

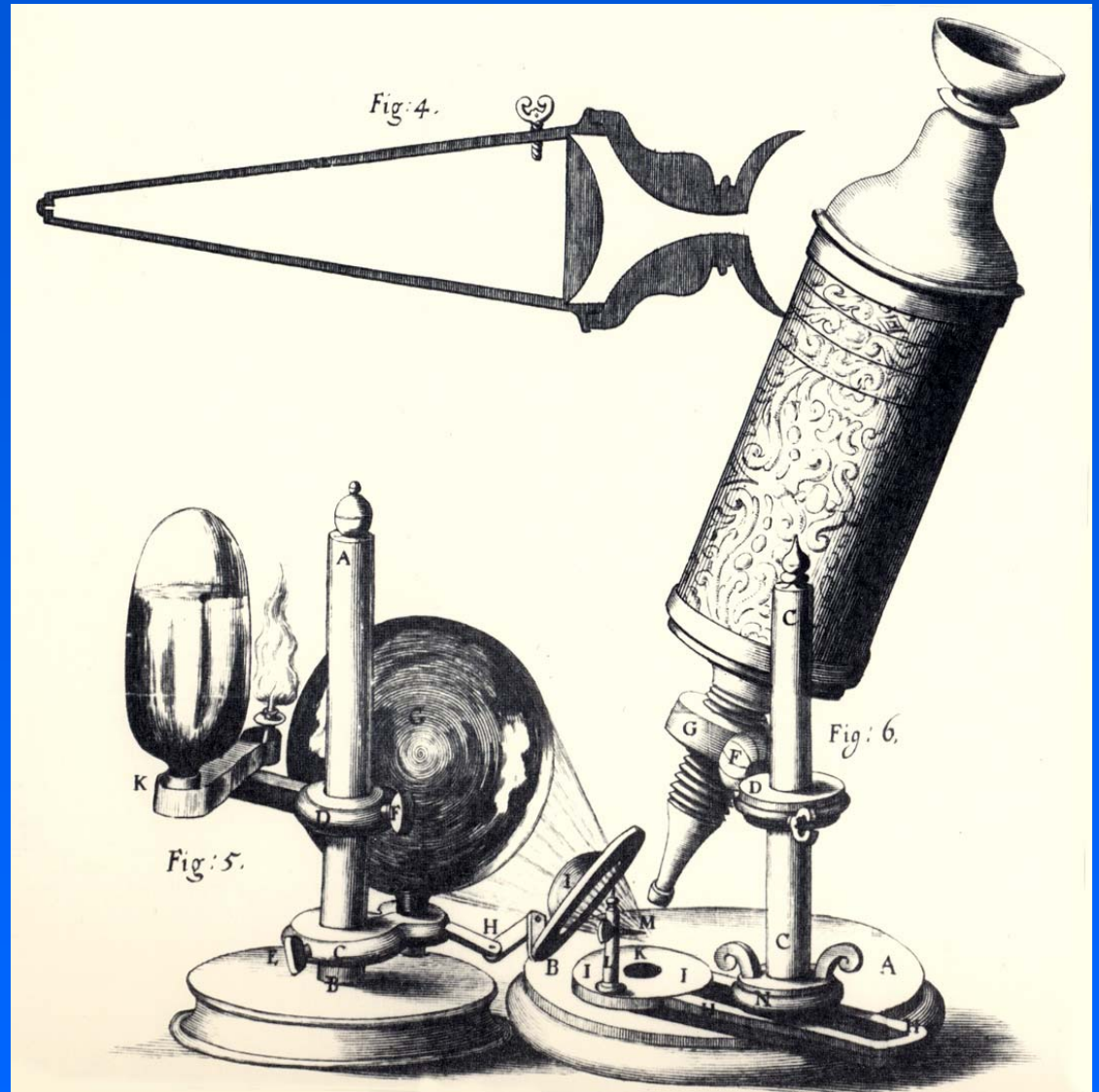
# Лекция 1

**Клеточная теория**

**Общие схемы строения прокариот и эукариот (растения и животные)**

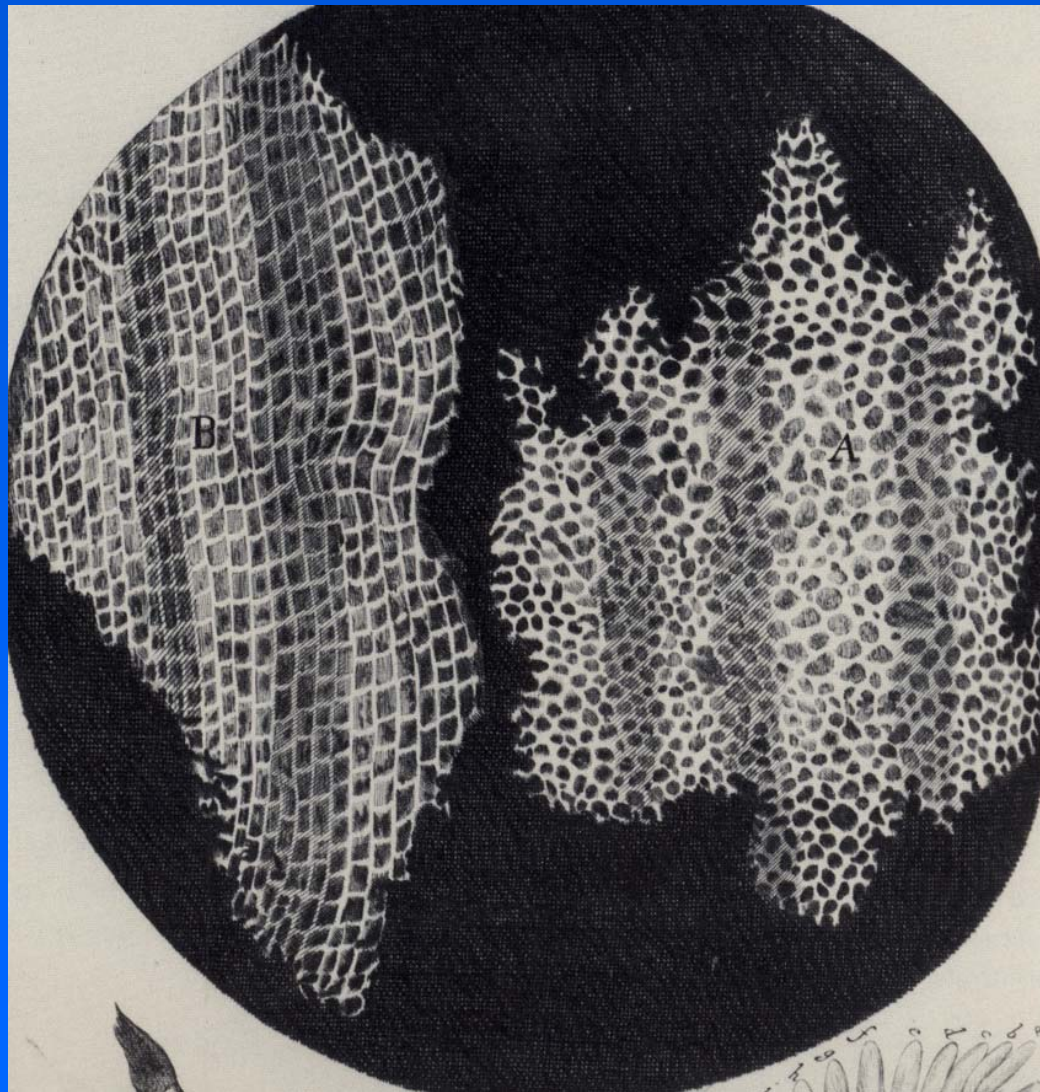
**Основные методы исследования клеток**

# Микроскоп Гука (около 1660 г.)





# Первый рисунок клеток



Роберт Гук,  
пробка,  
1665 г.


**Лупа  
 (“микроскоп”)  
Левенгука,  
конец 17  
века**







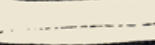
# Бактерии из полости рта

uerer, viderim crescentem inter dentes quo


*fig: A* 

*fig: B* 

*fig: E* 

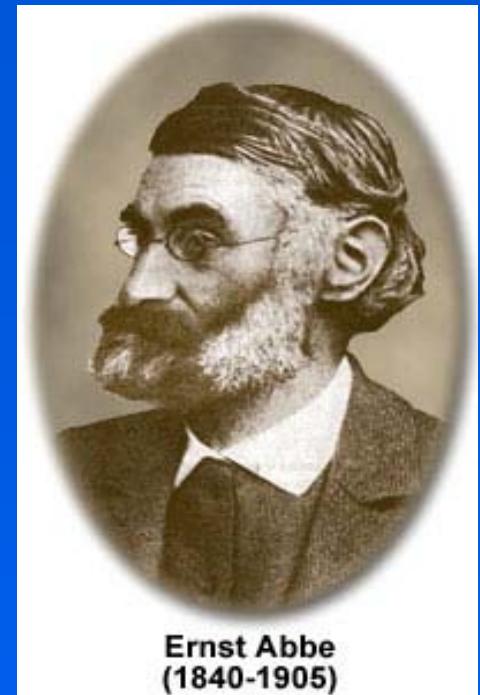
*fig: F* 



*fig: G* 

quandam all  
fitem farina  
lem. Hanc  
censui, (lic  
dignoscere r  
men ei viva  
esse. Sæpius  
pluviatili pu  
animalcula in  
salivæ immi  
ore meo peti  
aeris bullulas

# Теория и микроскоп Аббе



Ernst Abbe  
(1840-1905)

Изображение в микроскопе формируется в результате интерференции прямого и дифрагированного света.

Объектив, окуляр микроскопа и их расположение рассчитываются математически.

Предел разрешения микроскопа – около половины длины волны ( $0,61\lambda/NA$ ).

# Основные положения клеточной теории:

1. Все организмы состоят из клеток.
2. Новые клетки появляются только путем деления предсуществующих клеток (*omnis cellula e cellula*– Р. Вирхов).
3. Клетки разных организмов устроены и функционируют по единому плану.

# Клетка - элементарная единица жизни

**Клетка** – термодинамически открытая система, отделенная от внешней среды липопротеидной мембраной, способная к длительному самоподдержанию, росту и размножению без участия других клеток.

Источником энергии для жизнедеятельности клетки являются химические и фотохимические реакции.

Клеточная (липопротеидная) мембрана – это жидкий кристалл смектического типа.

Каждая клетка содержит генетический материал (ДНК) и аппарат для его экспрессии (системы транскрипции и трансляции), основанный на работе ферментов.



# Основные постулаты клеточной биологии

1. Клеточная теория – клетка есть элементарная единица живого.
2. Клетка способна к размножению, ограничиваемому только внешней средой.
3. Поведение клеток описывается законами физиологии.
4. Клетки способны образовывать сложные популяции (колонии, ткани, органы), которые поддерживаются за счет межклеточных взаимодействий.
5. Клетки многоклеточного организма в процессе его формирования дифференцируются и могут утрачивать свою автономность.

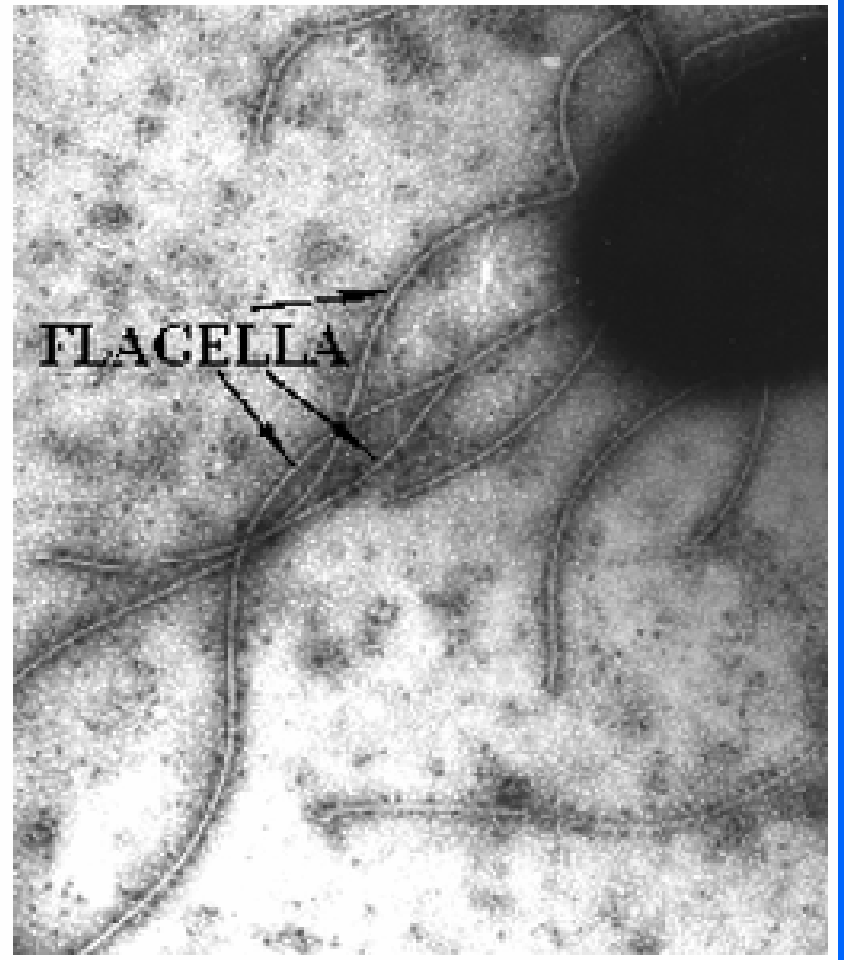
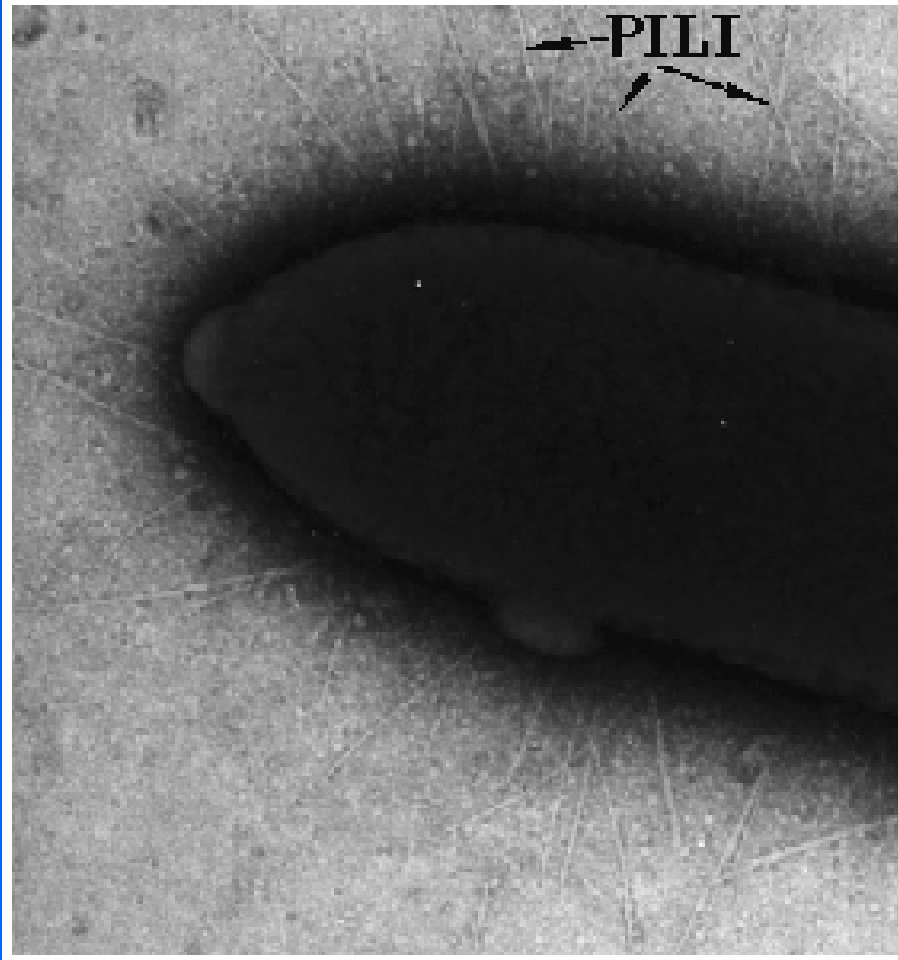
# Физиология в клеточной биологии

1. Гомеостаз внутренней среды и поддержание химического несоответствия внешней и внутренней среды.
2. Способность клеток и субклеточных структур к самоорганизации.
3. Принцип эквивинальности в развитии.
4. Принцип несводимости – поведение клеточных популяций (ткани, органы) не описывается через поведение отдельных клеток; поведение клеток лишь частично описывается через поведение отдельных макромолекул.
5. Основной закон физиологии: ответ на воздействие по принципу «все или ничего». Ответ обеспечивается через каскад усиления сигнала.
6. Преобладание регуляторных реакций над эффекторными.

# Бактериальная клетка, срез

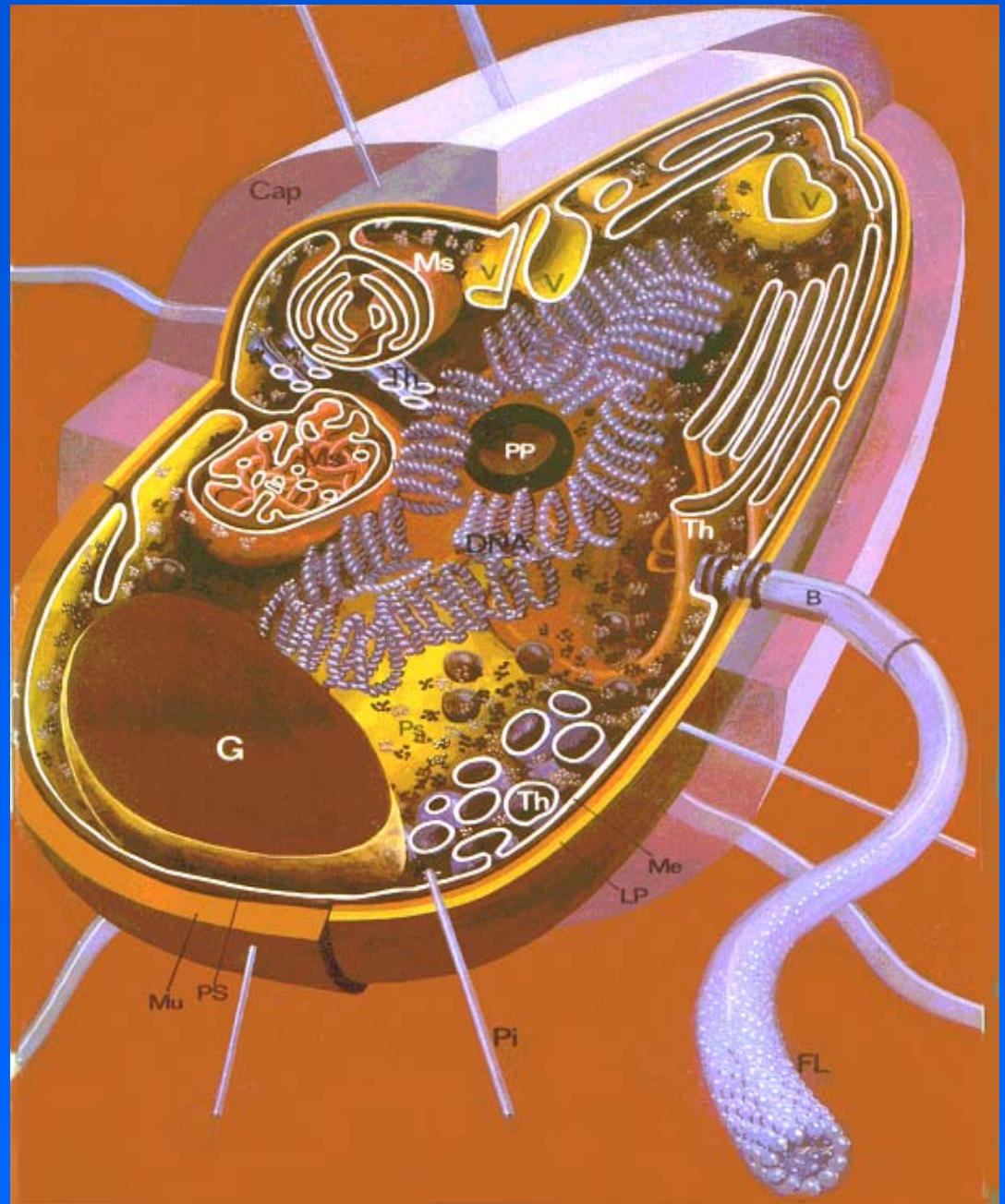


# Бактериальная клетка, выросты поверхности

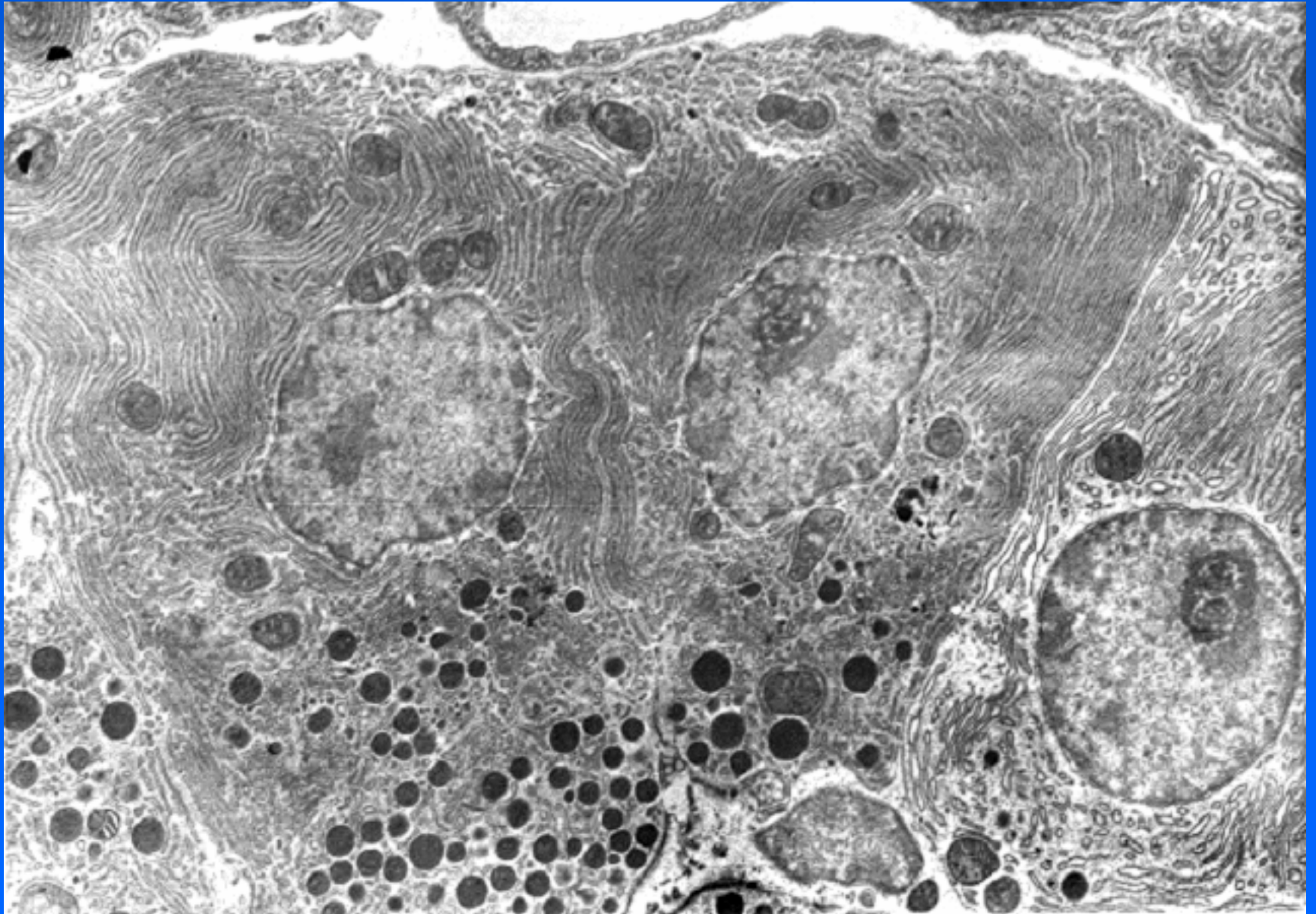




# Схема бактериальной клетки



# Животные клетки

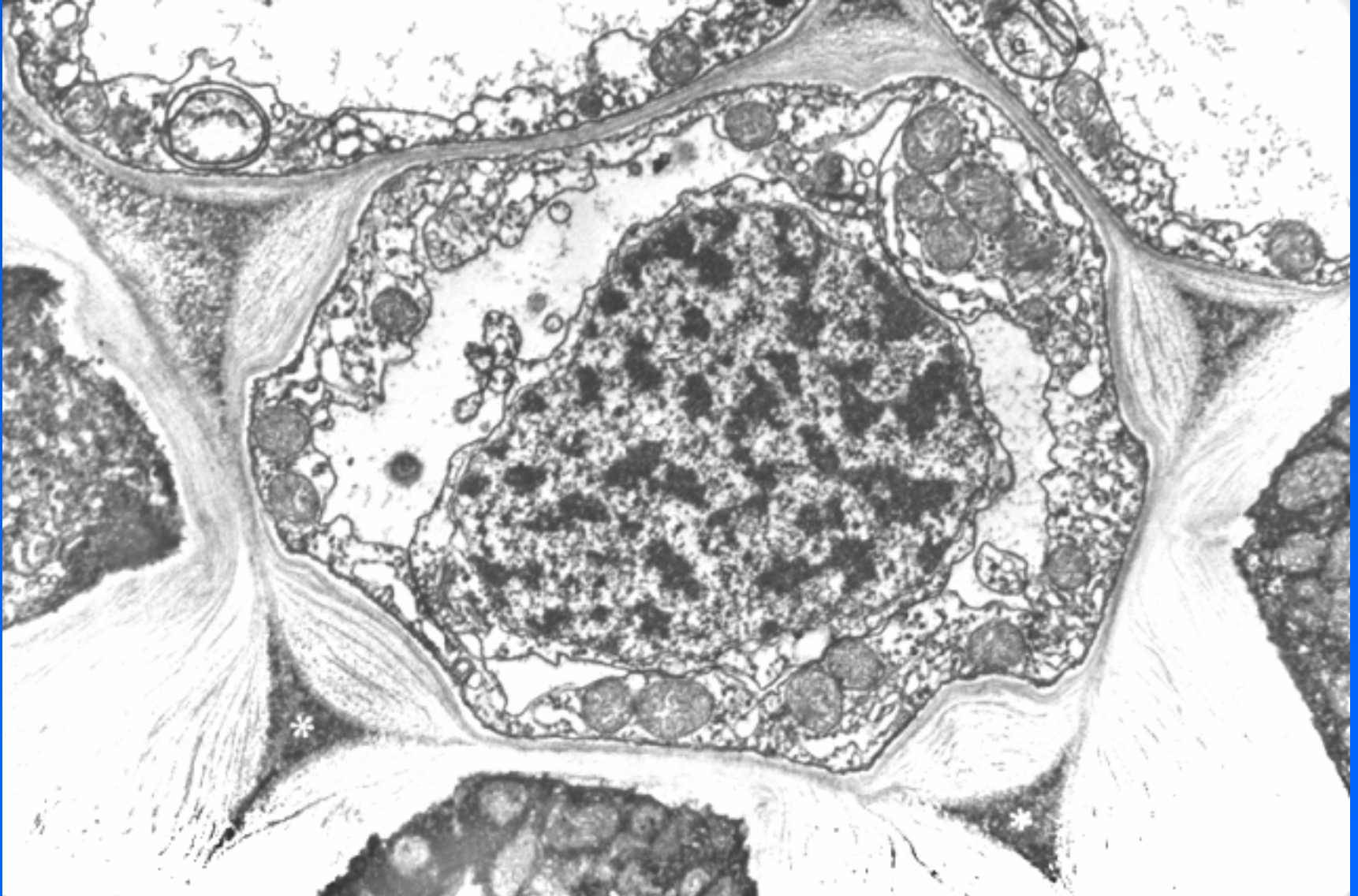




# Животная клетка - схема

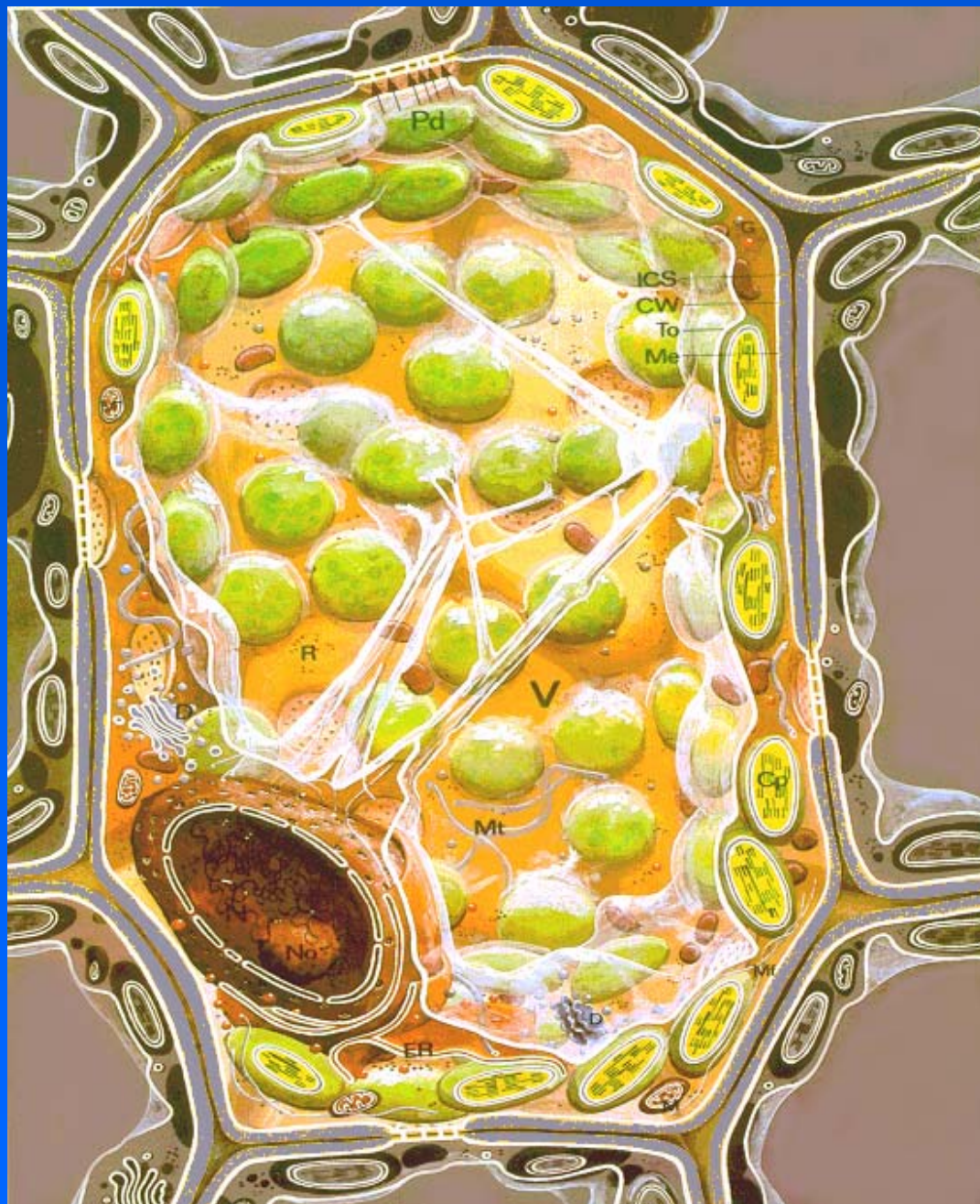


# Растительная клетка





# Растительная клетка (схема)



# Компоненты эукариотической клетки

Ядро: хранение, воспроизведение и реализация генетической информации (ДНК, РНК).

Гиалоплазма (цитозоль): система основного обмена.

Плазматическая мембрана: барьерно-рецепторная система.

Цитоскелет: опорно-двигательная система.

Вакуолярная система: система аккумуляции и сегрегации биополимеров (белков, углеводов) и продуктов метаболизма.

Митохондрии: энергообеспечение (электрохимический потенциал и синтез АТФ)

Пластиды: фотосинтез углеводов и АТФ.

# **Прокариоты и эукариоты – СХОДСТВО**

- 1. Плазматическая липопротеидная мембрана с избирательной проницаемостью.**
- 2. ДНК – РНК – белок: ферменты, рибосомы, генетический код.**
- 3. Деление клетки – после репликации ДНК по полуконсервативному механизму.**
- 4. Нуклеозидтрифосфаты как основное промежуточное звено в биоэнергетике.**
- 5. Эффективный синтез АТФ связанный с мембраной (протонная помпа).**

# Различия

<b>Прокариоты</b>	<b>Эукариоты</b>
Только плазмалемма	Мембранные органеллы
Одна кольцевая ДНК, опероны	Несколько линейных ДНК, индивидуальные промоторы и энхансеры каждого гена
Транскрипция и трансляция идут одновременно	Транскрипция и трансляция разобщены
Гистонов нет	Хроматин есть
Митотического аппарата нет	Митотический аппарат есть
Цитоскелета нет, транспорт за счет диффузии	Цитоплазма анизотропна, есть цитоскелет и быстрый транспорт вдоль него
Бактериальный жгутик, который вращается в мембране	Центриоль и эукариотический закрепленный жгутик
Размер клетки: 0,5-2 мкм	Размер клетки: 3-50 мкм



# Клетки многоклеточного организма

1. В начале развития (дробление или ранний эмбриогенез) разделяются на клетки зародышевого пути (дают гаметы или споры) и соматические клетки (погибают).
2. Обособление соматических клеток происходит путем репрессии некоторых генов у большинства животных и растений и путем диминуции хроматина (выброса хромосом) у некоторых животных.
3. Среди соматических и половых клеток обособляются т.н. стволовые клетки, которые поддерживают соответствующие диффероны.
4. Дифференцировка соматических клеток, как правило, означает перестройку профиля экспрессии разных генов, но не изменение генома. Дифференцированные клетки, как правило, приобретают чувствительность к сигналам внутри организма и теряют способность к размножению.
5. Дифференцировка половых клеток включает в себя деметилирование ДНК и проверку генома, а также мейоз.

# Основные методы клеточной биологии

1. Исследование фиксированных клеток – микроскопия световая и электронная.
2. Исследование живых клеток – культура ткани, световая микроскопия.
3. Исследование клеточных популяций – проточная цитофлюориметрия и сортировка.
4. Направленная регуляция экспрессии генов и белков.
5. Фракционирование компонентов живых клеток и исследование бесклеточных систем (экстрактов).
6. Исследование белков и нуклеиновых кислот на уровне одиночных клеток.

# Микроскопия световая

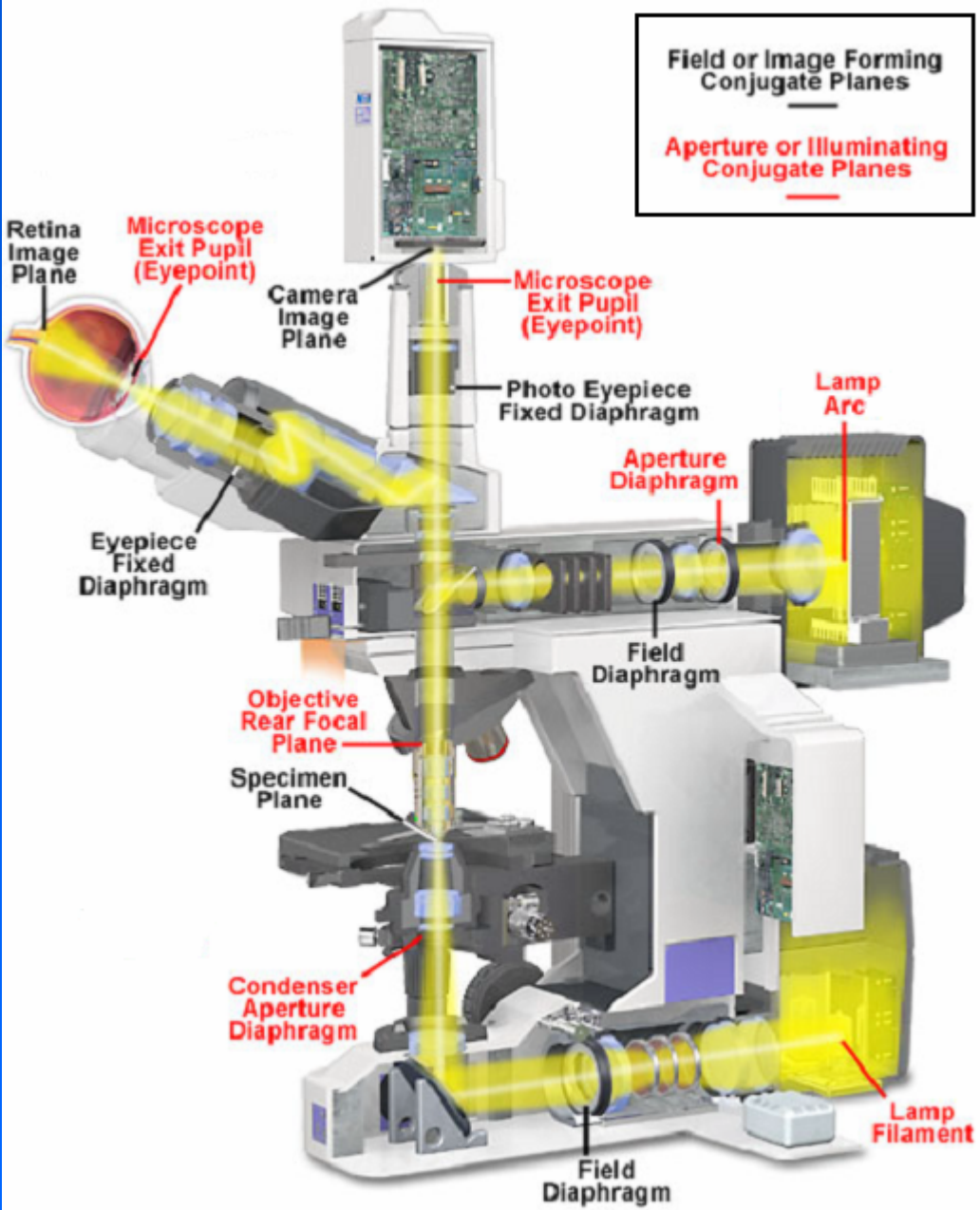
Световой микроскоп (просвечивающий, флюоресцентный, конфокальный) имеет предел разрешения в 0,25 мкм (увеличение в 10-1500 раз), он позволяет исследовать живые и фиксированные клетки.

Окраски – поглощающие красители и флюоресцентные красители. Ограничения световой микроскопии: разрешающая способность и малая глубина резкости.

Способы освещения: проходящий свет (светлое поле, фазовый и интерференционный контраст), падающий свет (флюоресценция).

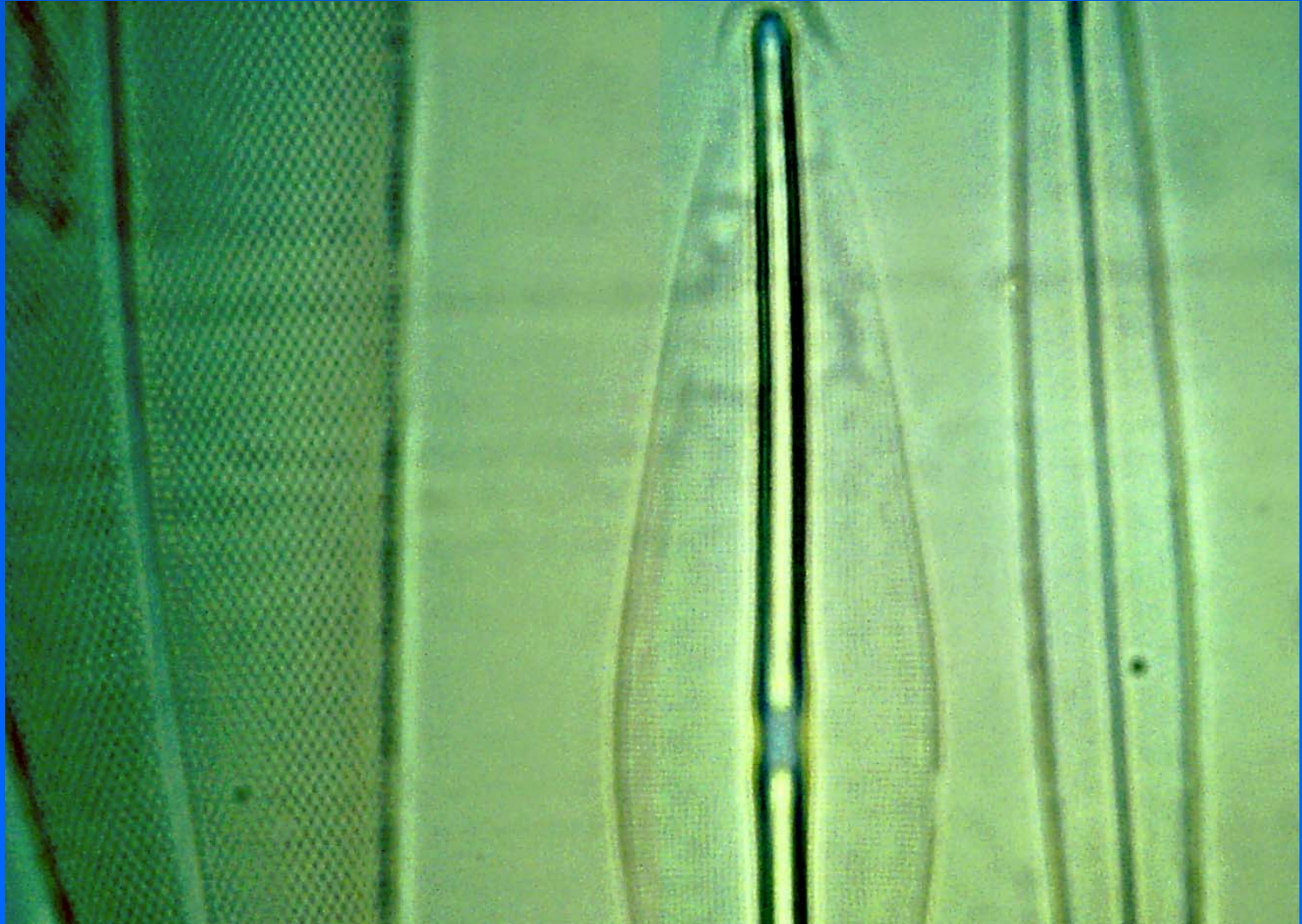
Флюоресцентная микроскопия позволяет детектировать отдельные молекулы.

# Исследовательский флюоресцентный микроскоп



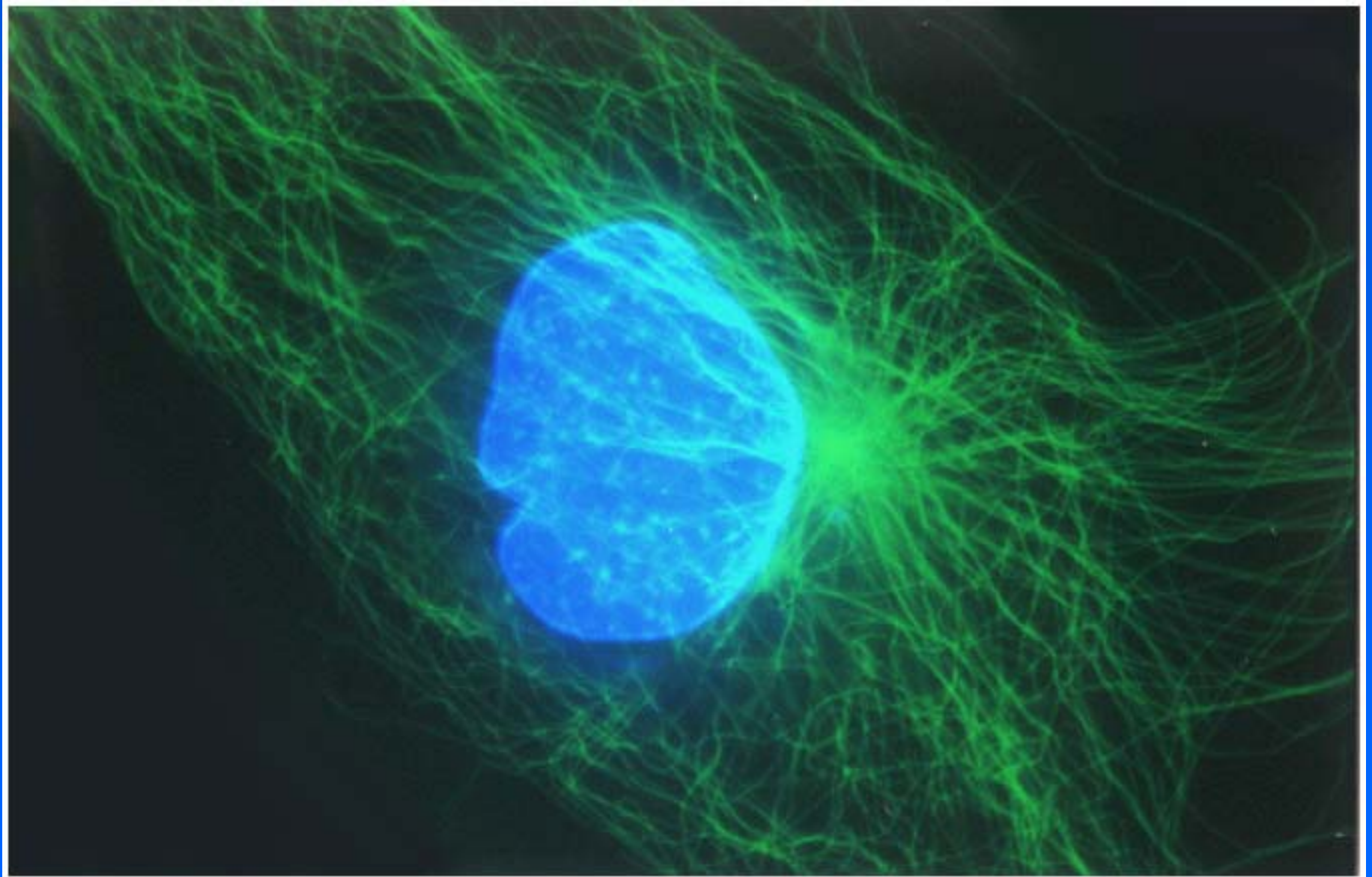


# Диатомовые водоросли, объектив x100





# Флуоресцентная микроскопия



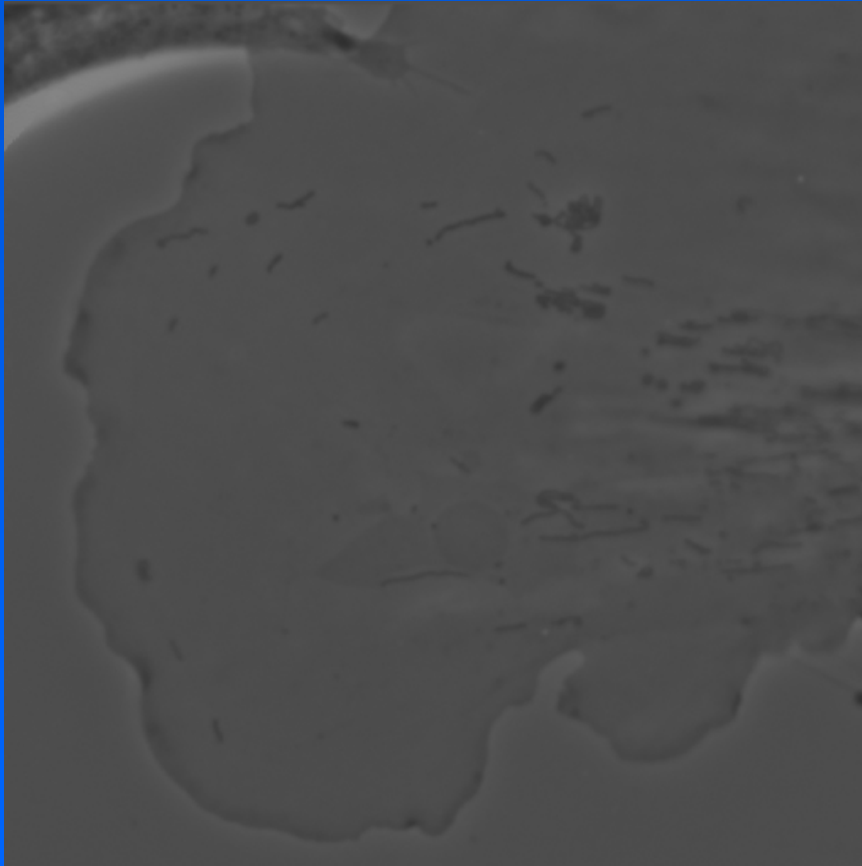


# Охлаждаемая ПЗС камера

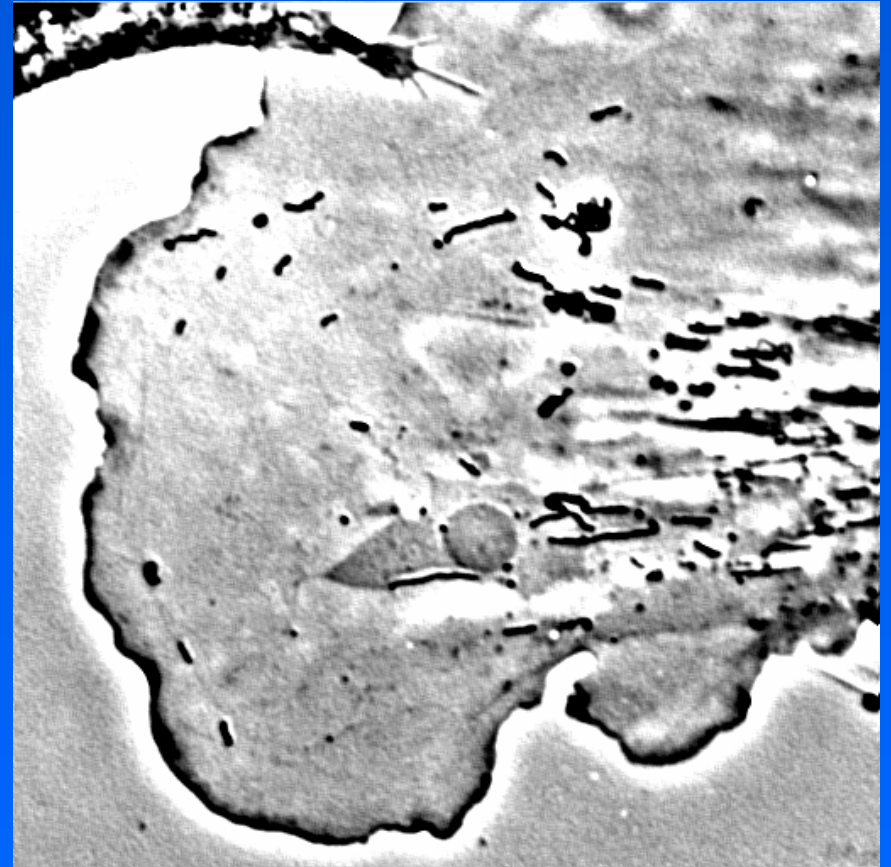


Камера позволяет регистрировать флюоресценцию отдельных молекул и различать очень малые перепады яркости – квантовый выход достигает 95%, число градаций серого – свыше 30000.

# Усиление контраста за счет динамического диапазона камеры

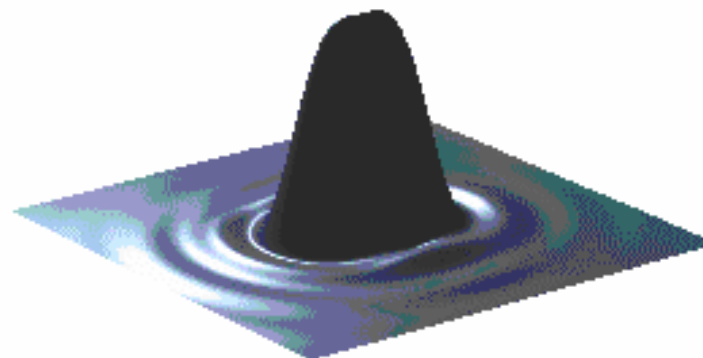
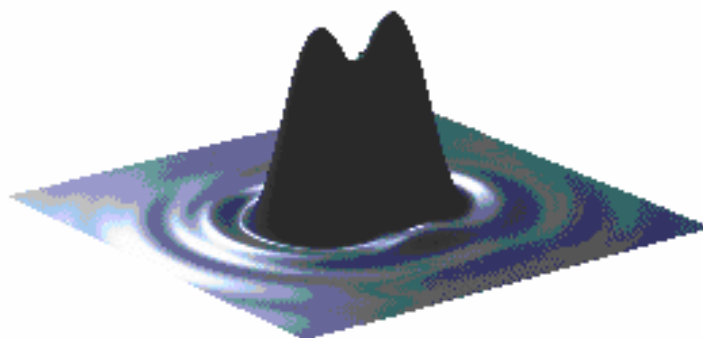
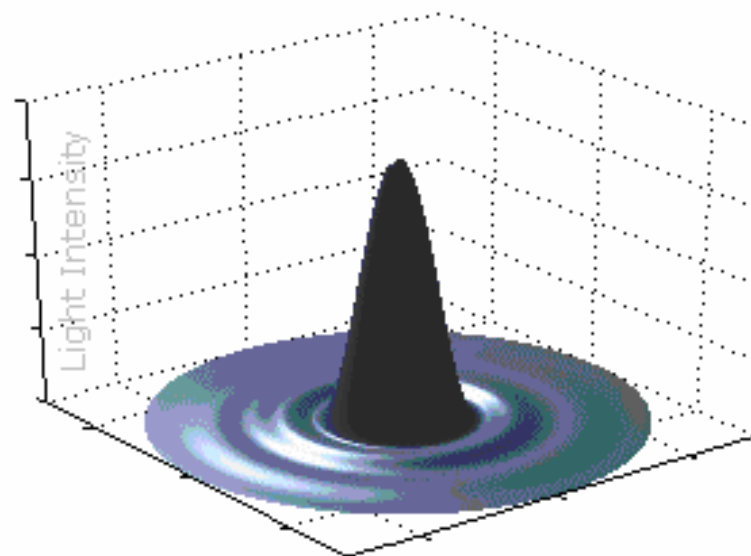
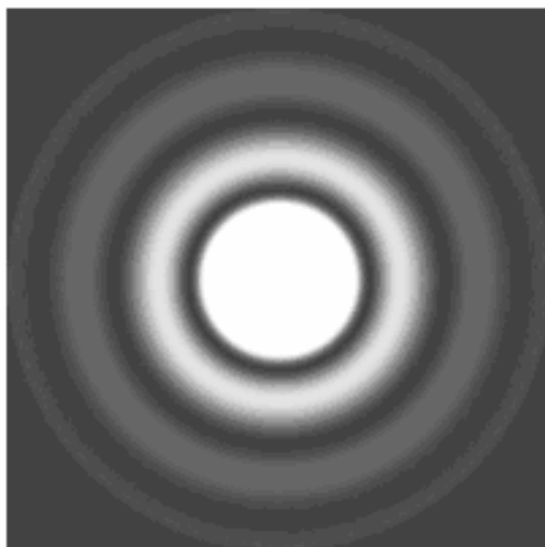


Исходный контраст



Контраст, увеличенный  
в 50 раз

# Диск Эри и проблема разрешения



# Цифровая запись изображения

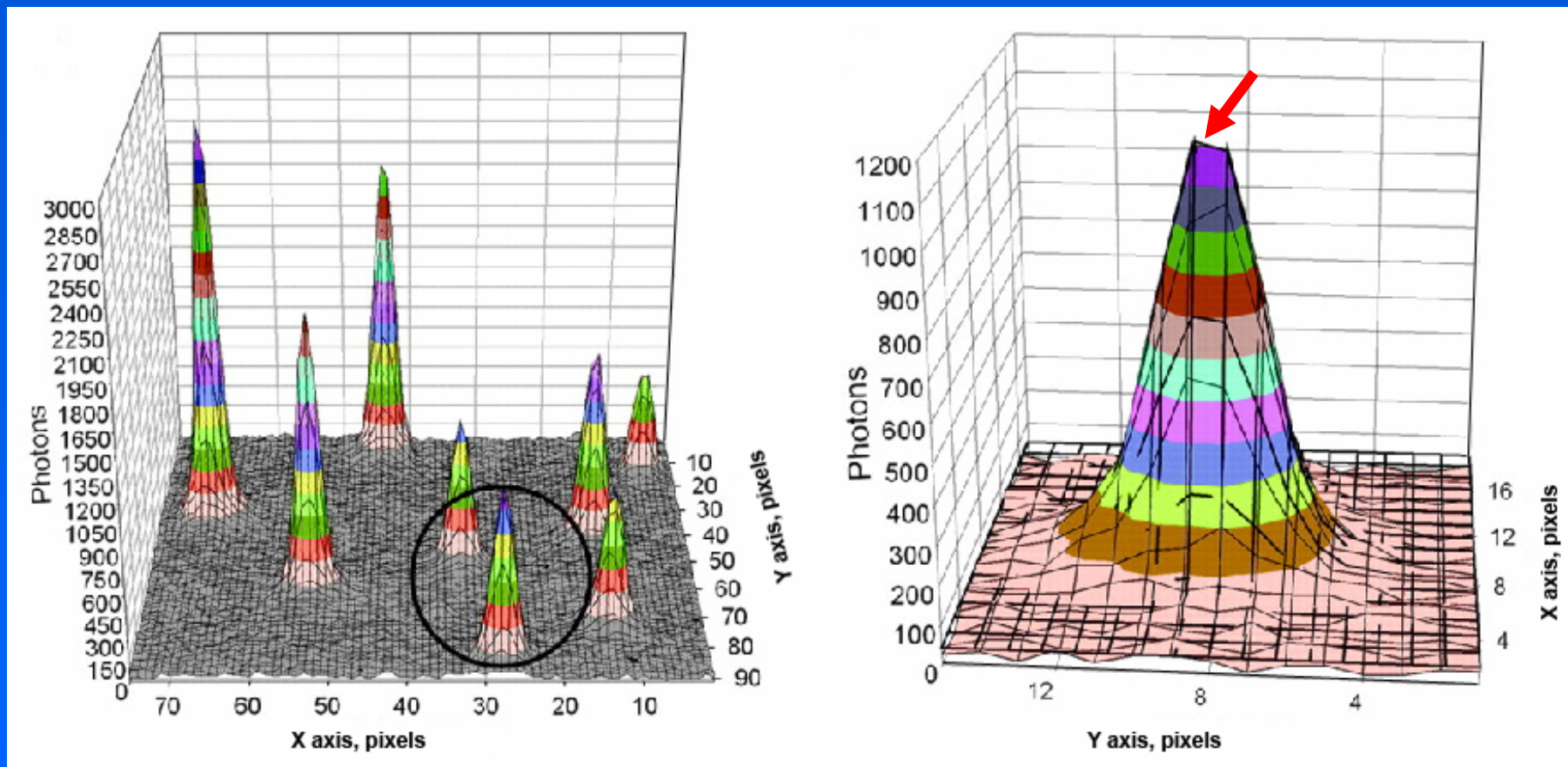
Пикселизация изображения – не увеличивает разрешение по сравнению с визуальным наблюдением, однако контраст записанного с помощью охлаждаемой ПЗС камеры изображения может быть увеличен в 10-100 раз.

Увеличение контраста позволяет точнее описать диск Эри, а в клетках – увидеть более мелкие детали.

При флюоресцентной микроскопии восстановление центроида диска Эри для каждой молекулы позволяет повысить разрешающую способность микроскопа примерно в 10 раз.

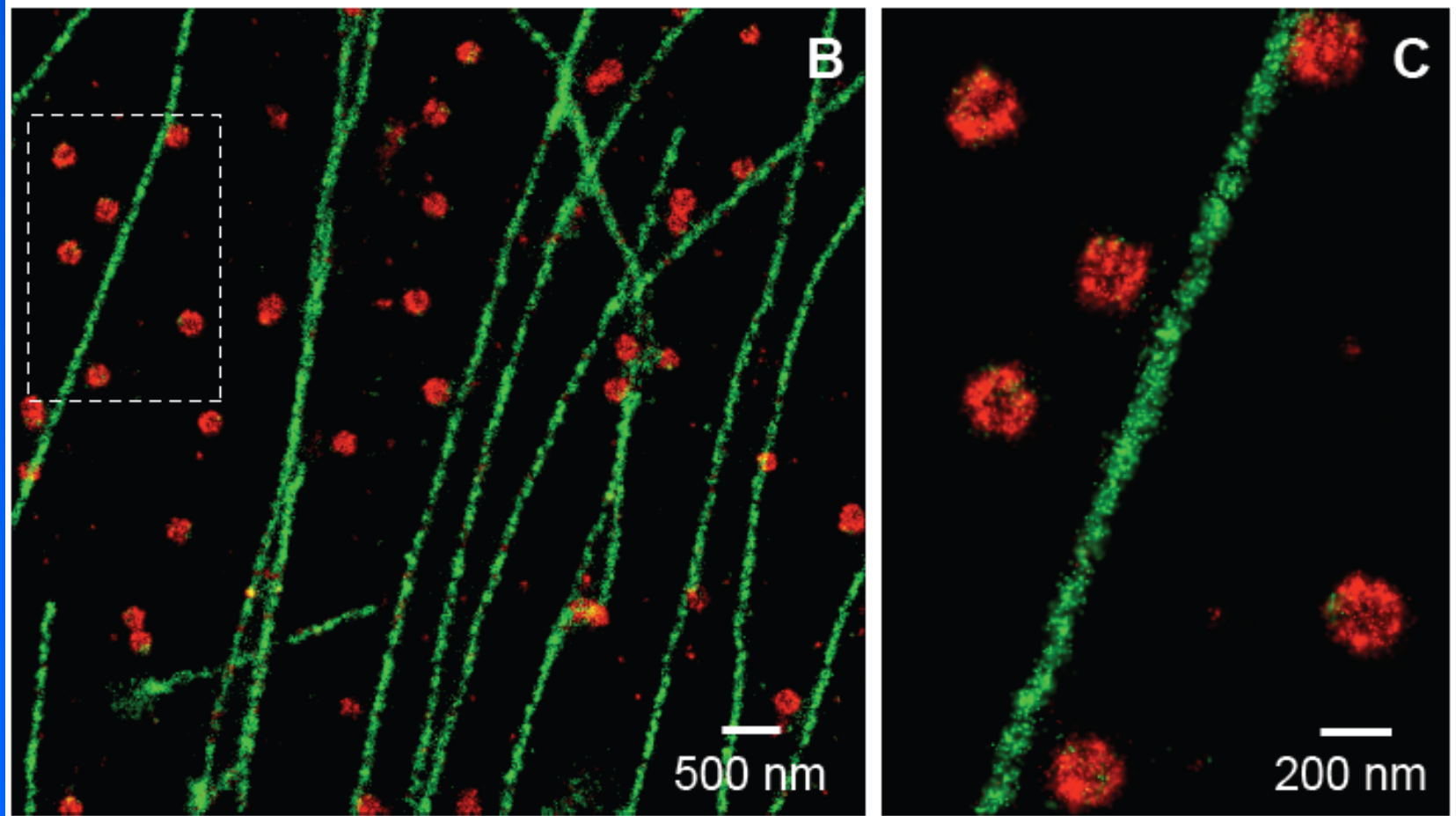


# Восстановление центроида



«Избыточная» пикселизация позволяет восстановить центроид одиночной молекулы (Су-3) по ее эмиссии. Точность определяется общим числом испущенных квантов. Время накопления сигнала ~ 0.5 секунды.

# STORM микроскопия



**Клатриновые пузырьки и микротрубочки,  
разрешение около 20 нм**

# Возможности современной световой микроскопии

Визуальное наблюдение окрашенных препаратов – эффективное увеличение до 1000 крат

Наблюдение фазовоконтрастных объектов – сдвиг фазы от 0,005 длины волны

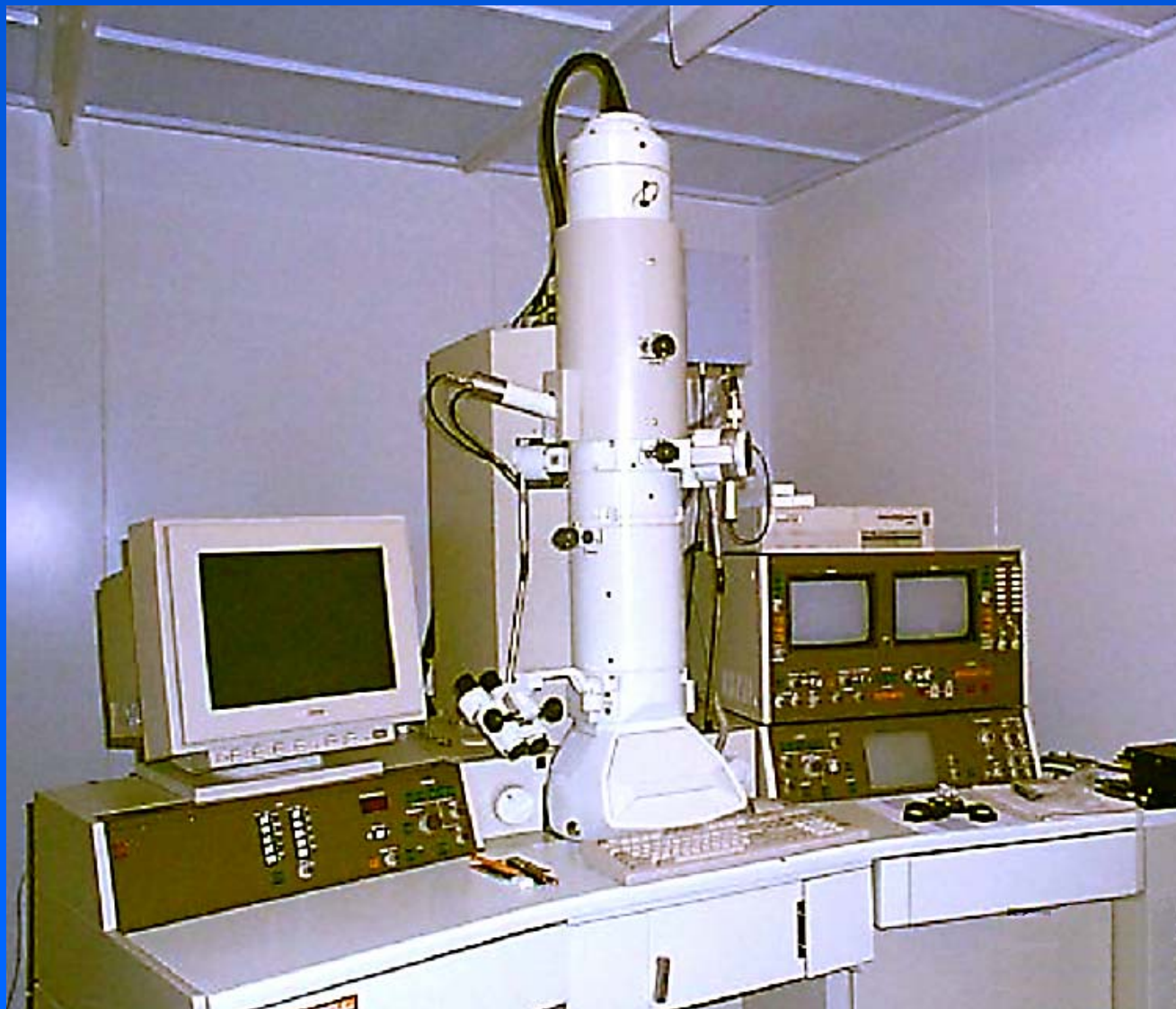
Наблюдение светорассеивающих объектов – размером от 10 нм и более

Сдвиг (деформация) волнового фронта – смещения одиночных объектов от 0,1 нм и более

Наблюдение флюоресценции – вплоть до отдельных молекул (фотостабильных)

Манипуляции световыми пучками (оптический пинцет)

# Электронный микроскоп, общий вид



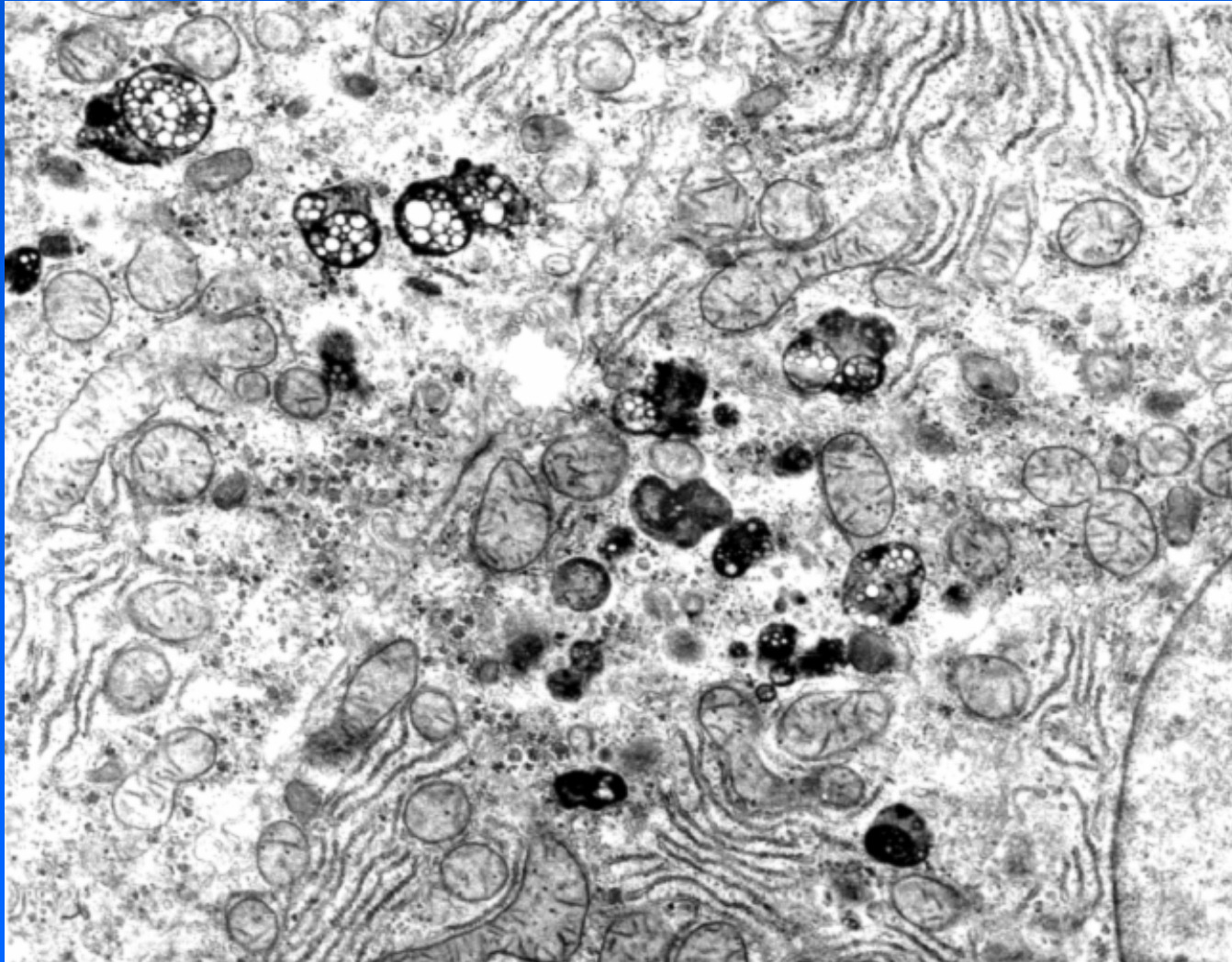


# Микроскопия электронная

**Электронный микроскоп (просвечивающий) – разрешение до 0,3 нм (увеличение в 1000-1000000 раз). Требуется высокого вакуума. Исследуются только тонкие препараты фиксированных клеток, выделенные компоненты клеток, макромолекулы. Окраски – соли тяжелых металлов (уран, свинец, осмий и др.), наночастицы золота, напыление платиной и т.д.**

**Сканирующий электронный микроскоп – поверхность клеток при увеличении 100-100000 раз.**

# Ультратонкий (~0.07 мкм) срез животной клетки



# Фиксация препаратов для микроскопии

Требования: быстрое проникновение в ткань, минимальное нарушение относительного расположения молекул (структуры), создание трехмерной прочной структуры (сшивки макромолекул), минимальная экстракция.

Фиксаторы для световой микроскопии: формалин и др. альдегиды, специальные фиксаторы (уксусная кислота, метиловый спирт и проч.)

Фиксатор для электронной микроскопии: глутаровый альдегид, затем  $\text{OsO}_4$  (на буфере, pH 7.2).

**Быстрое замораживание с последующей химической фиксацией.**

# Получение препаратов для микроскопии

Обезвоживание фиксированных образцов, пропитка и заключение в парафин или эпоксидную смолу.

Срезы: толщина 5 мкм для световой микроскопии (микротом) и 0,07 мкм для электронной микроскопии (ультрамикротом).

Окраски для световой микроскопии: общие (гематоксилин-эозин, азур-эозин и проч.) и специальные – выявление отдельных белков, углеводов и др. компонентов (цитохимия, иммунохимия).

Окраски для электронной микроскопии: общие (уранил-ацетат-цитрат свинца) и специальные (иммунохимия с наночастицами золота).



# Ограничения микроскопического анализа

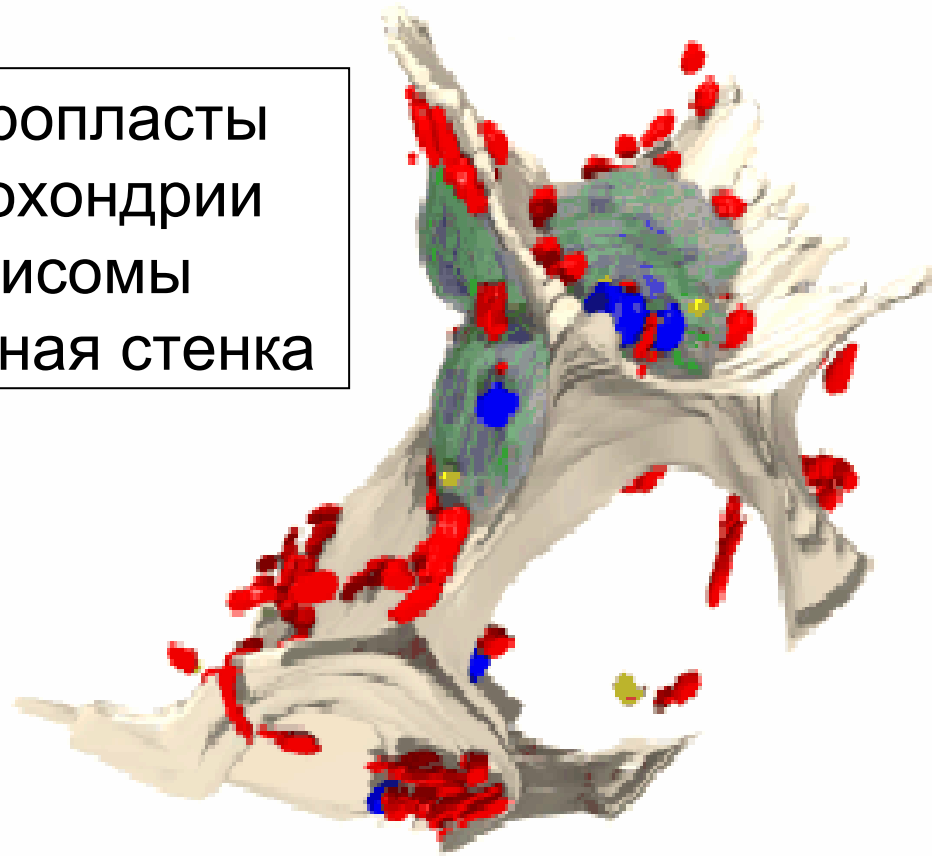
Световой микроскоп – малая глубина резкости при большом увеличении (оптические срезы около 0,5 мкм); разрешающая способность ограничена диском Эри.

Электронный микроскоп – малая проникающая способность электронов (0,1-1 мкм).

Поэтому объемное увеличенное изображение всегда есть результат реконструкции или томографии.

# Томография в ЭМ

зеленые – хлоропласты  
красные – митохондрии  
синие – пероксисомы  
серая – клеточная стенка



# Проточный флюориметр



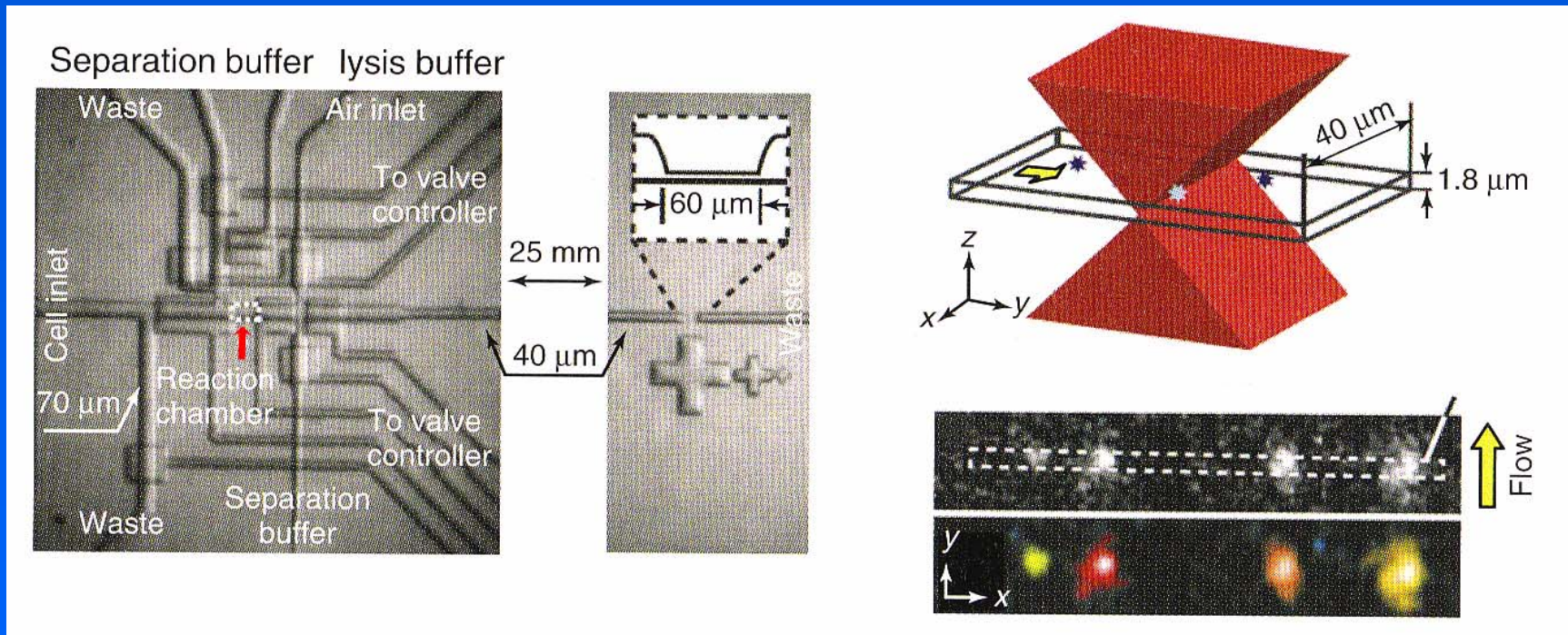
# Схема простейшего проточного цитофлюориметра



(modified from Purdue University  
Cytometry Laboratories)



# Чип для исследования отдельных клеток



Слева – ячейка для манипуляций с отдельными клетками; в центре – отсек для детектирования отдельных молекул. Справа: вверху – схема лазерной перетяжки; внизу – фотографии отдельных молекул (кадр с ПЗС-камеры).

# Лекция 2

**Строение синтез и деградация белка**

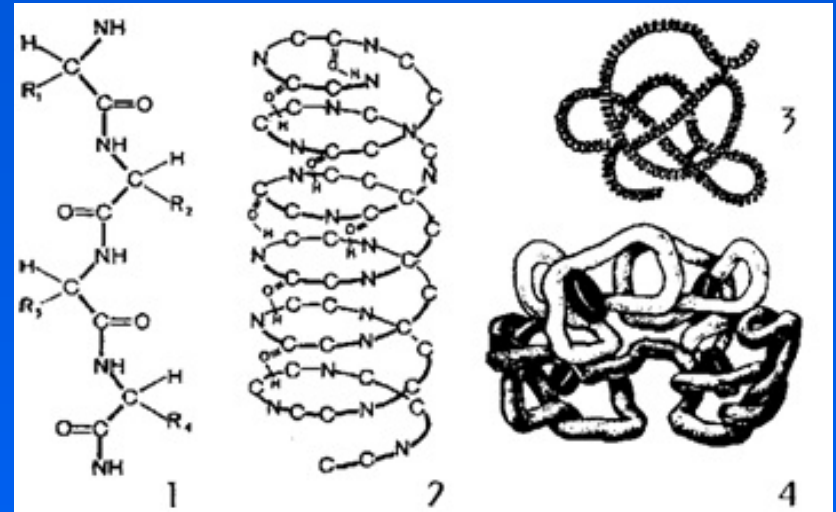
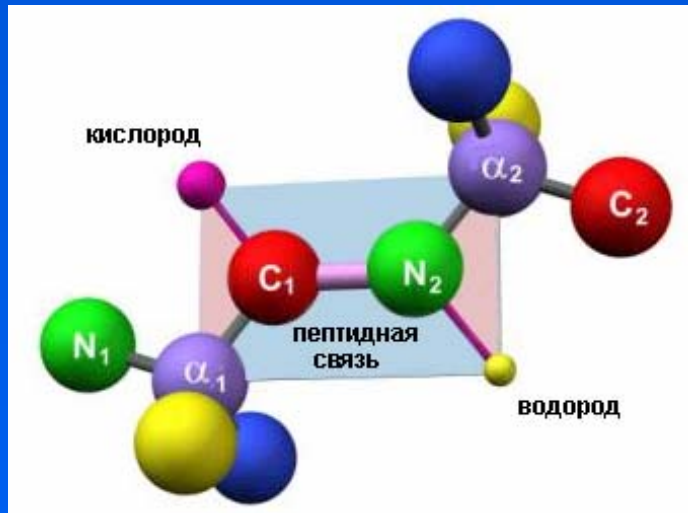
**Ферменты и принцип храповика**

**ДНК – репликация и транскрипция**

**РНК – различные виды**

**Основы организации генома эукариот**

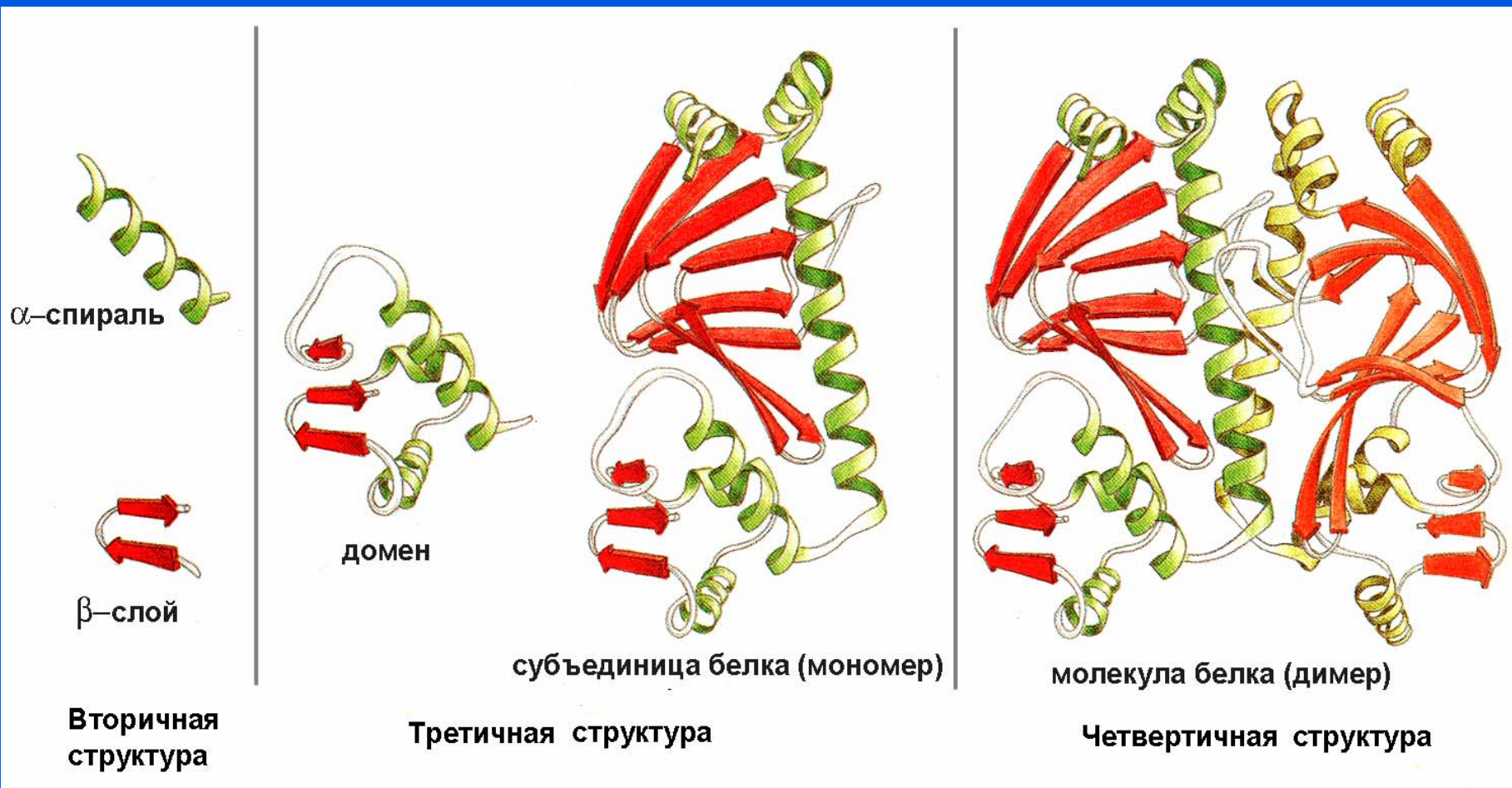
# Молекула белка



Первичная структура молекулы белка – линейная последовательность  $\alpha$ -аминокислот (-N-C-C-N-C-C-....).

Пространственная структура белка определяется слабыми взаимодействиями между боковыми цепями аминокислот (альфа-спираль, бета-слой).

# Уровни организации молекулы белка





# Параметры молекулы белка

Длина молекулы – от 20 нм до 1000 нм. Белки имеют в своем составе фибриллярные и глобулярные домены.

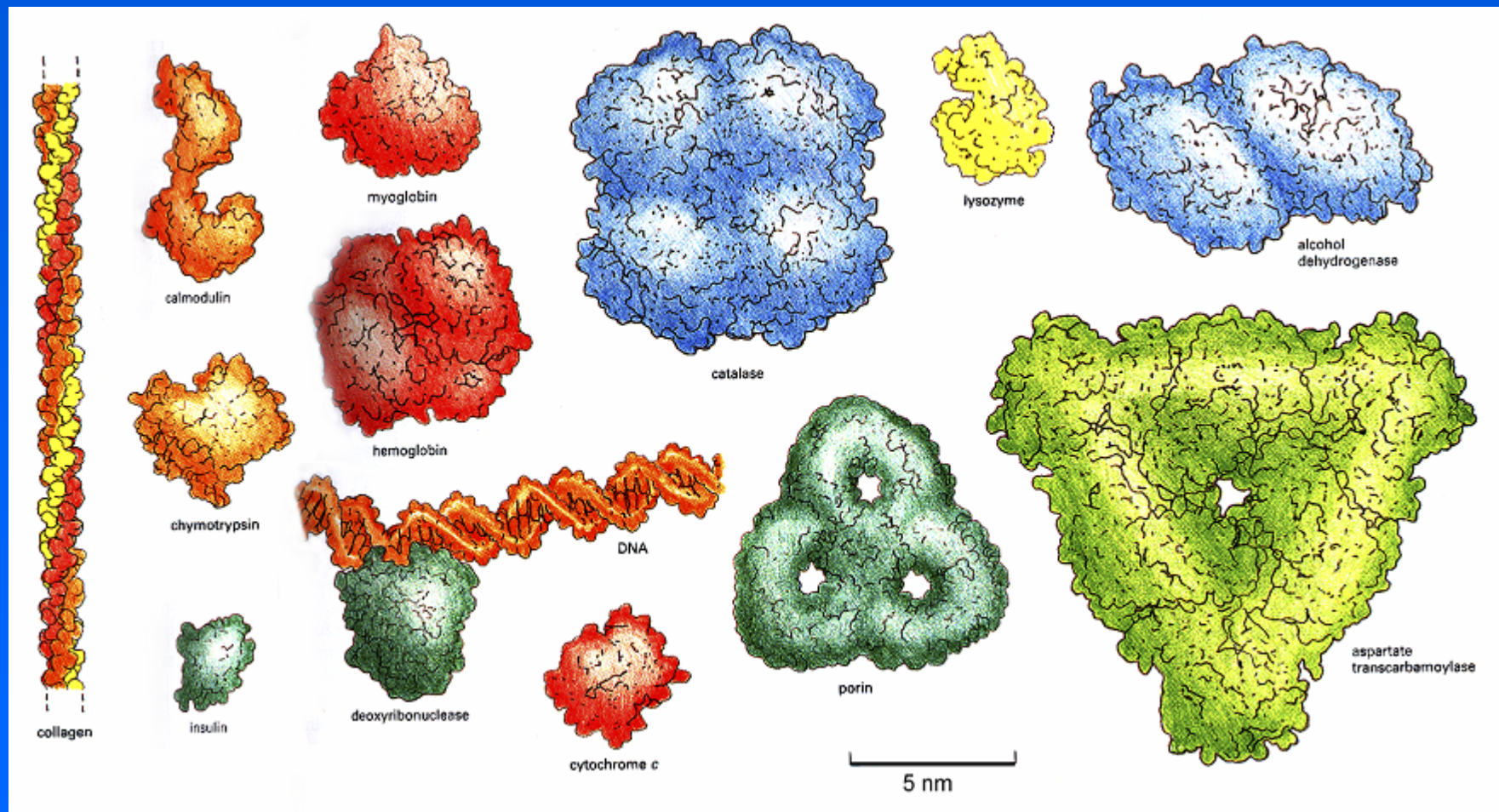
Фибриллярные домены, как правило, образуются за счет альфа-спиральных участков.

Глобулярные домены не содержат протяженных альфа-спиралей.

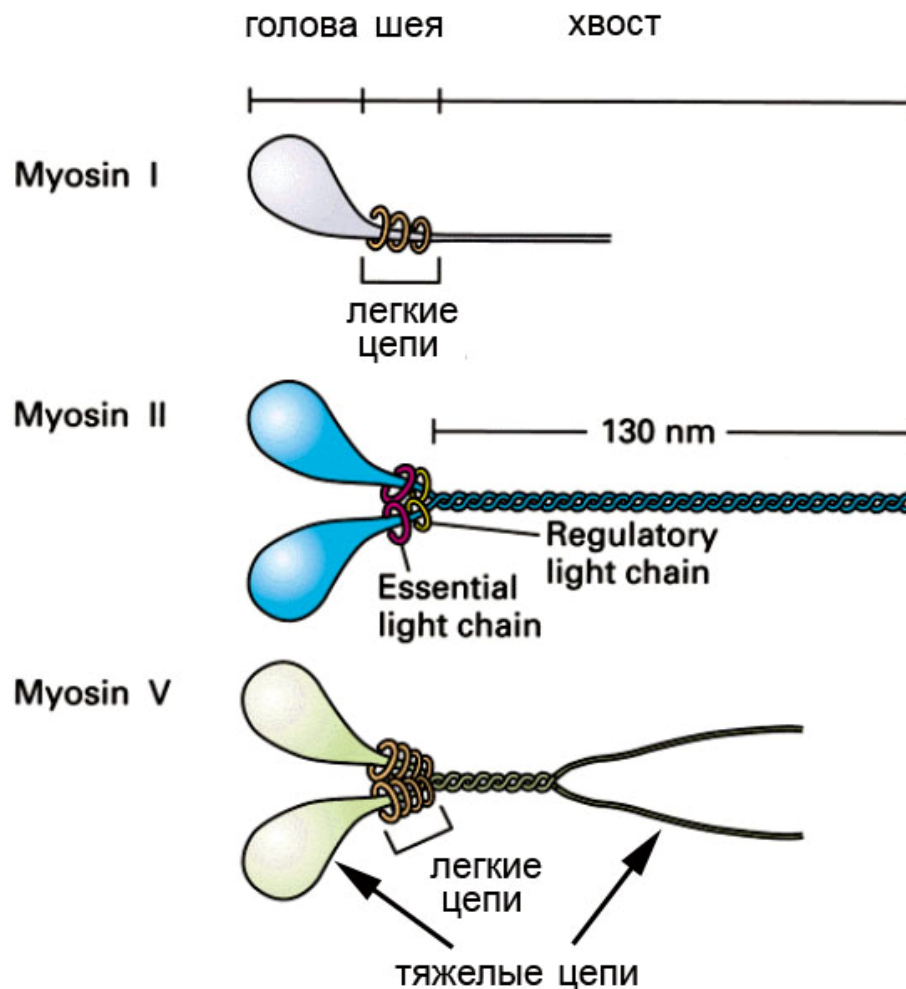
Белки, как правило, являются амфифильными соединениями – одни части молекулы эффективно взаимодействуют с водой, другие – с неполярными растворителями (липиды).

В водном растворе молекула белка может быть заряжена отрицательно (кислые белки), положительно (основные белки) или нейтрально.

# Примеры белковых молекул



# Молекулы миозинов



Легкие цепи миозина ассоциированы с шейей тяжелых цепей

Миозины II и V могут образовывать биполярные димеры

Миозин II - мышечный

Миозины I и V связываются хвостами с мембранами

# Ферменты

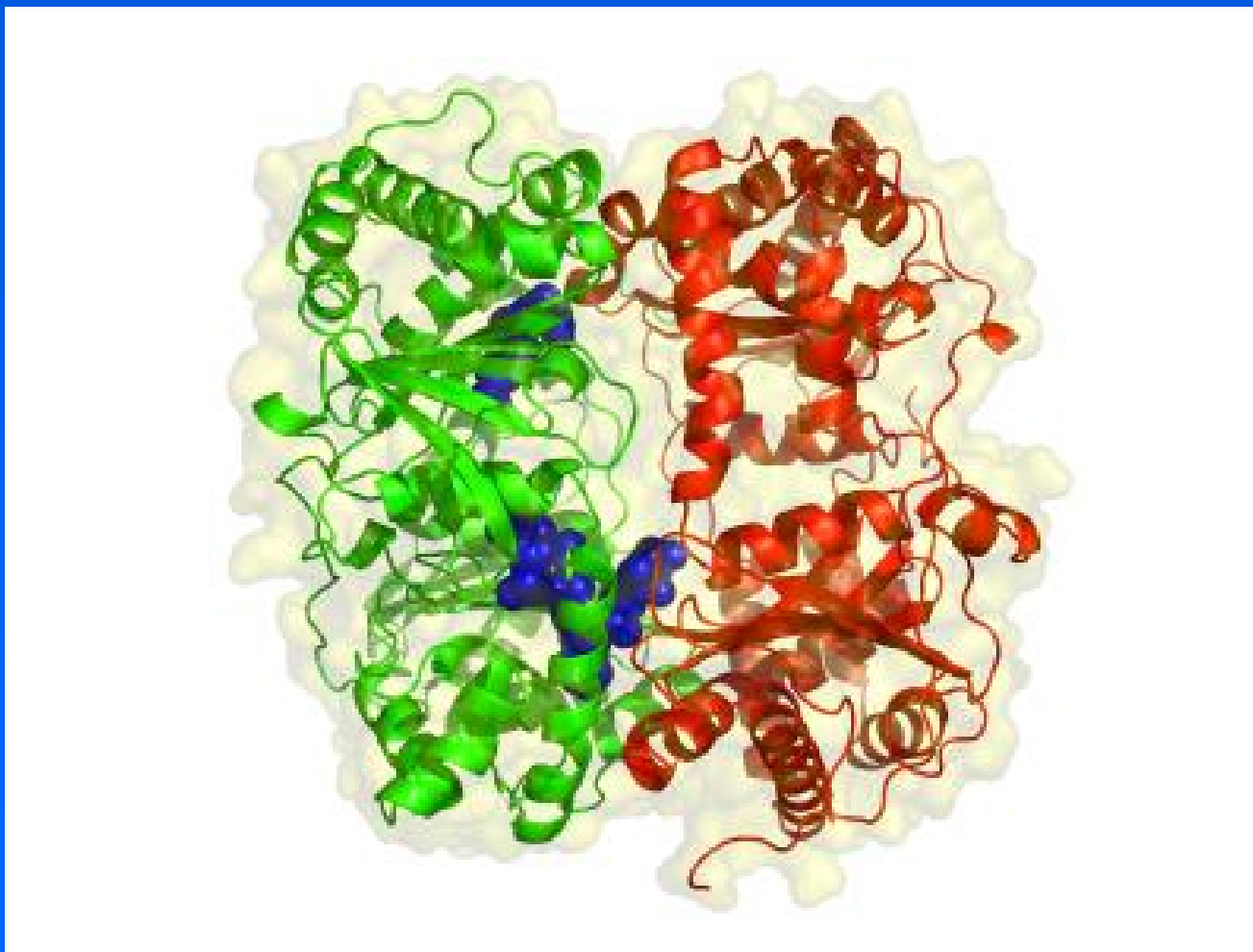
Сложная структура молекулы фермента обеспечивает пространственную специфичность узнавания и взаимодействия с субстратом (субстратами).

Активный центр фермента многократно снижает энергию активации – все реакции быстро достигают равновесия при нормальном давлении и постоянной температуре.

Многие катализируемые реакции сопряжены и идут в сильно неравновесных условиях для каждой из них. Равновесие суммы реакций под действием ферментов не изменяется!



# Структура фермента



Синим цветом выделен субстрат (белок)

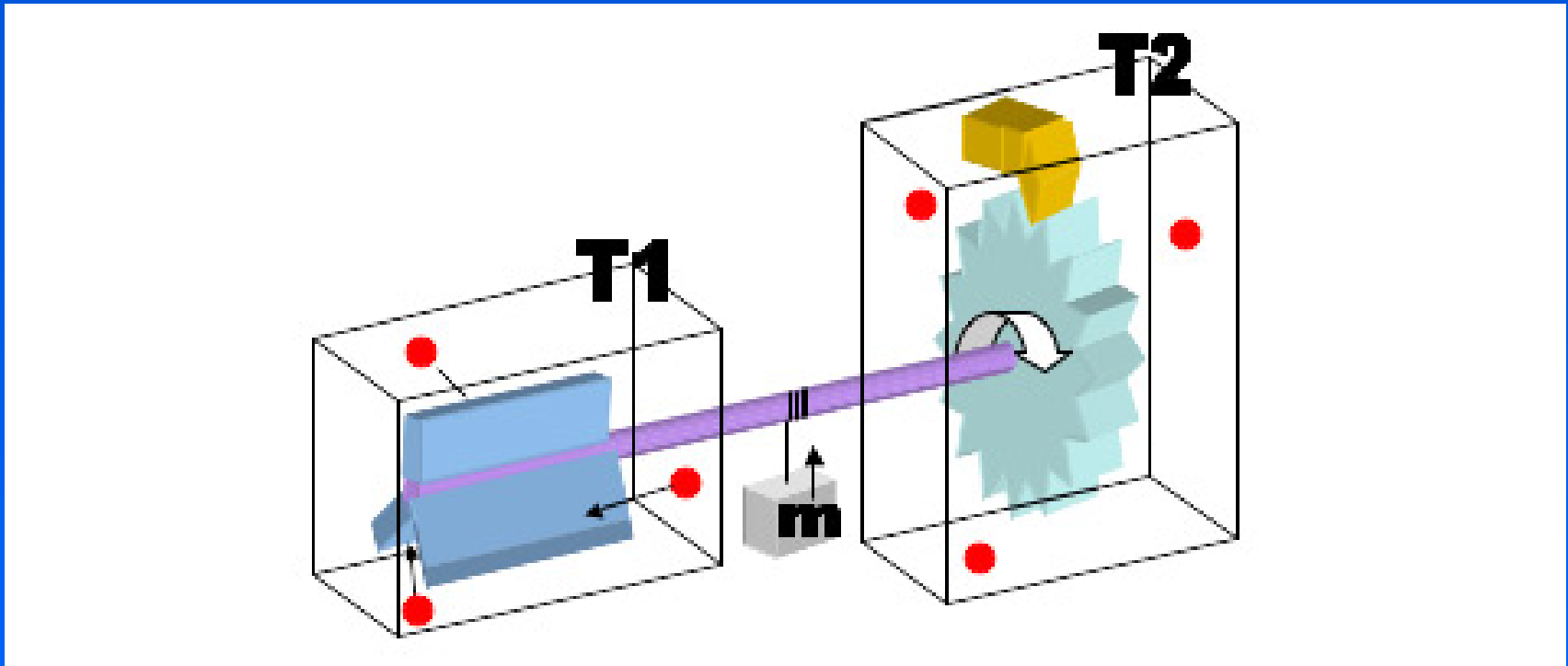
# Работа фермента

Молекулы ферментов обеспечивают высокую скорость реакции но не могут обеспечить ее необратимость иначе, чем за счет затраты внешней энергии для смещения равновесия промежуточных комплексов. Поэтому большинство ферментов катализируют одновременно две реакции – эндотермическую и экзотермическую.

Смещение равновесия промежуточных комплексов достигается за счет потребления энергии в ходе отдельных стадий реакции. Как правило, источником энергии выступает процесс гидролиза АТФ или ГТФ. При этом АТФ/ГТФ вовлекается в промежуточный комплекс, и процесс гидролиза происходит в несколько стадий одновременно с превращениями в главной (эндотермической) реакции.

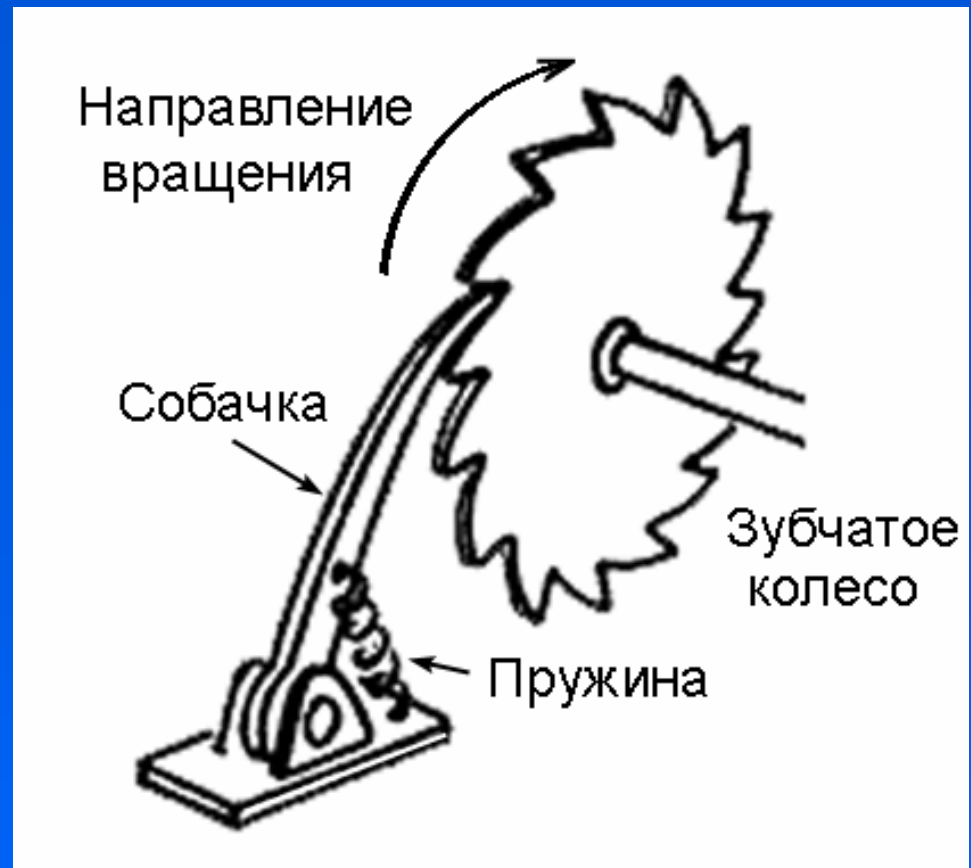
За счет энергии сопряженного гидролиза АТФ/ГТФ многие катализируемые реакции (синтез белков, синтез нуклеиновых кислот) оказываются в сильно неравновесных условиях и идут практически однонаправленно, реализуя «принцип храповика».

# Принцип храповика



Принцип храповика – преобразование колебательного процесса в однонаправленное движение (например, вращение). Для его реализации необходим поток внешней энергии.

# Храповик (трещотка)

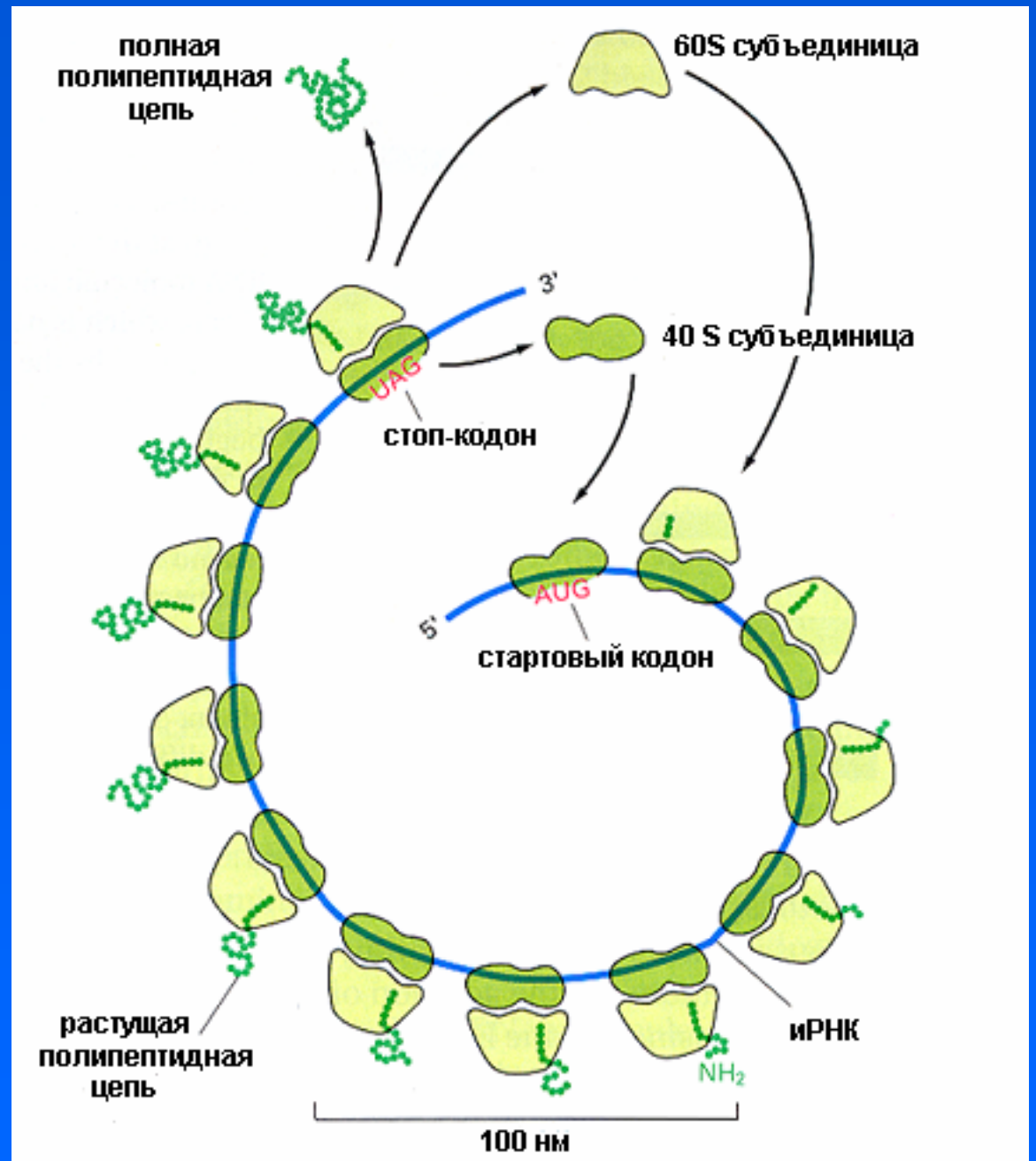


**Храповик – зубчатый механизм, допускающий передачу вращения только в одном направлении.**

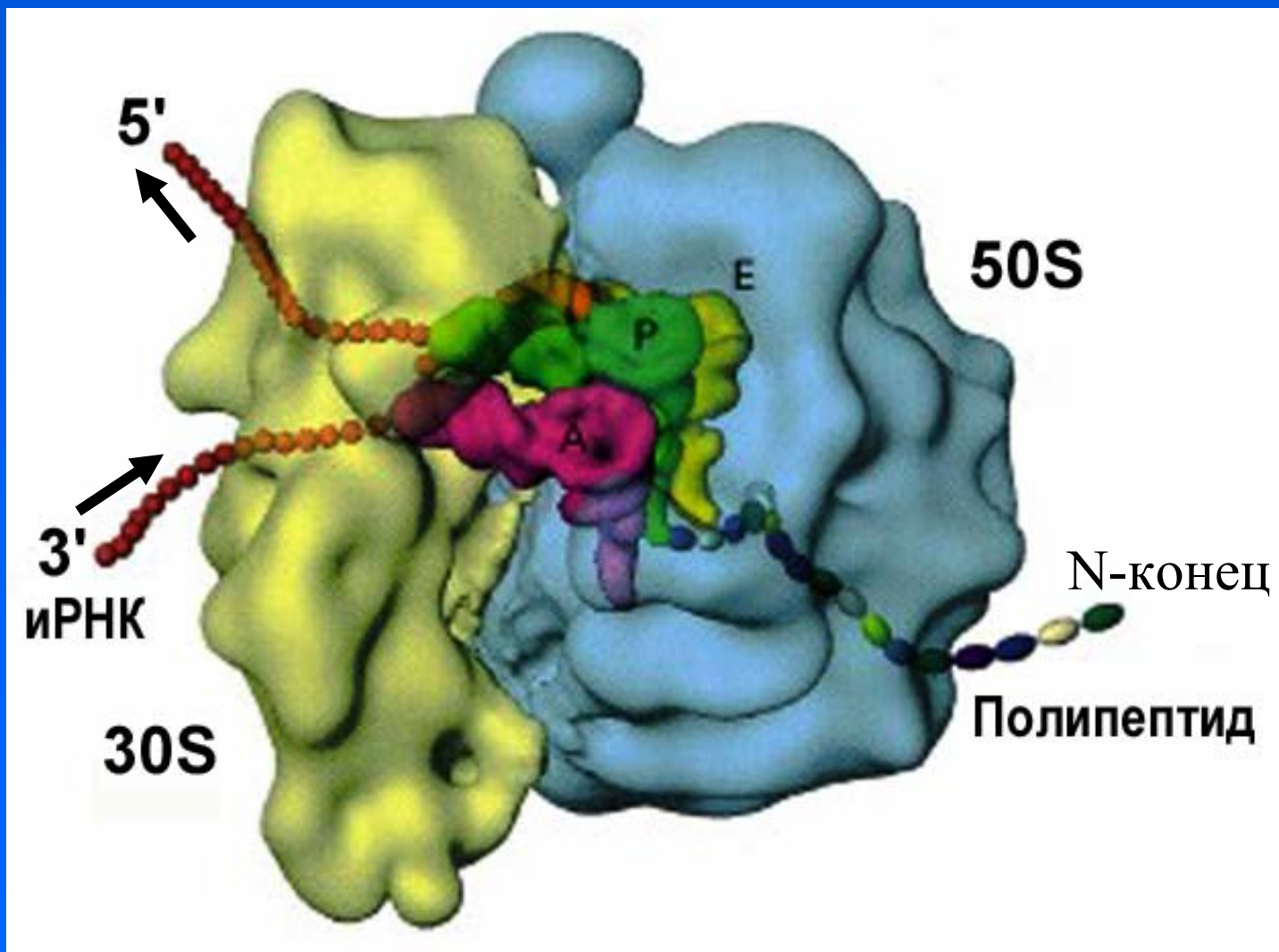
**Принцип храповика – преобразование колебательного процесса в однонаправленное движение (поступательное или вращательное). Однонаправленный процесс идет за счет потребления энергии извне. Роль собачки на пружине в ферментах выполняет гидролиз АТФ (ГТФ).**



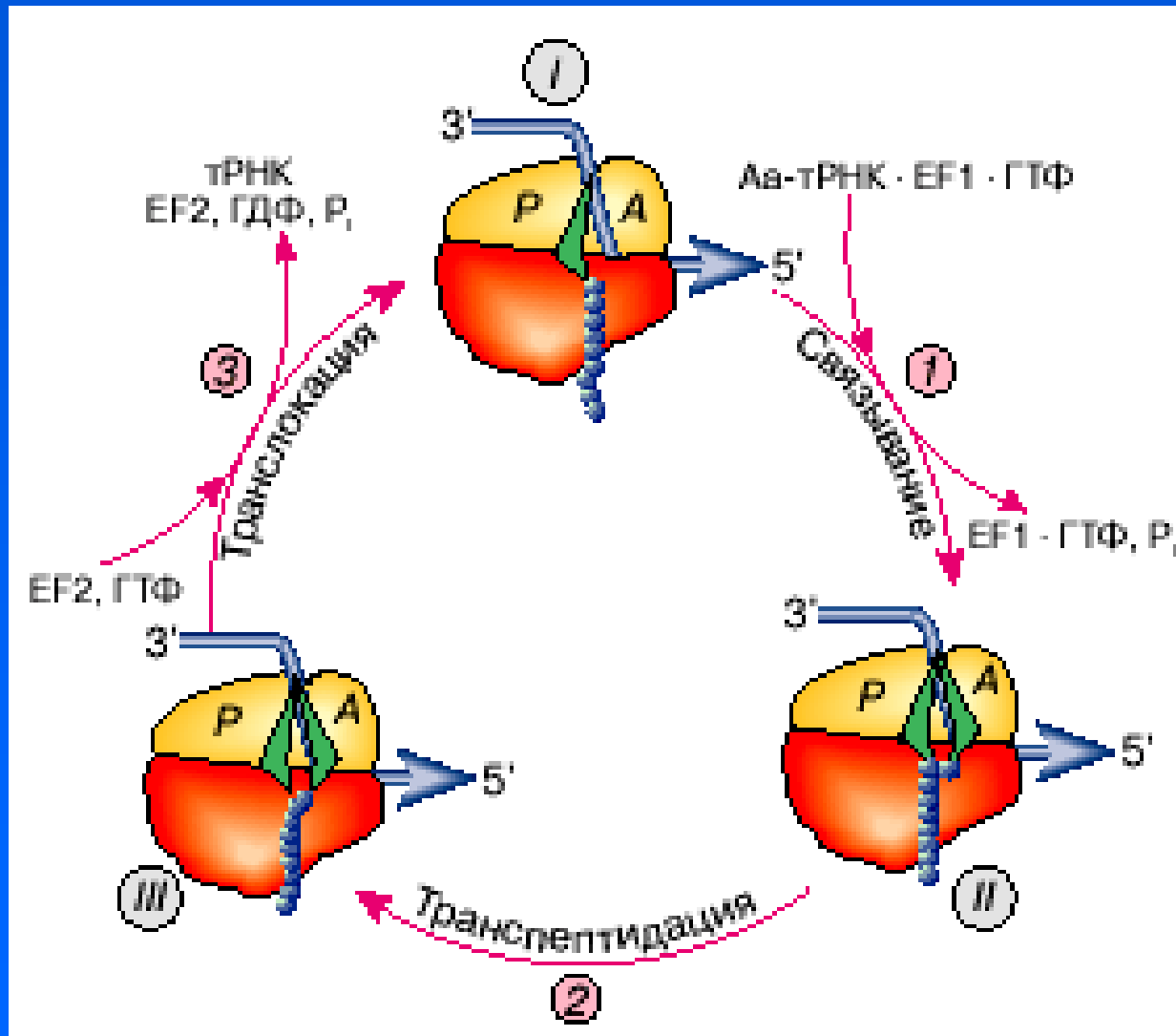
# Биосинтез белка



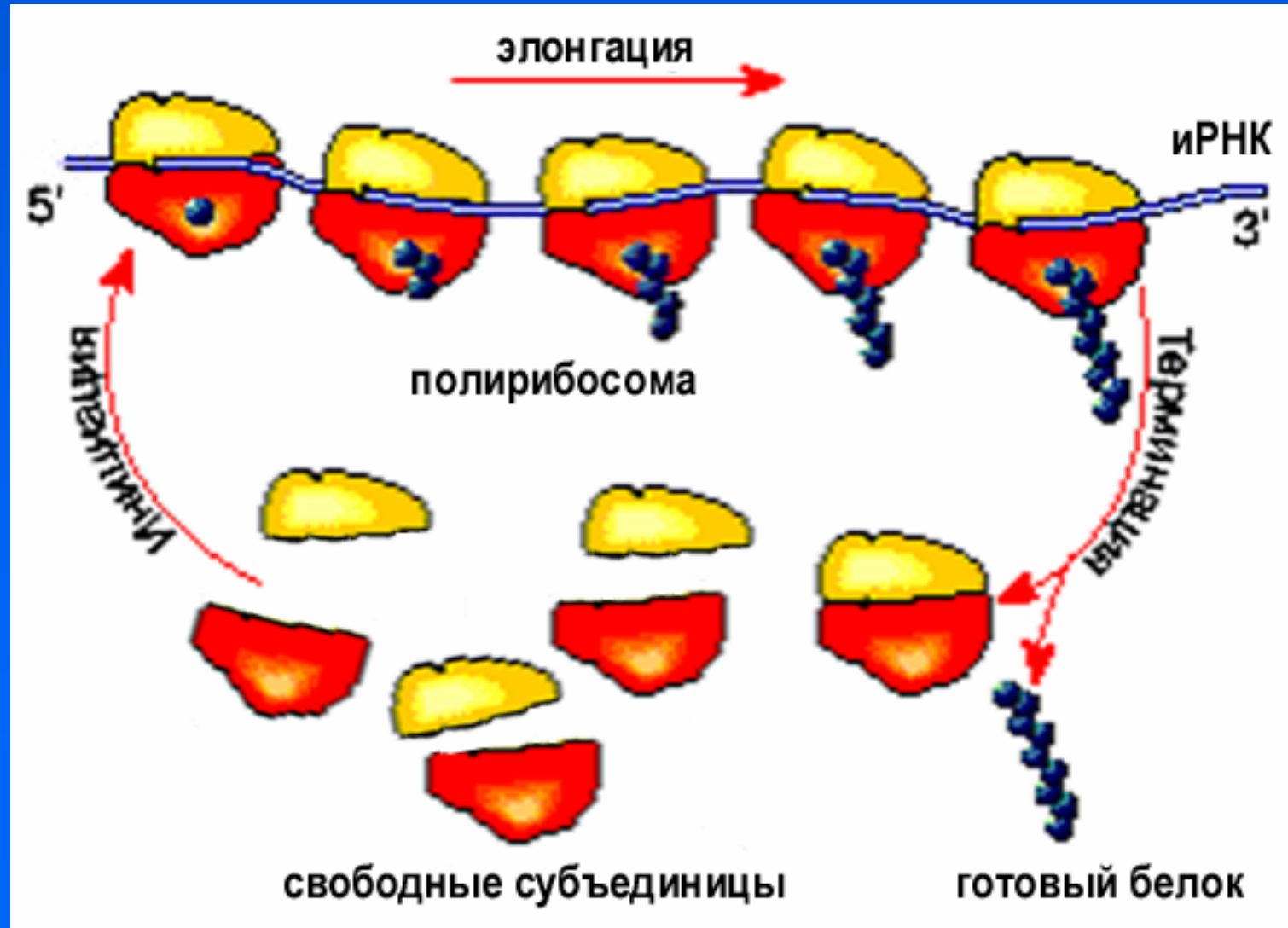
# Синтез белка в рибосоме



# Цикл работы рибосомы

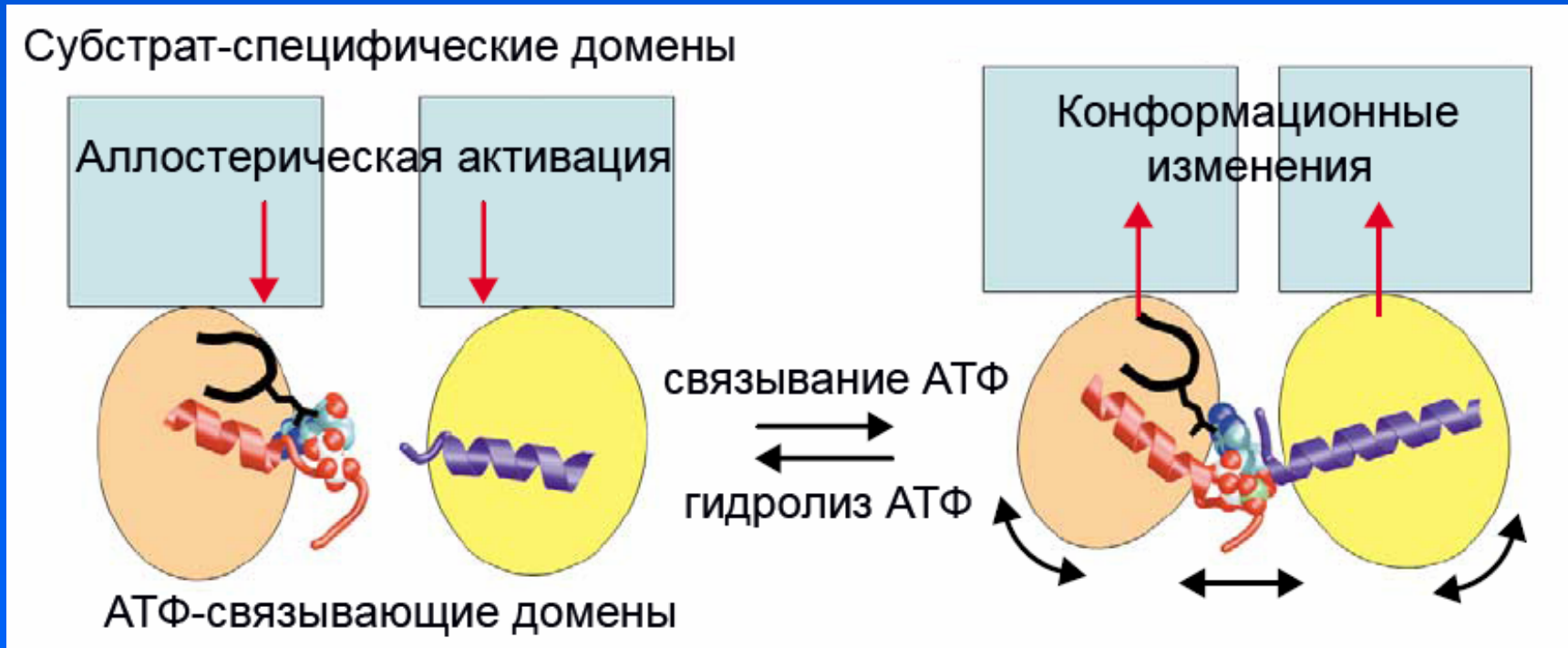


# Эпицикл рибосомы



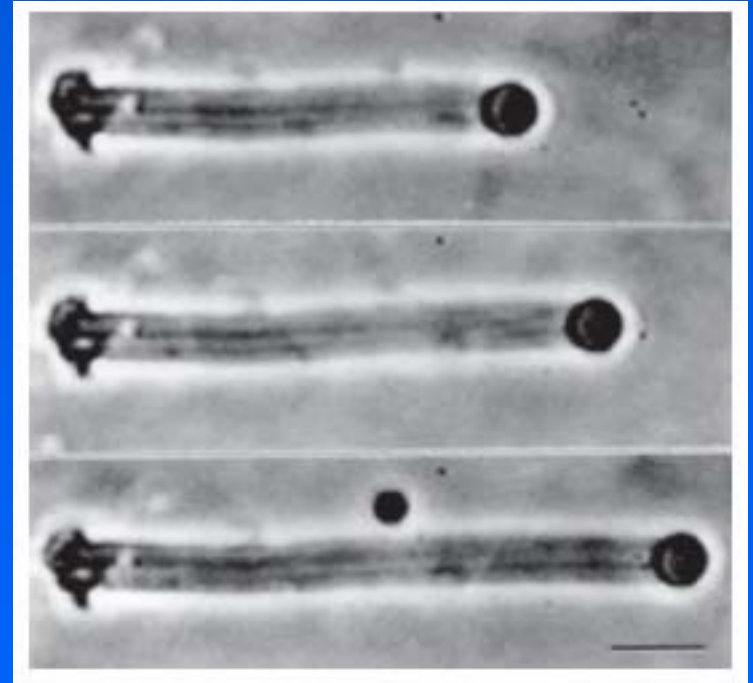
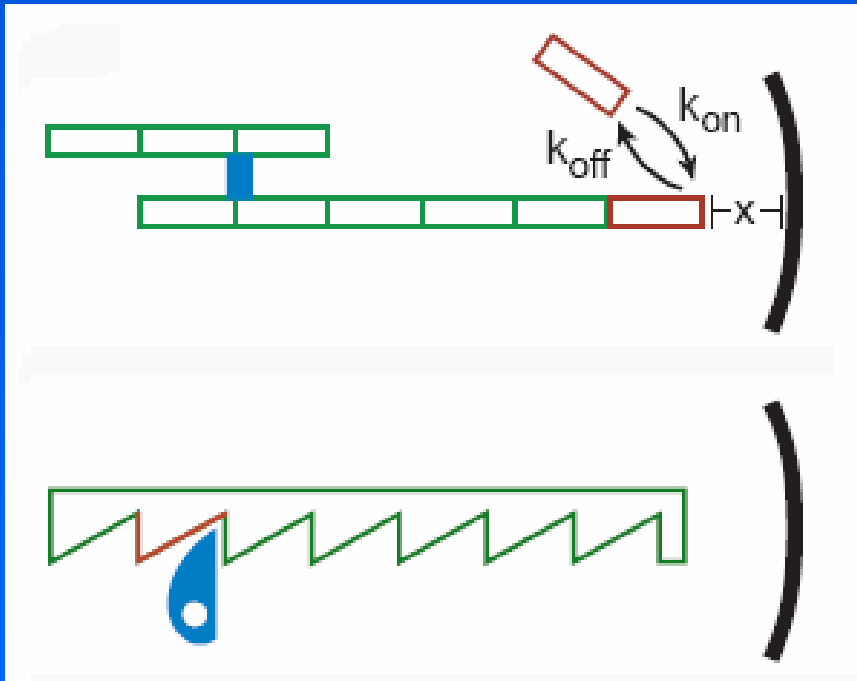


# Работа фермента (АТФ-аза)



Связывание и последующий гидролиз АТФ (ГТФ) приводит к конформационным изменениям молекулы фермента, достаточным для выполнения эндотермической реакции. Осуществление эндотермической реакции (шаг) сопровождается восстановлением исходной конформации молекулы фермента.

# Броуновская трещотка



Храповой механизм (трещотка) работает за счет энергии гидролиза АТФ при полимеризации актина

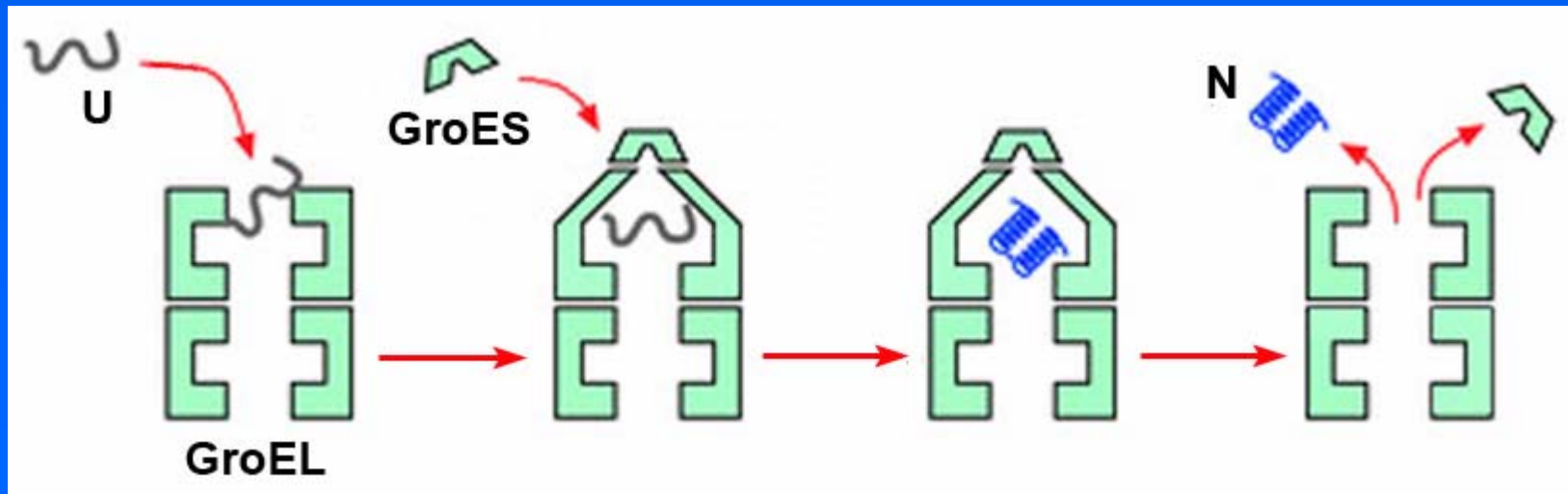
Растущий пучок микрофиламентов отталкивает шарик

# Посттрансляционные преобразования белка

1. Укладка – формирование уникальной трехмерной структуры.
2. Модификация боковых цепей – ацетилирование, тирозилирование и проч.
3. Надстройка углеводами и липидами.
4. Добавление аминокислот на конце.

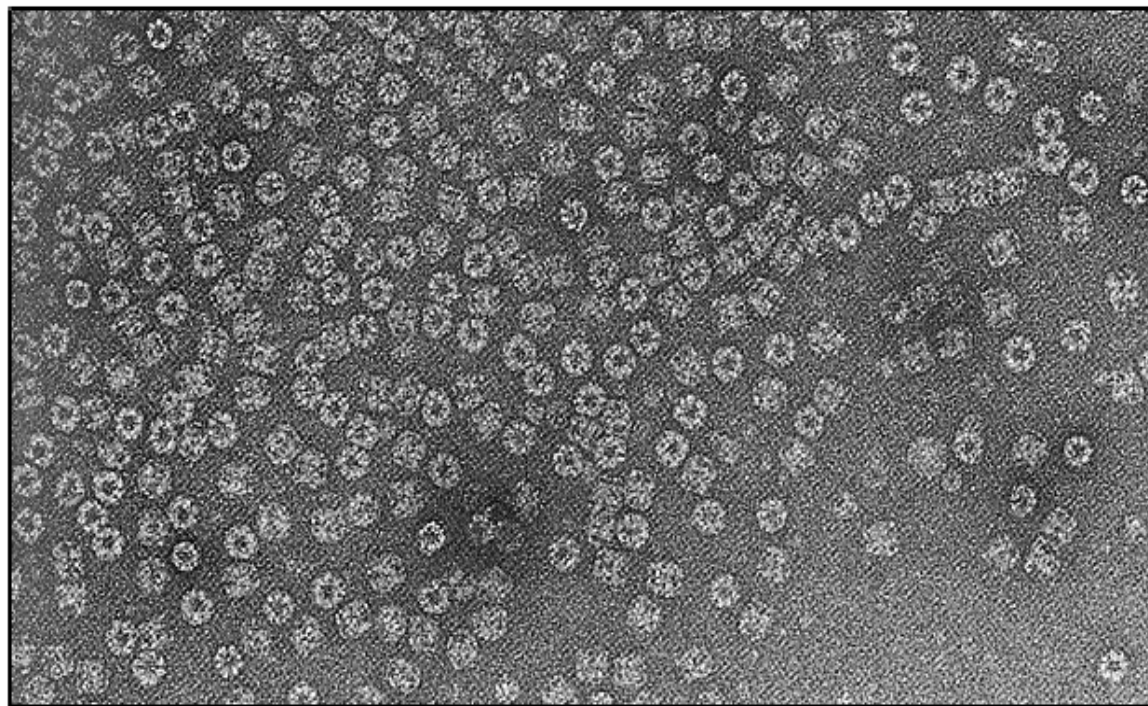
# Формирование пространственной структуры белков (folding)

1. Спонтанное – для небольших молекул
2. Активное (с затратой энергии АТФ) – через шаперонный комплекс



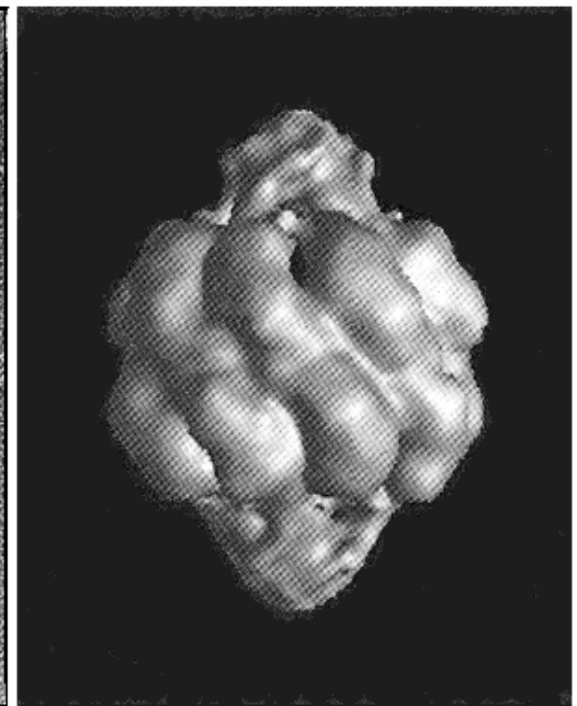


# Выделенные шаперонные комплексы



(A)

100 nm



(B)

10 nm

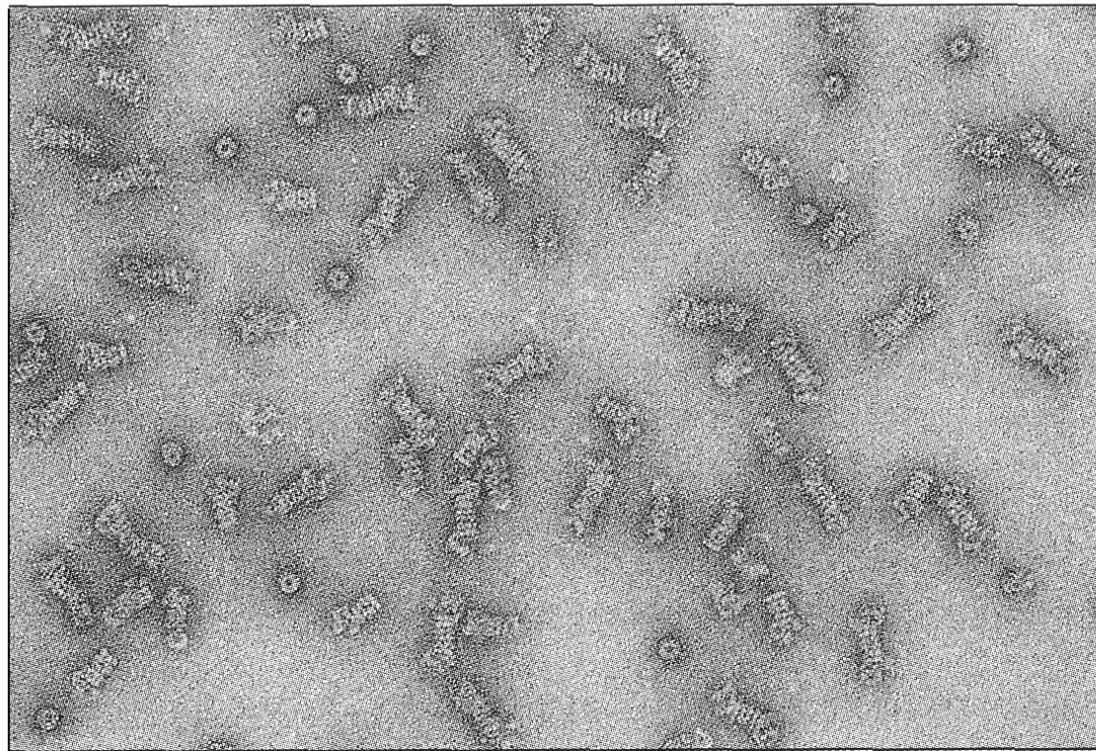
# Деградация белков в клетке

Полная деградация – расщепление на отдельные аминокислоты. Частичная деградация – расщепление на пептиды и олигопептиды.

1. Медленная – спонтанный протеолиз (часы и десятки часов).
2. Активная (с затратой энергии ГТФ) – через протеасомы при участии убиквитина.
3. Внутри органелл – ферментативный гидролиз в эндосомах и лизосомах при низком pH.
4. Расщепление каспазами при апоптозе.

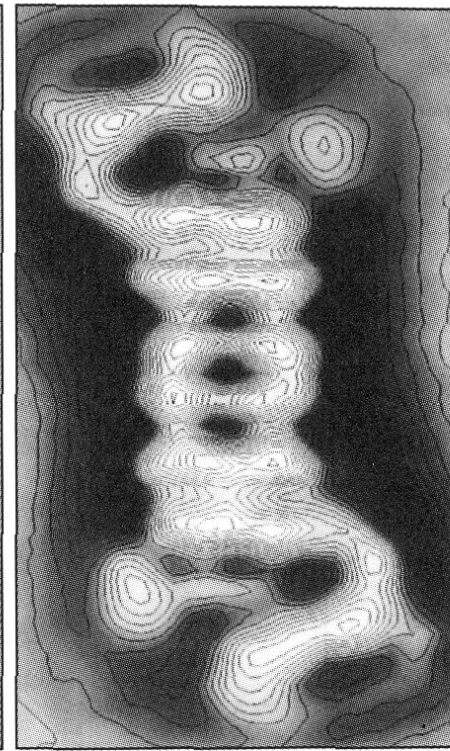


# Выделенные протеасомные комплексы (ЭМ)



(A)

100 nm



(B)

10 nm

substrate  
recognition  
and  
regulation

proteolytic  
machinery

# Центральная догма молекулярной биологии

Информация передается однонаправленно:

**ДНК – РНК – белок**

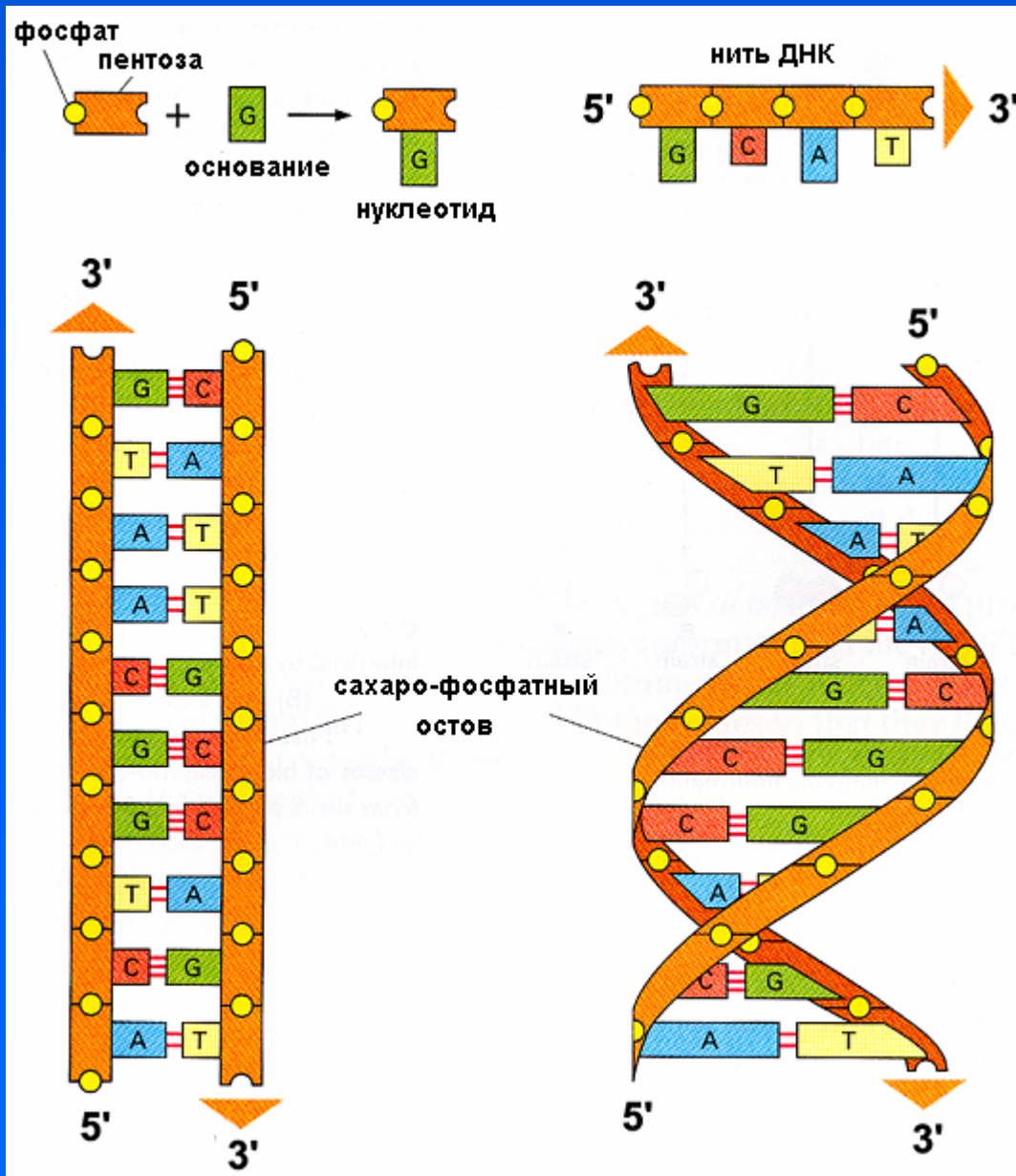
Генетический код: триплеты нуклеотидов  
(61 из 64) соответствуют аминокислотам (20)

Молекулы белков и нуклеиновых кислот  
полярны:

N-конец белка соответствует 5'-концу и-РНК и  
3'-концу ДНК.



# Схема молекулы ДНК



# Параметры молекулы ДНК

Расстояние между нуклеотидами – 0,34 нм. Диаметр молекулы – 2 нм.

Число нуклеотидов – от нескольких десятков тысяч (простейшие бактерии) до сотен миллионов. Длина молекулы – от 10 мкм до 10 см

В водном растворе молекула ДНК заряжена отрицательно (при нейтральном рН) и стремится распрямиться (палочка).

В клетке молекула ДНК компактно укладывается с помощью специальных белков.

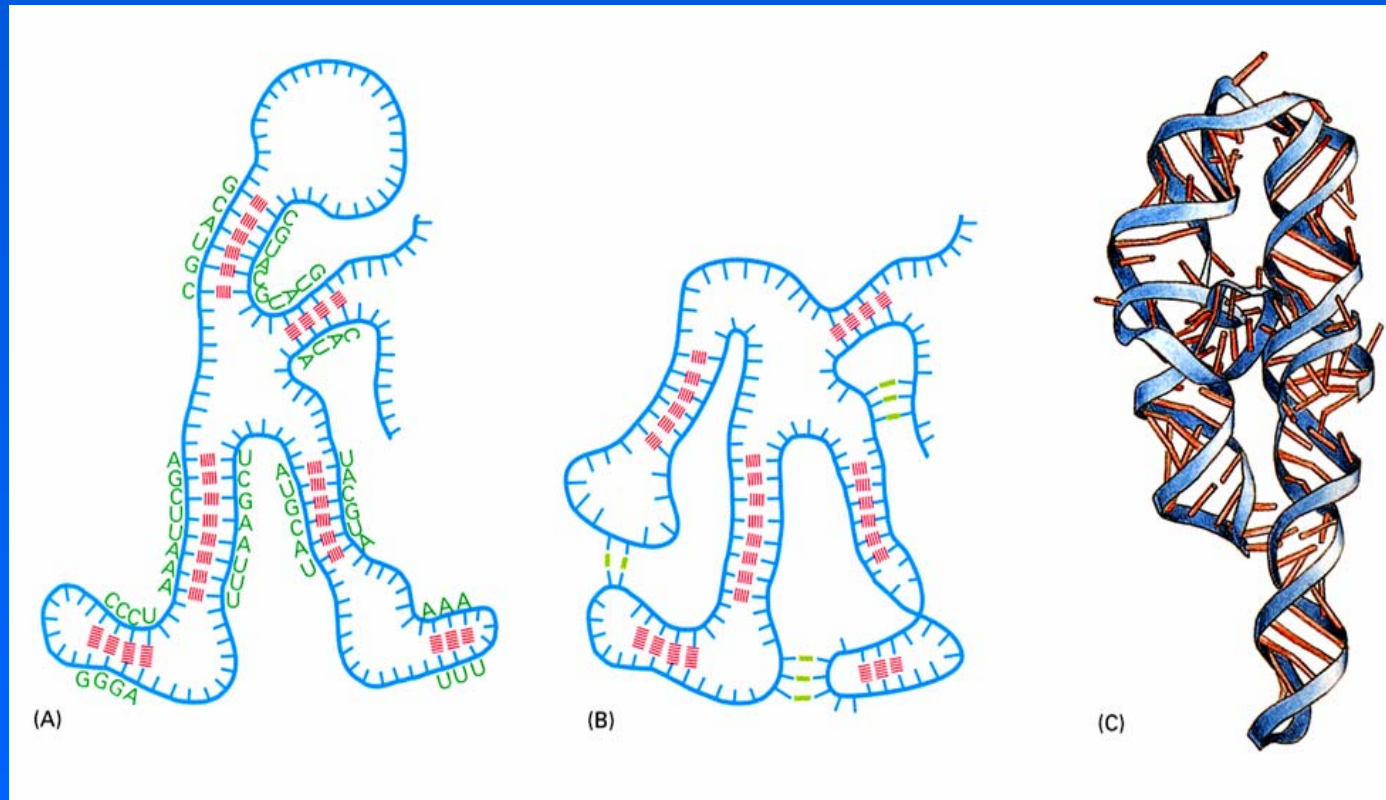
# Параметры молекул РНК

Длина молекулы – от 20 до 10000 нуклеотидов (до нескольких мкм).

В водном растворе молекула РНК заряжена отрицательно (при нейтральном рН) и образует сложную трехмерную структуру (за счет спаривания комплементарных оснований).

В клетке молекулы РНК взаимодействуют со специальными белками.

# Вторичная структура молекулы РНК

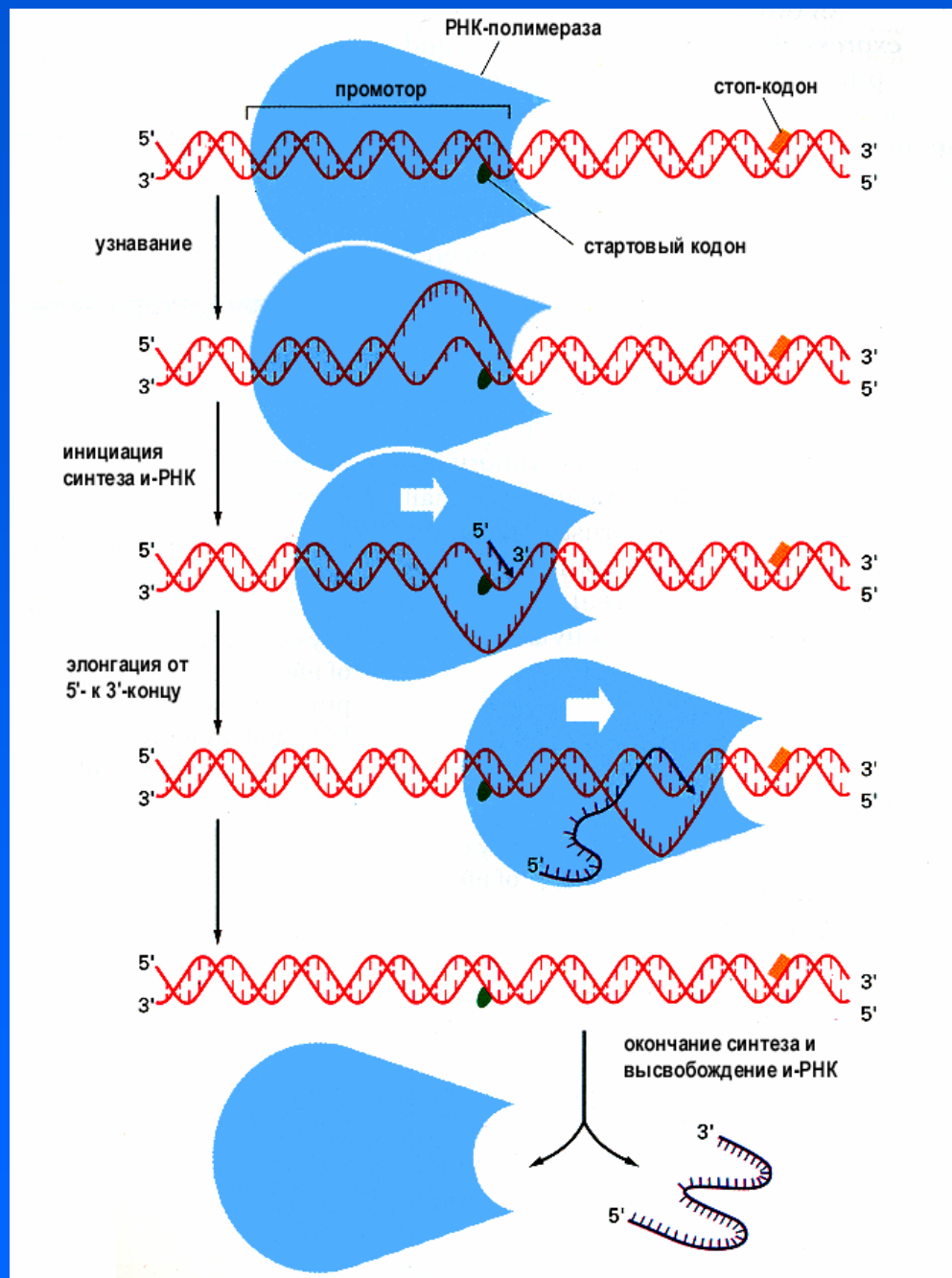


Вторичные структуры в мРНК служат для регуляции трансляции. Псевдоузлы служат для программированного изменения рамки считывания генов. Также вторичная структура служит для замедления деградации определенных мРНК.

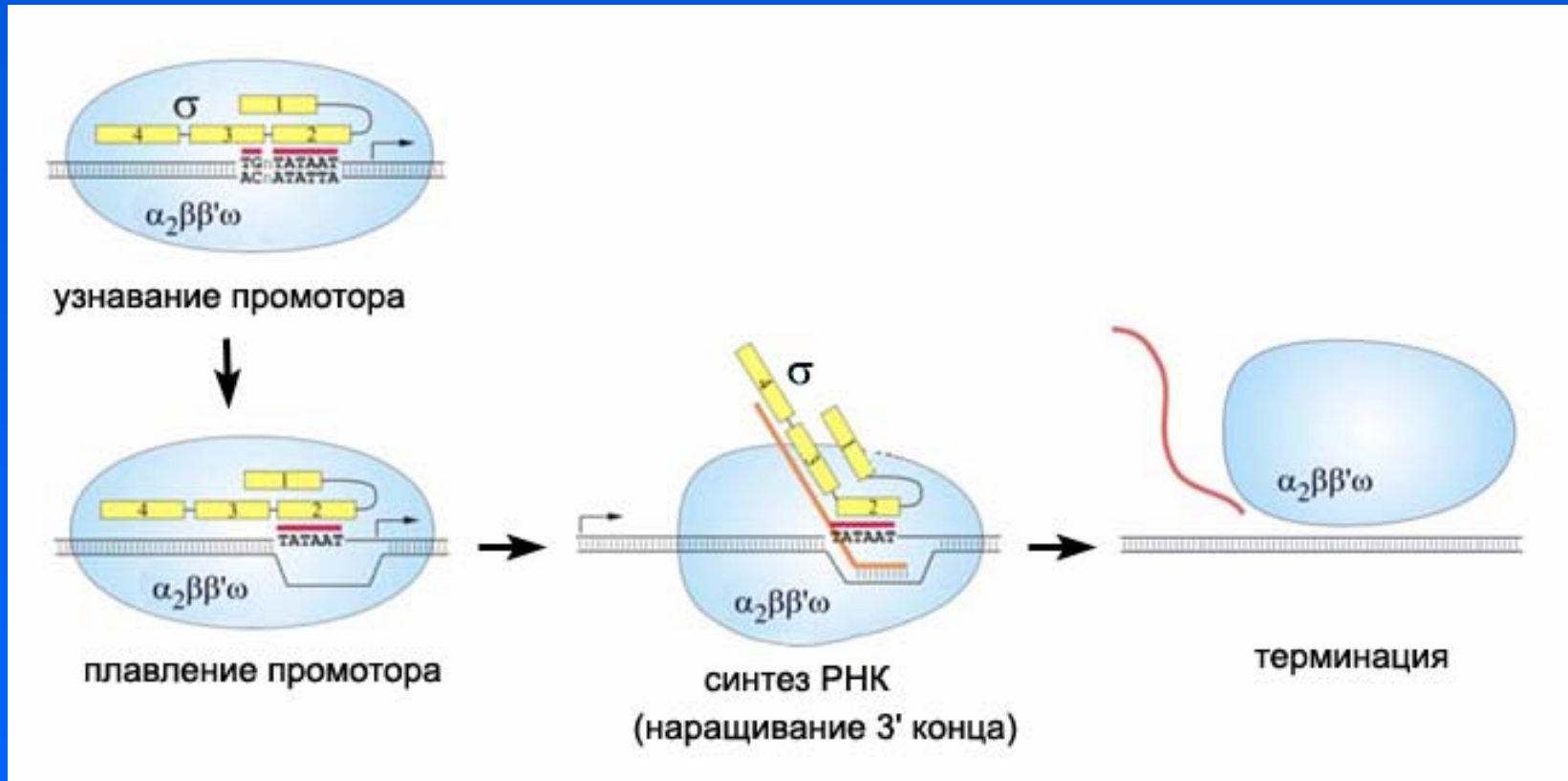


# Матричный синтез РНК - транскрипция

Все молекулы РНК сначала синтезируются на участках молекулы ДНК (рамки считывания), а затем могут изменяться.



# Схема работы РНК-полимеразы

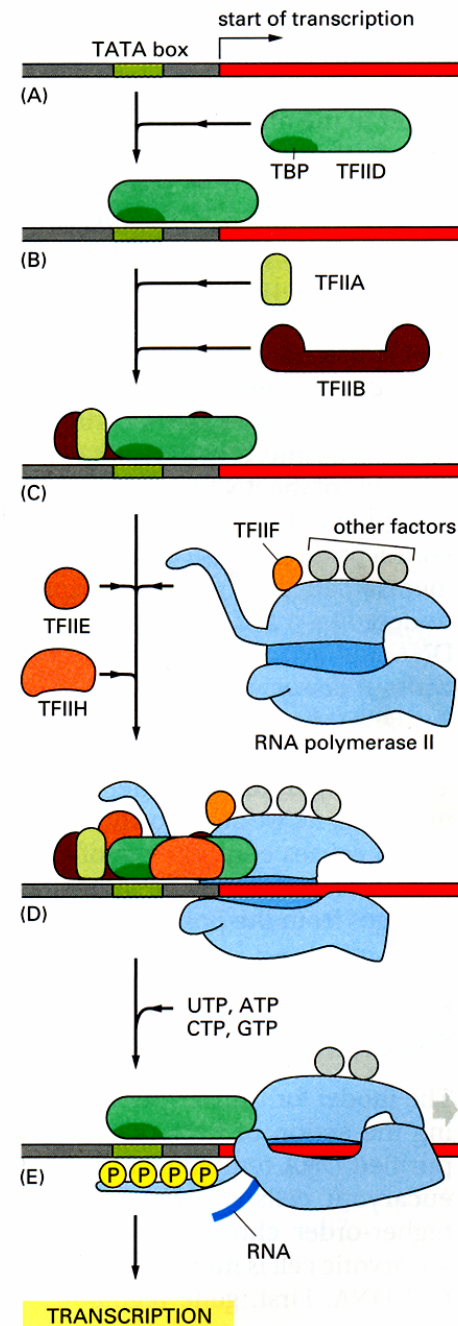


Плавление – TATA-бокс; элонгация – вытеснение  $\sigma$ -субъединицы; терминация – терминирующий кодон

# Виды молекул РНК

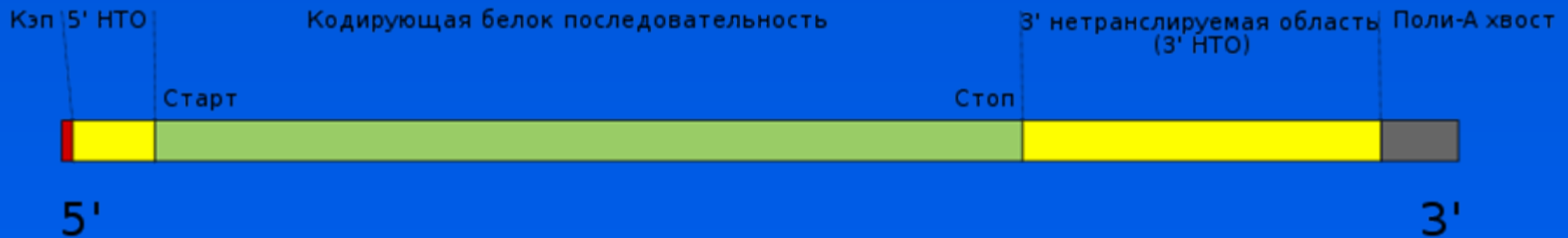
1. информационные РНК – по числу белков (РНК-полимераза II)
2. рибосомные – 4 (РНК-полимераза I для 28S, 18S, 5,8S и РНК-полимераза III для 5S)
3. транспортные – 20 (РНК-полимераза III)
4. малые ядерные РНК – более 100 (РНК-полимераза III)
5. микроРНК – не менее 500 (РНК-полимеразы II и III)

# Инициация РНК-полимеразы происходит с помощью факторов транскрипции





# Структура молекулы и-РНК

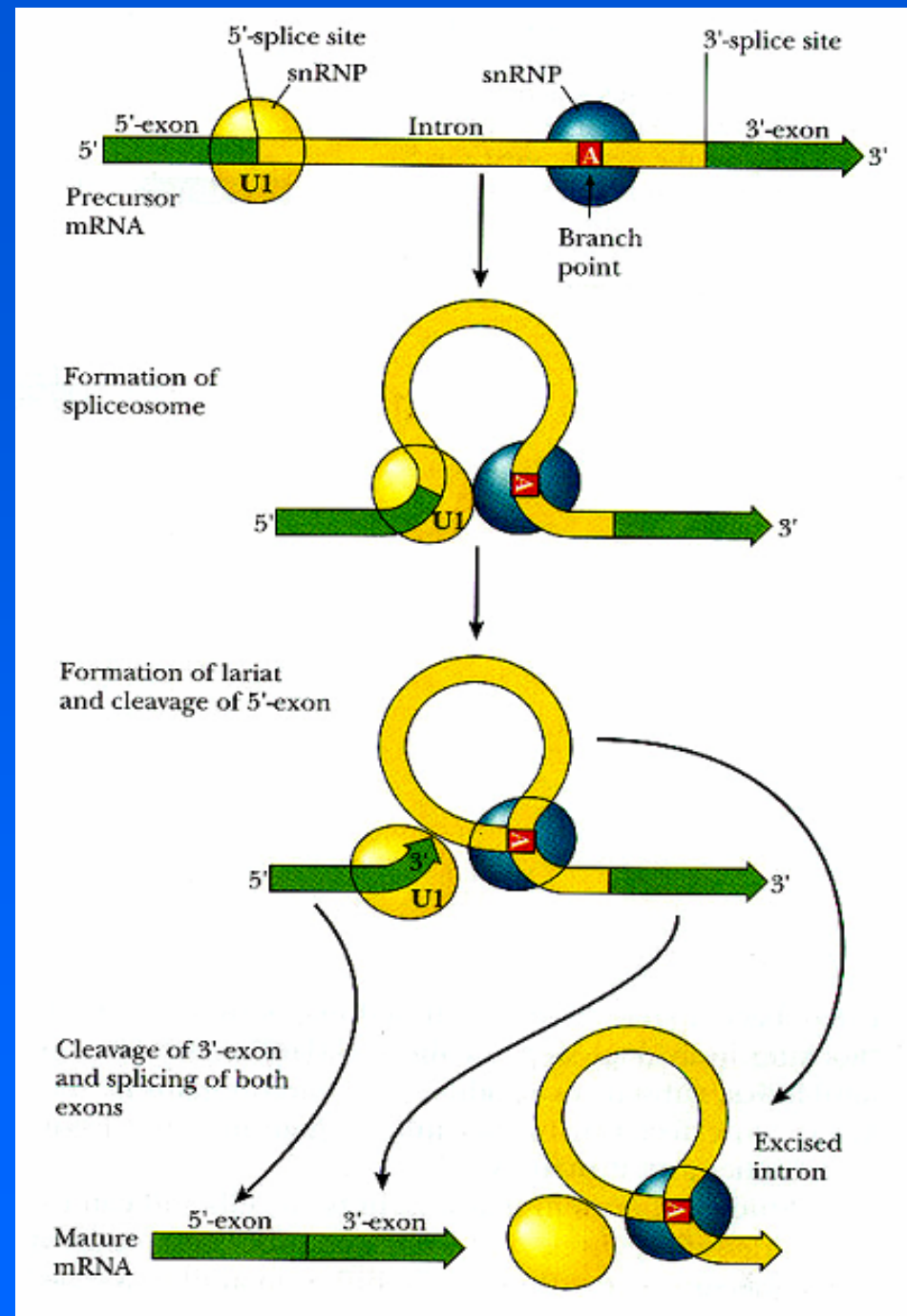


## Посттранскрипционные преобразования и-РНК:

1. Сплайсинг – удаление вставок (интронов) внутри кодирующей последовательности молекулы
2. Процессинг – укорочение молекулы с 5'- и 3'-концов
3. Формирование кэпа из нескольких нуклеотидов на 5'-конце
4. Надстройка поли-А на 3'-конце

# Сплайсинг на примере и-РНК

В сплайсинге участвуют малые РНК, которые узнают концы интронов и формируют сплайсосому.



# Репликация ДНК

**Принципы:** комплементарность и полуконсервативность.

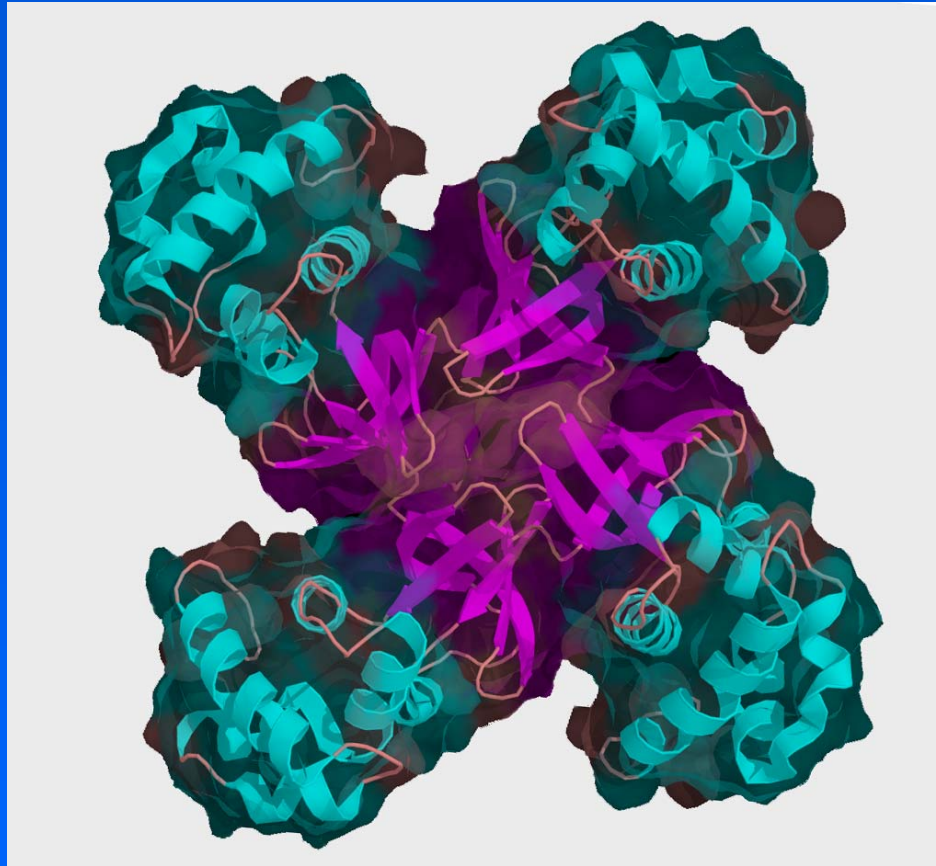
Мультиферментный комплекс ДНК-полимеразы движется только от 5'-конца к 3'-концу.

В результате одна цепь (ведущая) синтезируется непрерывно, вторая (отстающая) цепь синтезируется прерывисто (фрагменты Оказаки), и затем сшивается кусками.

Затравка для репликации – короткая молекула РНК (10-20 нуклеотидов). Ее синтезирует специфическая РНК-полимераза (ДНК-праймаза).

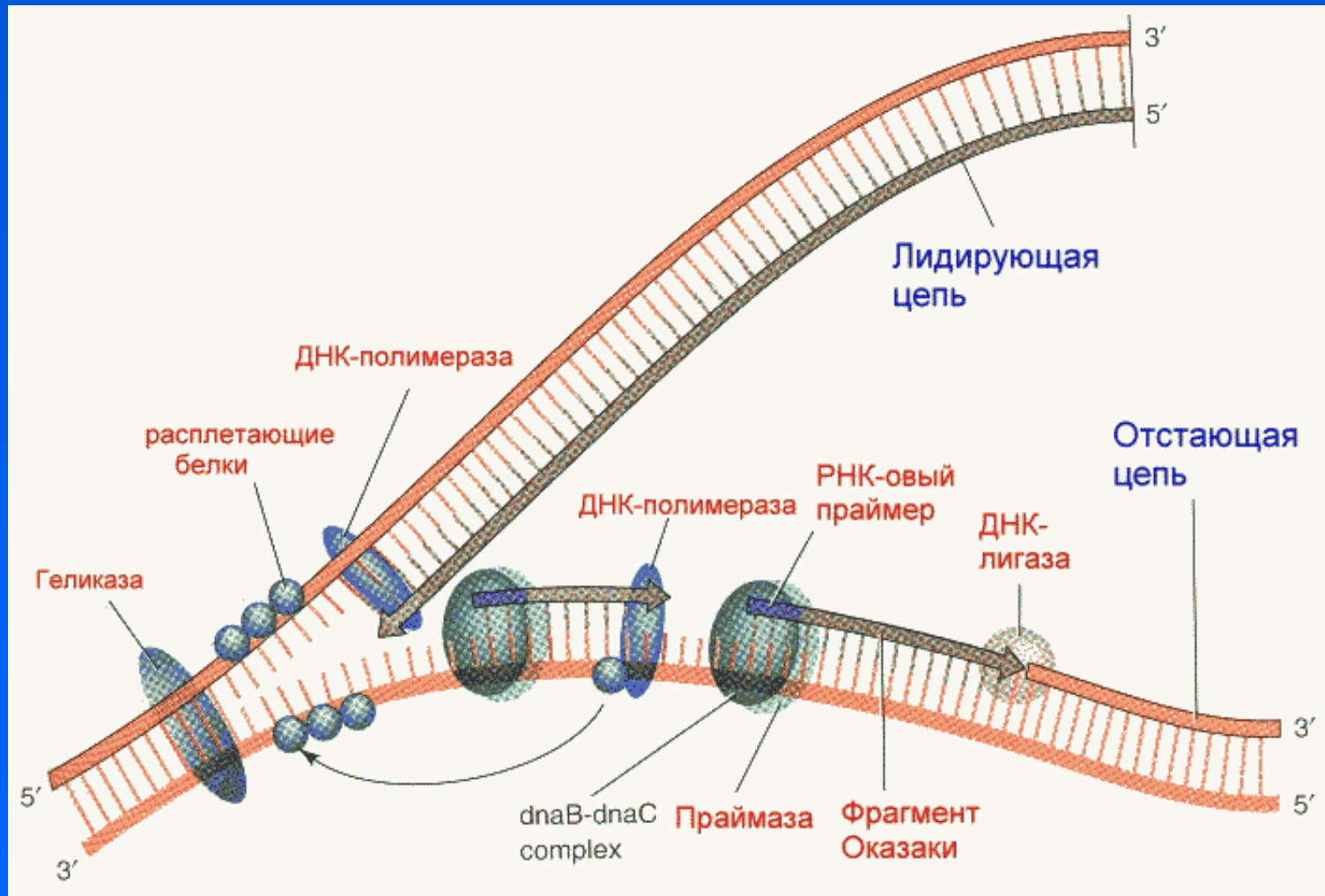
Перед началом репликации хеликазы обеспечивают локальное расплетание двойной спирали (разрушение водородных связей между нуклеотидами).

# Хеликаза



**Хеликазы** – группа эволюционно консервативных ферментов (АТФ-аз) отвечающих за локальное расщепление двойной спирали ДНК или РНК (образование шпильки). Участвуют в репликации ДНК, транскрипции и трансляции.

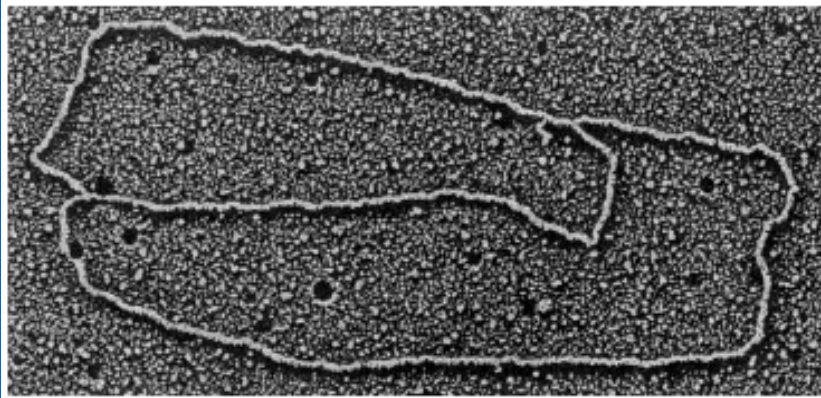
# Репликация ДНК



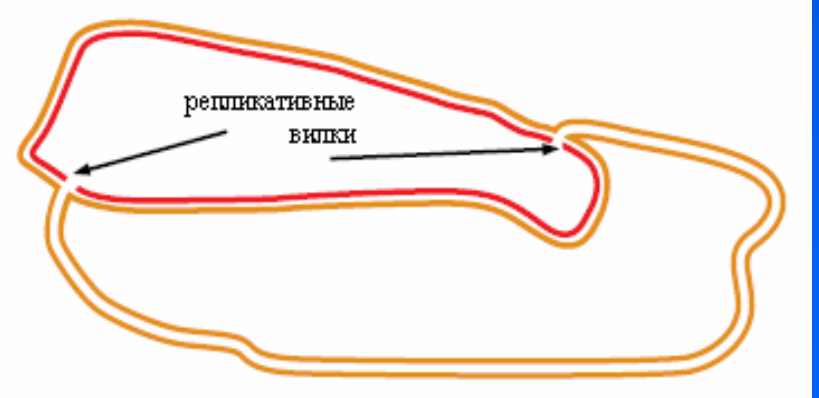
Отстающая цепь ДНК синтезируется другой молекулой ДНК-полимеразы, которая подходит на время синтеза каждого фрагмента Оказаки.



# Репликативные вилки кольцевой ДНК

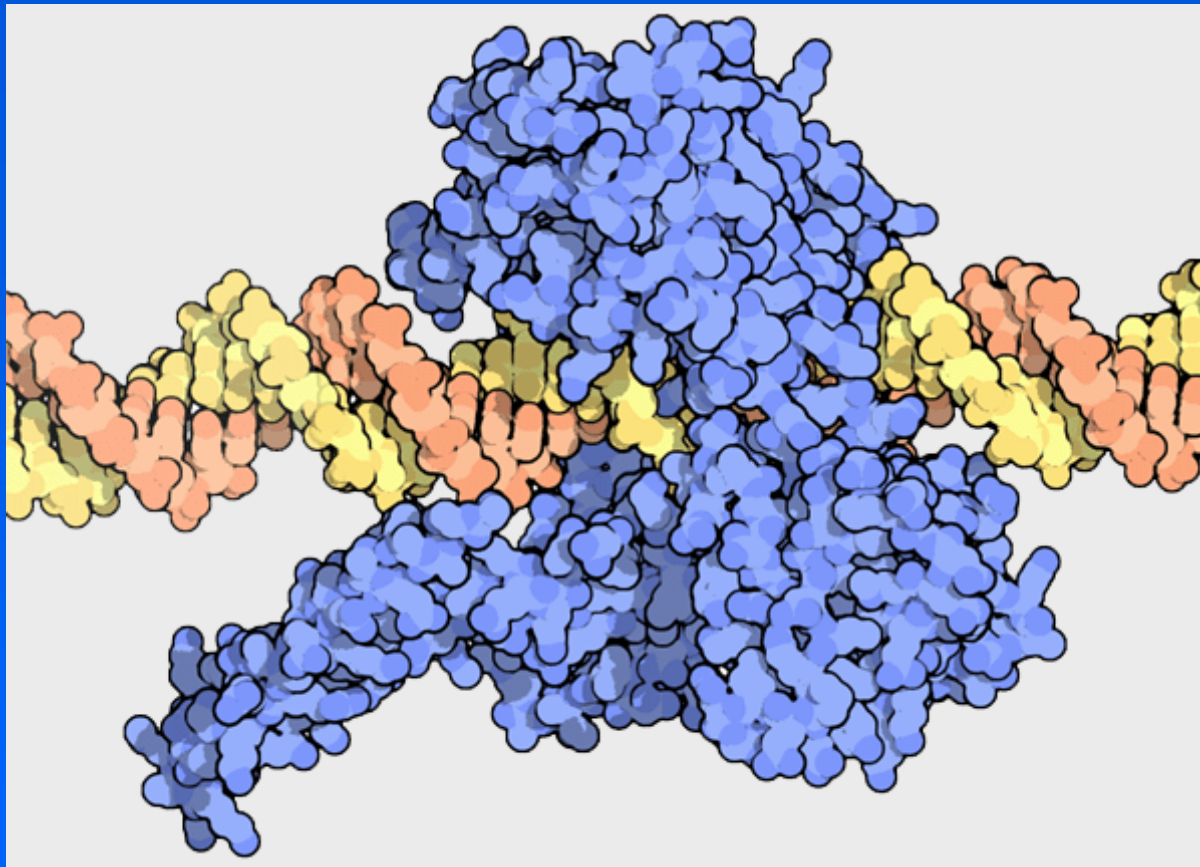


ЭМ – напыление



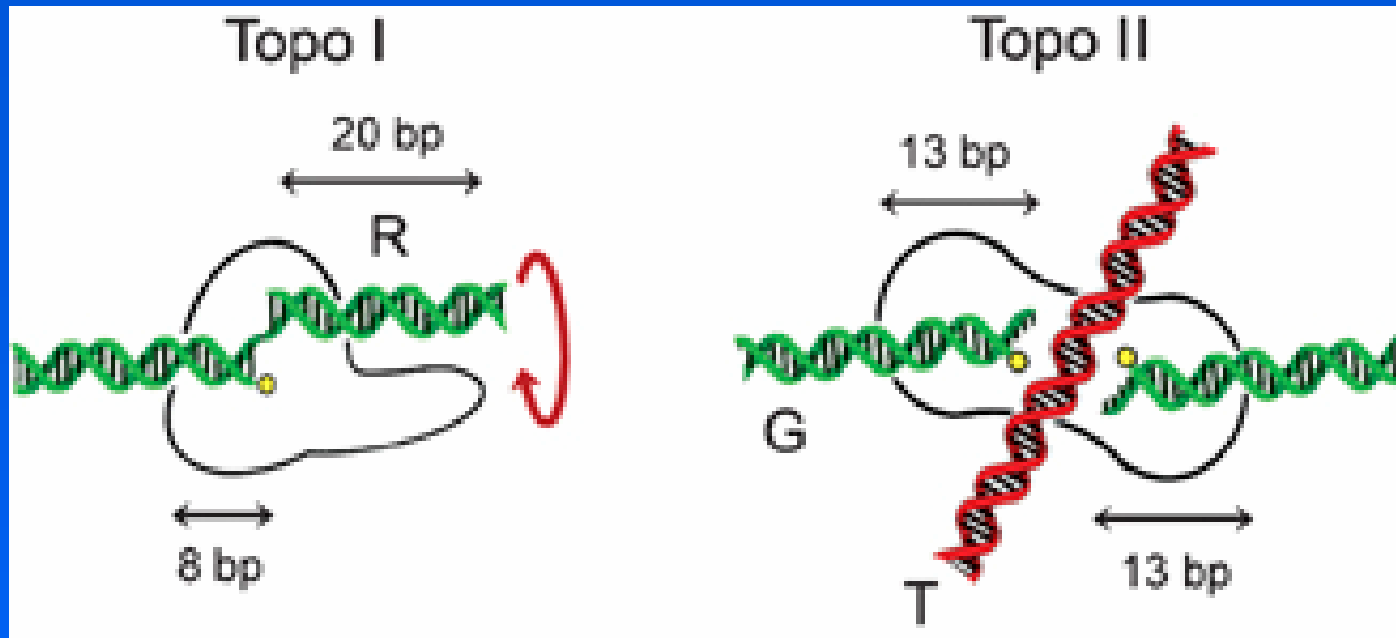
схема

# Разделение молекул ДНК



**Топоизомеразы – ферменты (АТФ-азы), ответственные за разделение спиралей и снятие «сверхскручивания» путем внесения обратимых разрывов в ДНК.**

# Топоизомеразы



**Топоизомераза I и Топоизомераза III** создают однонитевые разрывы и восстанавливают их после релаксации.

**Топоизомераза II** создает и восстанавливает двухнитевые разрывы, через которые продергивается двойная спираль ДНК.

# Особенности репликации ДНК у эукариот

Полирепликонность – на каждую линейную молекулу ДНК приходится около 1000 репликативных вилок (сайтов посадки комплексов ДНК-полимеразы).

При дроблении все сайты реплицируются одновременно.

В соматических клетках репликация идет не одновременно – в каждой хромосоме есть участки ранней и поздней репликации.

После окончания работы ДНК-полимеразы происходит надстройка концов новообразованной молекулы ДНК – фермент теломераза добавляет многократно повторяющиеся последовательности (напр. TTAGGG ).

# Строение генома прокариот

Кольцевая молекула ДНК (одна)

Кодирующие РНК участки – гены составляют основную часть генома (~70%)

Гены собраны в группы (цистроны), которые имеют общий регулятор (промотор)

Регуляторные последовательности короткие



# Строение генома эукариот

Несколько линейных молекул ДНК (хромосом). Кодирующие РНК участки составляют малую часть генома (~1,5% у человека).

Каждый ген содержит промотор и некодирующие вставки – интроны. Гены могут перекрываться и считываться с одного участка ДНК в противоположные стороны.

Большинство генов уникальны – присутствуют в одной или нескольких копиях на геном. Множественные тандемные повторы (100-1000) – гены рибосом, гистонов и тРНК.

Сателлитная ДНК (до 30% генома) состоит из повторов длиной от одного до нескольких тысяч нуклеотидов. Набор повторов консервативен (в пределах вида), а длина вставок варьирует, что позволяет установить уникальность ДНК особи.

Разбросанные повторы (длина 6-10 пар оснований) – до 15% генома, повторены  $10^5$ - $10^6$  раз.

Мобильные элементы и псевдогены.

# Размеры генома

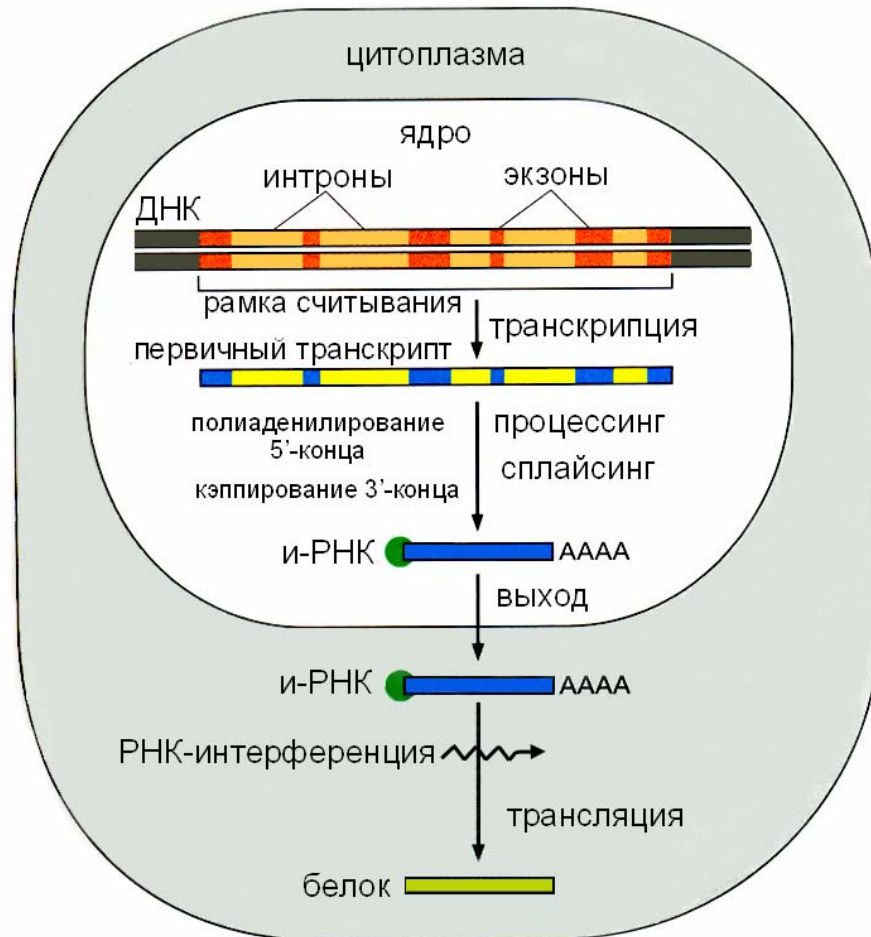
Прокариоты – 500-4500 генов; 0,5-4 млн. нуклеотидов.

Эукариоты: дрожжи – около 6300 генов (12 млн. нуклеотидов); человек – около 30000 генов (3200 млн. нуклеотидов).

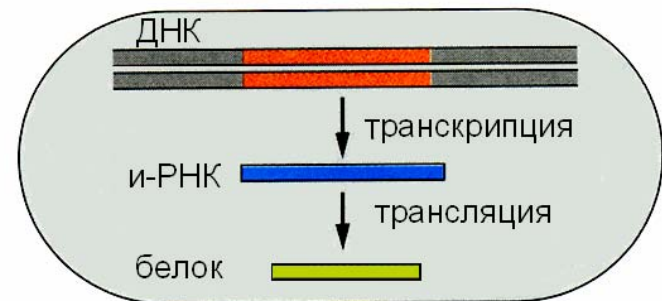
Размер генома эукариот (длина молекул ДНК) сильно (в десятки раз) различаются даже у родственных видов.

# Сравнение про- и эукариот

## эукариоты



## прокариоты



# Дополнительная регуляция трансляции у эукариот

Дискриминация иРНК – сильное/слабое связывание с факторами инициации и с рибосомой

Отрицательная обратная связь через ингибирование комплекса иРНК/рибосома продуктом (трансляционная репрессия)

Маскирование стабильных иРНК (многоклеточные эукариоты)

Инактивация факторов инициации трансляции (фосфорилирование eIF2)

# Регуляция экспрессии генов у эукариот:

На уровне энхансеров – эффект положения.

На уровне транскрипции – промоторы, метилирование ДНК.

На уровне сплайсинга (альтернативный сплайсинг – удаление различных экзонов).

Скорость деградации и-РНК (величина поли-А)

На уровне связывания и-РНК с рибосомами (РНК-интерференция, микро-РНК)



# Перестройки генома при дифференцировке клеток

Подстановка кодирующей рамки под активный промотор.

Состыковка разобщенных частей гена (иммуноглобулины, макронуклеус инфузорий).

Удаление гена из генома (диминуция хроматина).

Амплификация генов (рибосомные и гистоновые гены в ооцитах, политенные хромосомы).

# Лекция 3

Клеточное ядро

Строение хроматина и структура  
хромосом

Ядрышко

# **Основные функции клеточного ядра**

- 1. Синтез различных молекул РНК.**
- 2. Репликация молекул ДНК.**
- 3. Регуляция ядерно-цитоплазматического транспорта белков и РНК.**

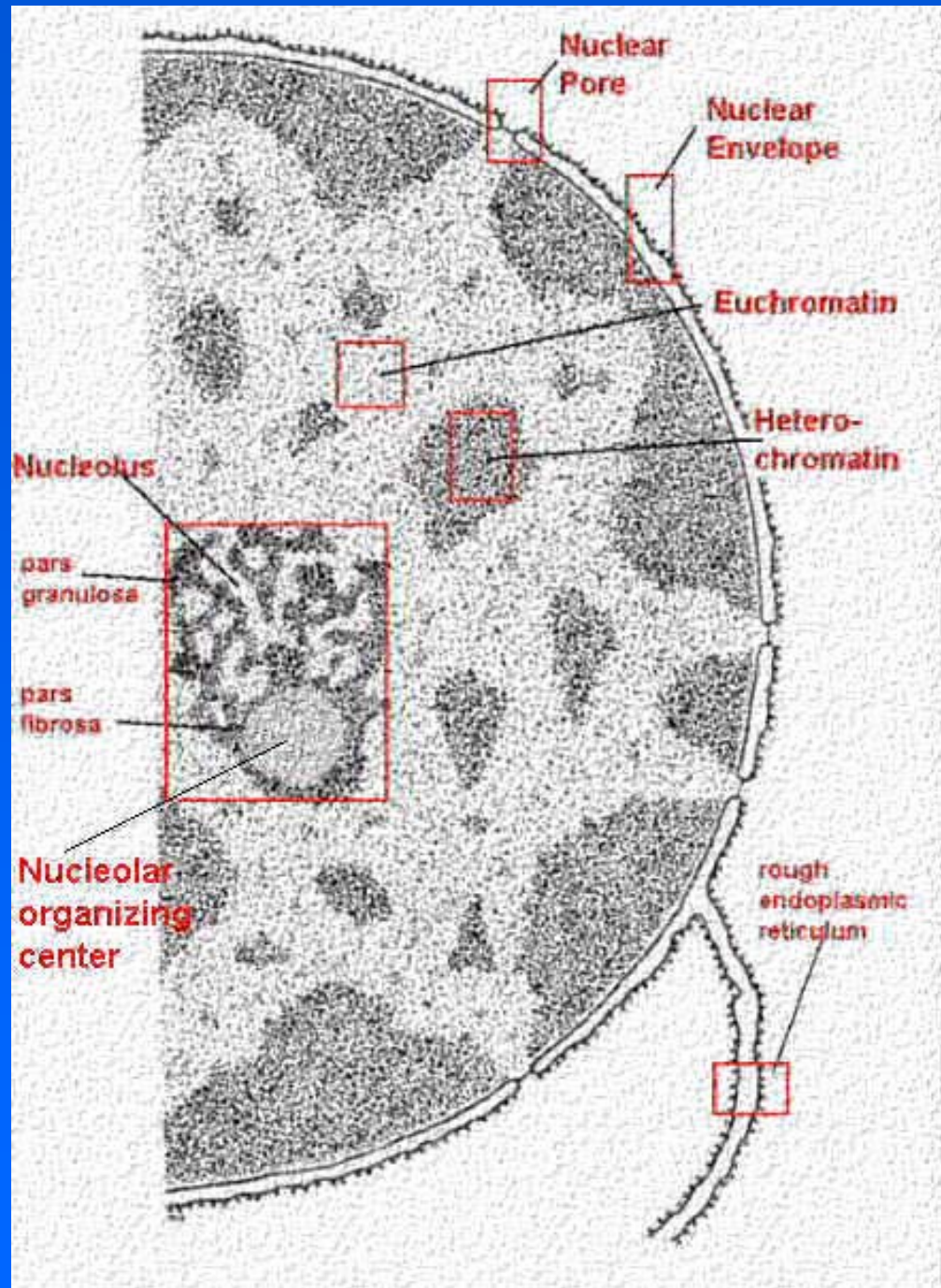
# Структуры ядра

Ядерная оболочка  
с порами

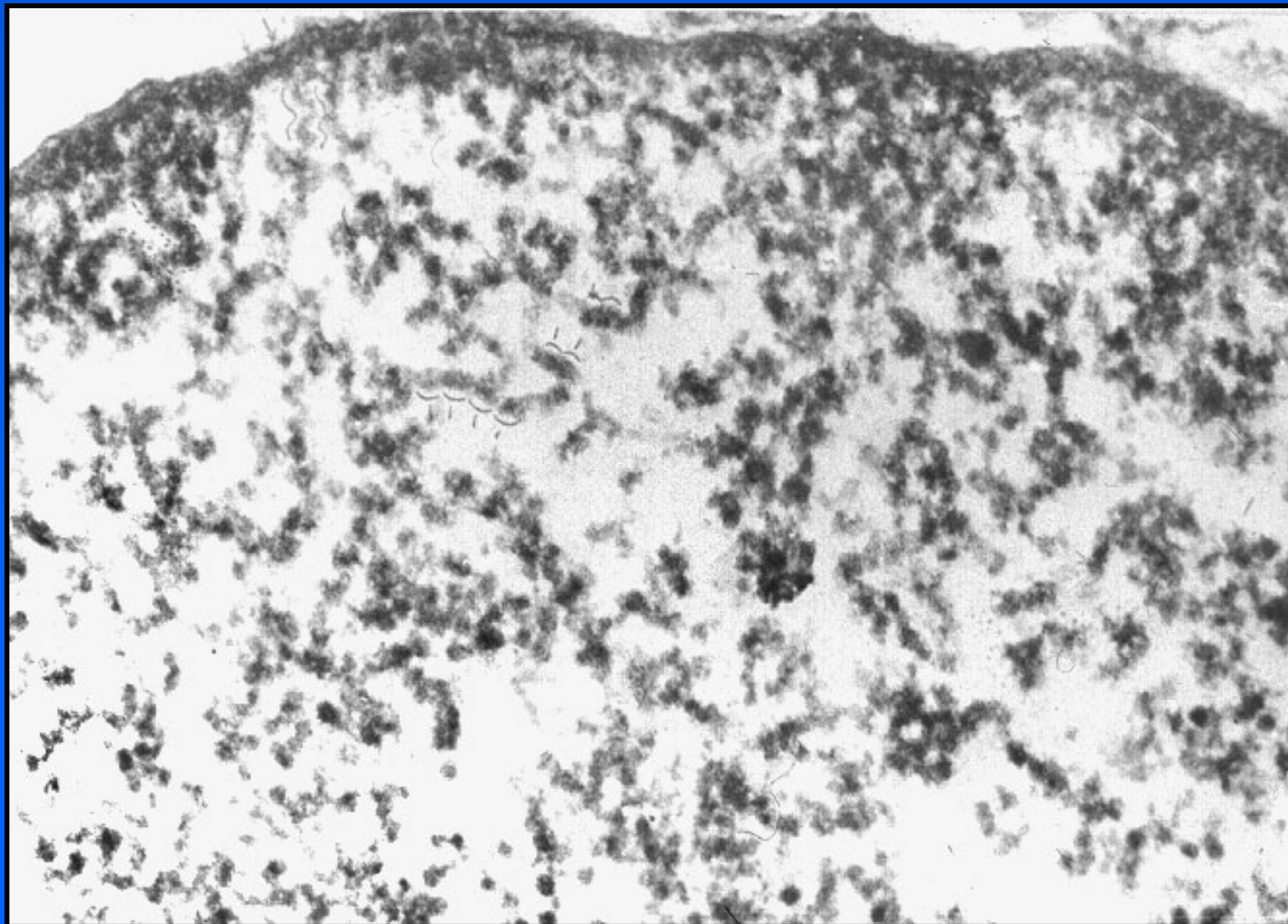
Хроматин –  
эухроматин и  
гетерохроматин

Ядрышко

Кариоплазма

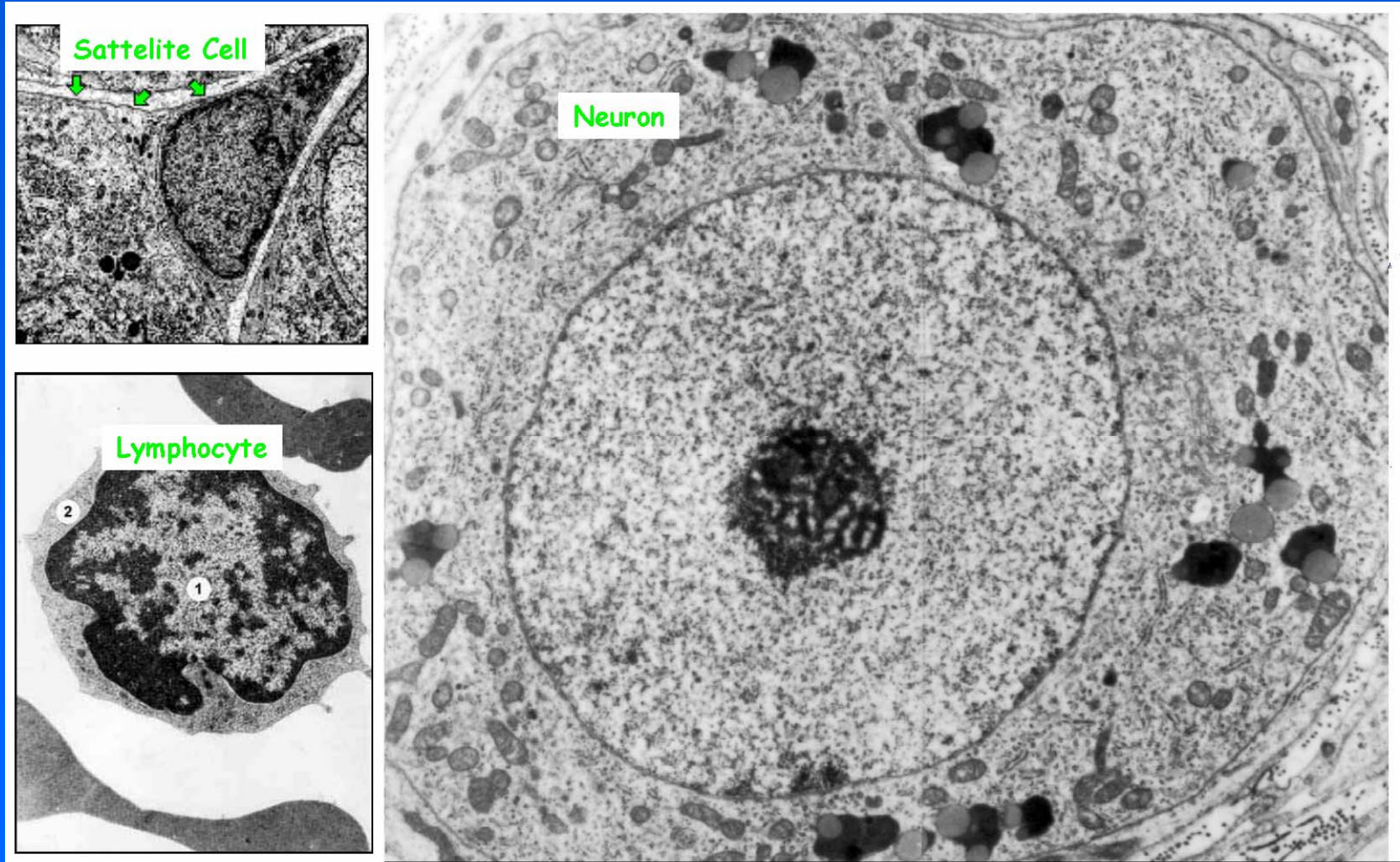


# Ультраструктура клеточного ядра

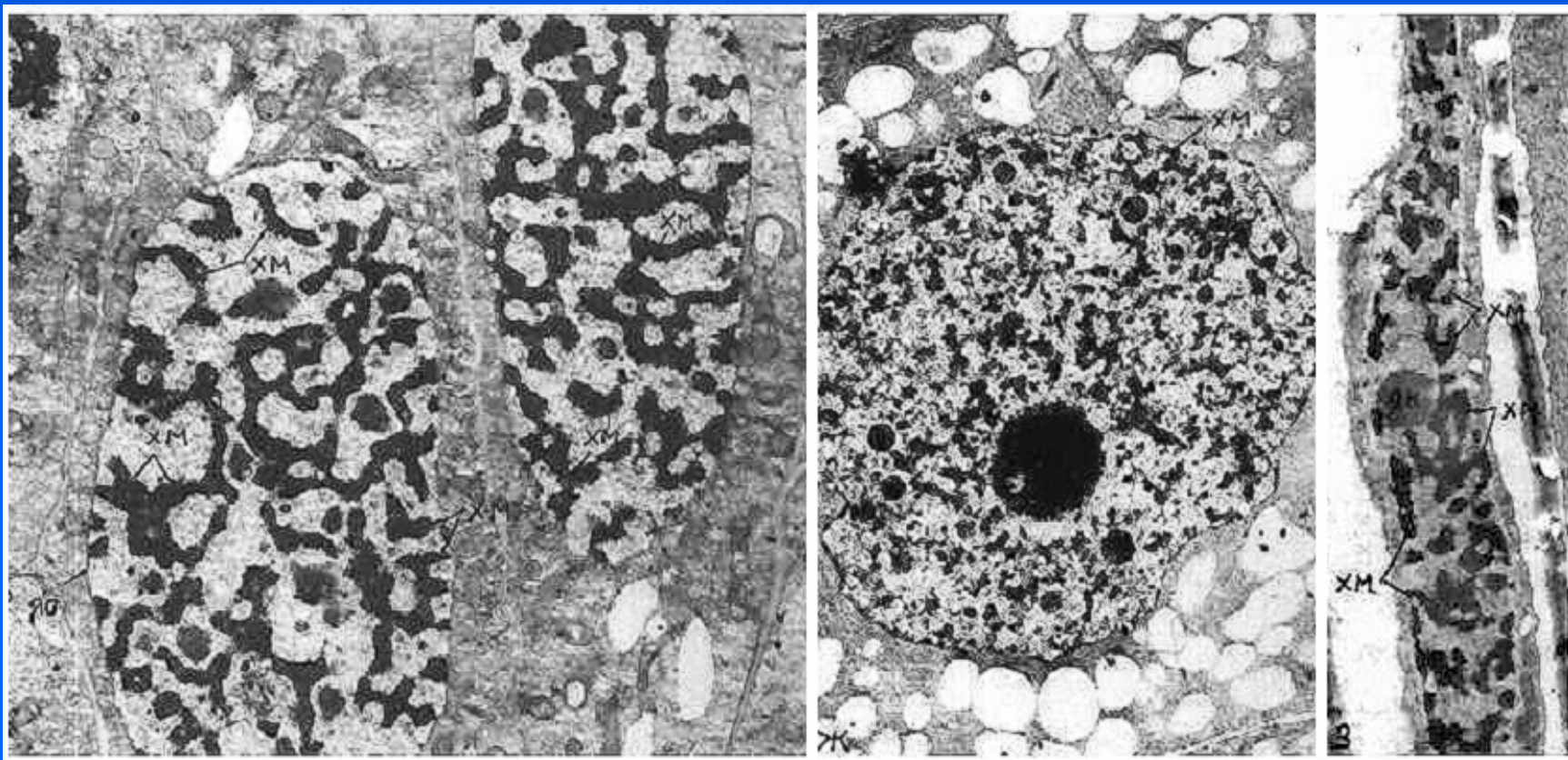




# Хроматин в ядрах животных



# Хроматин в ядрах растений



# ДНК и белки хроматина

Молекула ДНК – одна на хромосому.

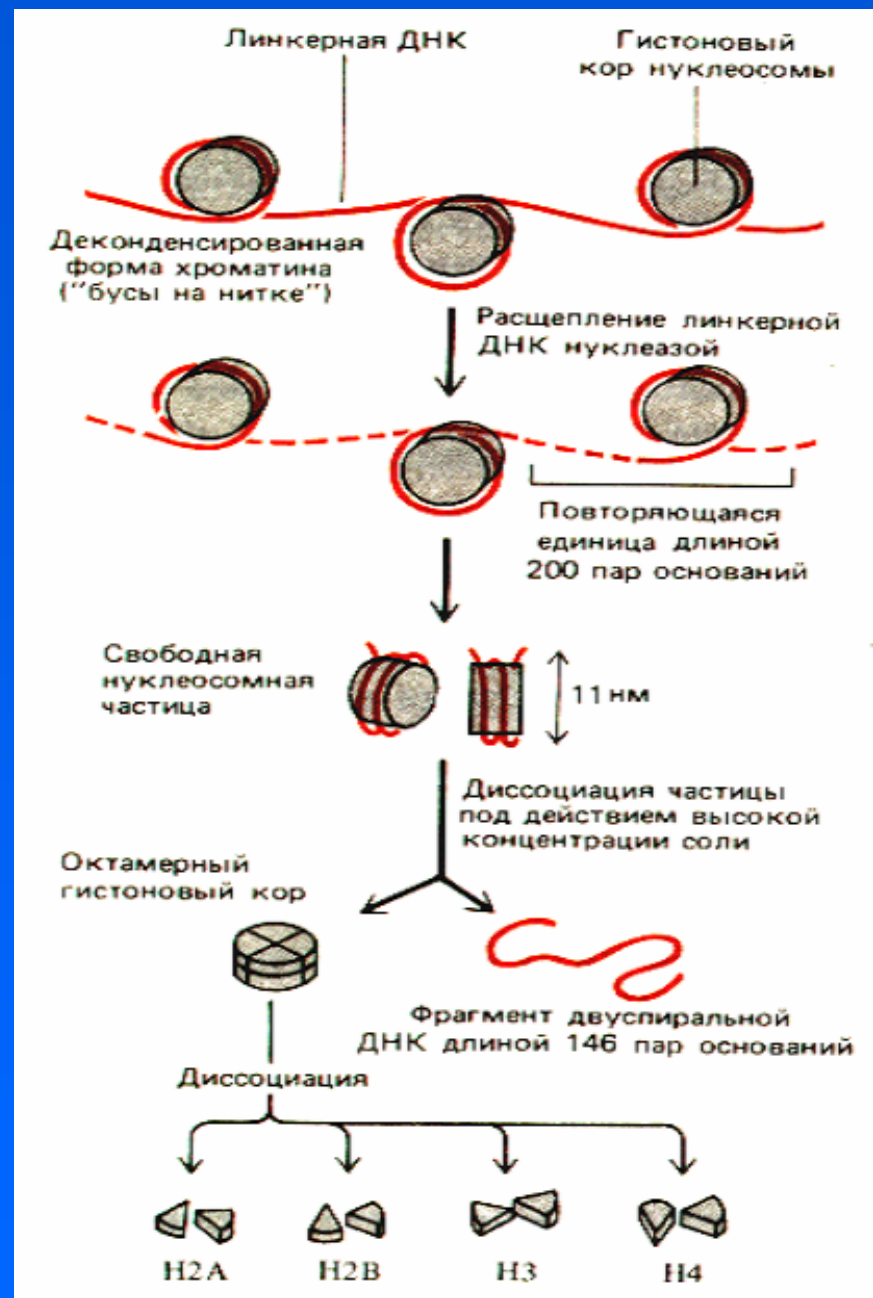
Молекулы гистонов – малый молекулярный вес (около 20 кД), положительный заряд, расположены по длине ДНК регулярно.

Негистоновые белки – большое разнообразие, играют различные роли в упаковке молекулы ДНК и в регуляции транскрипции.

Взаимодействуют со специфическими участками ДНК.



# ДНК и ГИСТОНЫ образуют нуклеосомы

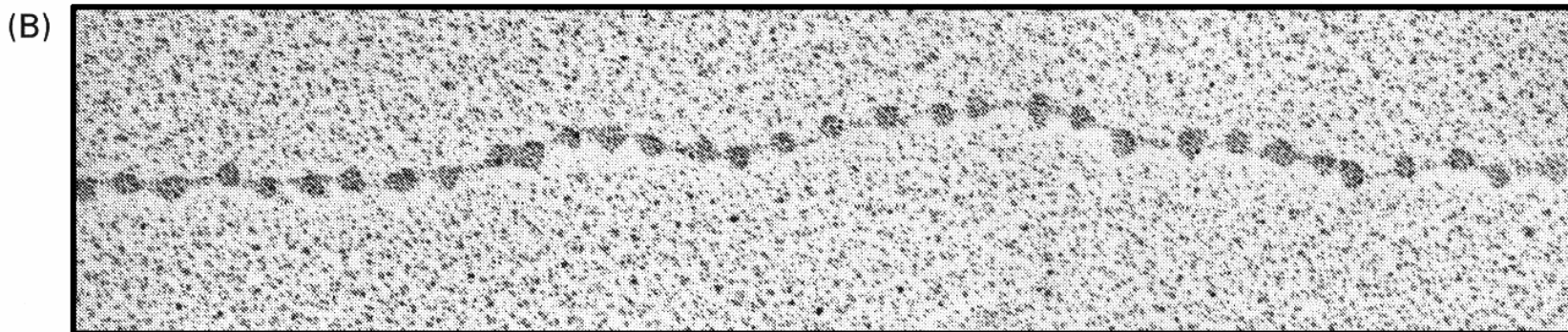
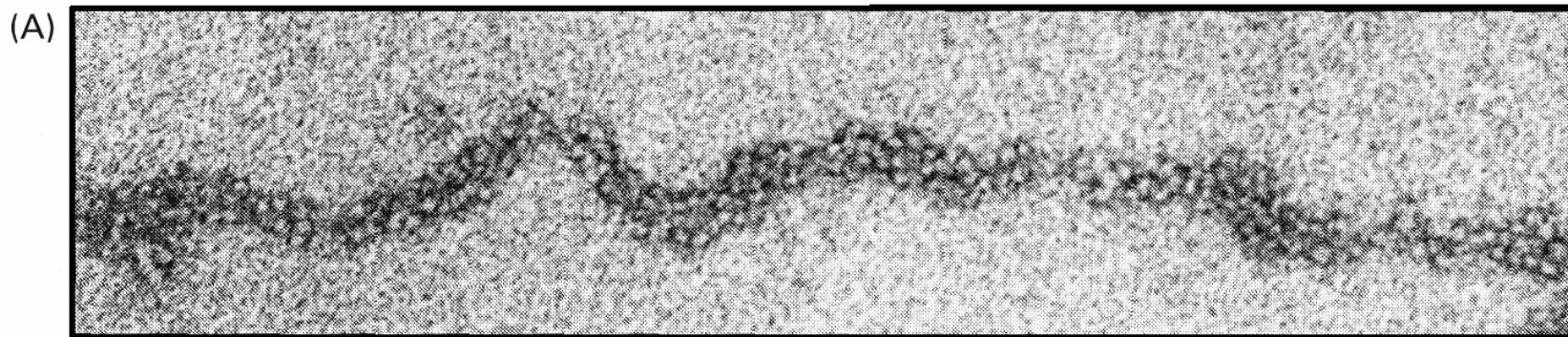


# Тонкая организация нуклеосомы



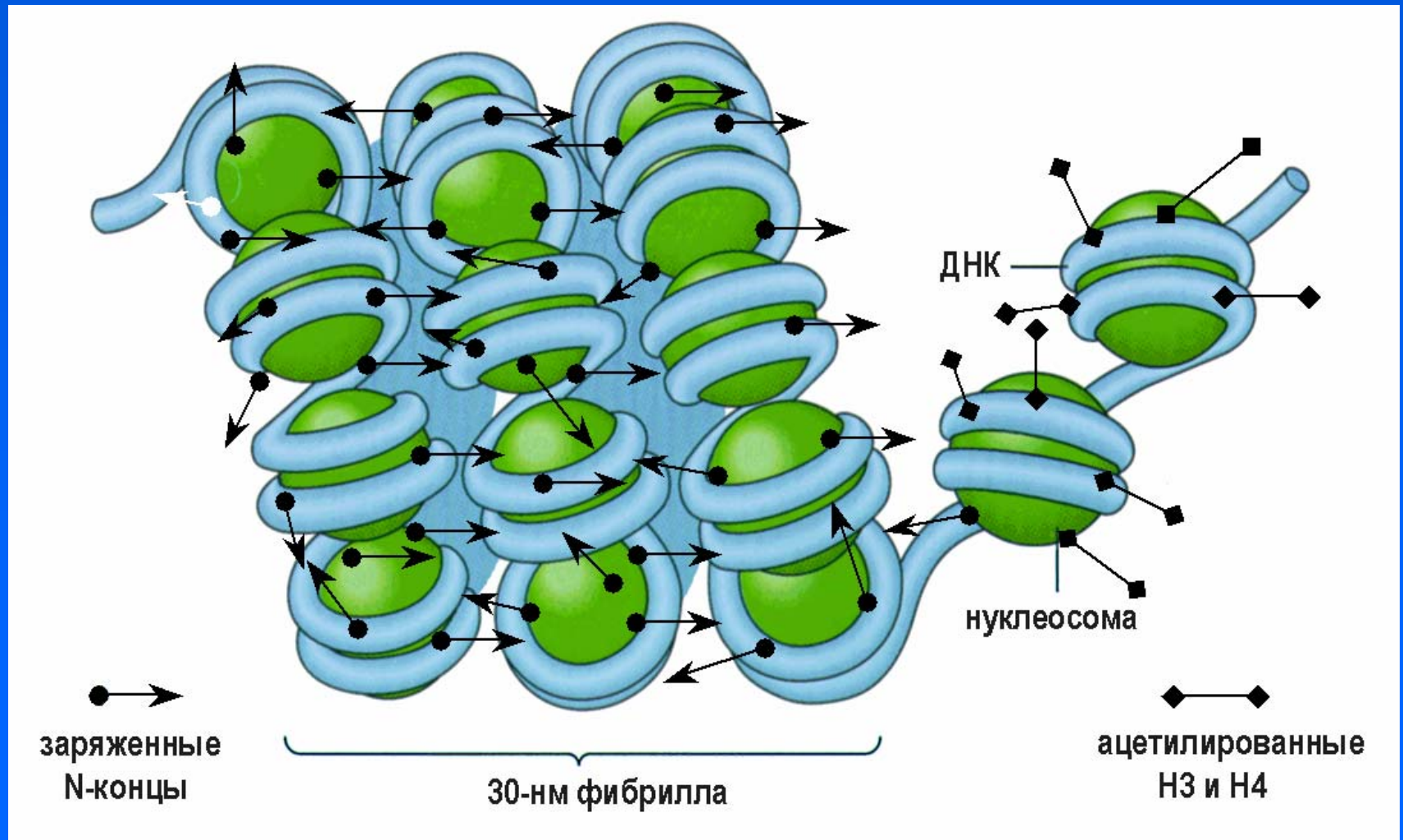


# Структура хроматиновой фибриллы



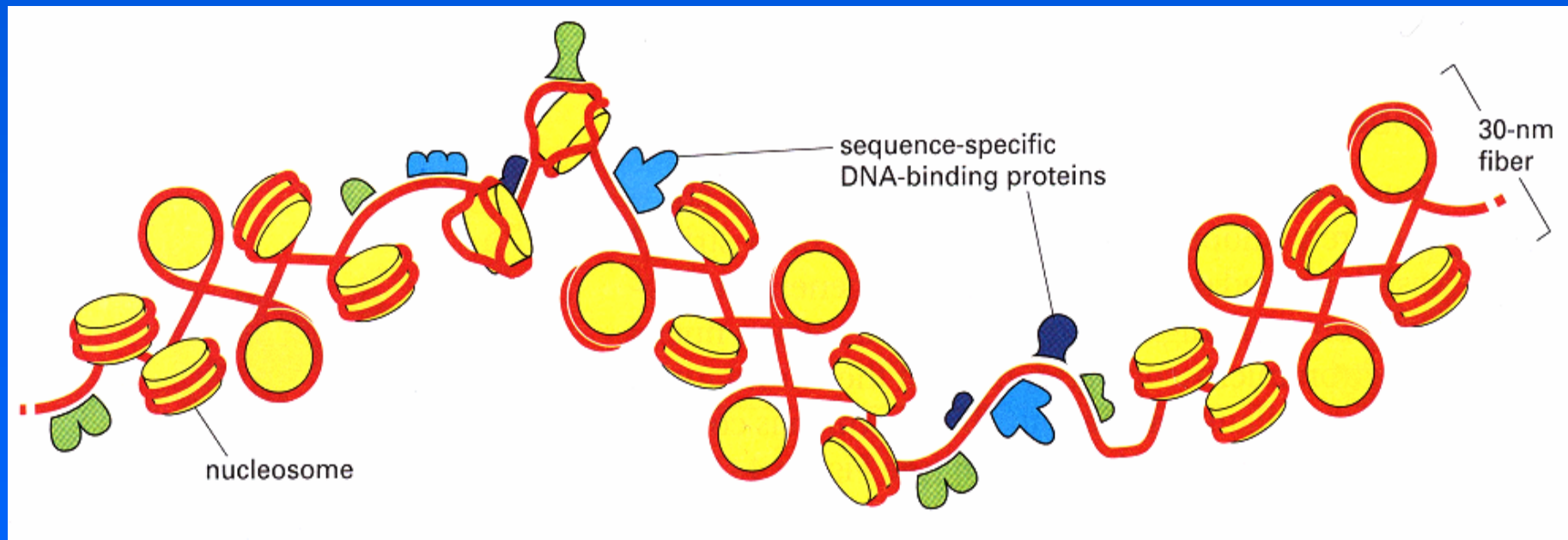
100 nm

# Ацетилирование гистонов определяет структуру хроматиновой фибриллы





# Нарушение структуры хроматиновой фибриллы транскрипционными факторами



Транскрипционные факторы взаимодействуют с ДНК при разрушении 30-нм фибриллы, и, нередко, нуклеосомной организации хроматина. Этому способствует ацетилирование гистонов.

# Транскрипция

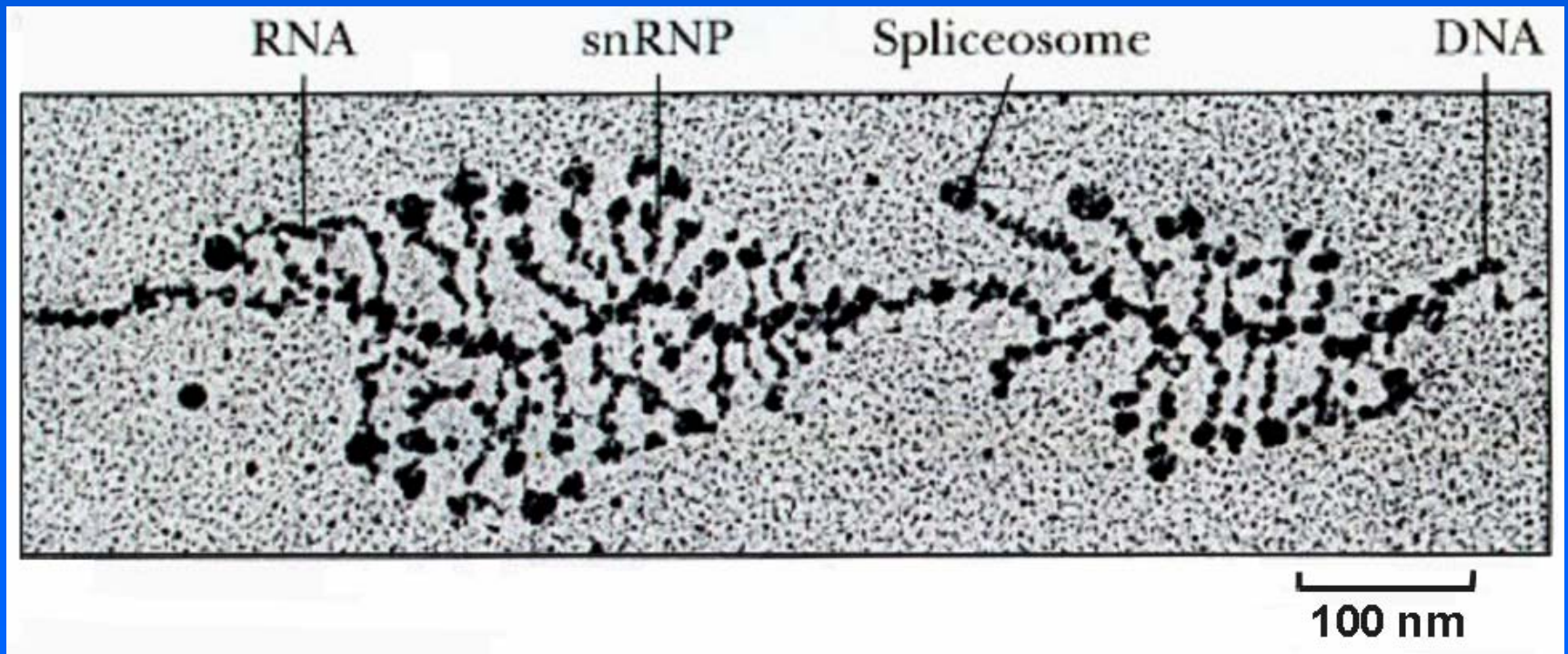
Транскрипция происходит в интерфазном ядре и подавляется во время деления клетки (митоза).

Пространственная организация транскрипции: ядрышко (рибосомные РНК), хроматин (остальные виды РНК).

Транскрипционные «фабрики» - комплексы, состоящие из РНК-полимеразы и других белков, участвующих в расплетании ДНК и формировании конечной молекулы РНК.

Активная транскрипция связана с деконденсацией хроматина вследствие ацетилирования гистонов.

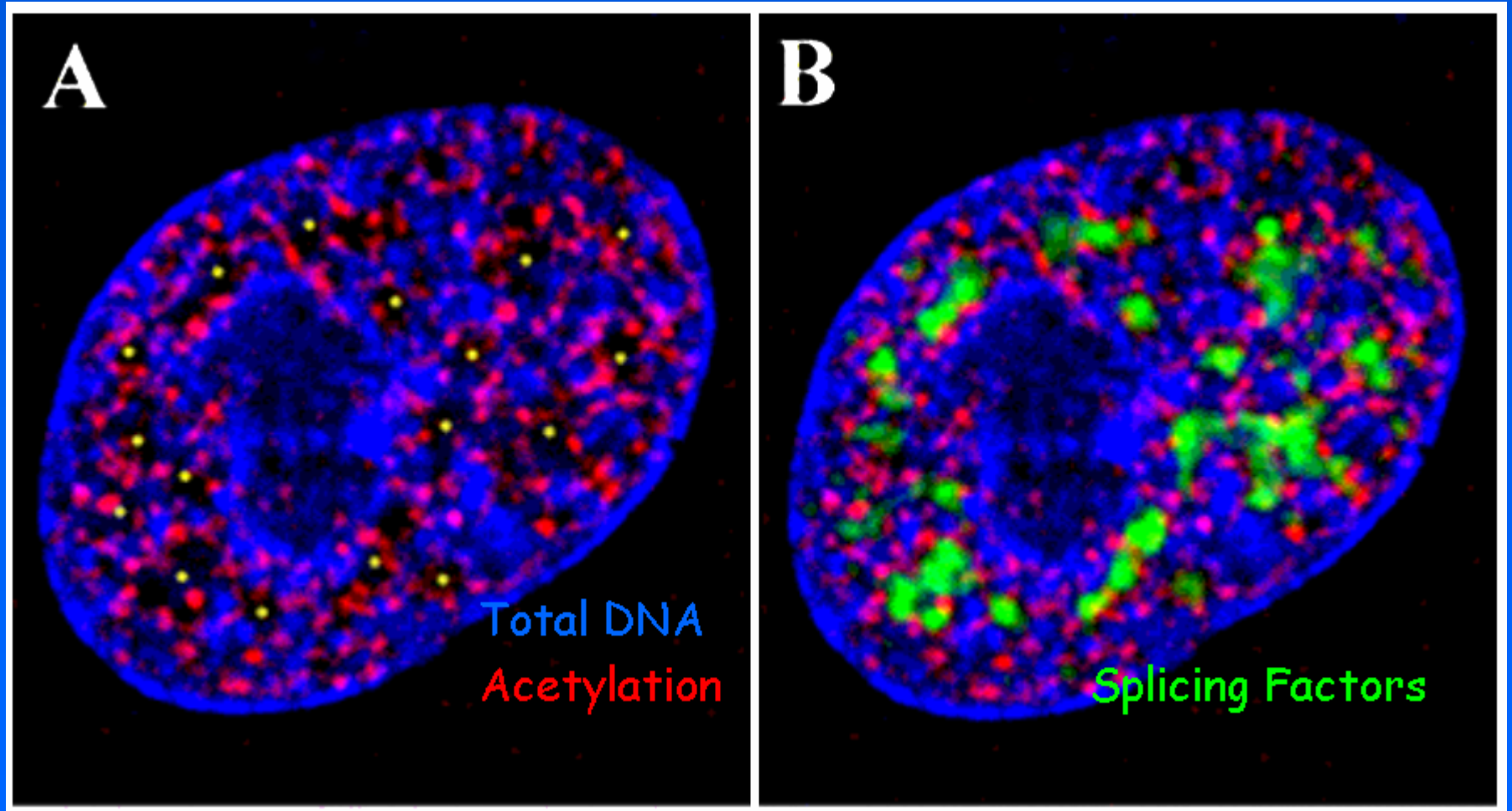
# Формирование и-РНК в ядре эукариот



**ЭМ, оттенение металлом**



# Ацетилированные гистоны и факторы сплайсинга в ядре



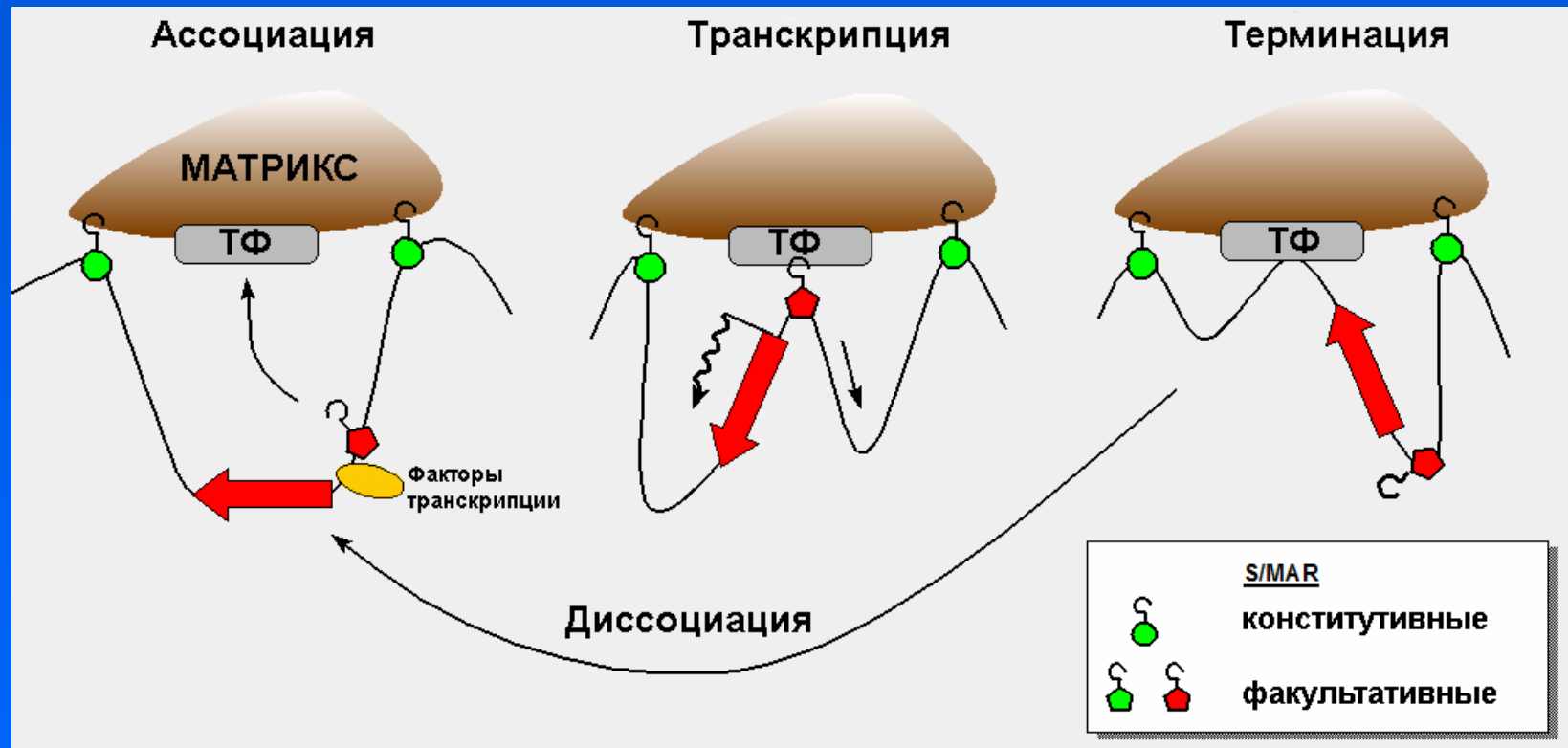
# Функциональная неоднородность хромосом

Неоднородность хромосом доказывается различной частотой мутаций (разрывов) и неслучайными рекомбинациями (перестановками).

**S/MAR** – scaffold/matrix associated regions – АТ-богатые участки ДНК длиной 300-1000 пар оснований, которые взаимодействуют с матриксом только во время транскрипции и обеспечивают узнавание больших кластеров ДНК-полимеразой и др. ферментами.

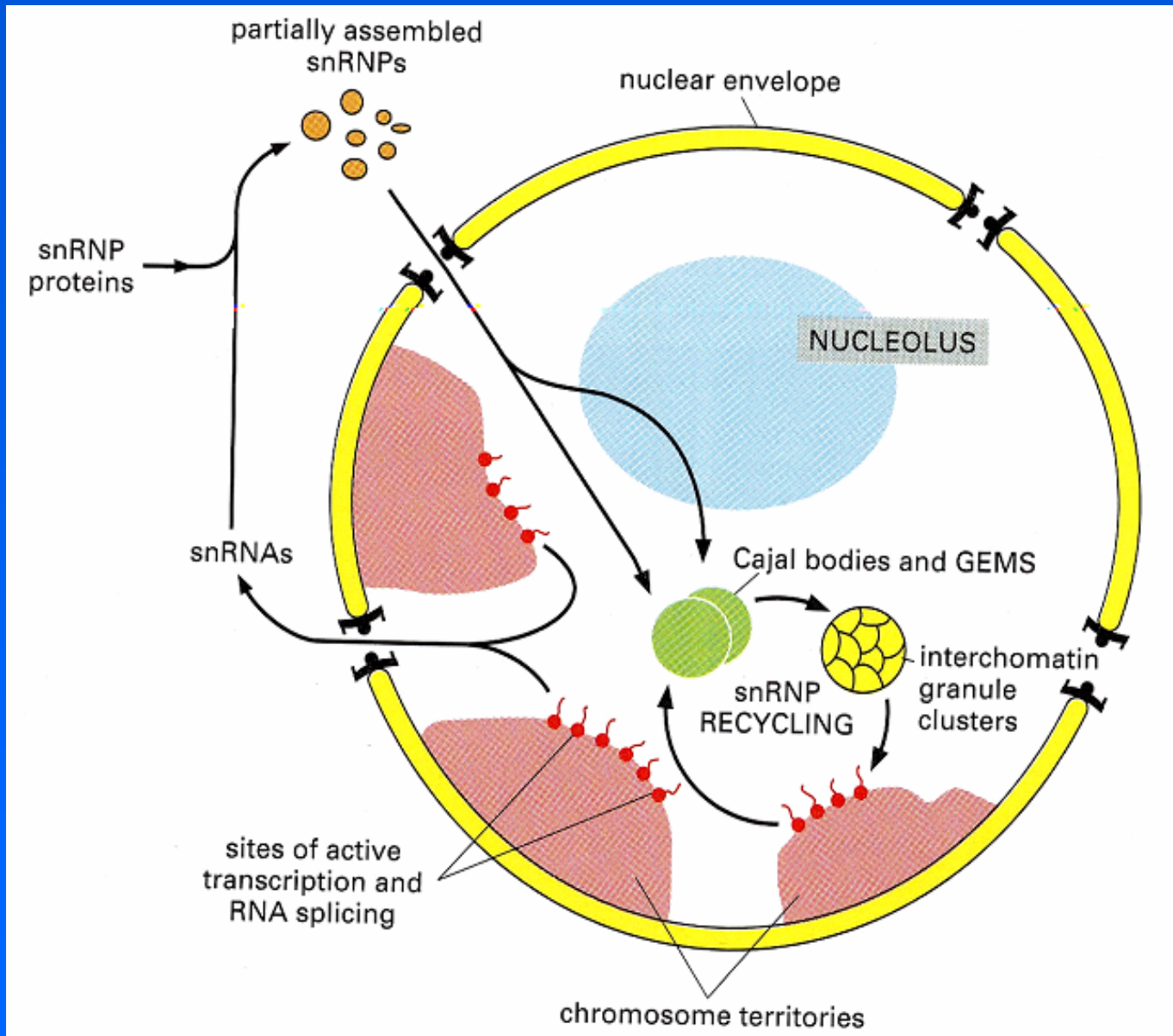
Боковые петли между участками S/MAR имеют, вероятно, длину около 100 кБ.

# Взаимодействие хроматина и матрикса

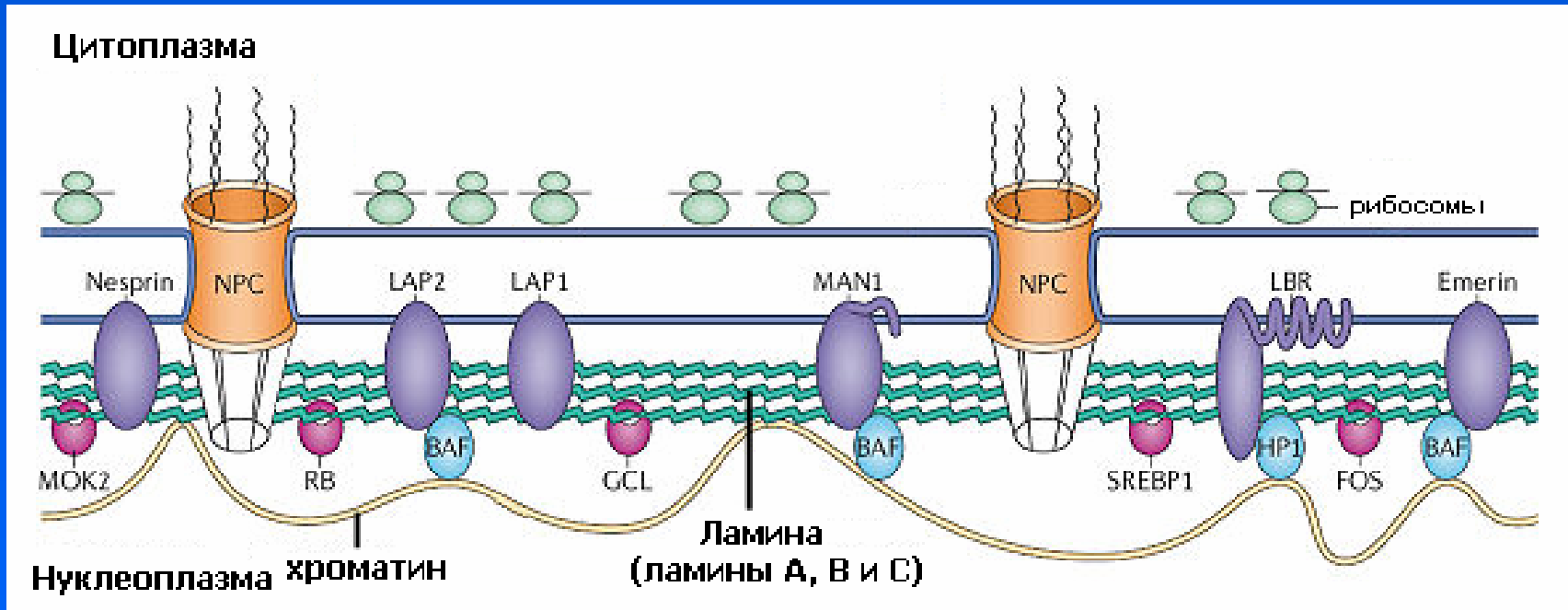


Вероятно, большинство SAR и MAR – одни и те же участки ДНК, взаимодействующие с матриксом, но идентифицированные разными методами.

# Цикл малых ядерных РНК



# Ядерная оболочка



## Состав ядерной оболочки:

наружная и внутренняя ядерные мембраны; ядерные поровые комплексы; ядерная ламина (толщина - 30-100 нм); белки, взаимодействующие с внутренней мембраной, ламиной и хроматином.



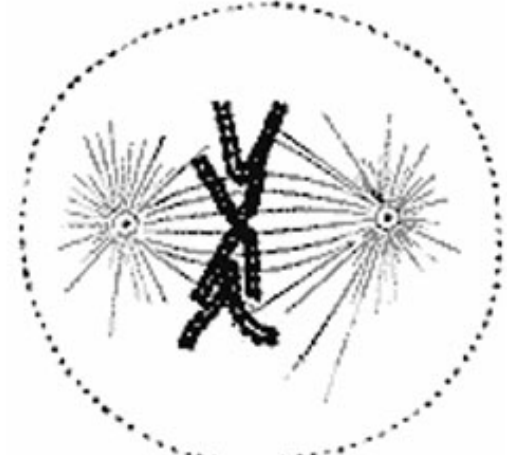
# Фазы митоза – схема



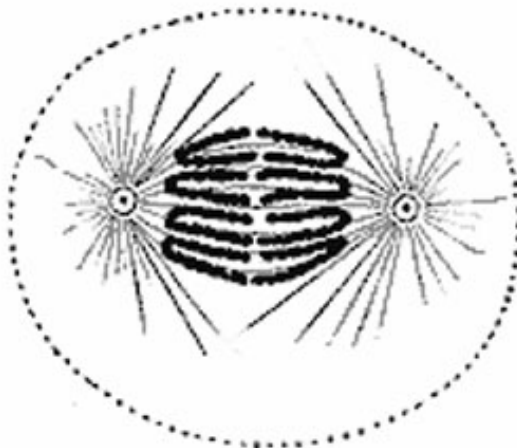
профаза



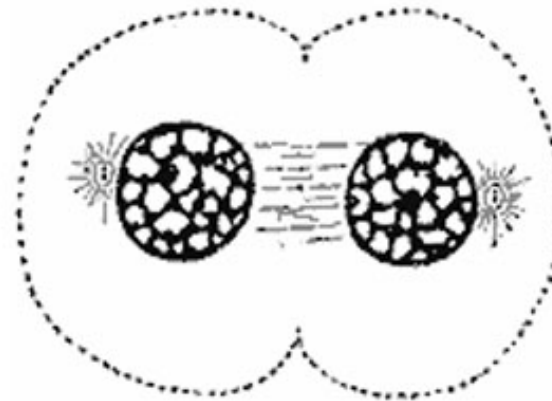
прометафаза



метафаза

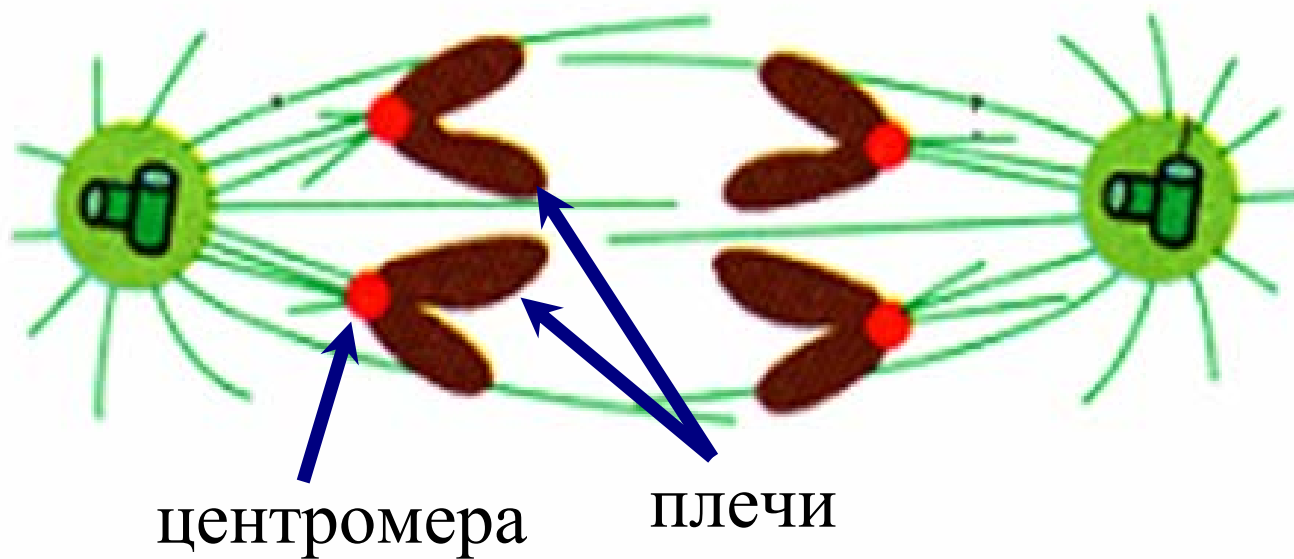


анафаза



телофаза

# Хромосомы при делении клетки



# Хромосома и хроматида

Сестринские хромосомы не идентичны (материнская и отцовская). Они вместе образуют диплоидный набор. Половые клетки содержат гаплоидный набор (в два раза меньшее число хромосом).

Перед делением происходит удвоение ДНК и всего хроматина. Возникает тетраплоидный набор.

Каждая хромосома в метафазе состоит из двух хроматид (две идентичных молекулы ДНК).

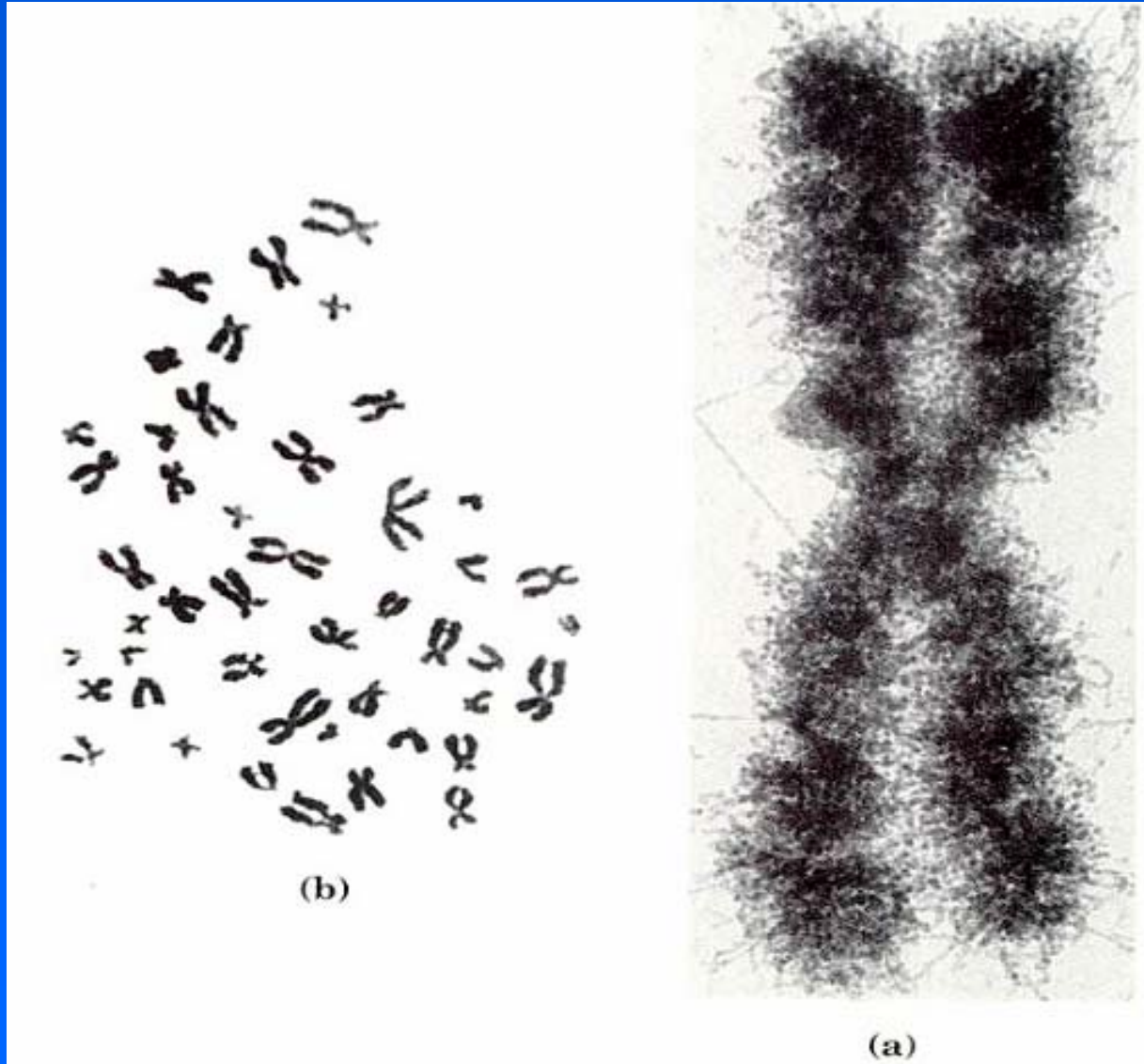
К полюсам во время митоза расходятся одиночные хроматиды – восстанавливается диплоидный набор молекул ДНК.

# Выявление хромосом

Хромосомы обособляются как отдельные структуры во время деления (митоза) и в некоторых специализированных клетках в интерфазе (политенные хромосомы слюнных желез насекомых). В это время они выявляются при различных методах наблюдения и окраски препаратов и могут быть механически выделены из клеток (т.н. хромосомные препараты).

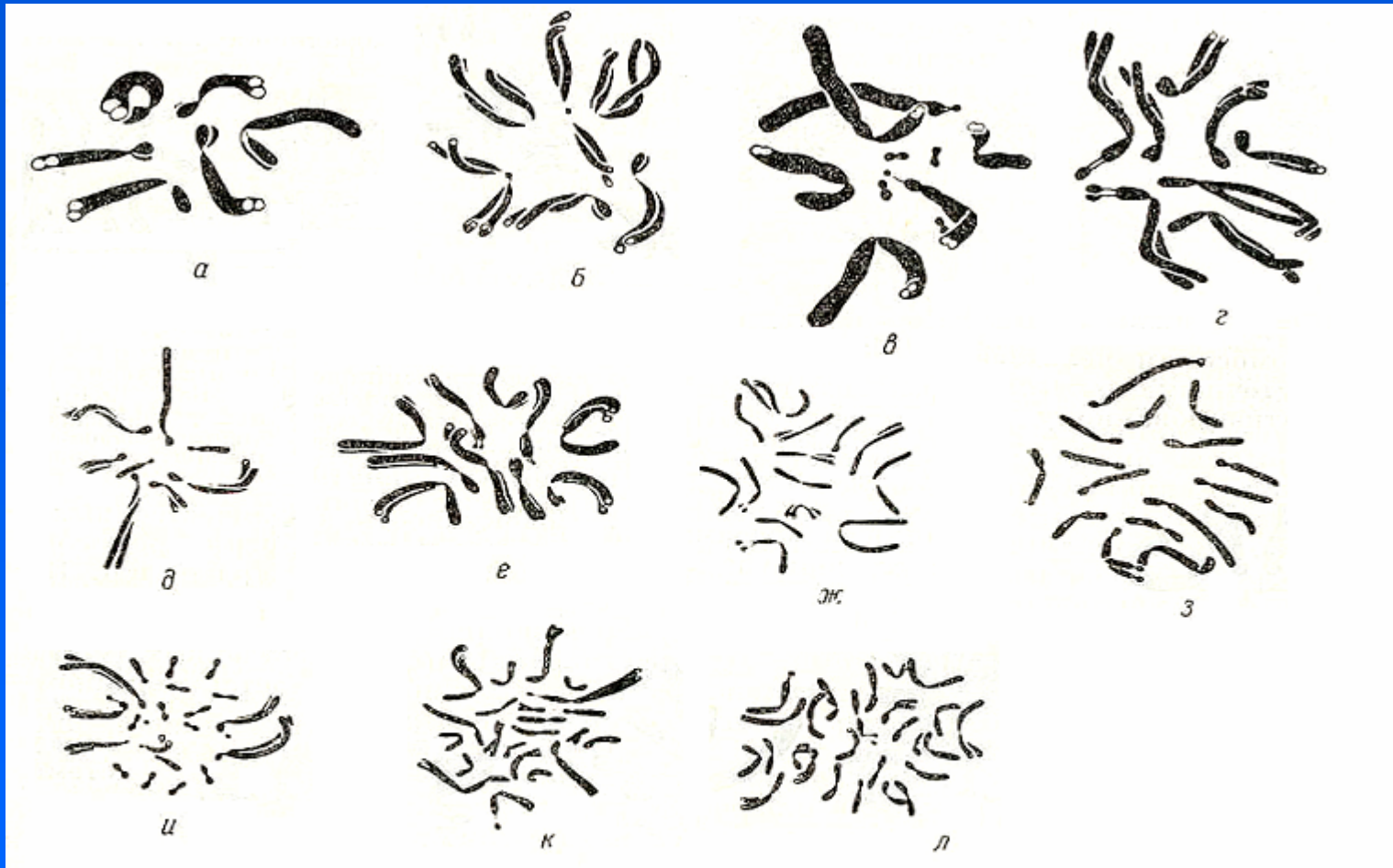
В большинстве интерфазных клеток отдельные хромосомы увидеть нельзя, они выявляются только при специальных методах флюоресцентной окраски и компьютерной обработки (синтеза) изображений.

# Кариотип и структура хромосомы





# Хромосомы растений рода *Crocus*



Митотические хромосомы из клеток корешков видов рода *Crocus*. 3700x. (по Mather, 1932).

*a* - *C. aucheri*,  $2n=6$ ; *б* - *C. graveolens*,  $2n=6$ ; *в* - *C. hyemalis*,  $2n=6+4$ ; *г* - *C. aureus*,  $2n=8$ ;  
*д* - *C. zonatus*,  $2n=8$ ; *е* - *C. stellaris*,  $2n=10$ ; *ж* - *C. huefelianus*,  $2n=14$ ; *з* - *C. hadriaticus*,  $2n=16$ ;  
*и* - *C. karduchorum*,  $2n=20$ ; *к* - *C. corsicus*,  $2n=22$ ; *л* - *C. imperati*,  $2n=26$

# Дифференциальная окраска хромосом

Принцип – дифференциальная деконденсация хромосом в гипотоническом растворе и частичный протеолиз.

Результат – гетерогенная окраска (поперечная исчерченность).

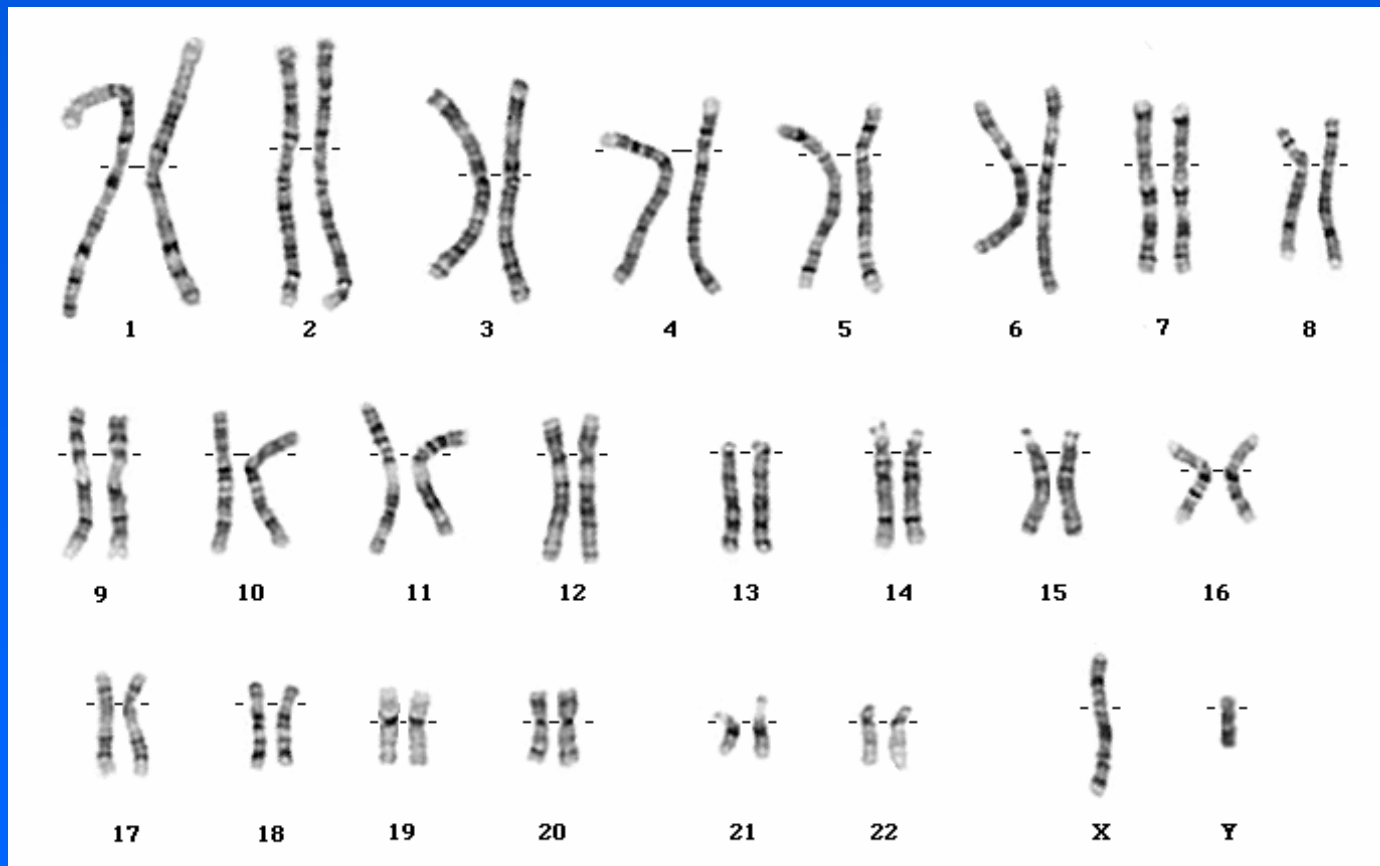
G-бенды (сегменты) – богатые генами участки.

R-бенды (сегменты) – центромерные районы.

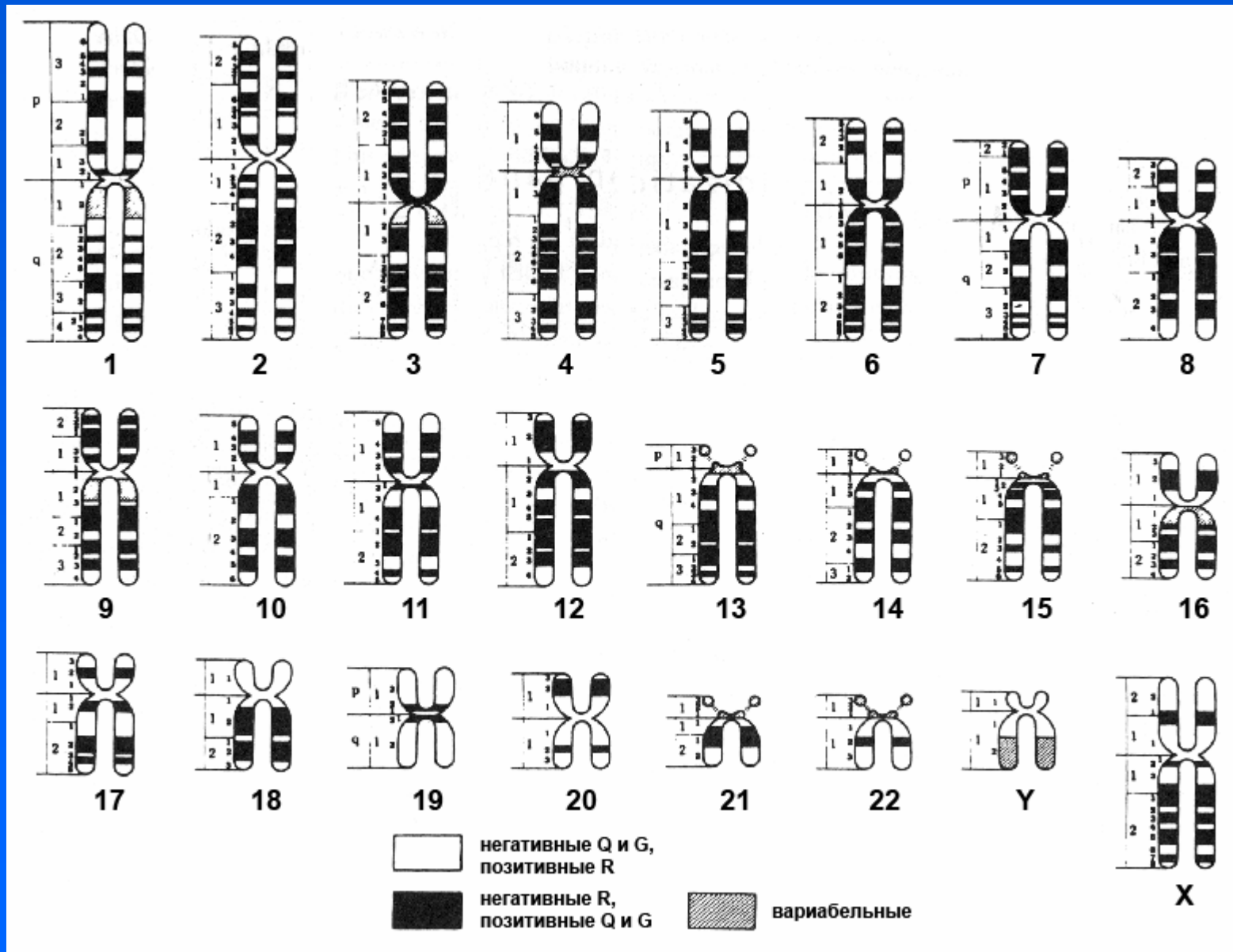
Номенклатура: p – короткое плечо, q – длинное плечо.

Пример: 14p31 – 14-я хромосома, короткое плечо, 31 сегмент (считается от центромеры).

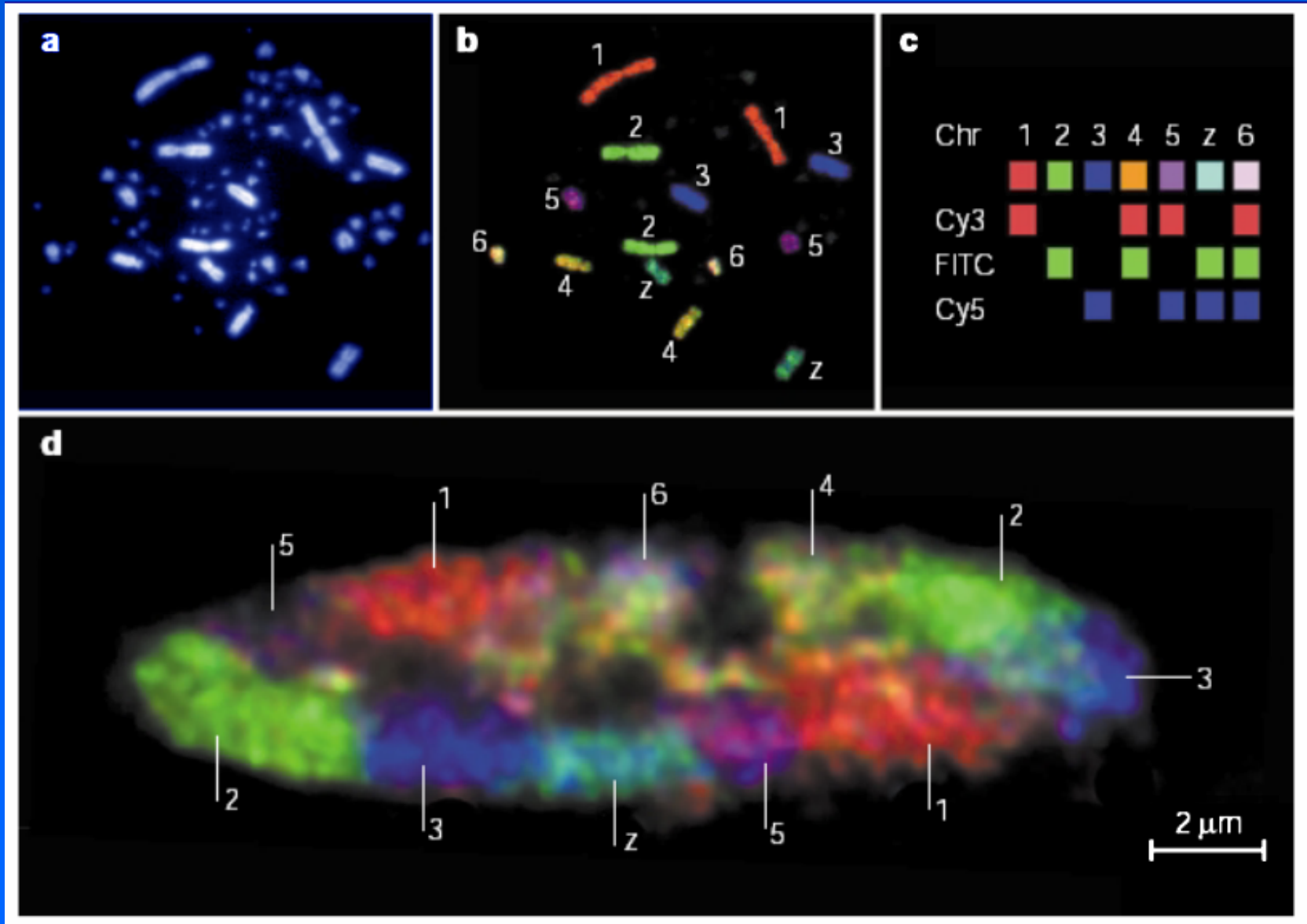
# Хромосомы человека, дифференциальная окраска



# Кариотип человека - таблица

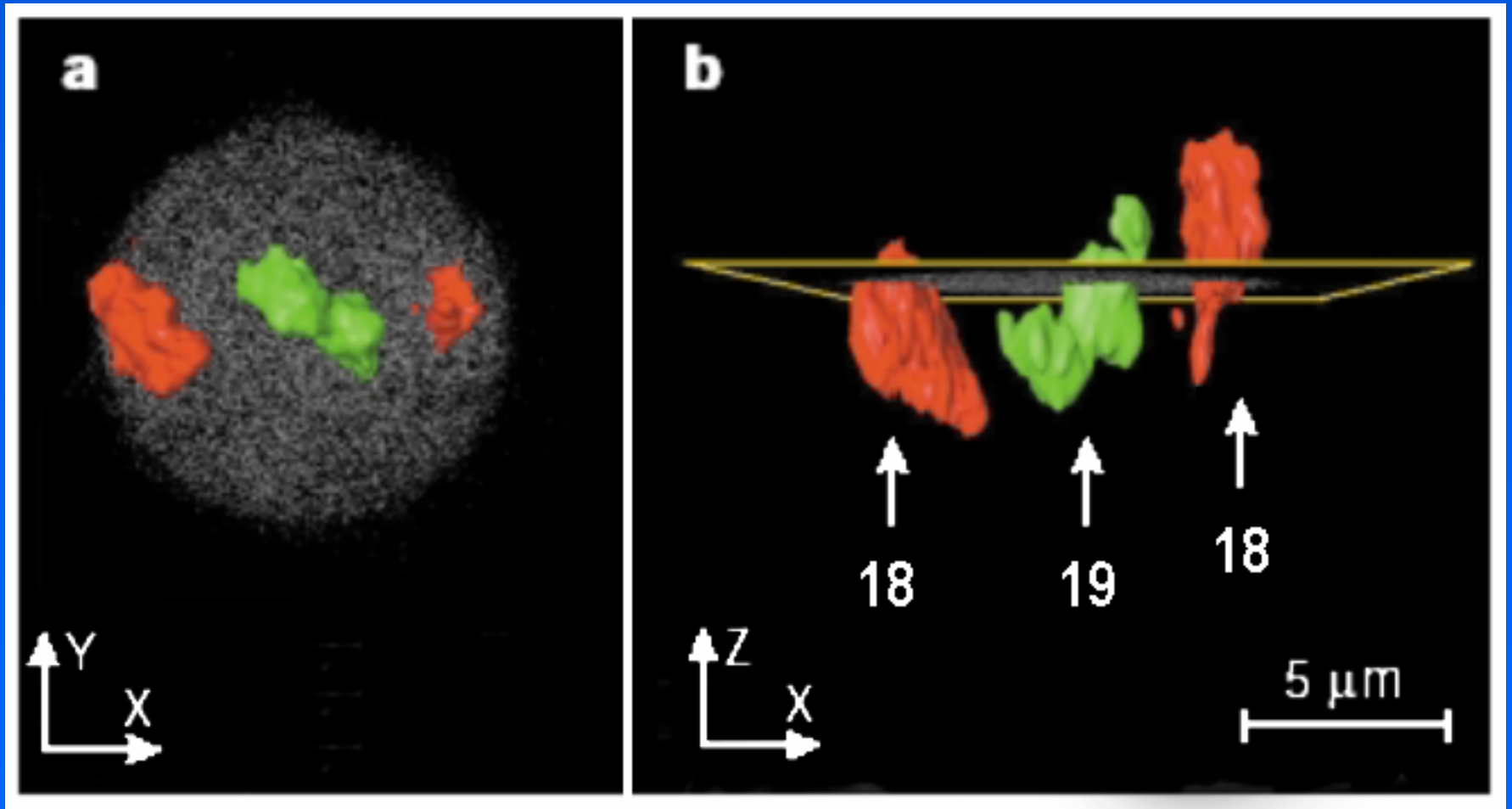


# Хромосомные территории в ядре

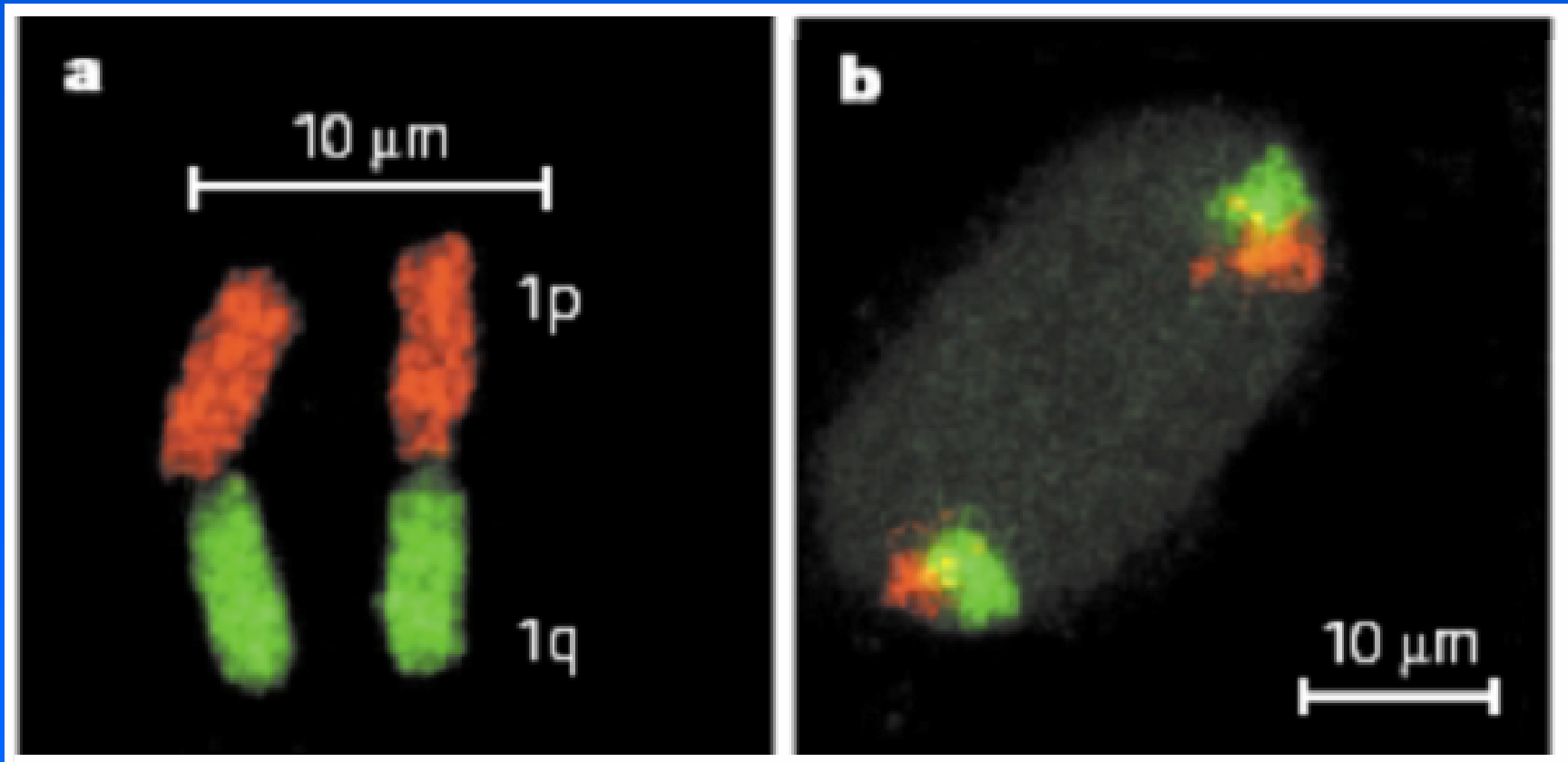




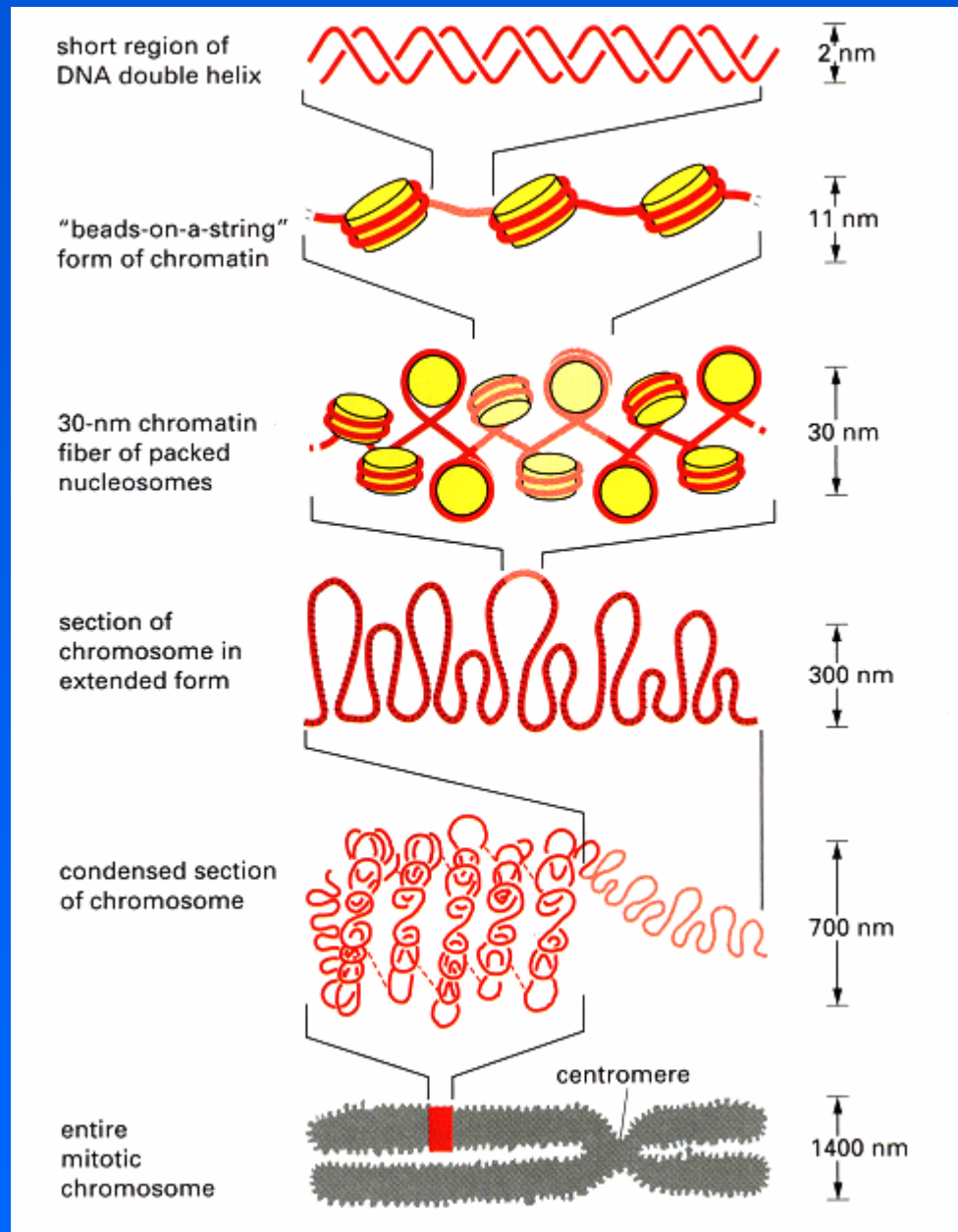
# 18 и 19 хромосомы в ядре лимфоцита человека



**Плечи хромосом также занимают в интерфазном ядре определенные территории**



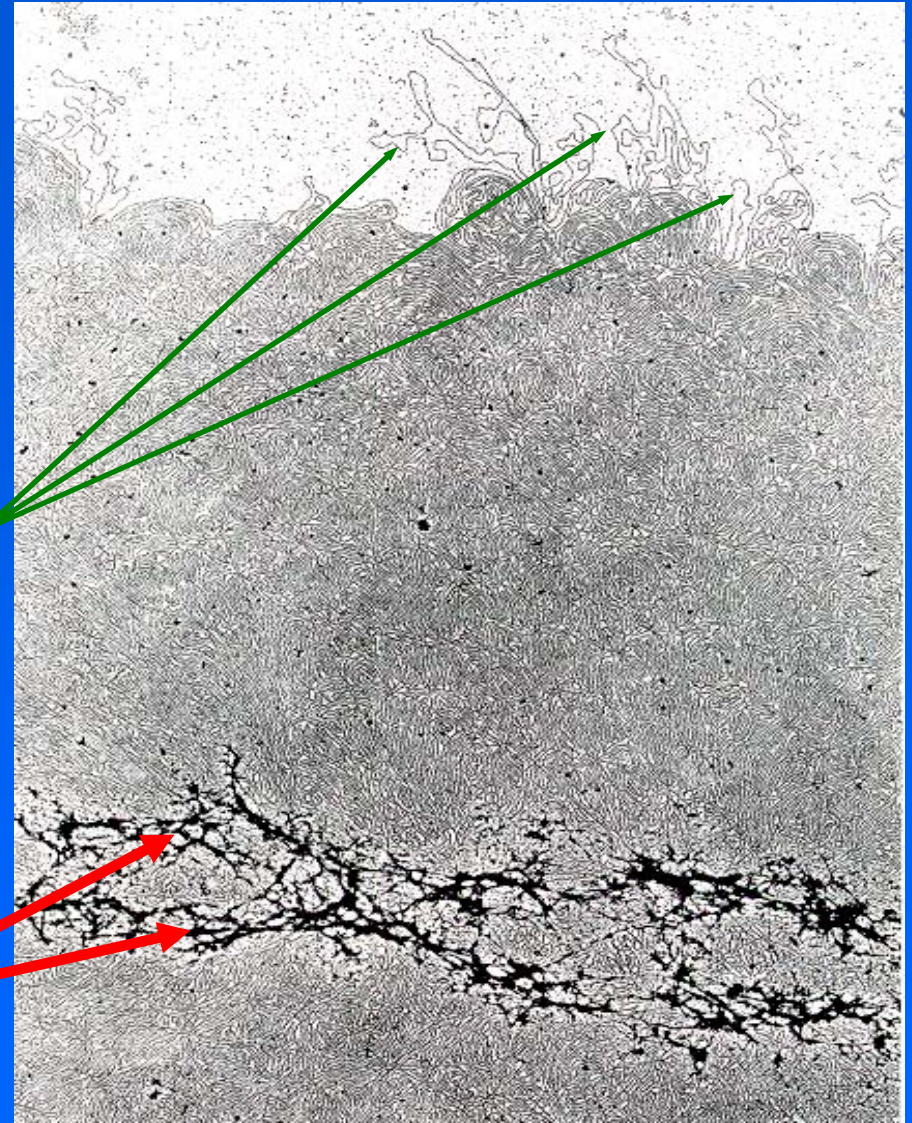
**В митотической  
хромосоме ДНК  
с помощью  
специальных  
белков  
упакована в  
10000 раз**



**Осевые структуры  
частично  
депротеинизированной  
хромосомы (scaffold)**

**Петли ДНК  
(около 100 кб)**

**Белковая «ось»  
хромосомы:  
топоизомераза II и  
др. белки**



# Структурные белки хромосом (когезины и конденсины)

**Smc-белки (structural maintenance of chromosomes) – консервативные белки, связывающиеся с ДНК при участии АТФ.**

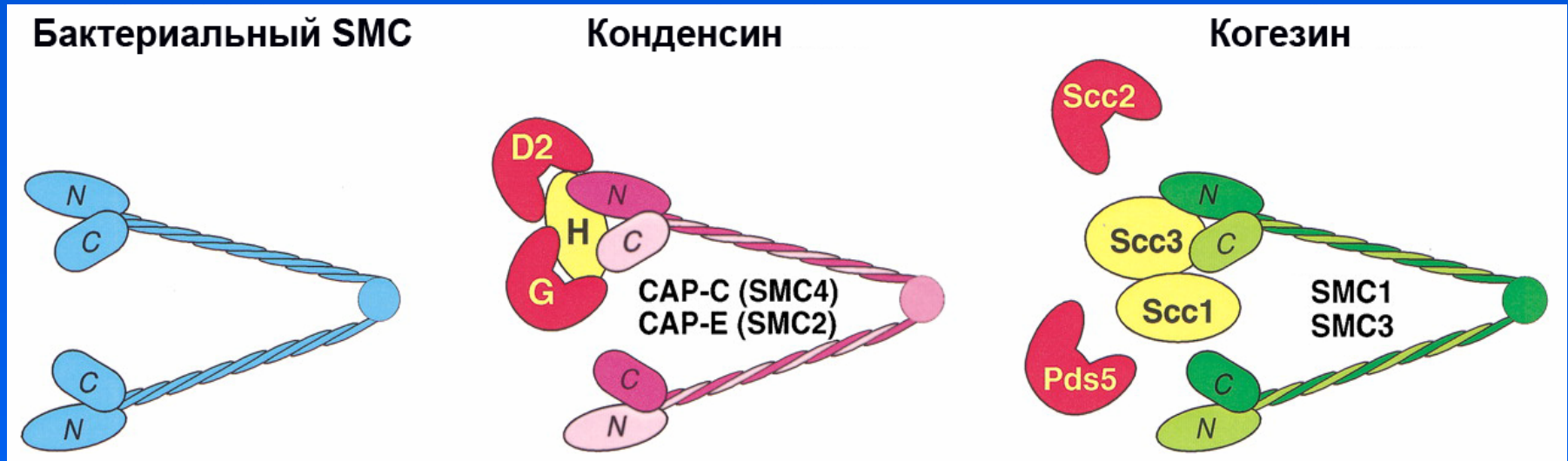
**Каждый Smc-белок имеет два удаленных центра связывания ДНК.**

**Прокариоты – один Smc-белок.**

**Эукариоты – шесть Smc-белков (три пары).**



# Структурные белки хромосом



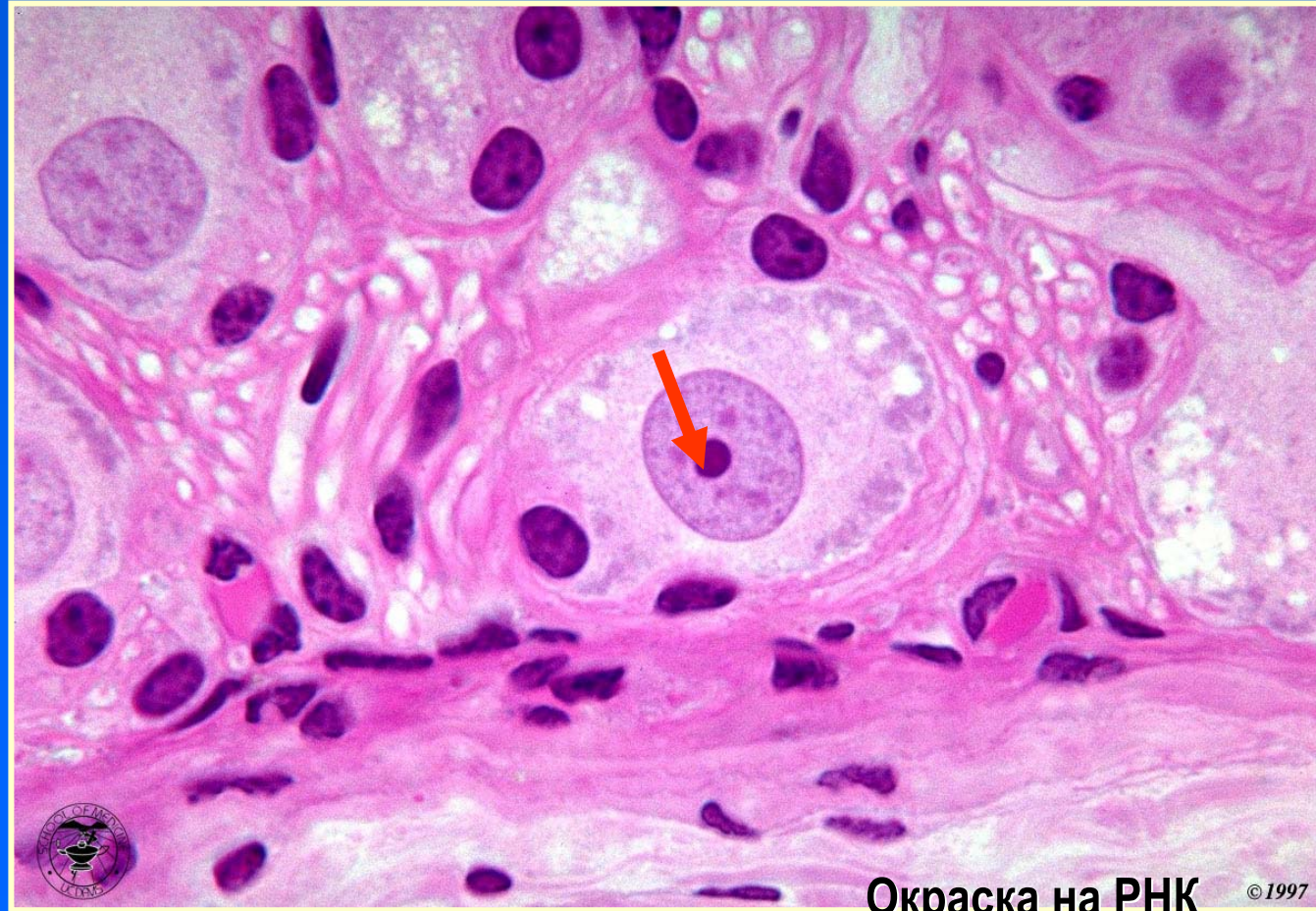
**SMC1+SMC3 – часть когезинового комплекса  
(интерфаза)**

**SMC2+SMC4 – часть конденсинового комплекса  
(митоз)**

**SMC5+SMC6 – репаративный комплекс (интерфаза)**

# Ядрышко – наиболее заметная структура клеточного ядра

- 1774-81 - первое описание ядрышка (Fontana)
- 1836 - предложен термин "ядрышко" (G.Valentin)



Окраска на РНК © 1997

# Основная функция ядрышка

Биогенез большой и малой субъединиц рибосом: синтез основной рибосомной РНК, ее преобразования, пространственная укладка и связывание с белками.

Все белки, входящие в состав ядрышка, синтезируются в цитоплазме.

Активность ядрышка определяется общей интенсивностью синтеза белка.

# Основные характеристики ядрышка

Число в ядре – 1-5 (редко больше).

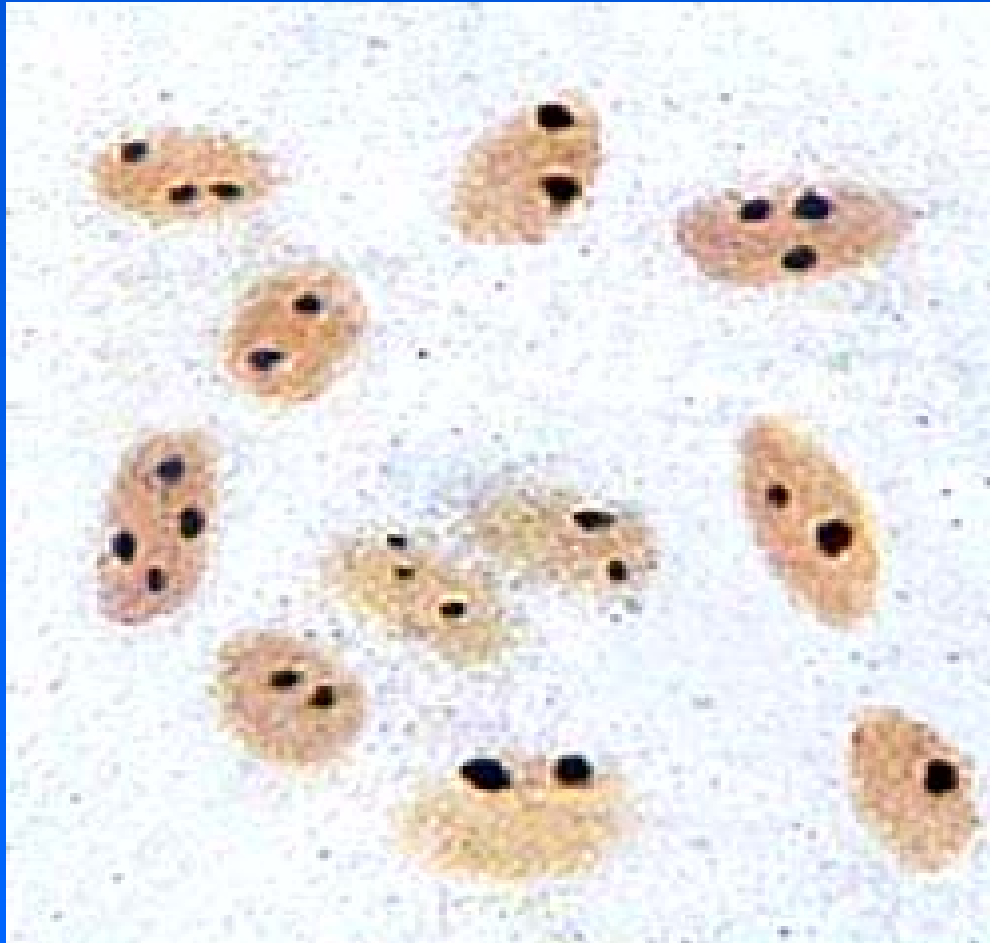
Размер – 0.5-5 мкм. Форма – чаще округлая.

Окружено хроматином (околоядрышковый хроматин)

Состав – РНК и белки (среднее отношение белок/РНК 8 : 1). Содержание ДНК мало.

Дифференциальная окраска – серебрение, окраска на РНК.

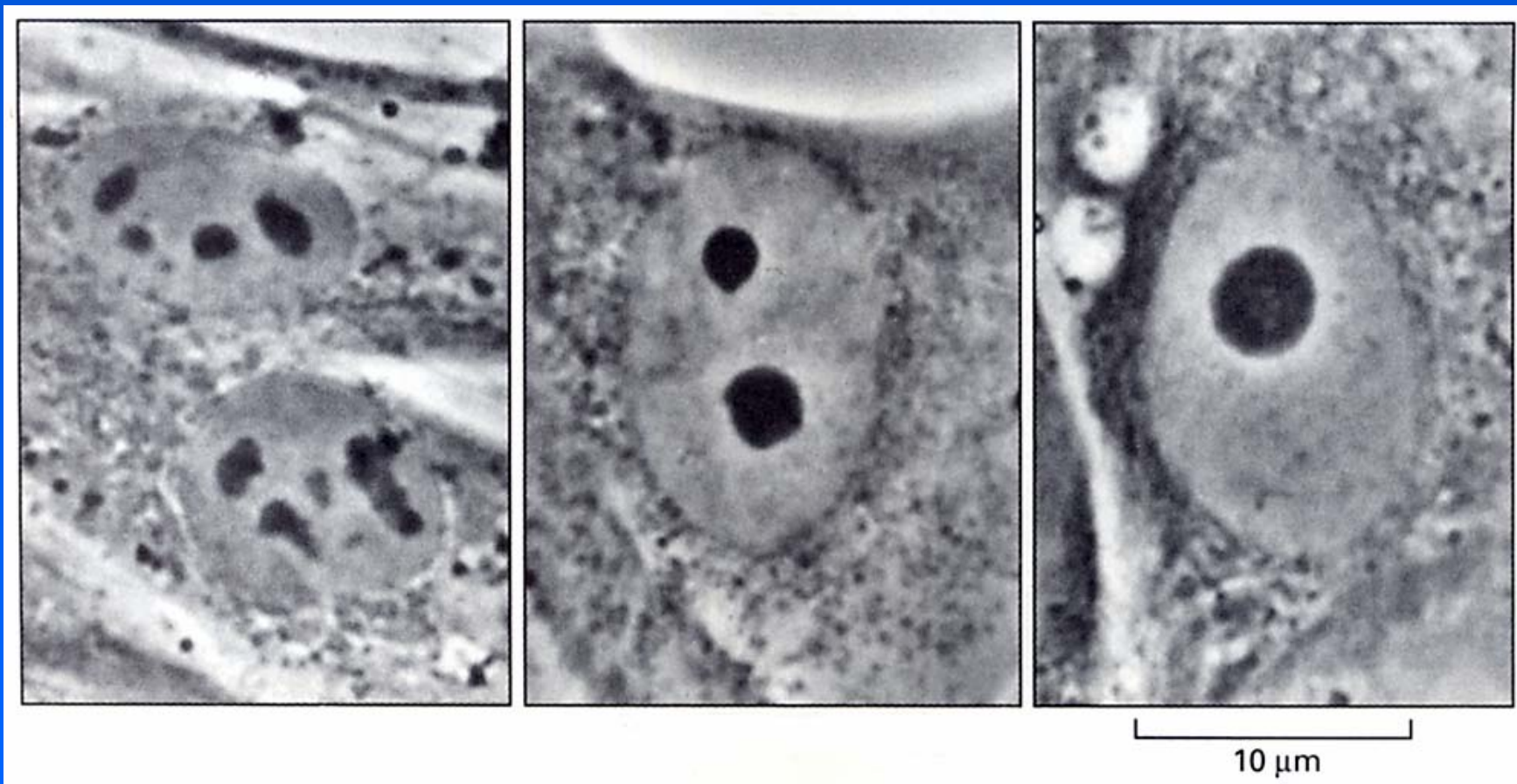
# Серебрение ядрышек



Число и размер ядрышек в клетках одной ткани непостоянны.



# Слияние ядрышек в живой клетке



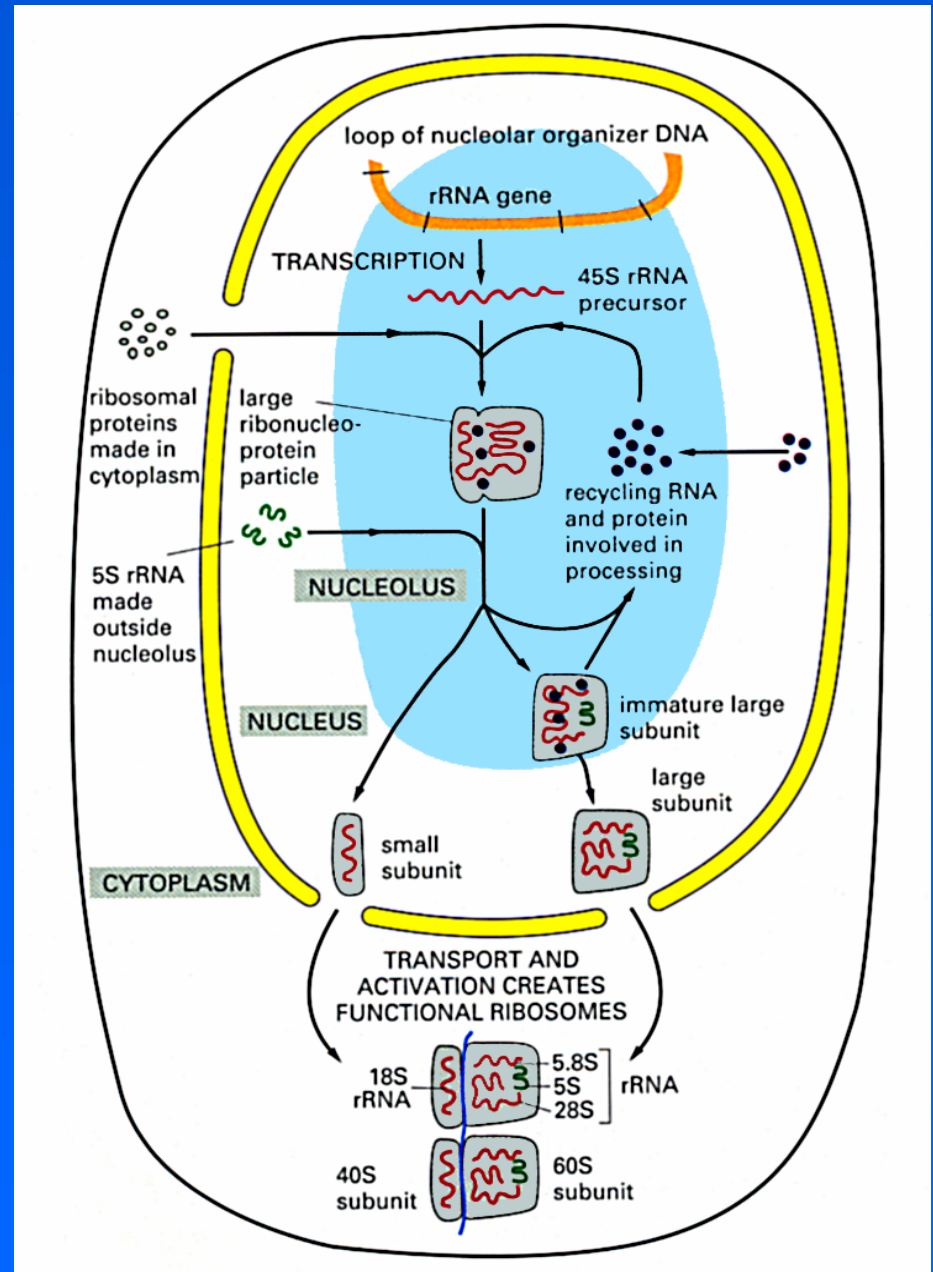
# **Лекция 4.**

## **Ядрышко**

**Ядерные поры и транспорт**

**Клеточные мембраны**

# Схема работы ядрышка



# Основные характеристики работы ядрышка

Включение предшественников РНК происходит постоянно. Переход РНК из фибриллярного компонента в гранулярный занимает около 20 мин. Выход рибосом в цитоплазму – 30 мин.

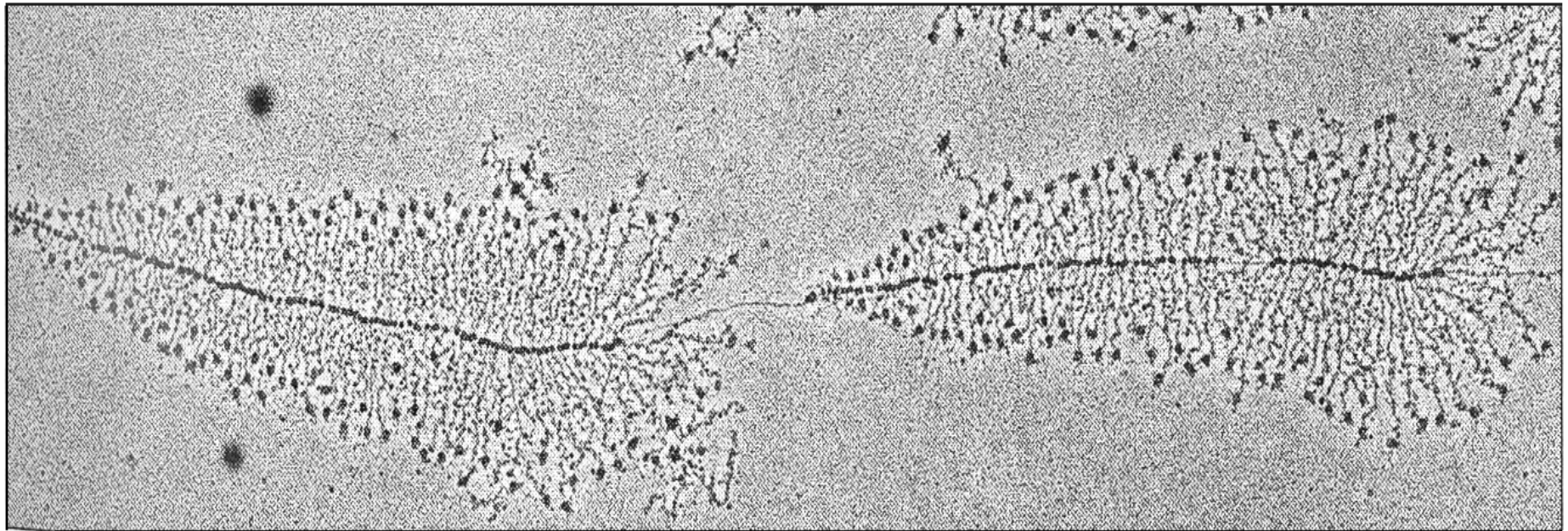
Число генов 45S РНК – 100-5000; 5S РНК – 200-10000  
45S РНК – длина 5,2 мкм; 80S частица РНП – прерибосома.

Специальные белки и малые РНК обеспечивают процессинг рРНК и формирование рибосомных субъединиц.

Продуктивность ядрышка – 1000-10000 рибосом в секунду.



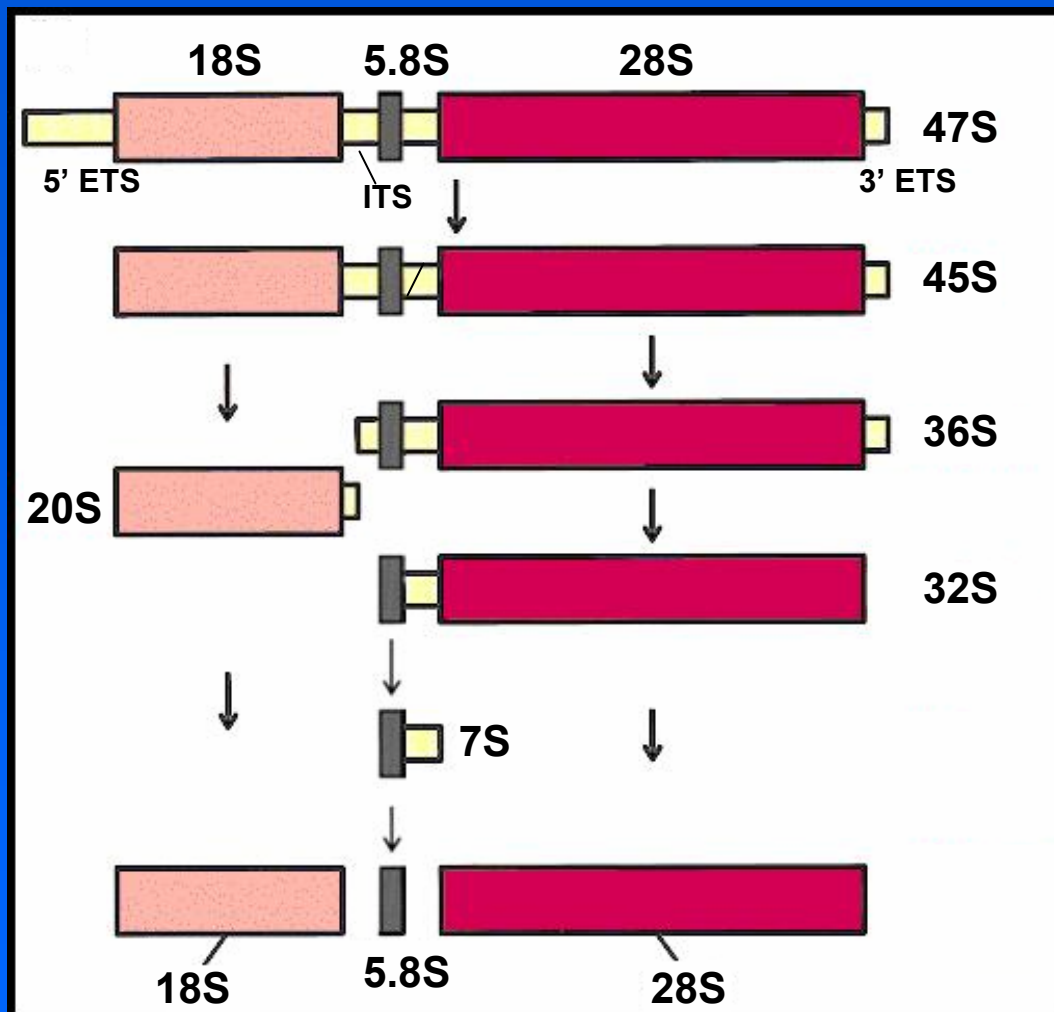
# Транскрипция рибосомных генов



1  $\mu\text{m}$



# Основные этапы процессинга рРНК



Процессинг приводит к образованию трех молекул рРНК из одного транскрипта

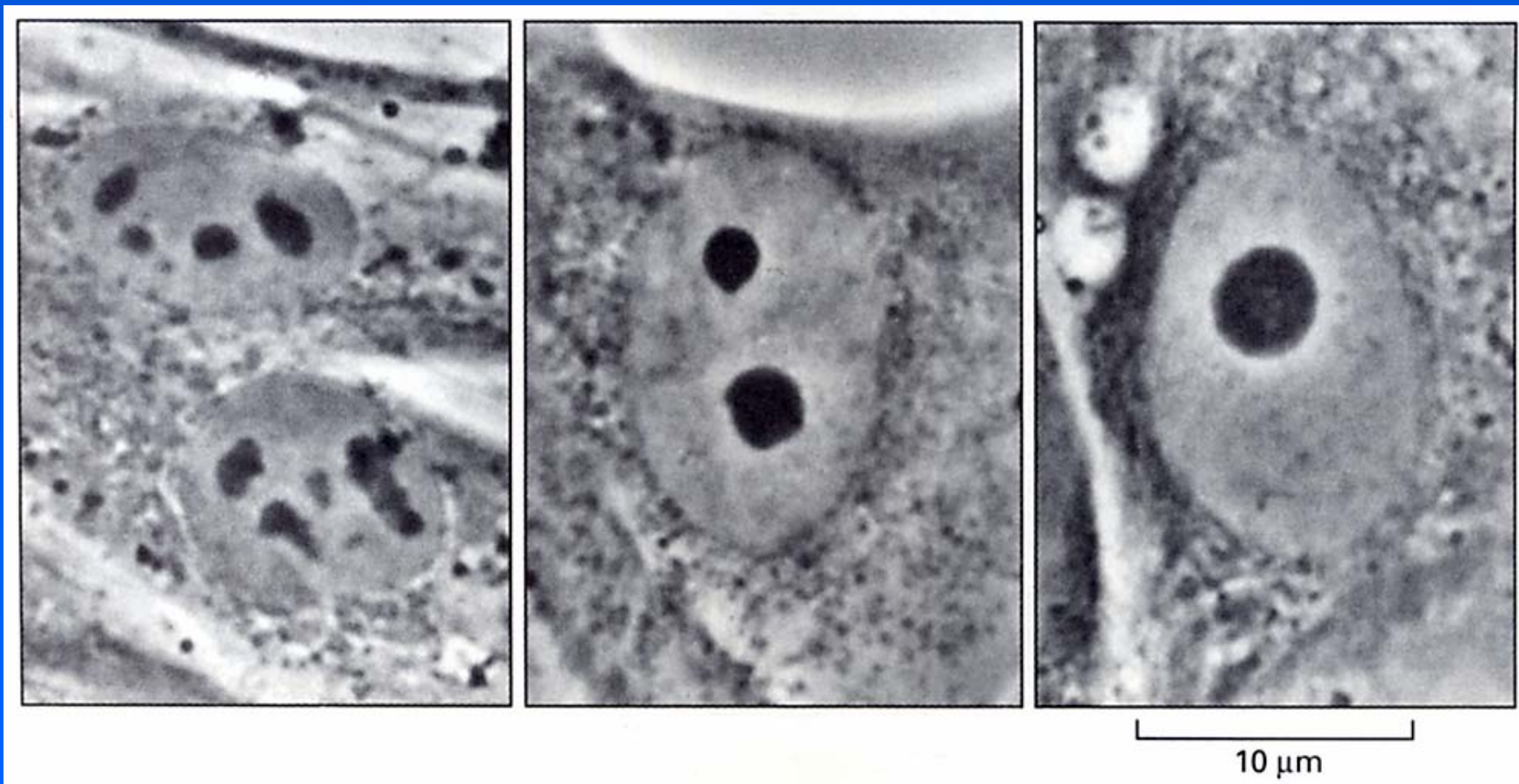
# Химический состав ядрышка

рДНК ~ 2 %

РНК – 5 – 14% (транскрипты рРНК на разных стадиях созревания, малые ядрышковые РНК)

Белки ~ 80-90%. В последние 10 лет идентифицировано более 6000 ядрышковых белков. Многие из них эволюционно консервативны. К основным относятся белки, участвующие в формировании рибосом (около 30%), некоторые факторы транскрипции, РНК-полимераза I и др. (В-23, нуклеофозмин, фибрилларин).

# Слияние ядрышек в живой клетке



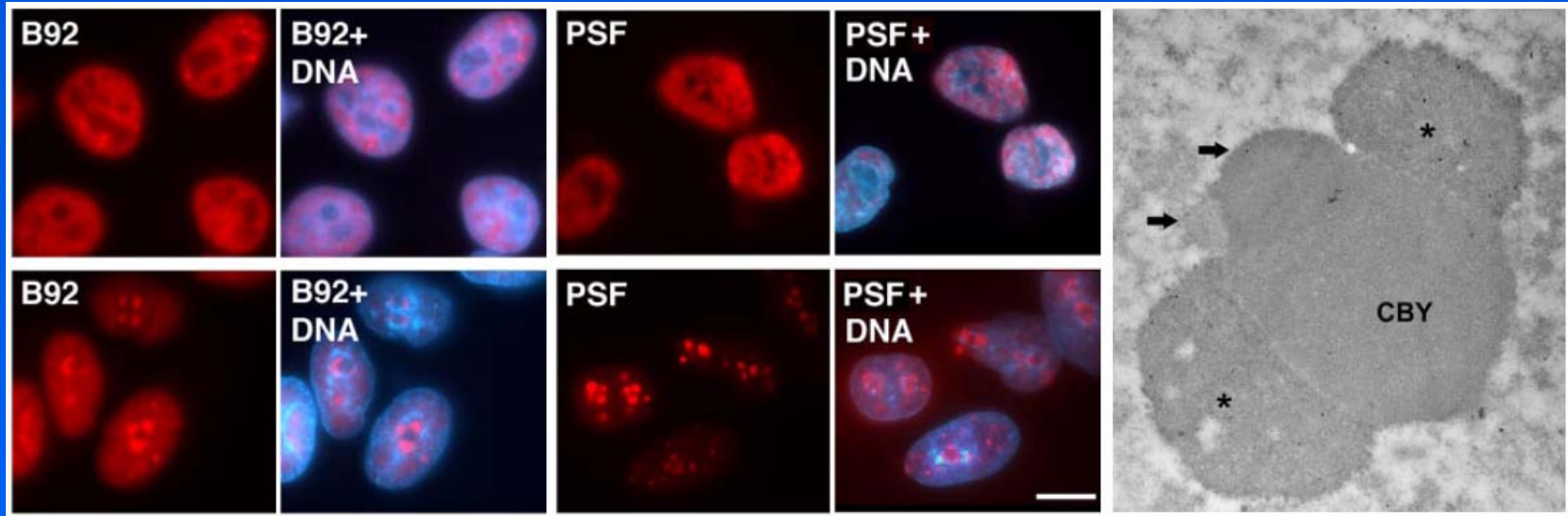
# Цикл ядрышка

**Интерфаза – функционирующее ядрышко. В митозе ядрышко деградирует и его компоненты входят в состав хромосом.**

**Начало деления (профаза) – постепенный распад ядрышка, его остатки собираются на ядрышковых организаторах (специализированные участки хромосом).**

**Выход из деления (переход от телофазы к интерфазе) – формирование предъядрышек на ядрышковых организаторах, затем, по мере инициации транскрипции, рост предъядрышек и их слияние.**

# Сегрегация ядрышка



Сегрегация ядрышка – процесс, происходящий при подавлении транскрипции. Он вызывается различными агентами (в частности, под действием актиноминацина Д) и часто знаменует раннюю стадию апоптоза. В норме сегрегация ядрышка происходит в начале деления.

При сегрегации исчезает фибриллярный компонент и происходит аккумуляция вокруг гранулярного компонента ядрышка ряда ядерных белков, которые в норме находятся в нуклеоплазме.



# Ядрышковый организатор

Ядрышковый организатор (ЯО) – участок ДНК, где последовательно располагаются много копий гена, на котором закодированы три рРНК (5.8S, 18S, 28S). В состав ЯО входят и некоторые другие гены ядрышковых белков.

ЯО – вторичная перетяжка на хромосоме. В интерфазе ЯО может быть активным или неактивным.

Число ядрышек меньше, чем число ЯО вследствие инактивации некоторых ЯО или из-за слияния ядрышек.

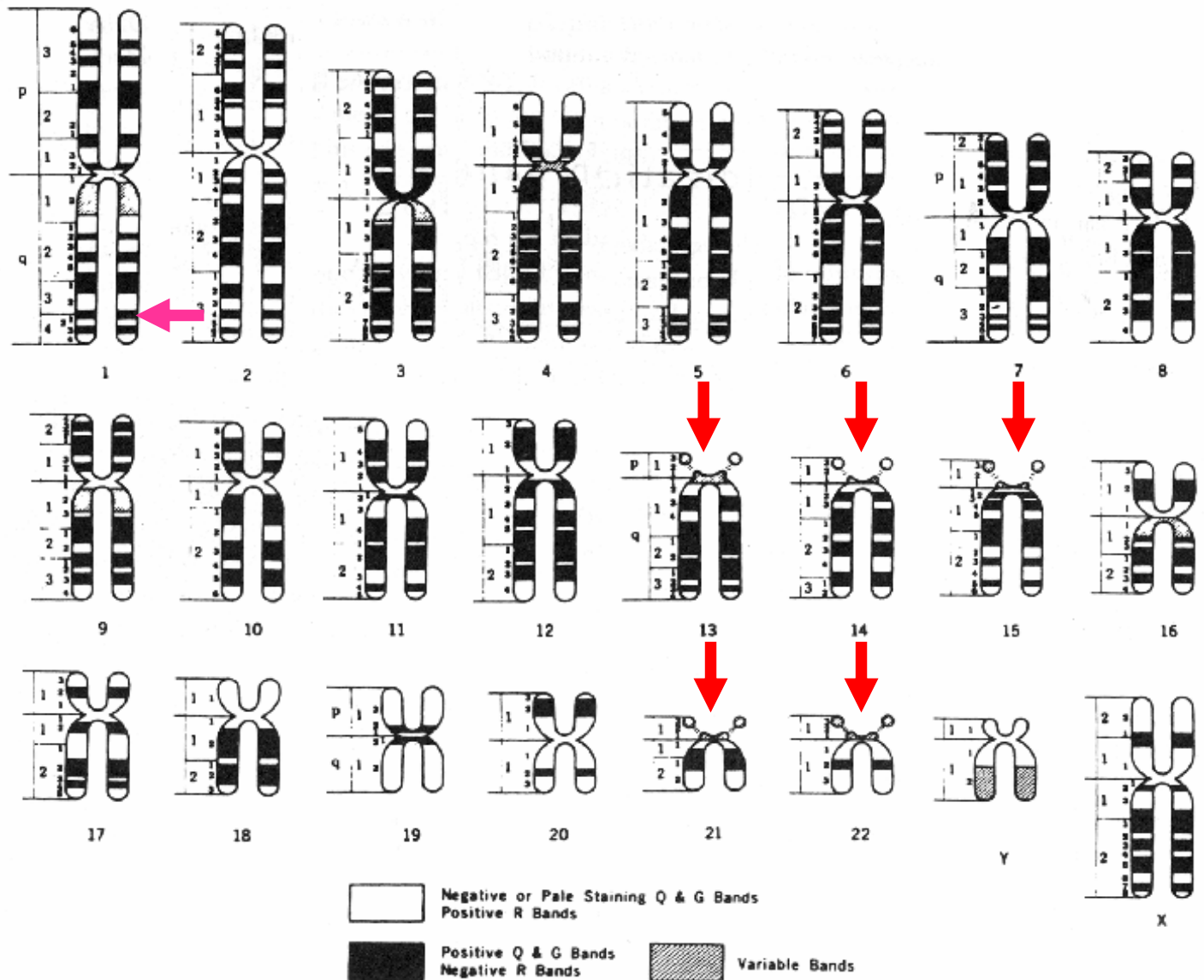
Некоторые белки ядрышка постоянно связаны с ЯО.

В оогенезе у некоторых организмов происходит амплификация ЯО – происходит многократное удвоение рибосомной ДНК и формируются внехромосомные ядрышки.

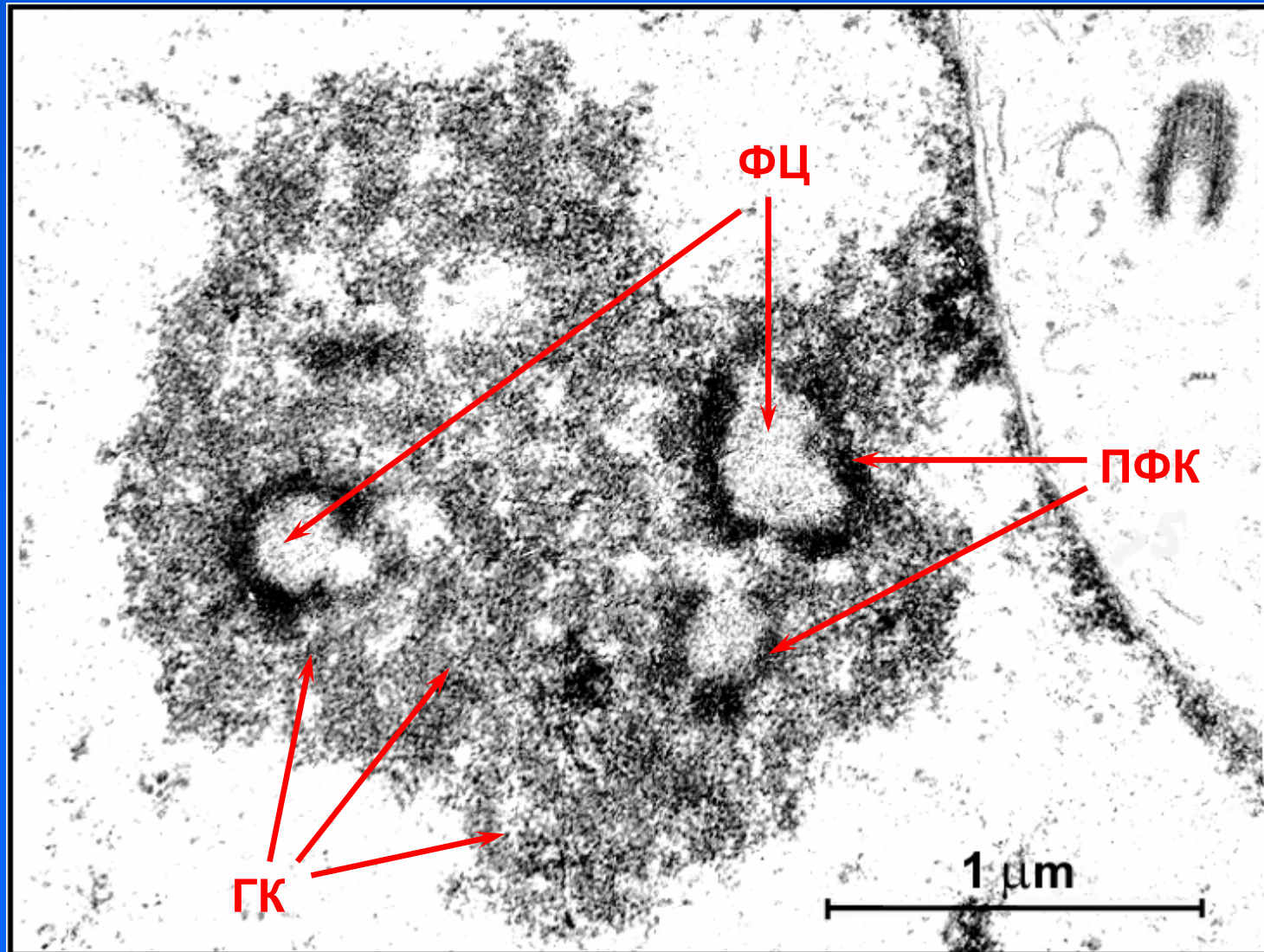
## Число ядрышковых организаторов (на гаплоидную клетку)

- Человек – 5 (13, 14, 15, 21 и 22 хромосомы)
- Мышь – 5-6 (12, 15, 16, 18, 19 хромосомы)
- Свинья – 2 (8 и 10 хромосомы)
- Курица – 1
- Шпорцевая лягушка (*X. laevis*) – 1
- Дрожжи (*S. cerevisiae*) – 1 (12 хромосома)

# Ядрышковые организаторы в хромосомах человека



# Ультраструктура ядрышка



# Компоненты ядрышка

Фибриллярный центр – имеет низкую электронную плотность, вероятно, содержит рДНК.

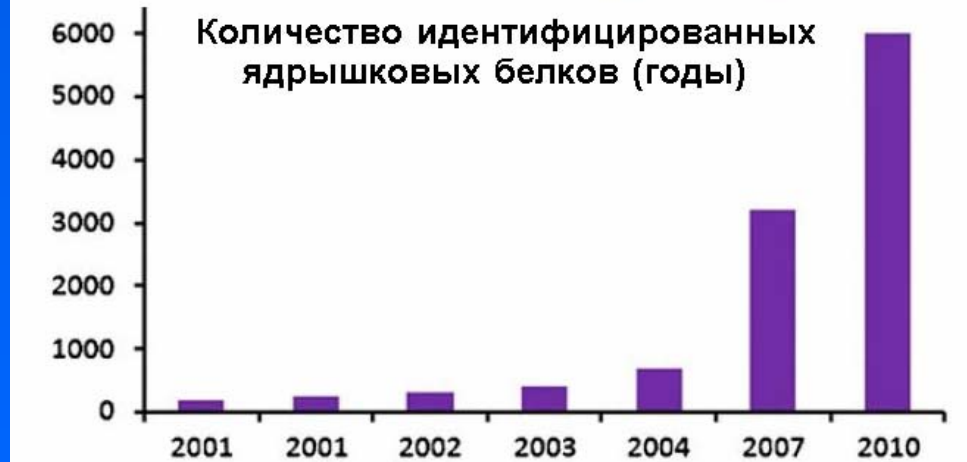
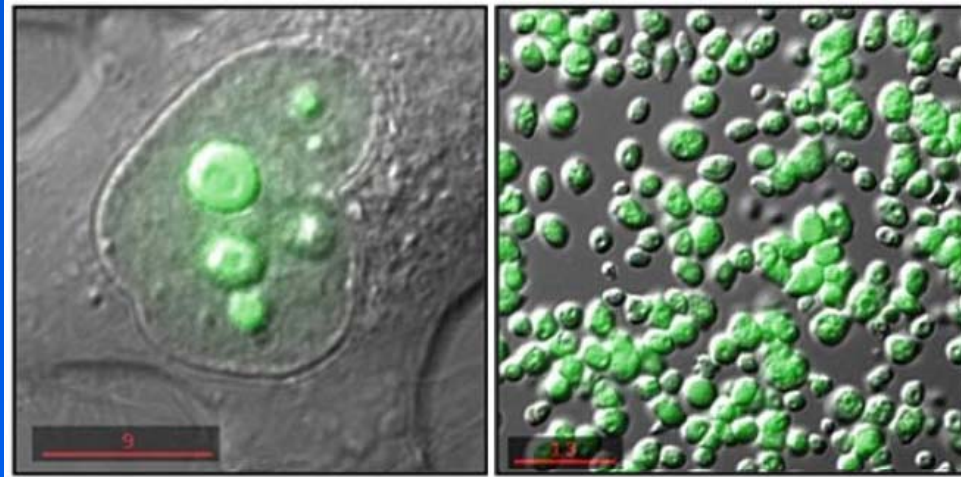
Плотный фибриллярный компонент – фибриллы толщиной 5-7 нм (РНП).

Гранулярный компонент – гранулы (РНП и белки) диаметром около 15 нм. Иногда образует нуклеолонему.

При искусственном подавлении транскрипции фибриллярные центры исчезают, а гранулы РНП и белков разделяются (сегрегация ядрышка).



# Белки ядрышка



**Вверху – трансфекция ядрышкового белка с ЗФБ (GFP) показывает специфичность его локализации.**

# Основные белки ядрышка

Рибосомные белки.

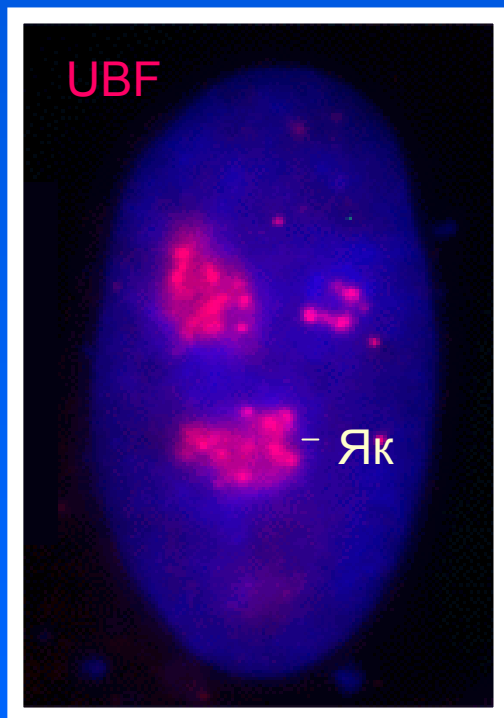
Комплекс РНК-полимеразы 1 – 11-14 белков общим м.в. 500 кД.

Факторы транскрипции рРНК (UBF и др.).

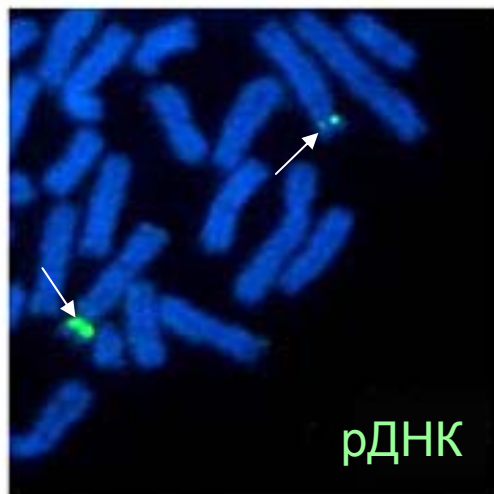
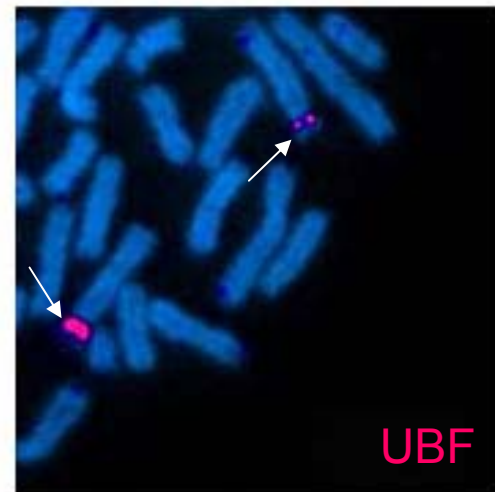
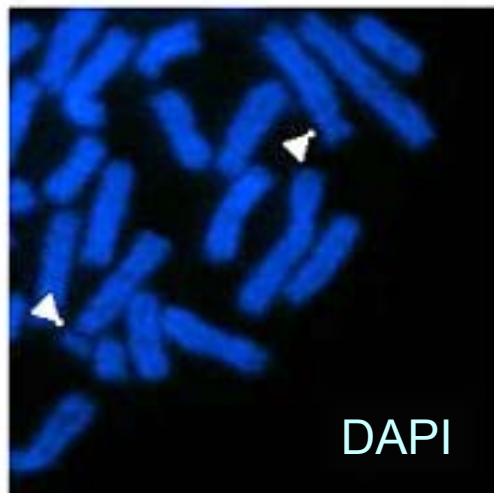
Фибрилларин (Nop1) – обеспечивает ранние этапы процессинга рРНК, входит в состав мякРНП, эндонуклеаза и метилтрансфераза.

В23/нуклеофозмин – шаперон, обеспечивает сборку пре-рибосом.

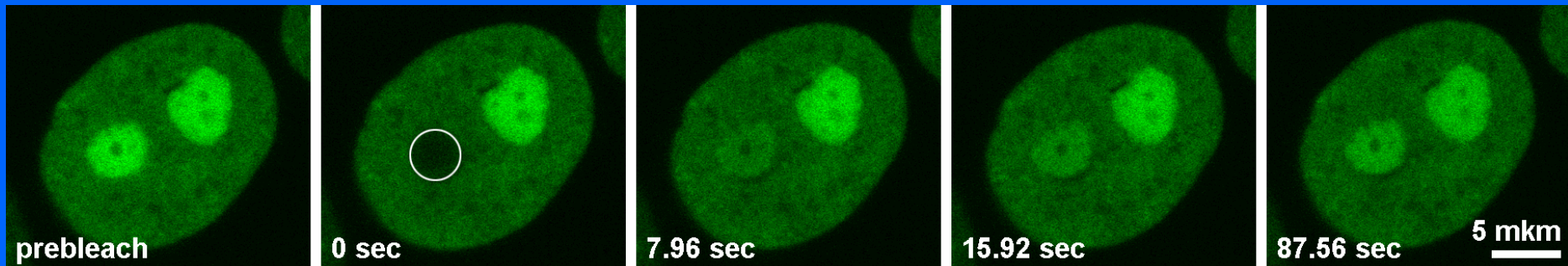
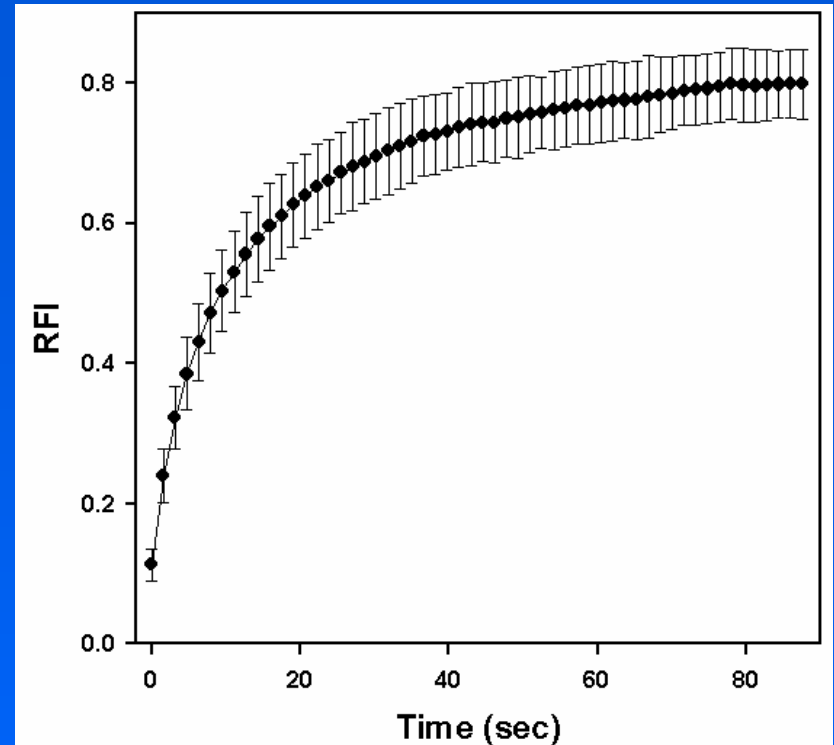
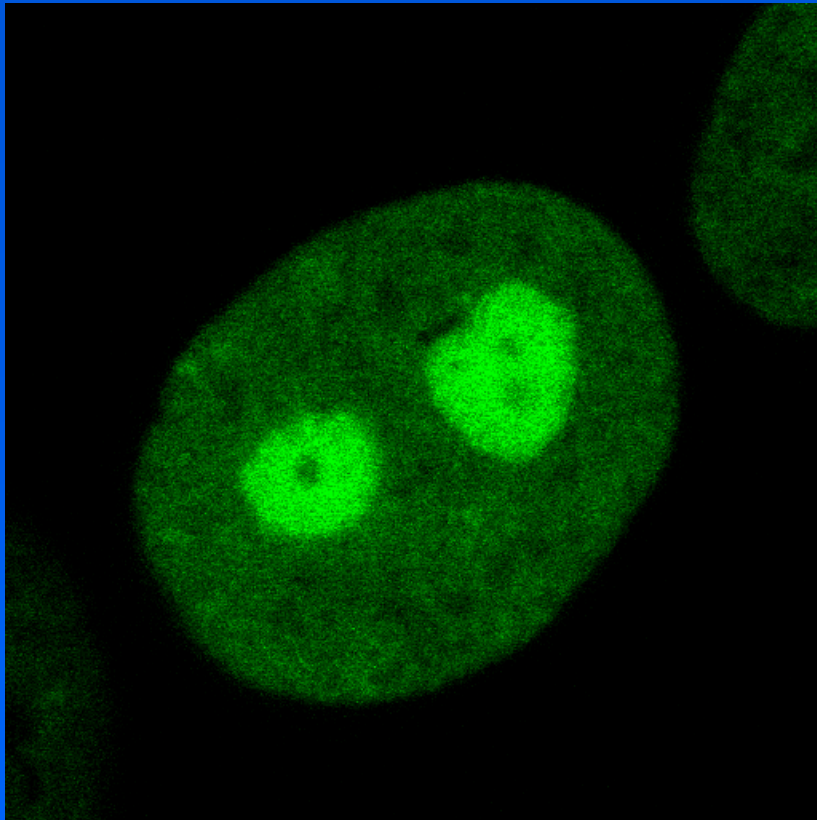
# Белки ядрышка в интерфазе и митозе



Интерфаза



# Динамика белков ядрышка (FRAP)



# Динамика ядрышка

Ядрышко соединено с ядерной оболочкой, часто с помощью глубокой инвагинации.

Все белки ядрышка быстро обмениваются с нуклеоплазмой, а многие – с цитоплазмой. Период полувосстановления ядрышковых белков в нуклеоплазме составляет от 10 с до 3 мин. Время удержания ядрышковых белков в составе ядрышка примерно на порядок больше.

Обмен многих ядрышковых белков не связан с выведением рибосом в цитоплазму.



# Ядерно-цитоплазматический транспорт

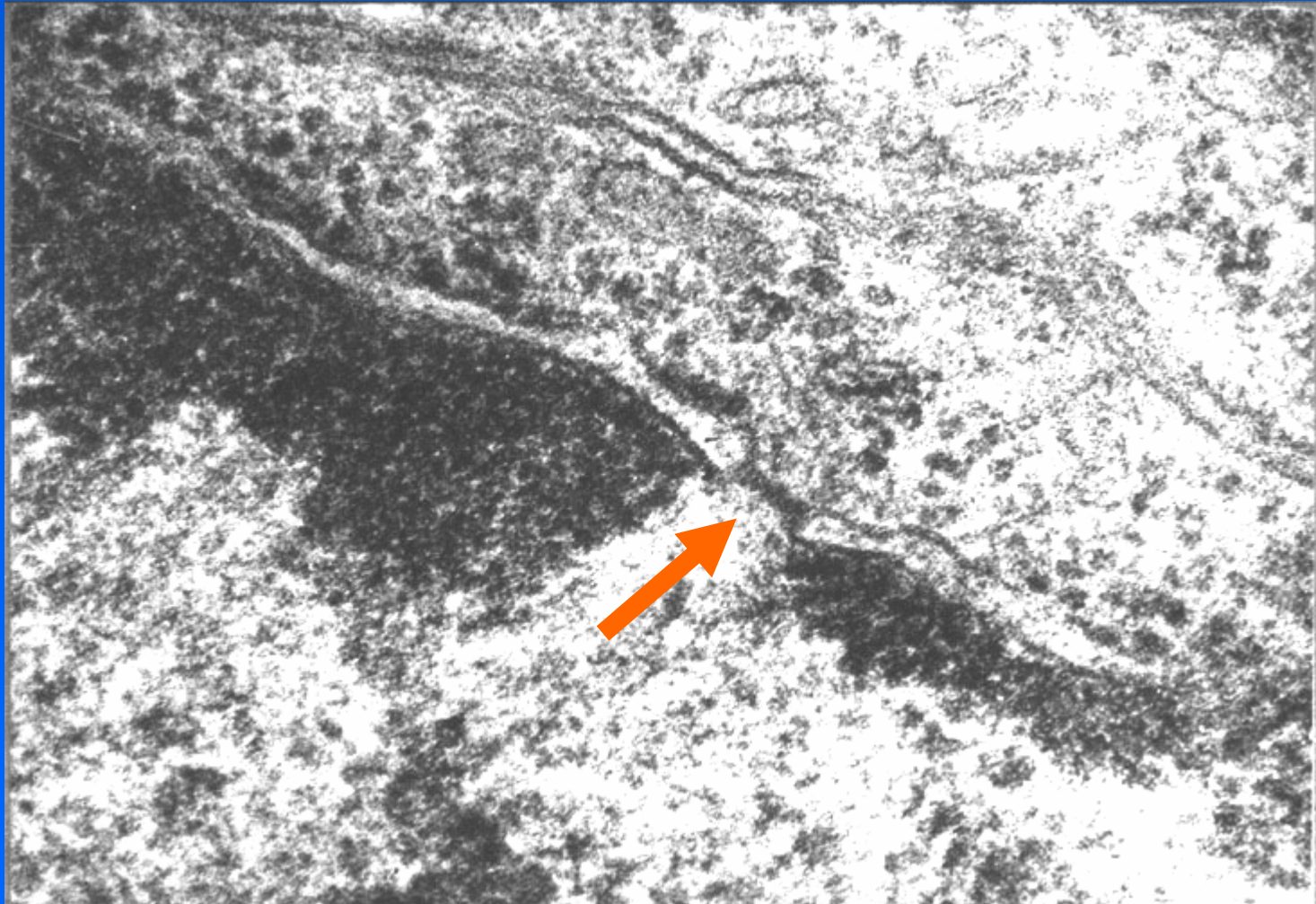
Белки и РНК перемещаются из ядра в цитоплазму и обратно через специальные структуры – ядерные поры.

Количество ядерных пор определяет интенсивность обмена между ядром и цитоплазмой.

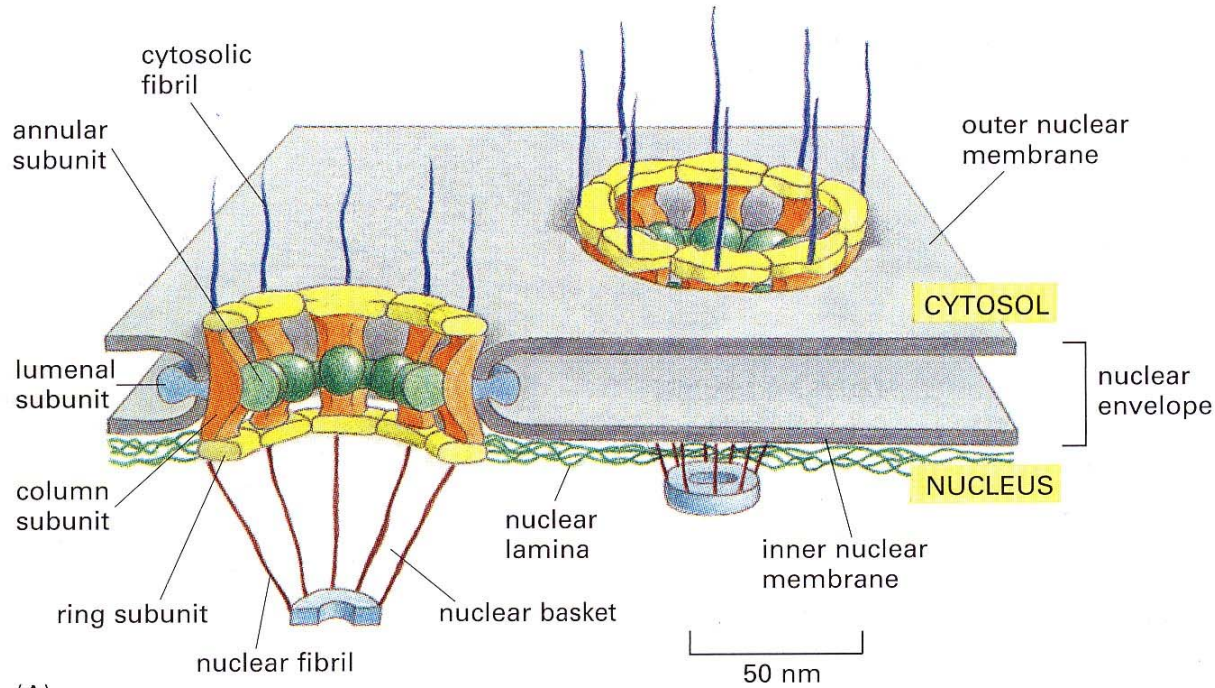
Ядерная пора представляет собой специальную структуру, имеющую симметрию 8-го порядка, которая встраивается в ядерную оболочку.

Диаметр ядерной поры – 120 нм.

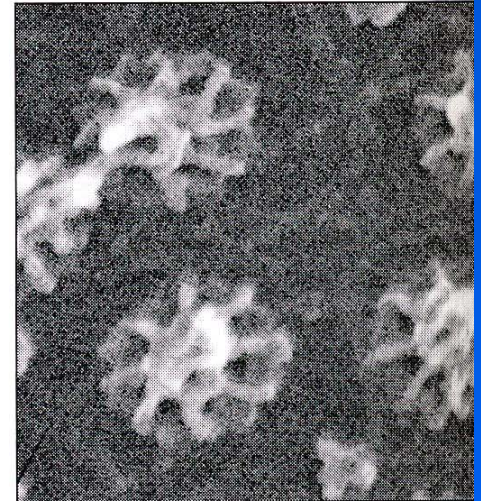
# Ядерная пора на срезе



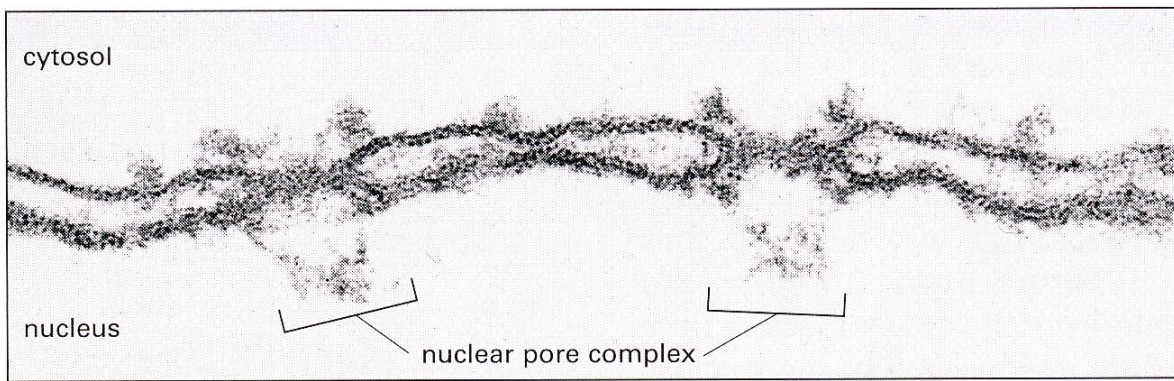




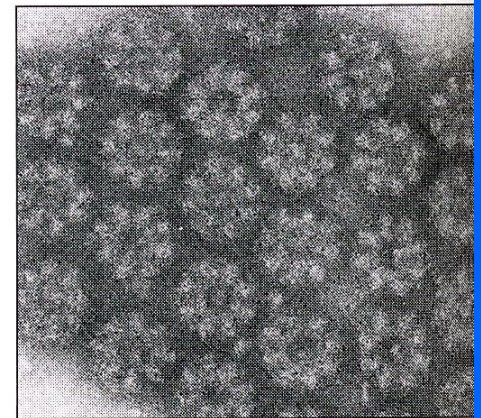
(A)



(B)



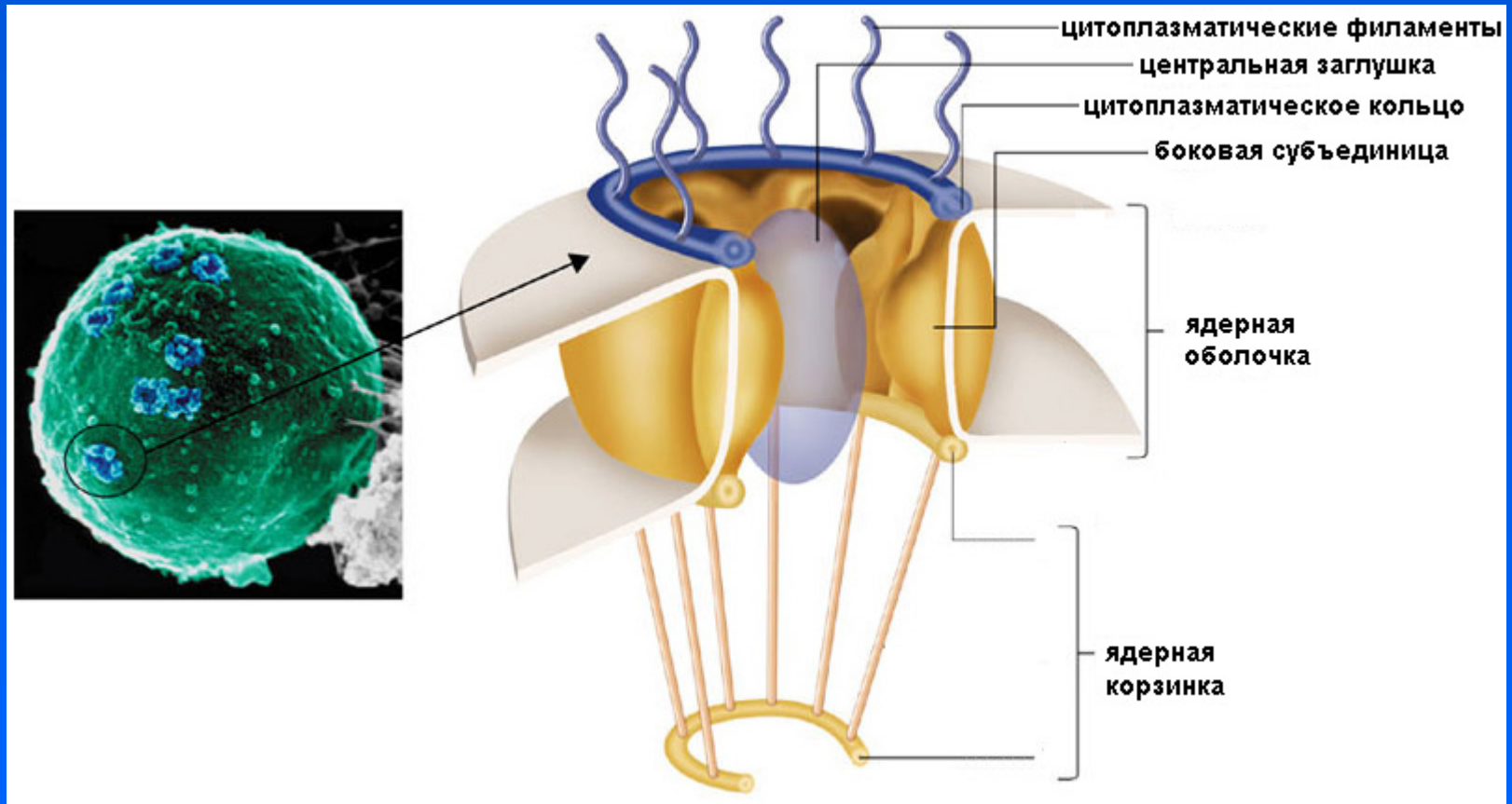
(C)



(D)

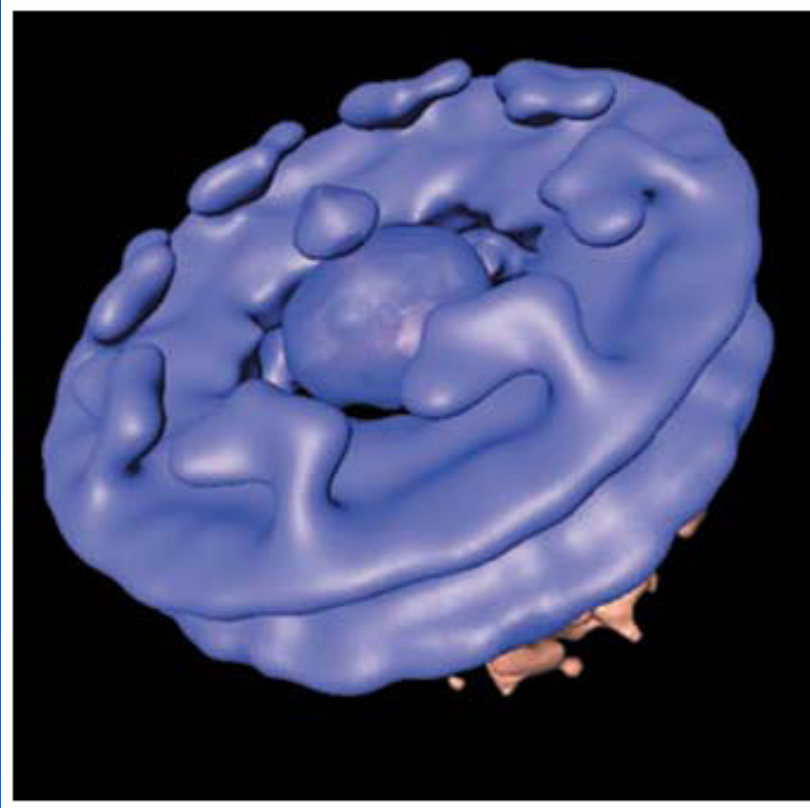


# Модель комплекса ядерной поры

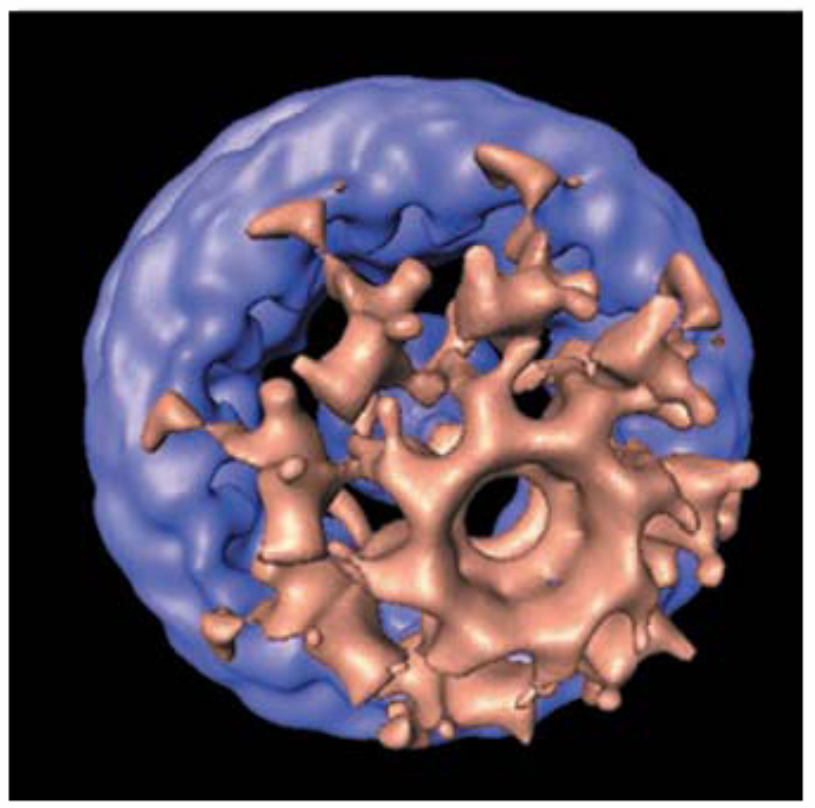


Комплекс ядерной поры имеет массу 120 мД. Он содержит более 50 разных белков (нуклеопоринов) и обеспечивает избирательный транспорт между ядром и цитоплазмой.

# Объемная модель ядерной поры



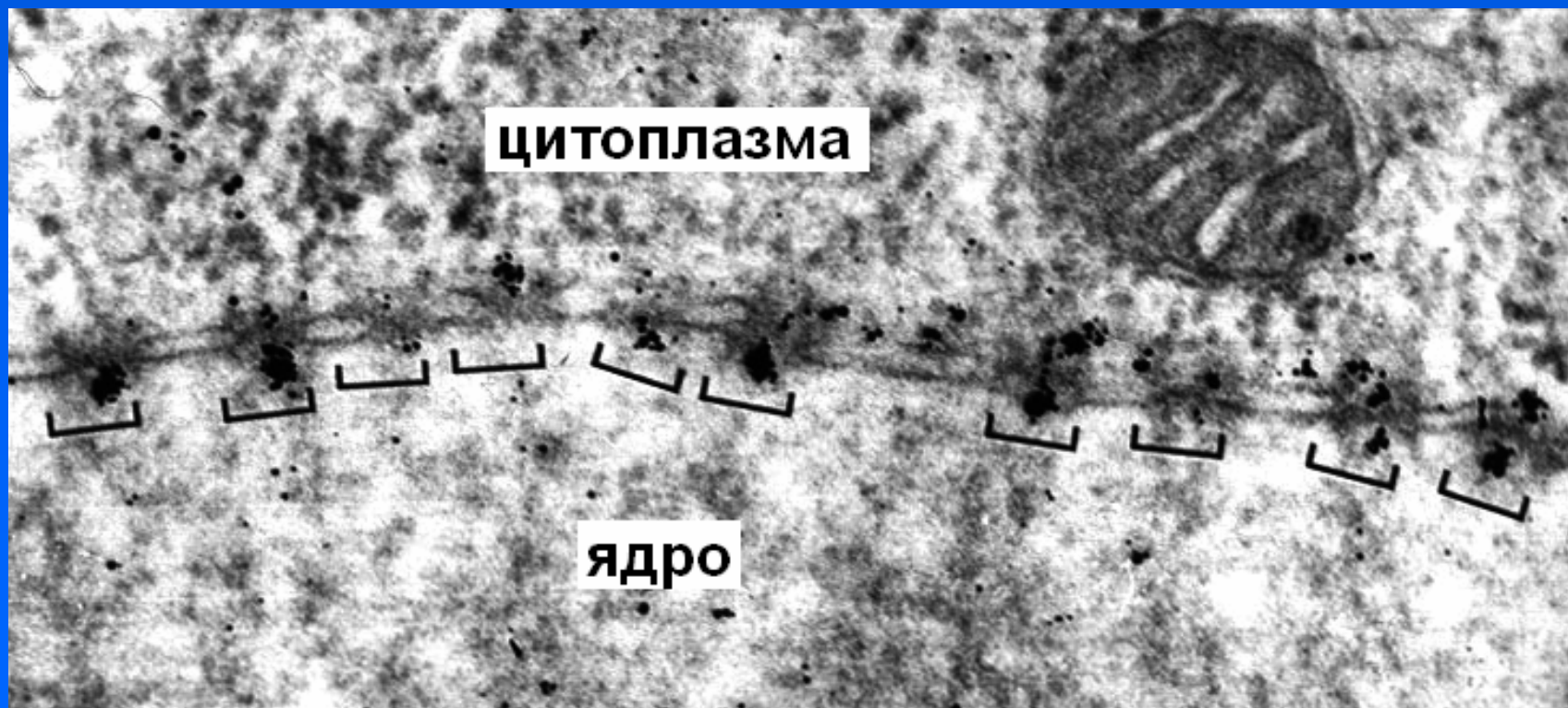
**Цитоплазматическая  
поверхность**



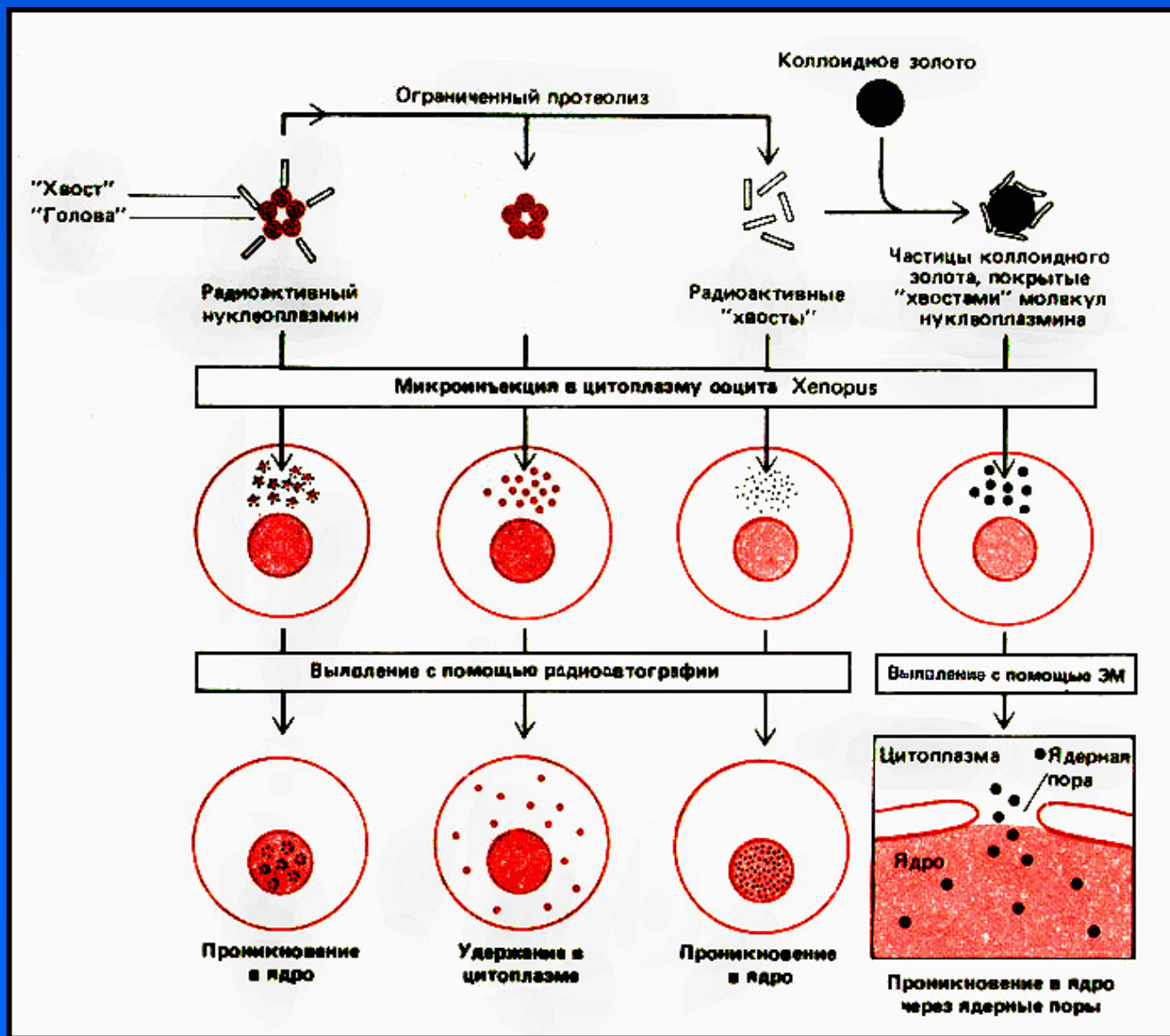
**Ядерная  
поверхность**



# Высокомолекулярные вещества могут накапливаться в порах (коллоидное золото)



# Для прохождения через пору нужна специальная сигнальная последовательность



# Пассивный транспорт через ядерную пору

Центральный канал поры – 9 нм в диаметре и 200 нм в длину.

Примерно треть белков нуклеопоринов имеют повторяющийся мотив – Phe-Gly, разделенный полярными аминокислотными последовательностями различной длины.

FG-нуклеопорины образуют в составе поры относительно длинные филаменты. Они обеспечивают низкоафинное связывание переносимых молекул и ускоряют перенос через пору за счет подавления броуновского движения в ее канале.

# Активный транспорт через ядерную пору

Белки с м.в.  $>30$  kD, попадающие в ядро, имеют сигнал ядерной локализации (NLS) и/или сигнал экспорта (NES); их перенос обеспечивается энергией гидролиза ГТФ.

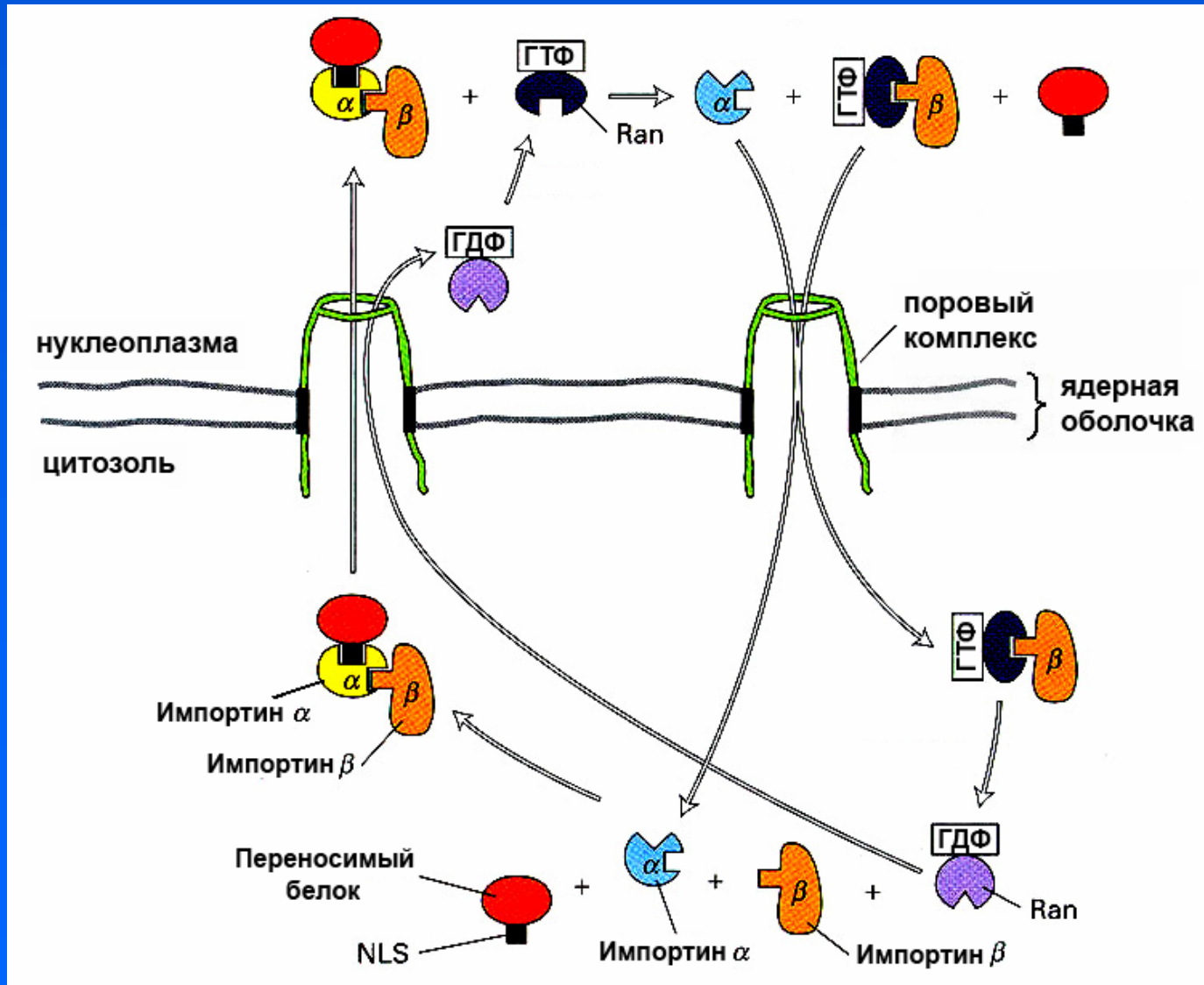
Сигнал локализации – короткий пептид. NLS может состоять из двух участков.

Белки, необходимые для импорта и экспорта, различаются: импортины  $\alpha$  и  $\beta$ , и экспортины.

Система переноса включает малую ГТФ-азу RAN и ее адапторные белки. Экспортины образуют комплекс с переносимой молекулой в присутствии ГТФ-RAN, импортины – в присутствии ГДФ-RAN.

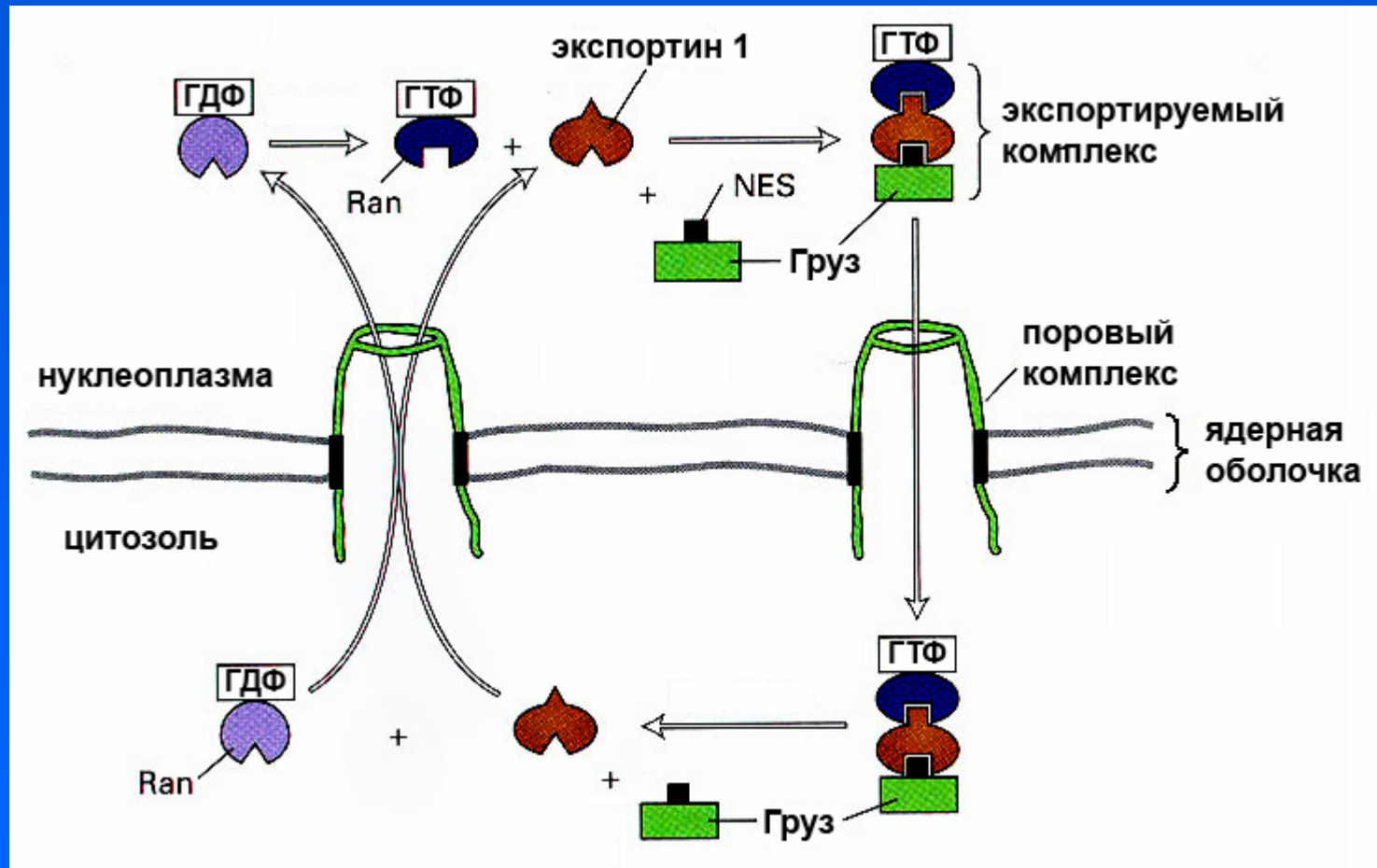
иРНК для переноса взаимодействуют со специальными белками с сигналом экспорта (NES).

# Импорт белков в ядро





# Экспорт из ядра

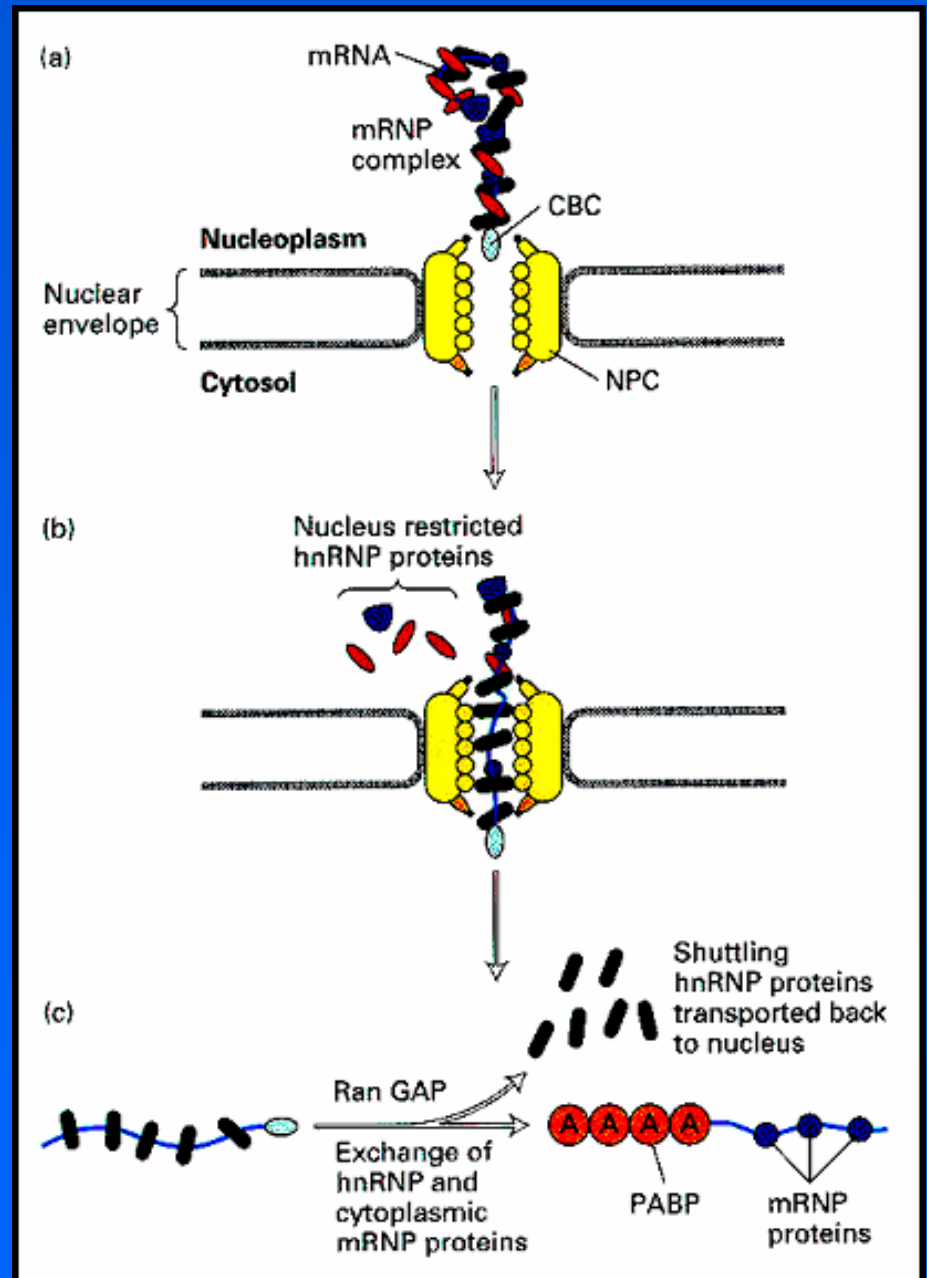


**В экспорте участвуют специальные белки (экспортин 1) и ГТФ-аза Ran**

# Транспорт и-РНК через ядерную пору

В экспорте участвует  
TREX – transition export  
complex, связанный с  
модифицированным 5'-  
концом иРНК.

Перенос РНК обеспечи-  
вается гидролизом ГТФ.



# Цикл ядерной поры

Интерфаза – функционирующие поры. Механизм увеличения их числа при активации транскрипции неизвестен.

Запасные поровые комплексы могут располагаться в цитоплазме.

В начале митоза – деградация пор, которая начинается с диссоциации наружных нуклеопоринов. Это приводит к повышению неспецифической проницаемости ядерной оболочки.

Выход из деления – формирование пор путем встраивания их в возникающую на поверхности хромосом ядерную оболочку.

# **Клеточные мембраны – строение и химический состав**

# Жидкие кристаллы и клетка

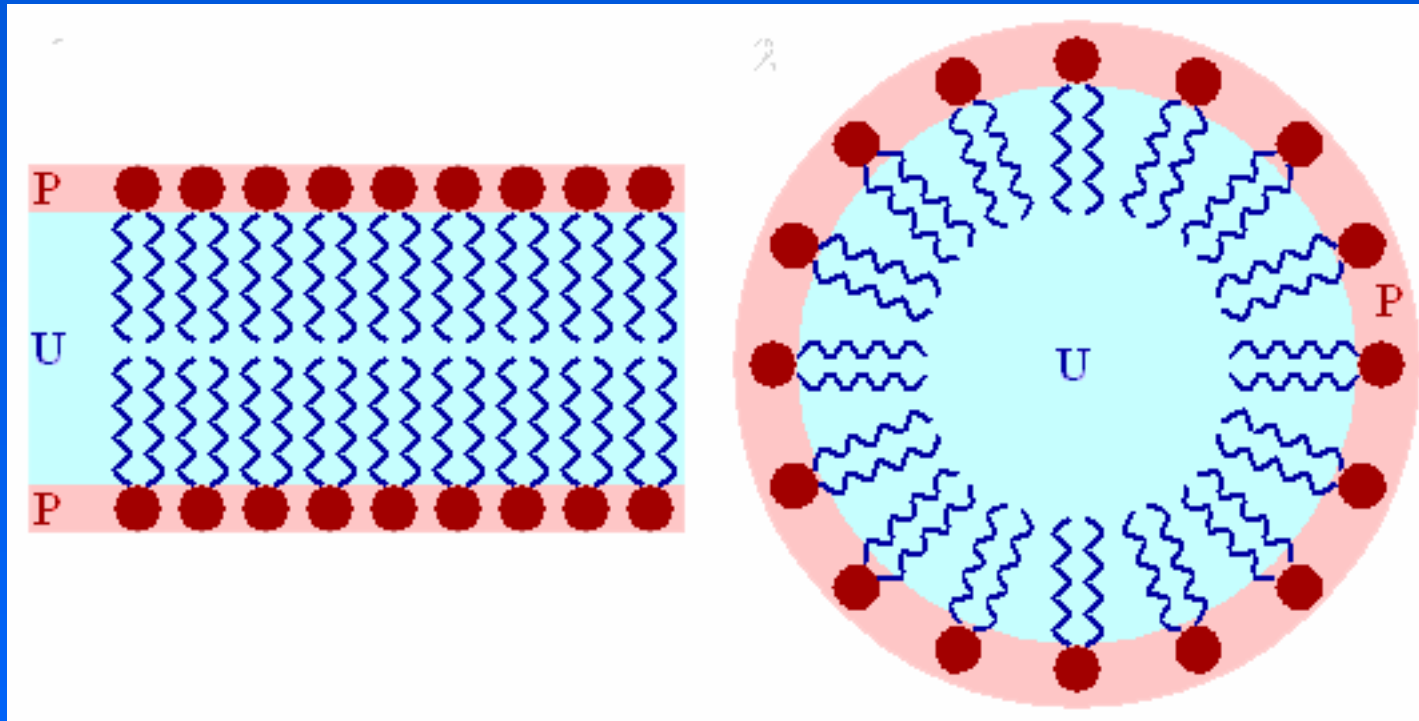
Основное отличие живой клетки от раствора – резкое угнетение Броуновского движения при комнатной температуре. Отсутствие Броуновского движения означает, что цитоплазма находится не в жидком, а в жидкокристаллическом состоянии.

Клеточная мембрана полностью соответствует смектической фазе ЖК.

Гиалоплазма местами соответствует нематической фазе, а местами – смектической фазе ЖК.



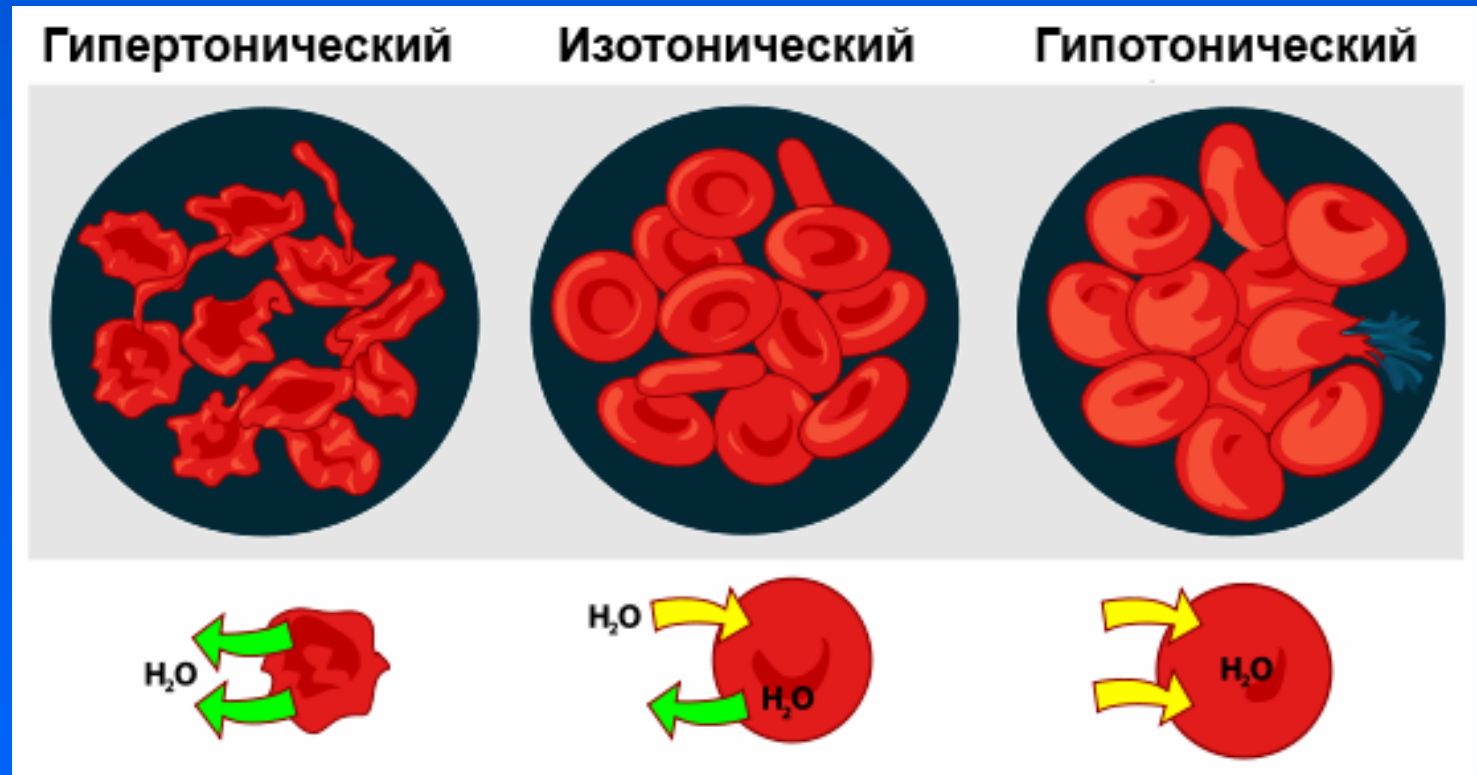
# Фосфолипиды в воде



Липидный бислой (слева) и мицелла (справа).

Биологическая мембрана – лиотропный жидкий кристалл (смектическая фаза).

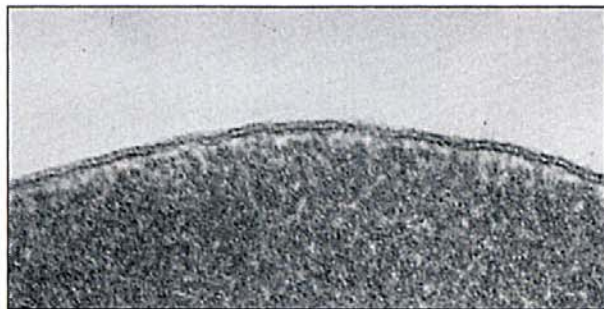
# Мембрана как осмометр



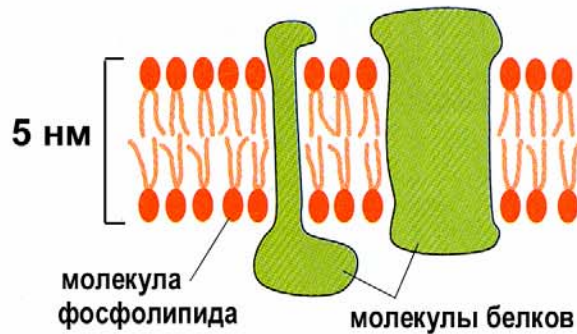
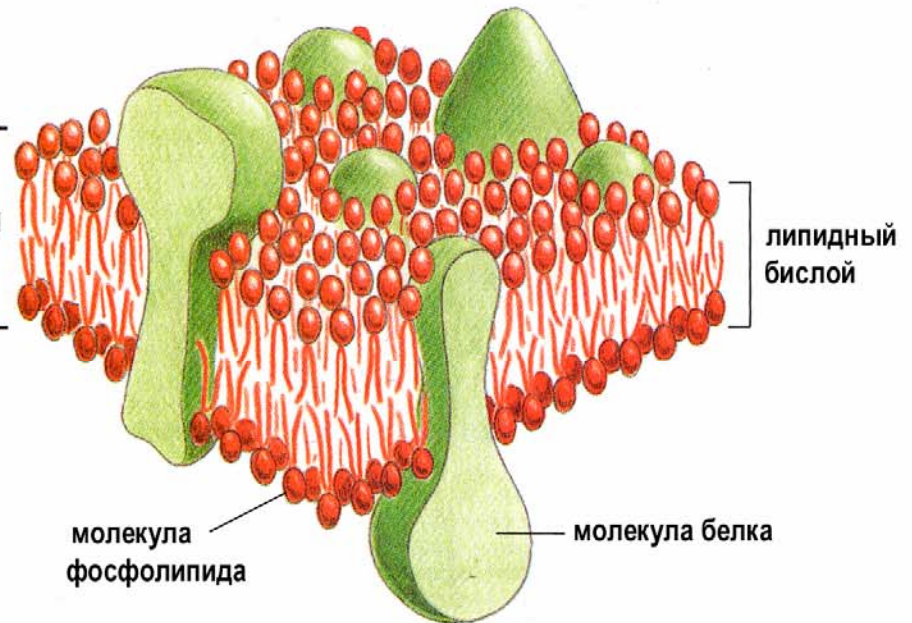
**Полупроницаемость мембраны: вода проходит, а растворенные в ней вещества – нет.**

**В гипотонической среде поверхность клетки разглаживается.**

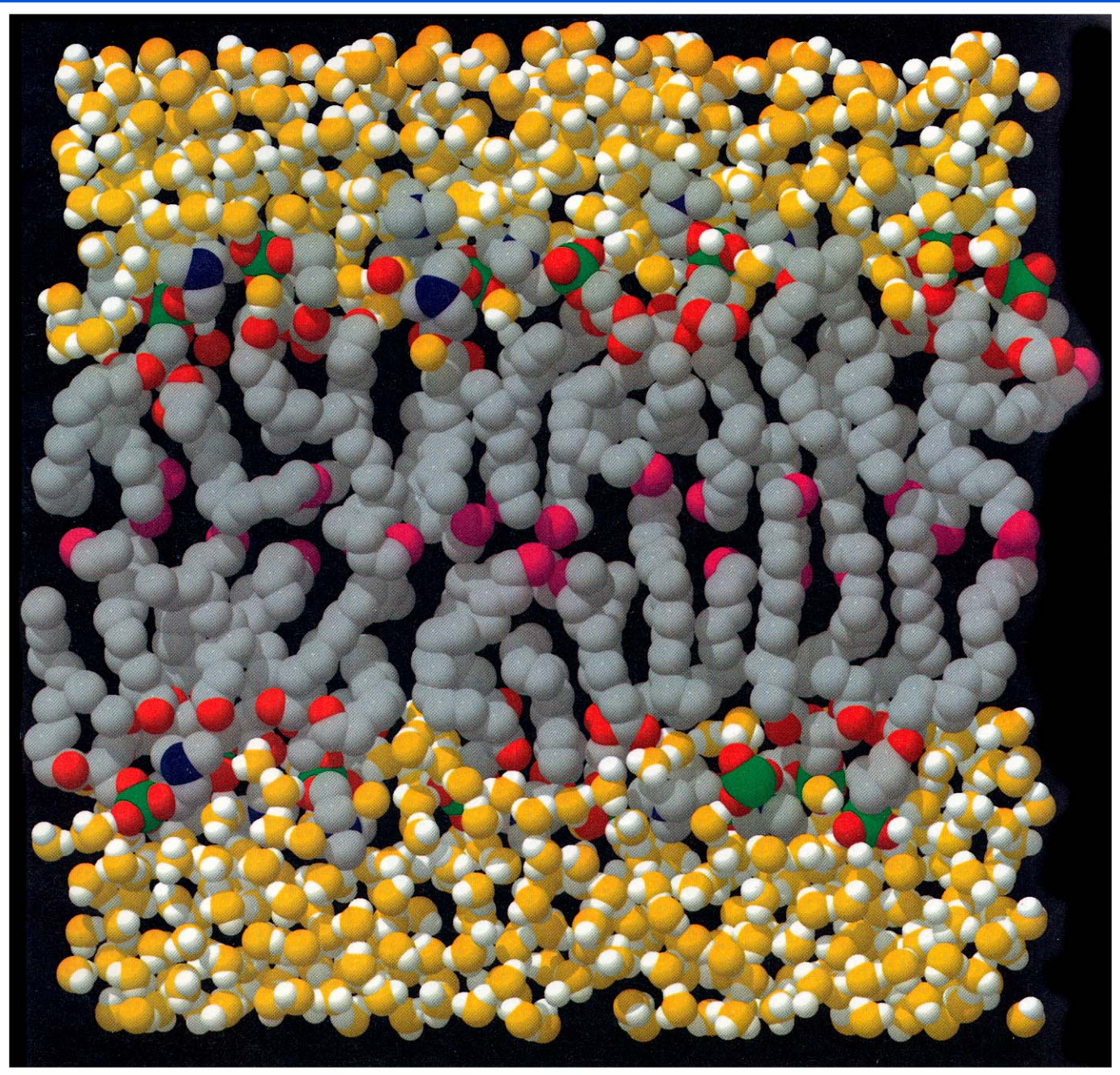
# Строение мембраны



5 нм

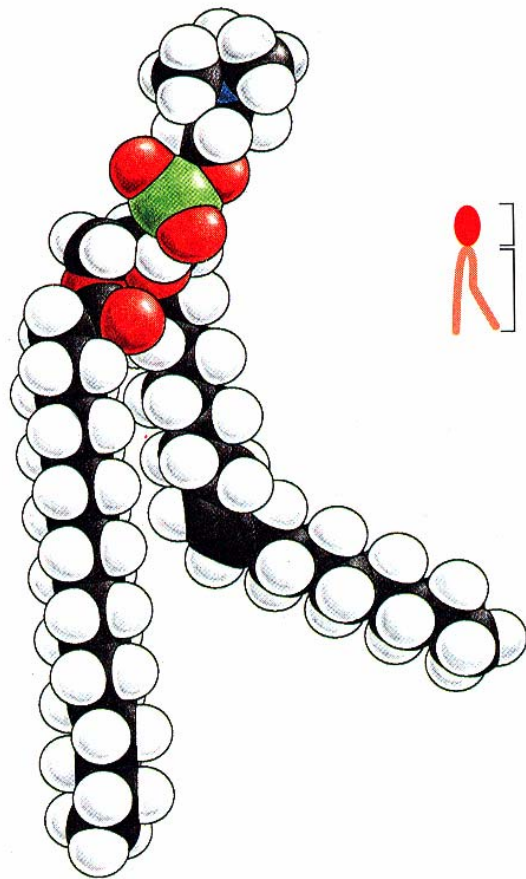




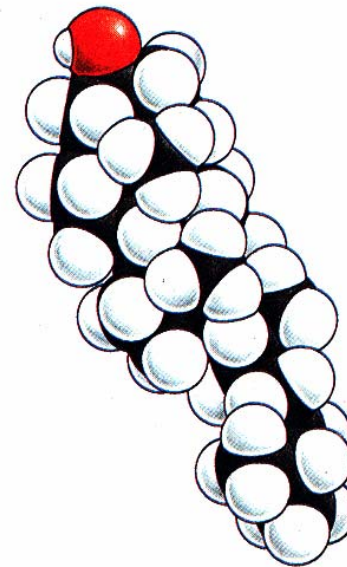




# Строение липидов мембраны



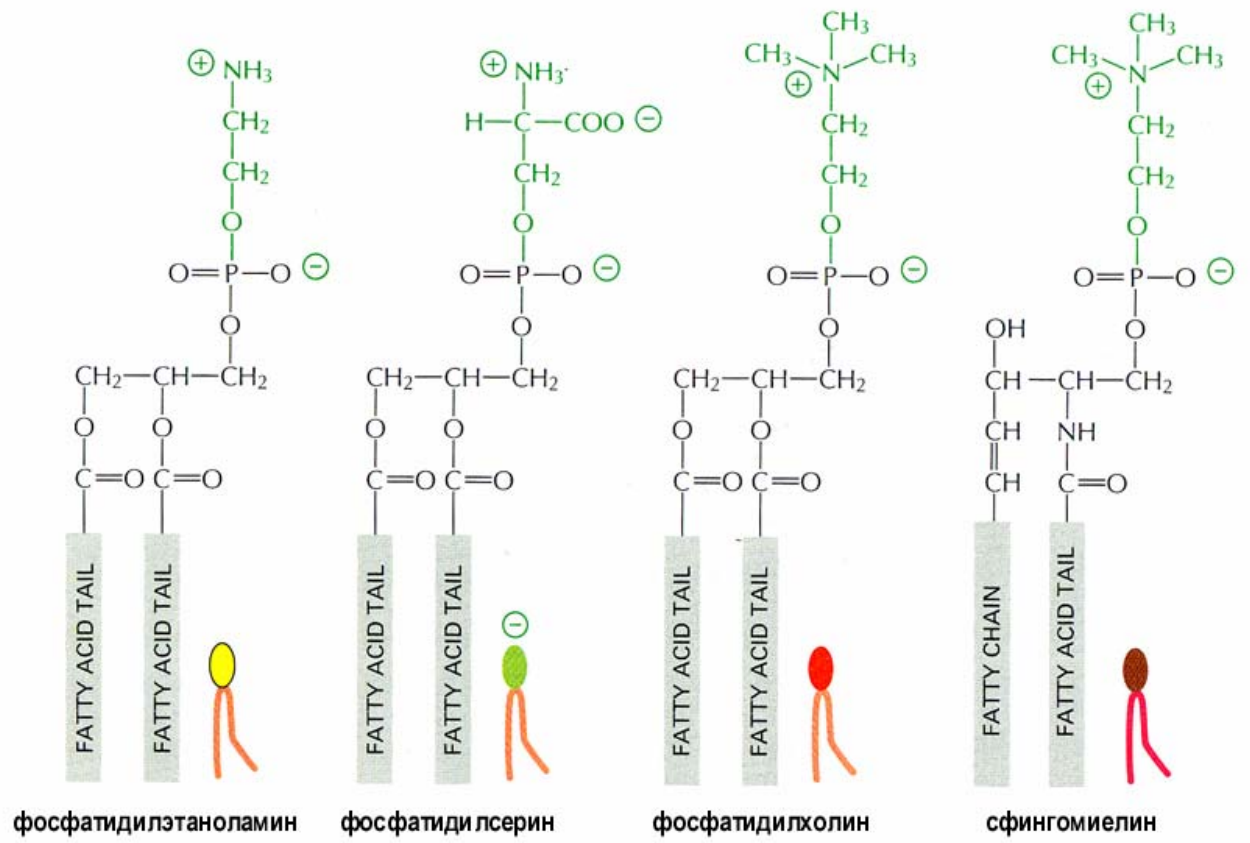
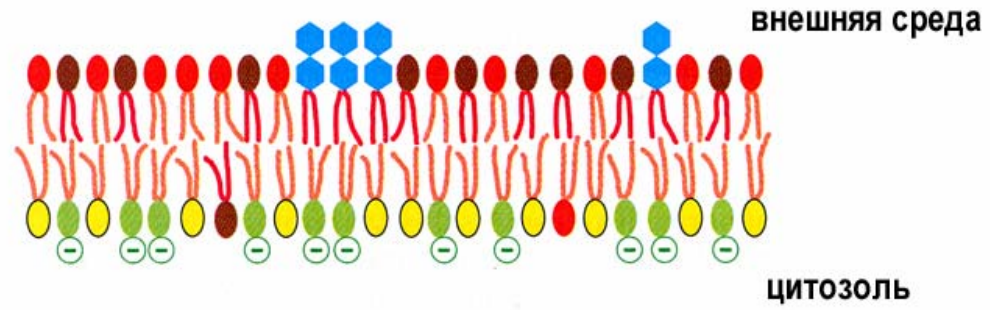
фосфолипид



холестерин



# Основные фосфолипиды мембраны



# Основные характеристики фосфолипидной мембраны

Толщина – 5-10 нм; площадь неопределенно велика.

Всегда топологически замкнута (пузырек).

Химически устойчива в водных растворах.

Непроницаема для ионов, относительно проницаема для воды, высокопроницаема для гидрофобных веществ.

Обладает низкой электропроводностью (диэлектрик) и выдерживает большие электрические поля (до  $10^7$  В/см)

Включает в себя различные (преимущественно гидрофобные) белки, которые определяют ее специфичность.

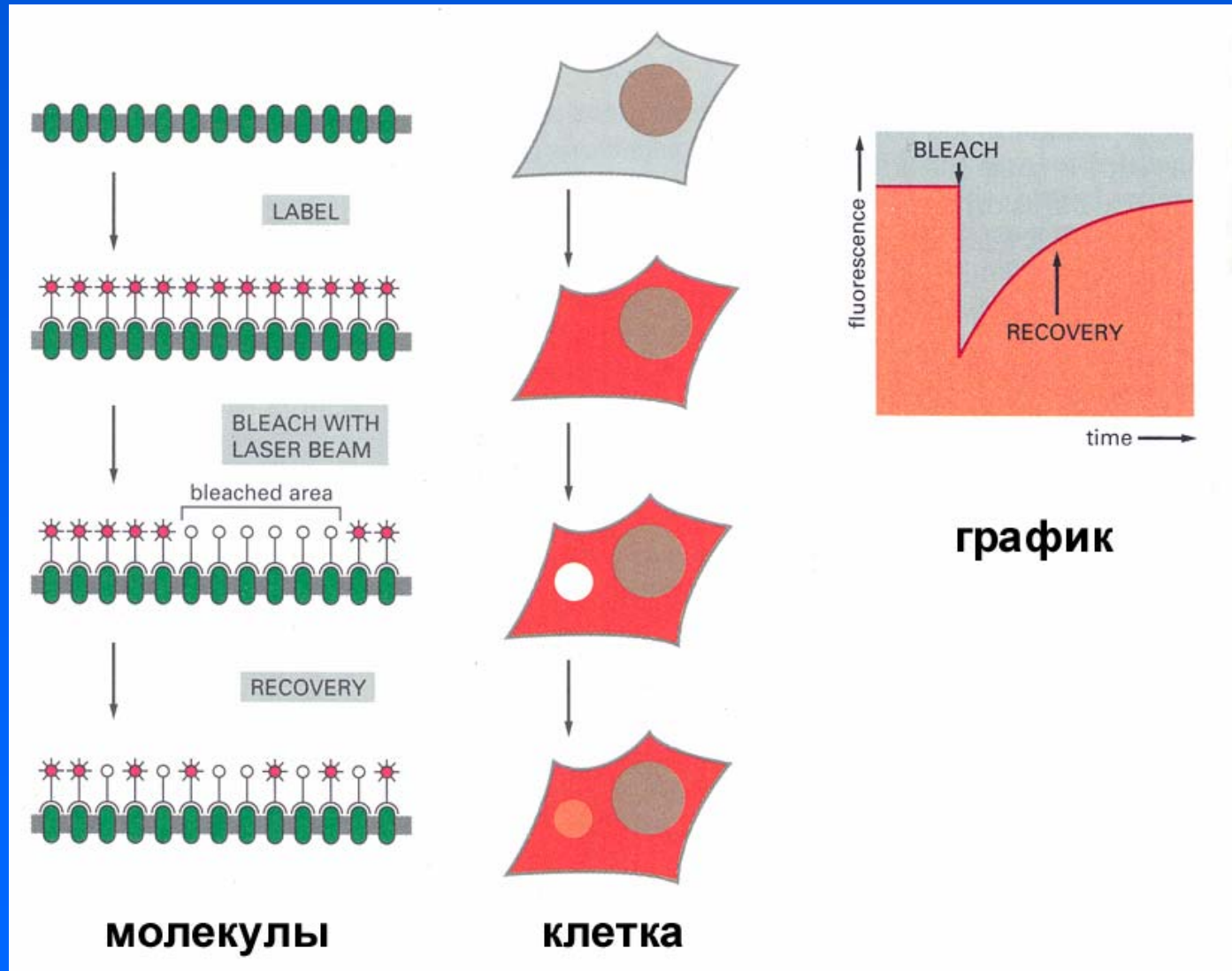
# Свойства липидов мембраны

Фосфолипиды в составе мембраны образуют два монослойных двумерных раствора. Перемещения липидов поперек мембраны маловероятны.

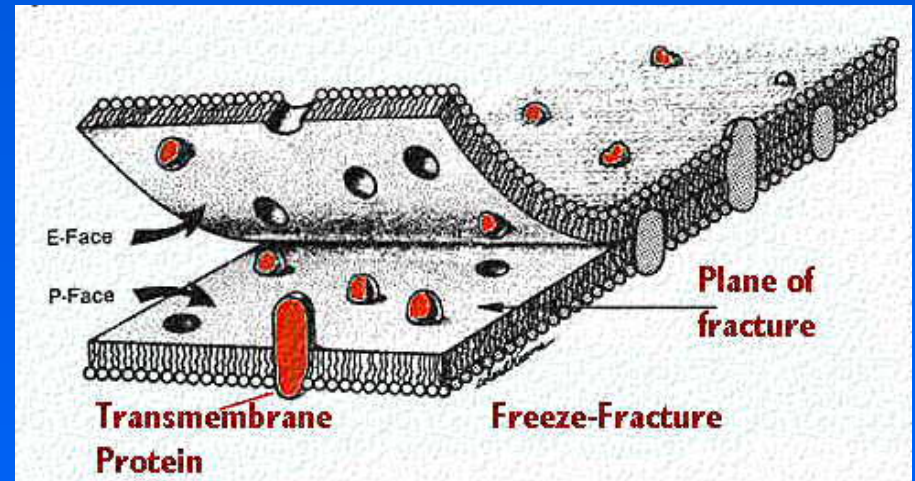
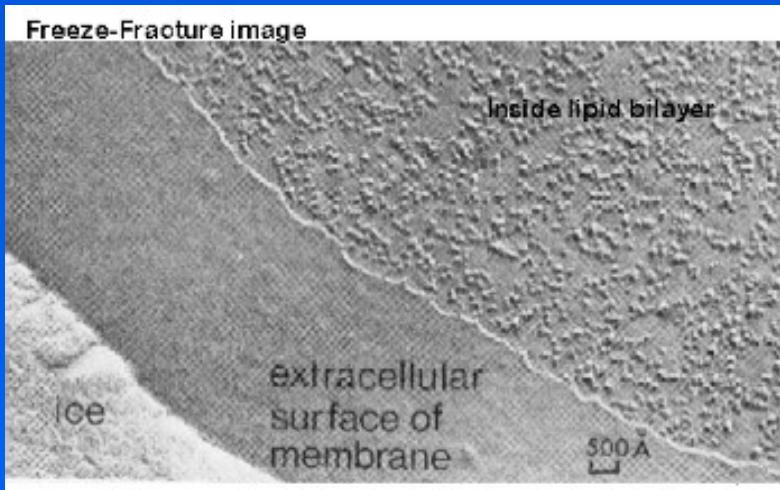
Неполярные липиды могут образовывать в составе мембраны квазикристаллические структуры – липидные рафты.

Липиды могут быть гликозилированы.

# Диффузия липидов - метод FRAP



# Мембрана асимметрична по расположению белков



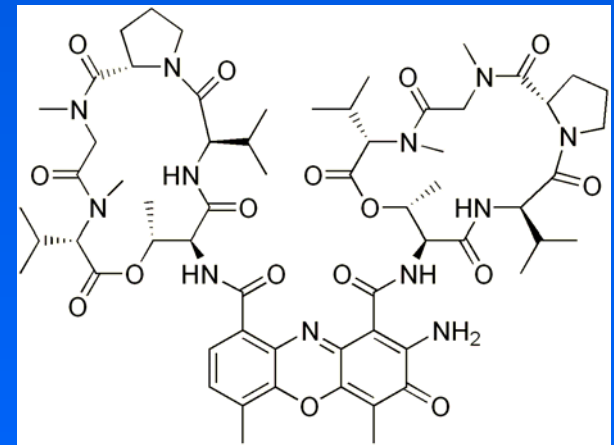
Скол мембраны демонстрирует ее различные поверхности (электронная микроскопия быстро замороженного образца).



# Сегрегация ядрышка

Сегрегация ядрышка – процесс, происходящий при подавлении транскрипции. Он вызывается различными агентами и часто знаменует раннюю стадию апоптоза. В норме сегрегация ядрышка происходит в начале деления.

Актиномицин Д – ингибитор транскрипции и репликации ДНК, проникающий в живые клетки. В низких дозах он избирательно подавляет работу РНК-полимеразы II и биогенез рибосом. В высоких дозах он полностью подавляет транскрипцию.



Воздействие АМД на митотические клетки приводит к тому, что предъядрышки после телофазы возникают, но не сливаются. При воздействии АМД на интерфазные клетки фибриллярные центры в ядрышках исчезают, а гранулы РНП и белков разделяются.

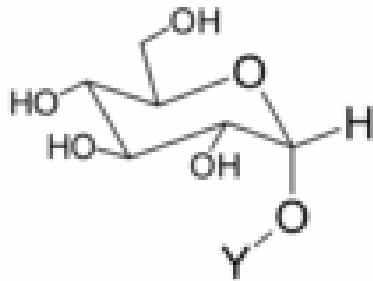
# **Лекция 5.**

**Плазматическая мембрана**

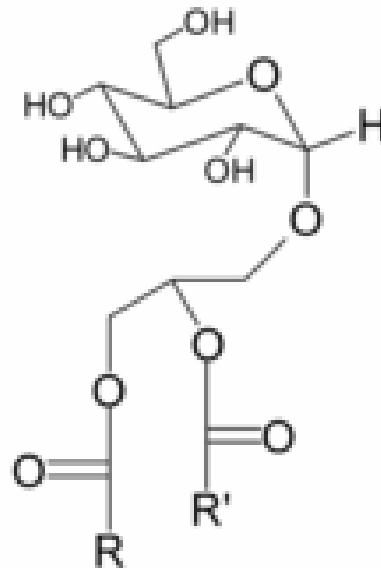
**Биогенез мембран: ЭПР и  
комплекс Гольджи**

# Гликолипиды мембран

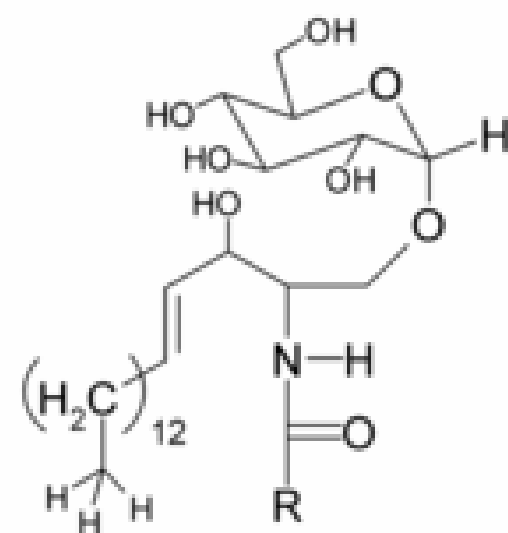
гликолипид



глицерогликолипид



сфингогликолипид



Y = ЛИПИД

R = жирная кислота

Простейший гликолипид – цереброзид имеет один остаток глюкозы или галактозы. Более сложные – ганглиозиды (разветвленные цепи углеводов, содержат до 7 остатков сахаров).

# Гликолипиды мембран

Гликолипиды в наружном листке плазматической мембраны – универсальный компонент в клетках эукариот. Основная химическая функция – придание гидрофильных свойств поверхности клетки. Основная биологическая функция – узнавания клетками друг друга (свой-чужой).

Гликолипиды плазматической мембраны взаимодействуют с белками и участвуют в формировании рецепторных комплексов. Состав гликолипидов в клетках животных высокоспецифичен. Он зависит от типа клеток, стадии дифференцировки и проч.

Синтез гликолипидов происходит в эндоплазматическом ретикулуме, деградация – в лизосомах.

Наиболее распространенный класс гликолипидов – сфинголипиды.

Очень богата гликолипидами нервная ткань, где они участвуют в формировании синаптических контактов.

# Гликокалликс

Гликокалликс (мягкая оболочка клетки) имеется у бактерий и некоторых эукариотических клеток. Он располагается снаружи от липидного бислоя.

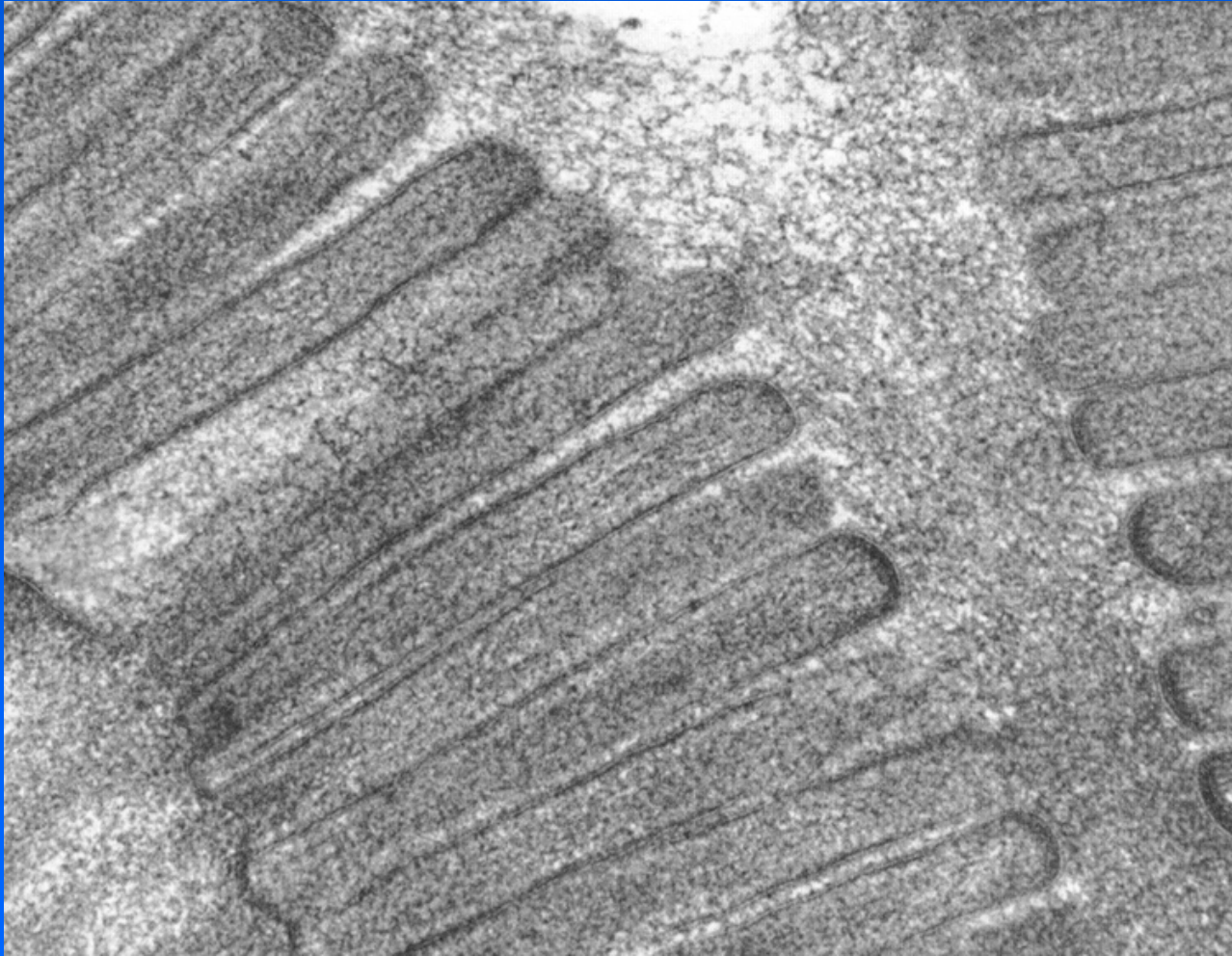
Состав – гликопротеины, гликолипиды, сложные полисахариды.

Толщина гликокалликса – до 100 нм и более.

Гликокалликс отвечает за распознавание клеток (свой-чужой); он содержит ферменты и участвует в пристеночном пищеварении (клетки кишечника).



# Гликокаликс в щеточной каемки



# Липидные рафты

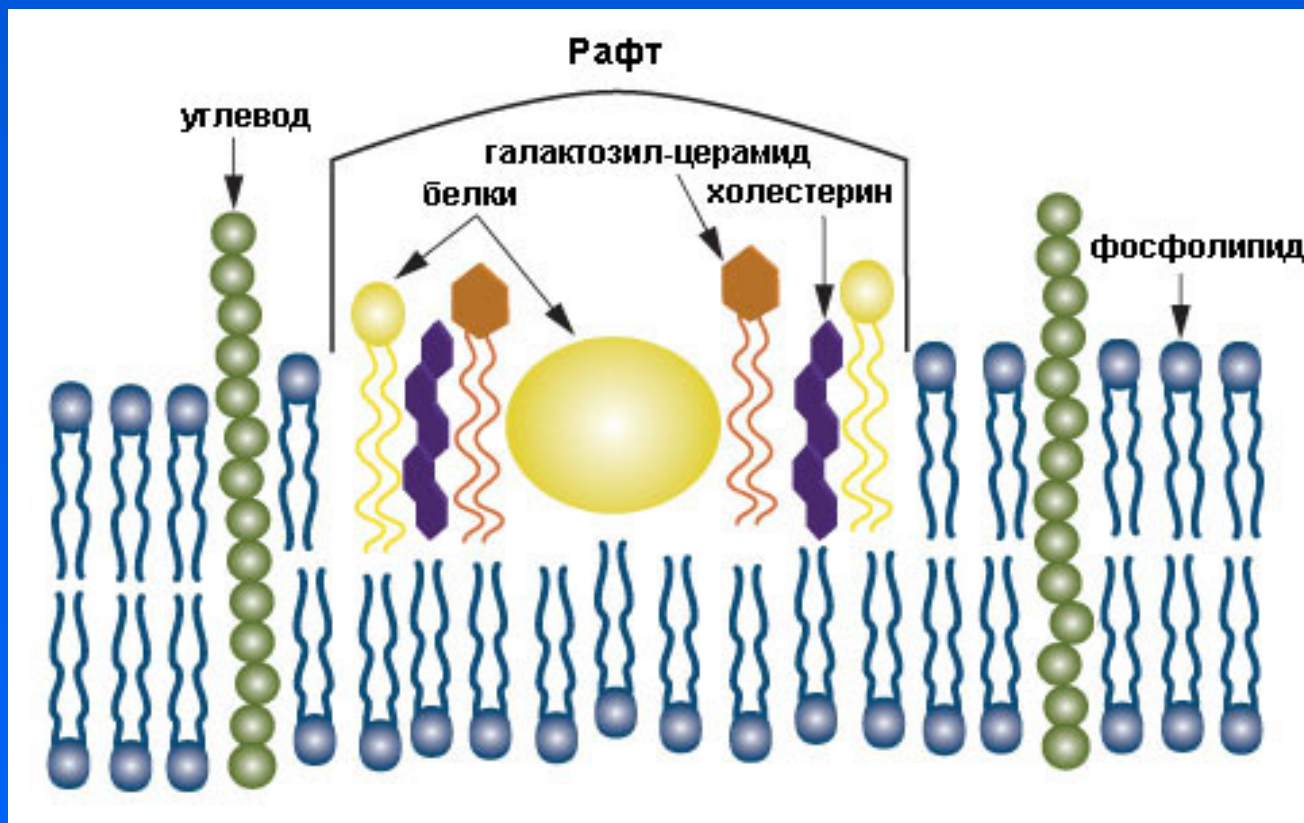
Липидные рафты – домены в мембране, обогащенные холестерином и сфинголипидами и обедненные ацетилхолином, которые содержат монослой упорядоченных липидов ( в квазикристаллической структуре). Рафты также обогащены гликолипидами.

Диаметр рафта – 10-200 нм. Время жизни рафта *in vivo* – от десятков миллисекунд до минут. Маленькие рафты могут объединяться и стабилизироваться за счет включения в их состав белков. Стабилизация рафтов основана на белок-липидном и белок-белковом взаимодействиях.

Физиологическая роль рафтов – формирование сигнальных (рецепторных) комплексов белков: В- и Т-клеточные рецепторы, рецепторы факторов роста, передача сигналов между нервными клетками и др.

Возможно, что наряду с рафтами существуют и более мелкие комплексы, состоящие из нескольких десятков молекул липидов или одной белковой молекулы в окружении холестерина и сфинголипидов.

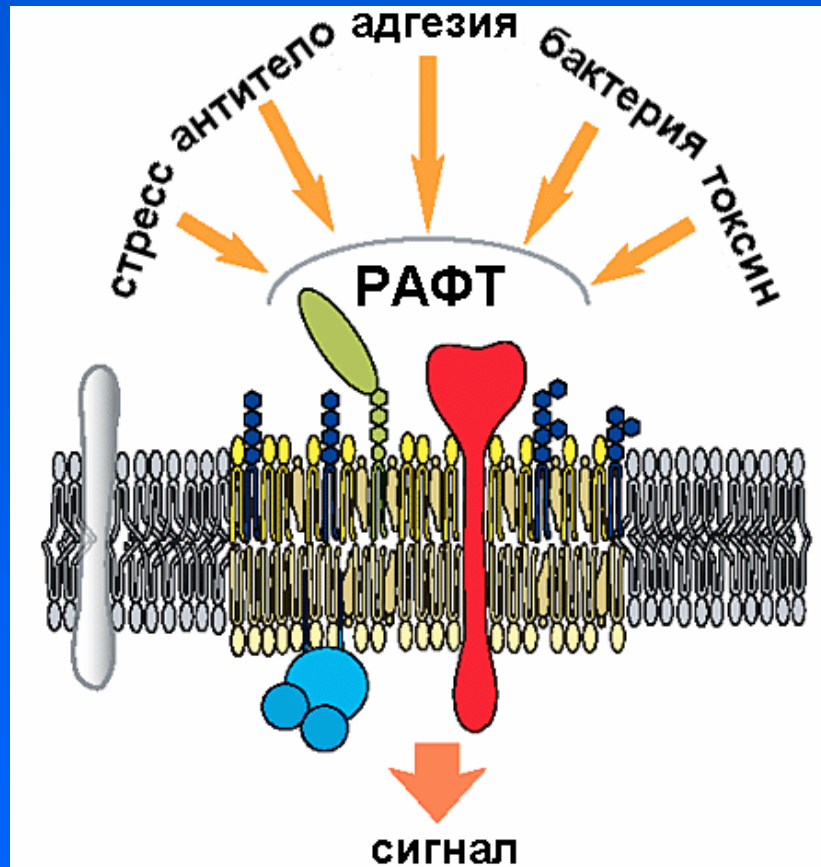
# Липидный рафт (схема)



Рафт может возникать в одном слое липидов – наружном или внутреннем. Мембранные белки связаны с липидами рафтов через насыщенные жирные кислоты или заякорены через гликозилфосфатидилинозитол.

В плазматической мембране рафты возникают в наружном слое.

# Липидные рафты (функции)



Липидный рафт является проводником для различных сигналов и веществ, поступающих в клетку. Рафты обогащены гликосфинголипидами. Липиды рафтов участвуют в процессах адгезии, гликолипиды «обеспечивают» связывание патогенов и токсинов, белки обеспечивают передачу сигналов внутрь клетки.

# Основные свойства клеточных мембран

Два двумерных раствора (наружный и внутренний монослои липидов) – высокая латеральная и низкая поперечная подвижность фосфолипидов.

Имеет асимметричные поверхности (липиды и белки).

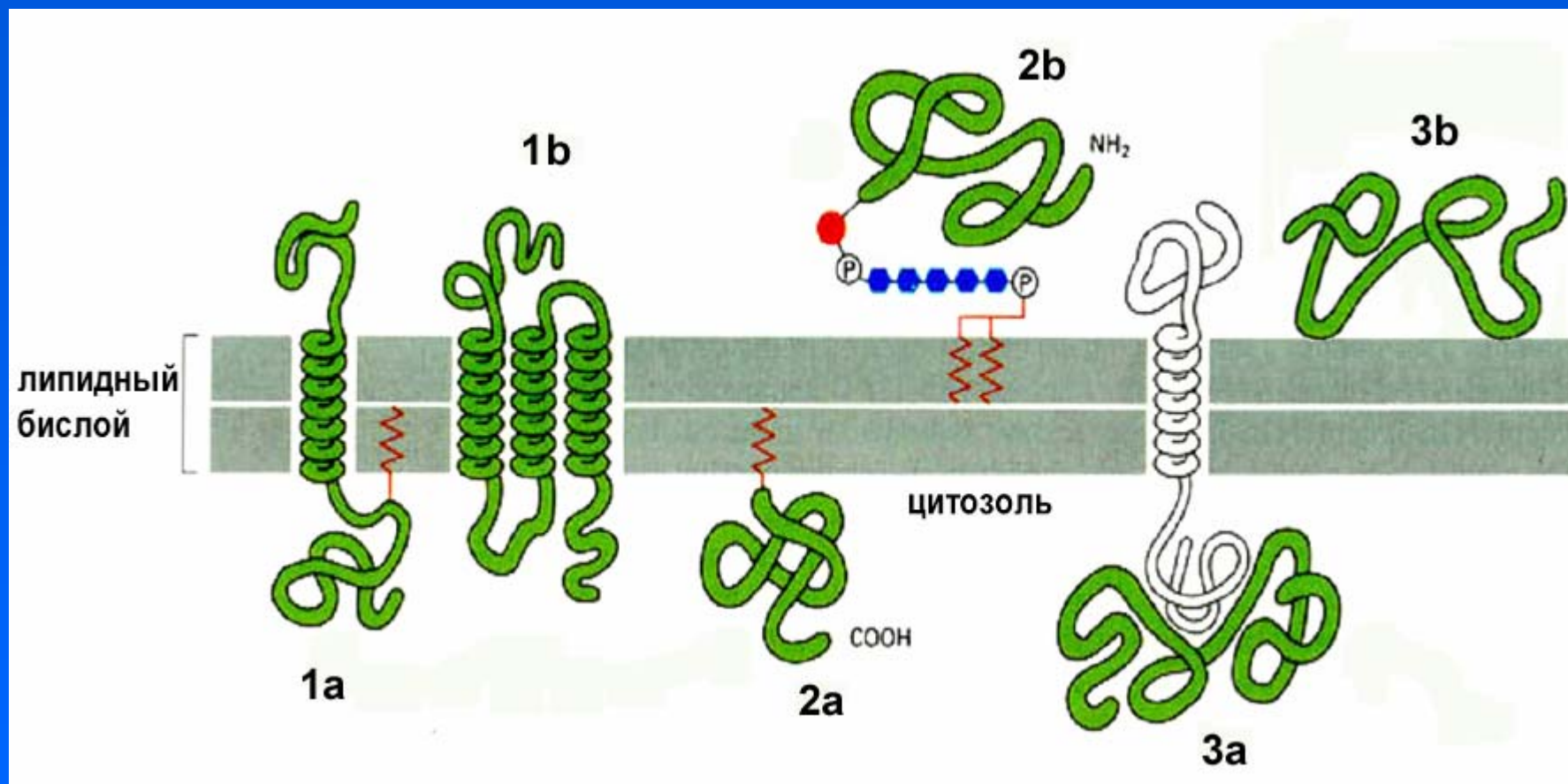
Содержание белков различно – от 20 до 70% от общей массы.

Как правило, заряжена (разность потенциалов – 20-150 мВ).

Белки обеспечивают: избирательную проницаемость мембраны (облегченная диффузия, совместный транспорт, перенос за счет заряда), системы активного переноса (за счет гидролиза АТФ), связь с цитоскелетными структурами.



# Белки закреплены в мембране тремя основными способами



Интегральные (1) и полуинтегральные (2, 3) белки

# Транспорт через мембрану

Пассивный транспорт (за счет энергии градиента концентрации).

Перенос липофильных катионов и анионов – за счет заряда.

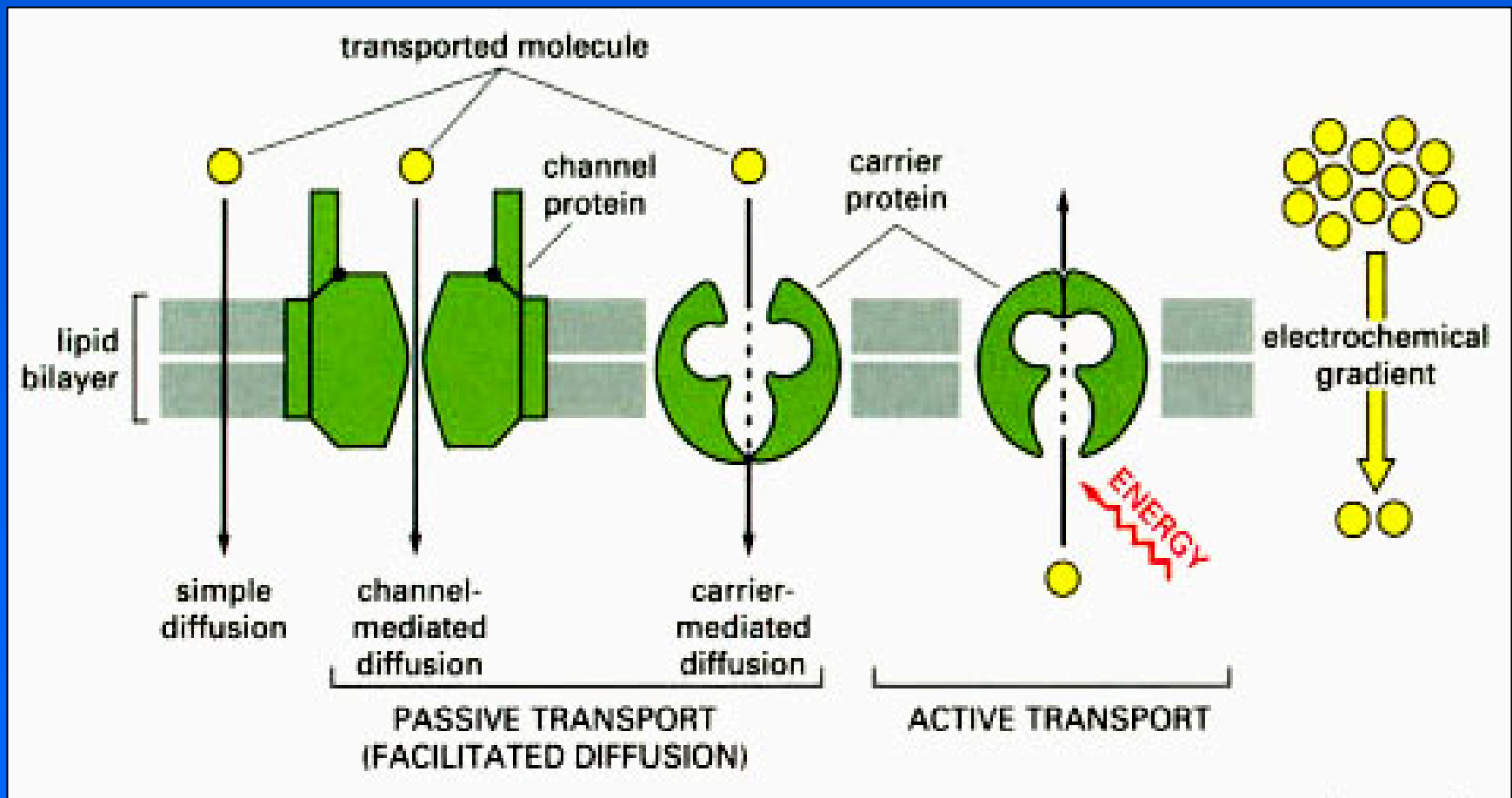
Облегченная диффузия: каналы для гидрофильных молекул, создаваемые с помощью молекул интегральных белков.

Диаметр канала – около 2 нм.

Котранспорт – одновременный перенос с помощью специальной молекулы, одно вещество против градиента концентрации (переносчик), другое – по градиенту.

Активный транспорт – изменение конформации молекул переносчика и перенос происходят за счет гидролиза АТФ.

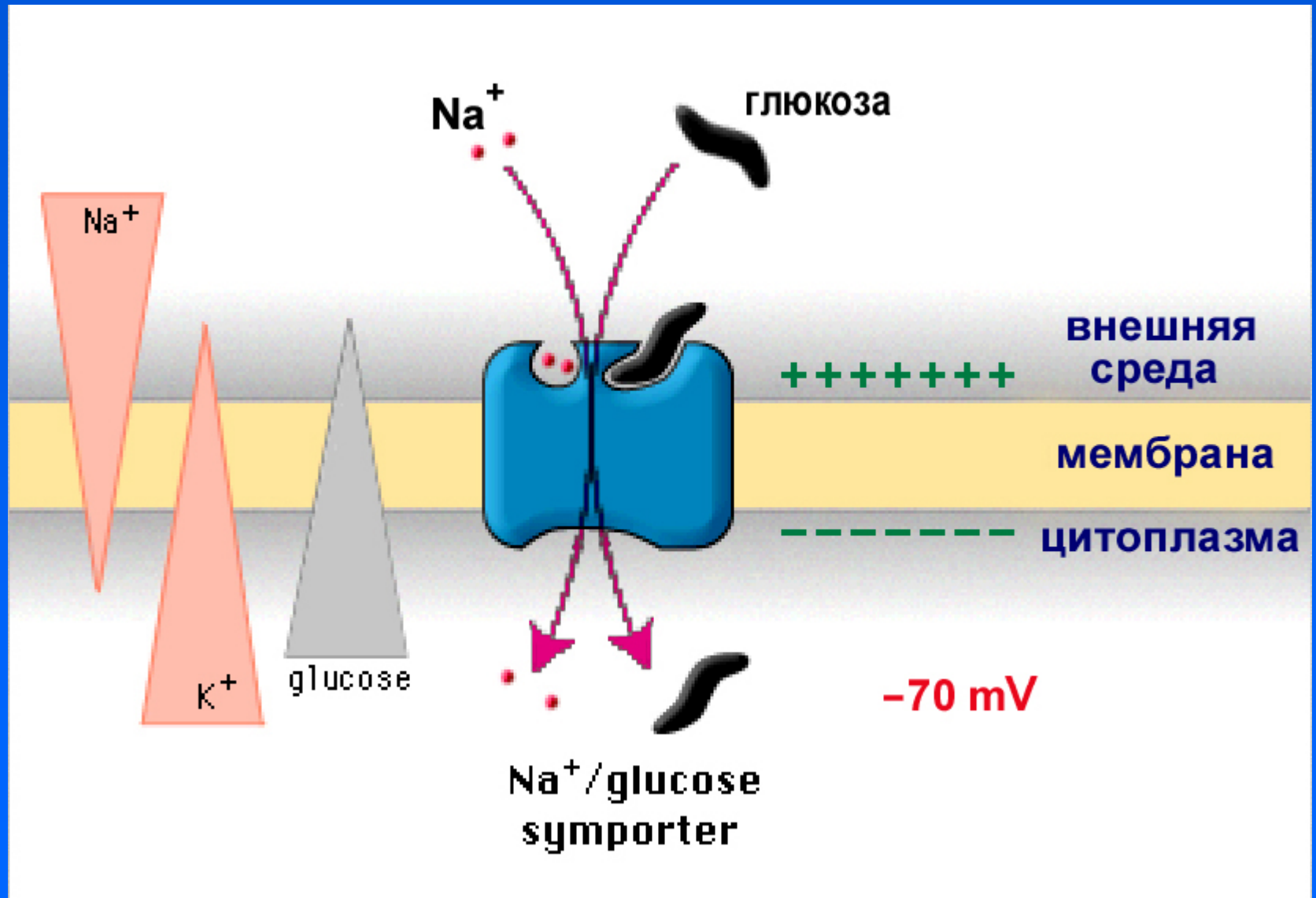
# Перенос молекул через мембрану клетки



# Основные ионы снаружи и внутри клетки (концентрация в мМ)

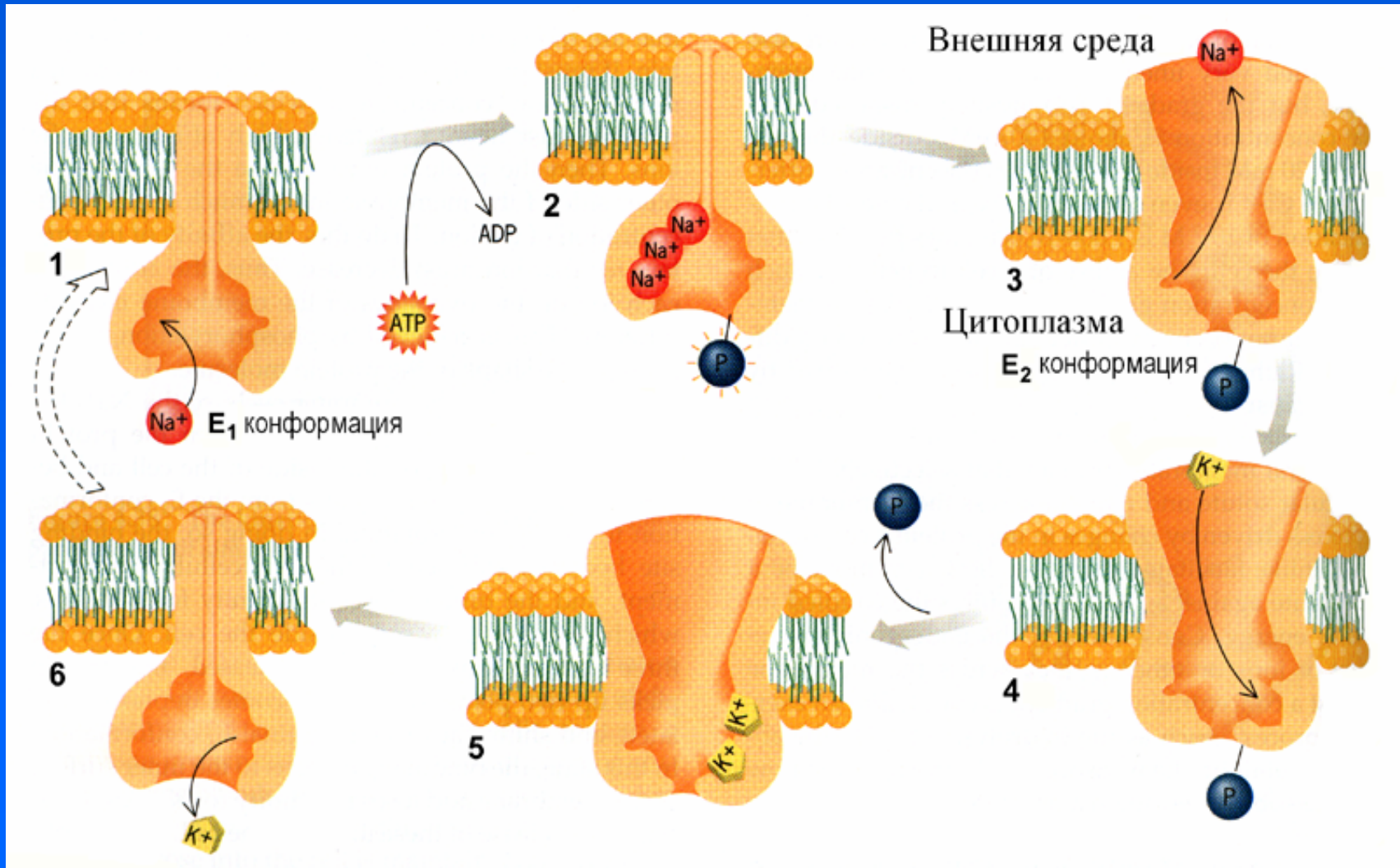
	Цитоплазма	Кровь
$K^+$	139	4
$Na^+$	12	145
$Ca^{++}$	<0.0002	1.8
$Cl^-$	4	116
$HCO_3^-$	12	29
Белки <sup>-</sup>	138	9

# Совместный перенос





# Цикл Na-K-АТФазы



# Компартментализация цитоплазмы (мембранные отсеки) у эукариот

Ядро

Эндоплазматическая сеть

Аппарат Гольджи – несколько отсеков

Лизосомы (вакуоли растений)

Транспортные везикулы (эндоцитозные  
и экзоцитозные) – несколько отсеков

Пероксисомы

Митохондрии

Хлоропласты

# Соотношение мембран в клетке

	Гепатоцит	Экзокринная клетка
Плазматическая мембрана	2	5
Гранулярный ЭПР	35	60
Гладкий ЭПР	16	<1
Аппарат Гольджи	7	10
Митохондрии, внешняя мембрана	7	4
Митохондрии, внутренняя мембрана	32	17
Ядро	0.2	0.7
Секреторные пузырьки	<0.1	3
Лизосомы и пероксисомы	0.8	<0.1

# Эндоплазматический ретикулум

ЭПР – сеть мембранных трубочек и мешочков, связанных друг с другом (и с ядерной мембраной).

Гранулярный ЭПР – на поверхности мембран сидят рибосомы.

Гладкий ЭПР – рибосом нет.

Основные функции гладкого ЭПР: синтез липидов и стероидов, метаболизм углеводов, обмен кальция.

Разновидность гладкого ЭПР – саркоплазматический ретикулум в мышцах. Он регулирует уровень ионов кальция для сокращения и релаксации мышцы.

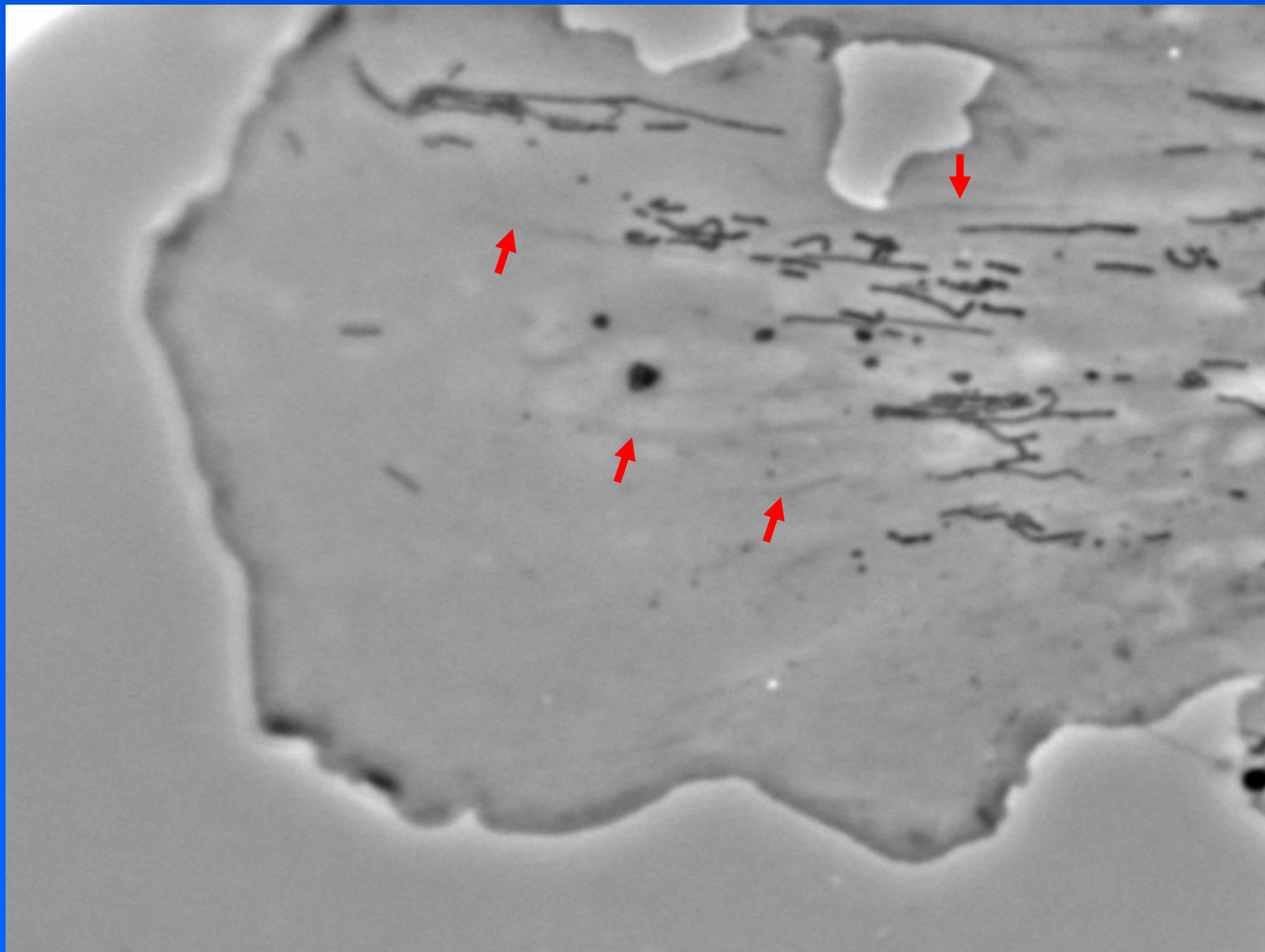
# Эндоплазматическая сеть, сканирующая ЭМ



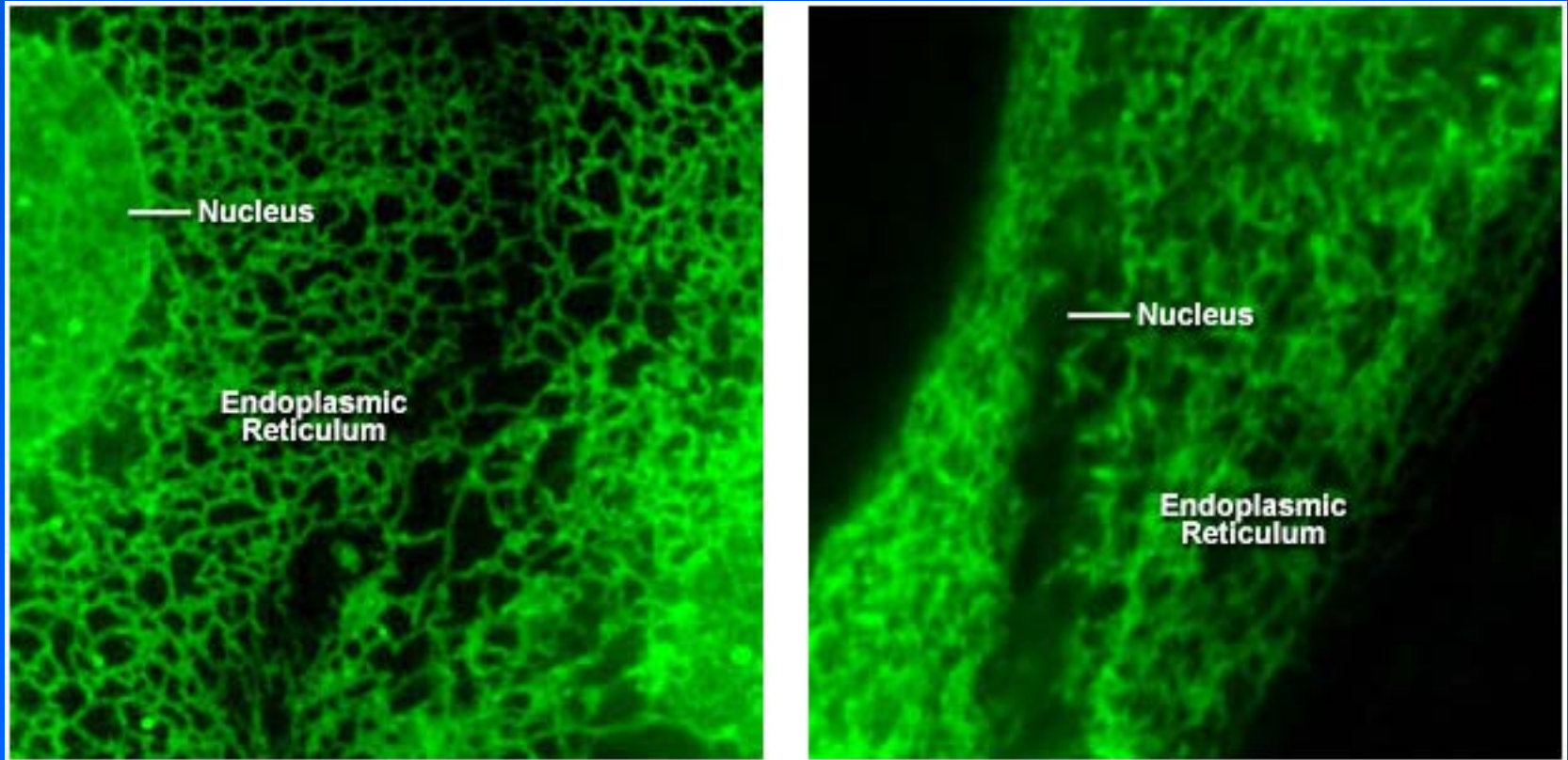
ЭПР представлена в виде анастомозирующих каналов (трубок) и соединенных с ними плоских мешков (цистерн). Желтым цветом выделены отдельные рибосомы.



# Эндоплазматическая сеть в живой клетке

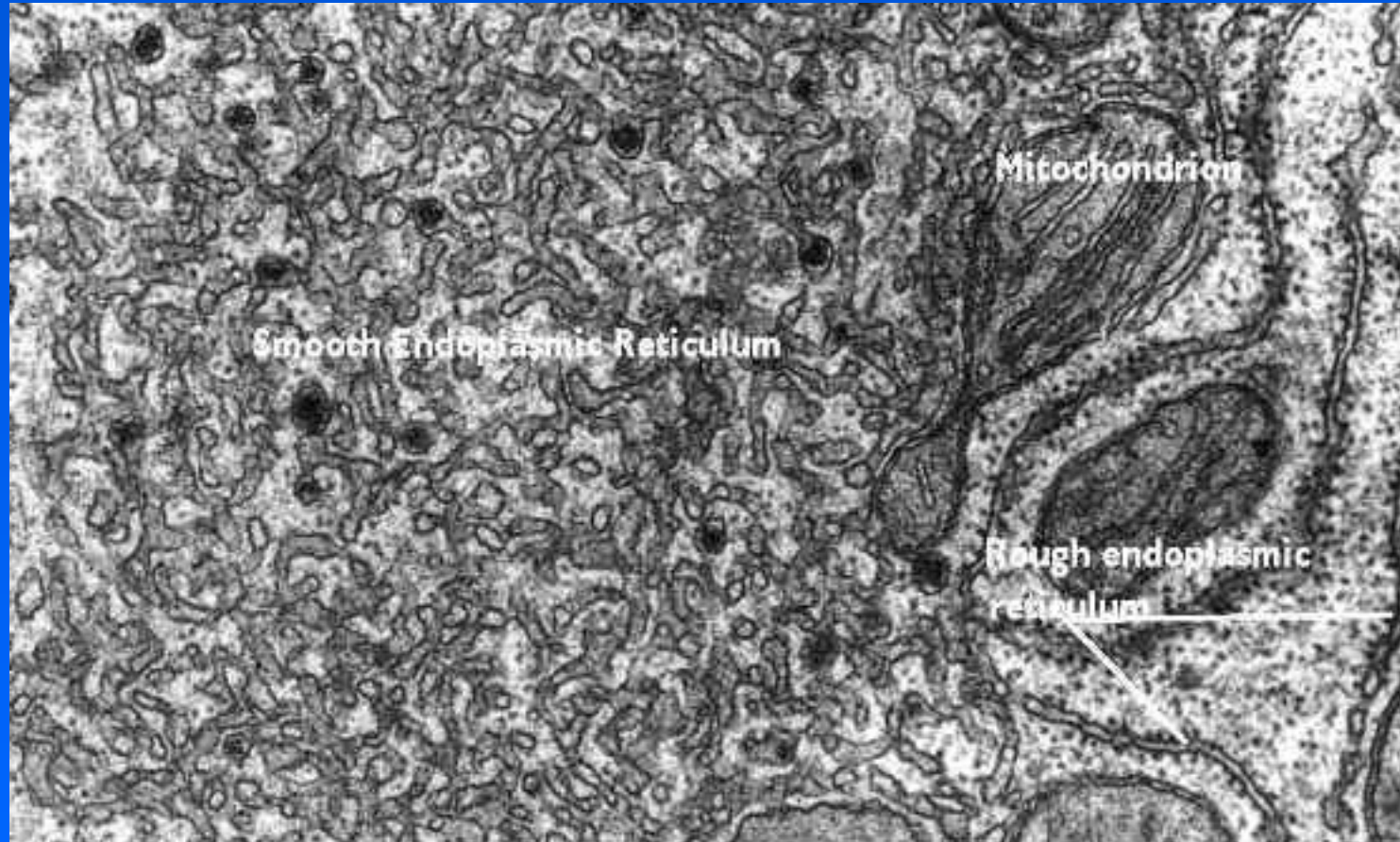


# Эндоплазматическая сеть в клетке – флуоресценция



**ЭР представляет собой сеть, которая занимает большую часть цитоплазмы клетки.**

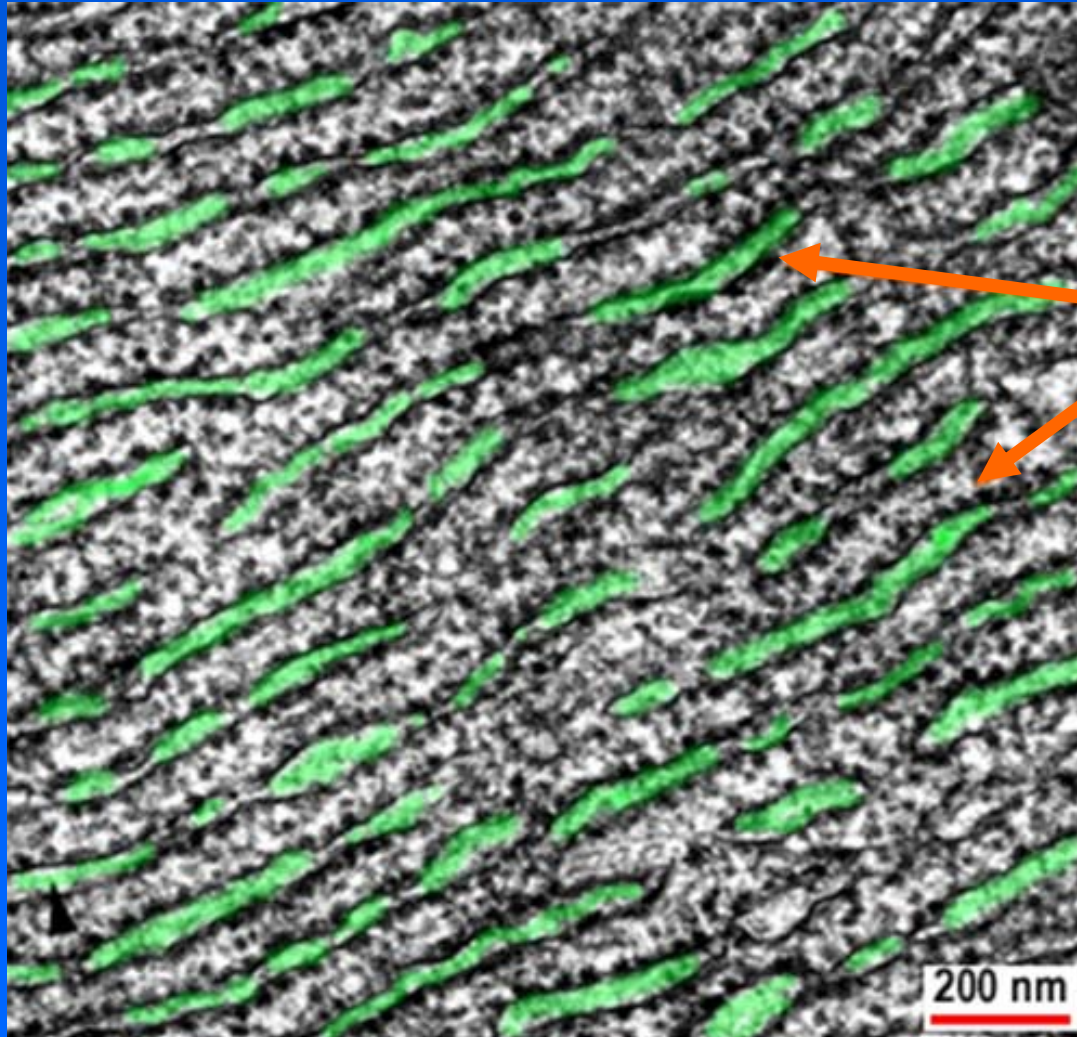
# Гладкий эндоплазматический ретикулум



В некоторых клетках имеются значительные области гладкого ЭПР, который отличается от гранулярного ЭПР (справа) большей извилистостью мембран.

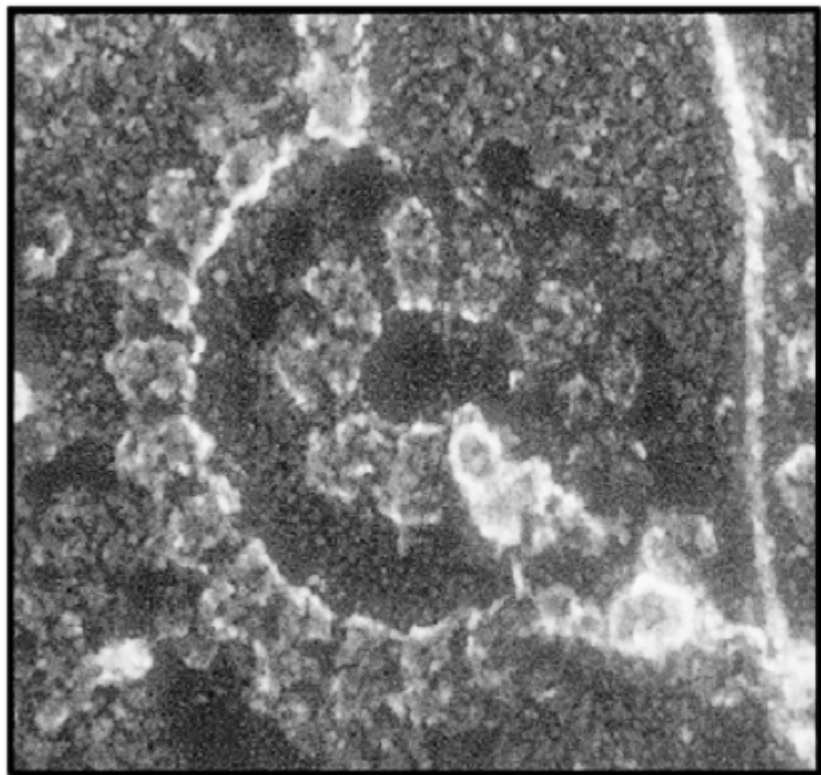


# Общий вид гранулярной эндоплазматической сети



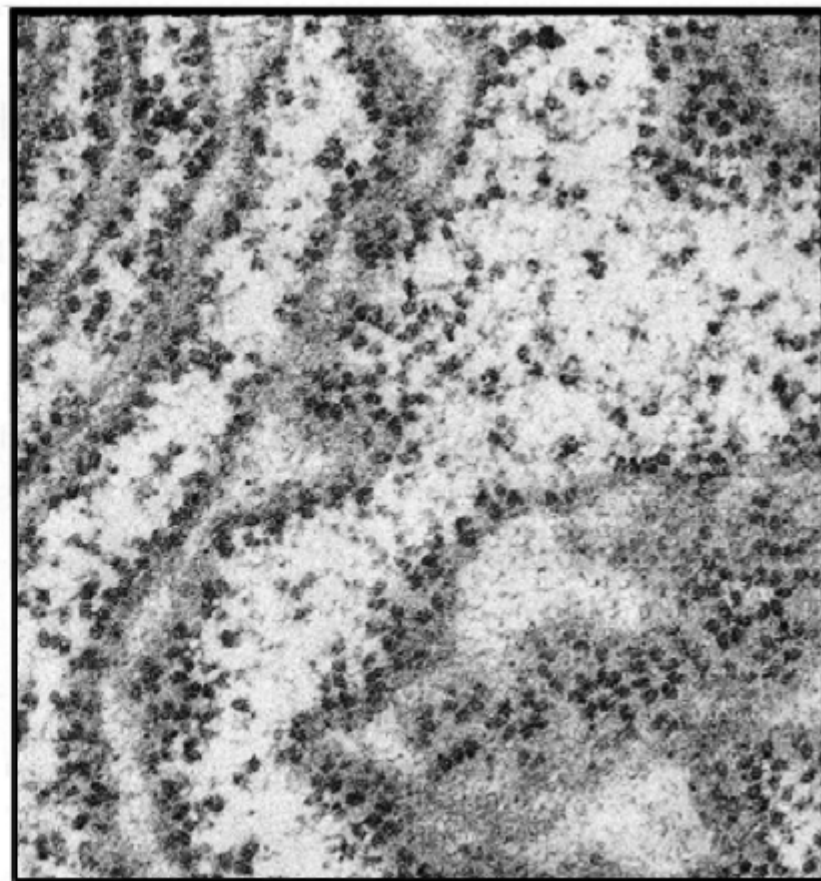
рибосомы

# Полирибосомы и гранулярная эндоплазматическая сеть



(A)

100 nm



(B)

400 nm



# Основные функции ЭПР

Биосинтез секретируемых и мембранных белков (гранулярный ретикулум).

Биосинтез липидов (гладкий ретикулум).

Первичная посттрансляционная модификация белков.

Регуляция кальциевого обмена (депо ионов  $\text{Ca}^{++}$ ) – гранулярный и гладкий ретикулум, специализированный гладкий ретикулум (Т-система) в мышечных клетках.

# Биосинтез секретлируемых и мембранных белков

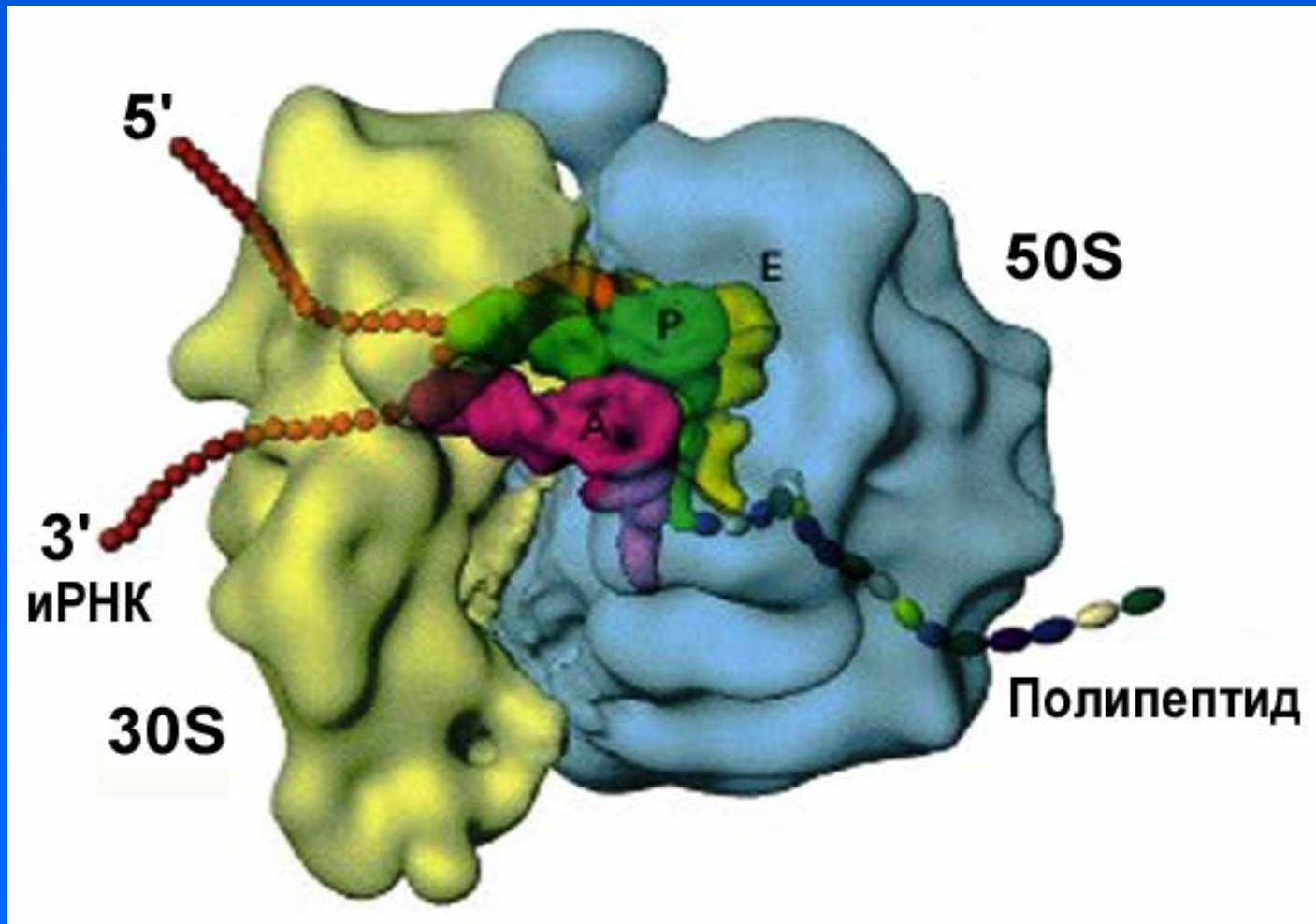
Биосинтез секретлируемых белков начинается на рибосомах также, как и остальных, но быстро останавливается (формирование сигнального пептида).

Окончание элонгации полипептида обеспечивается через связывание рибосомы с транслоконом в мембране ЭПР.

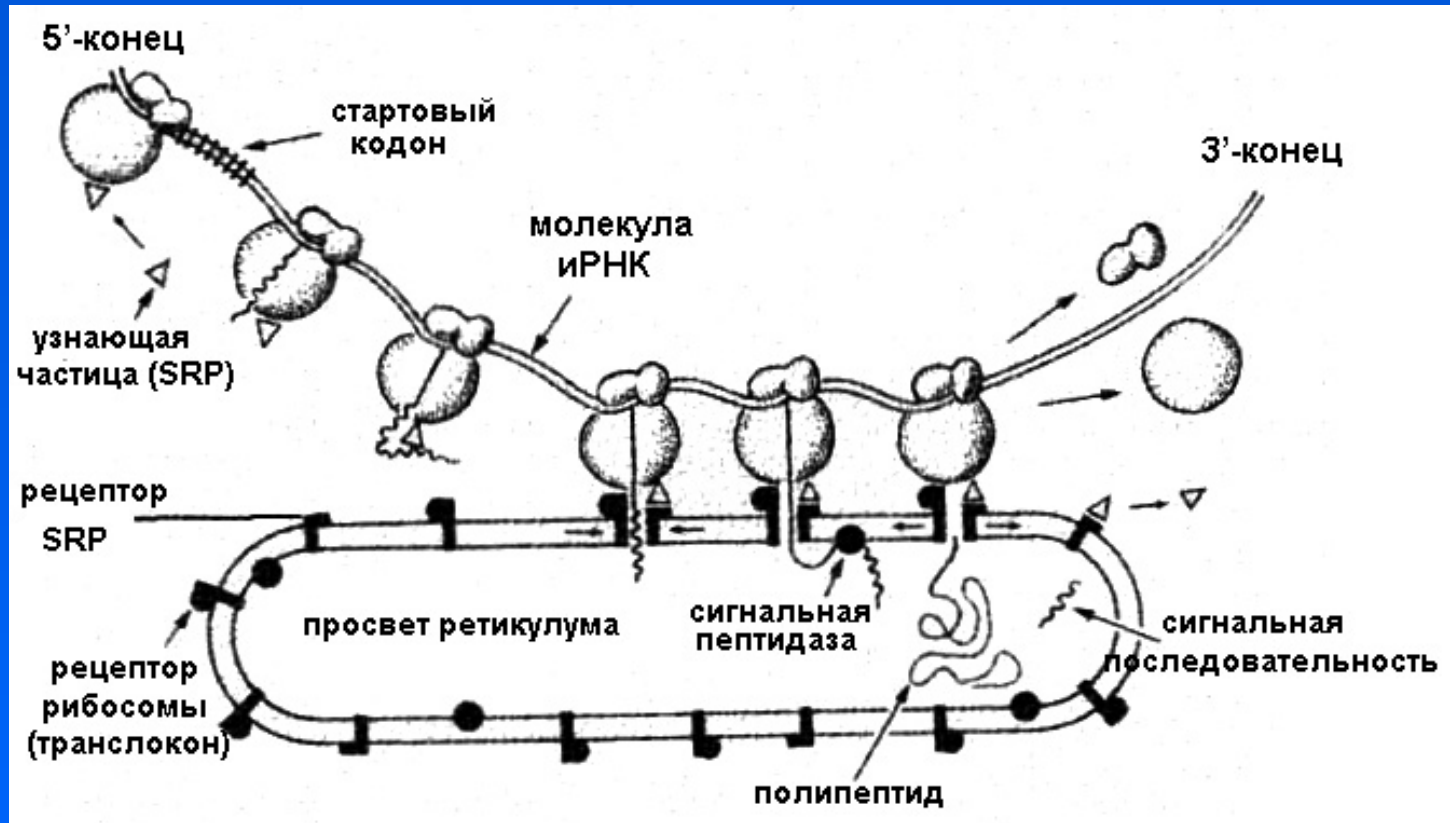
Синтезированный белок укладывается в мембрану или сворачивается в просвете ЭПР.

Мембранные и секретлируемые белки часто претерпевают посттрансляционную модификацию (гликозилирование и др.) , которая начинается уже внутри просвета ЭПР.

# Биосинтез белка в рибосоме



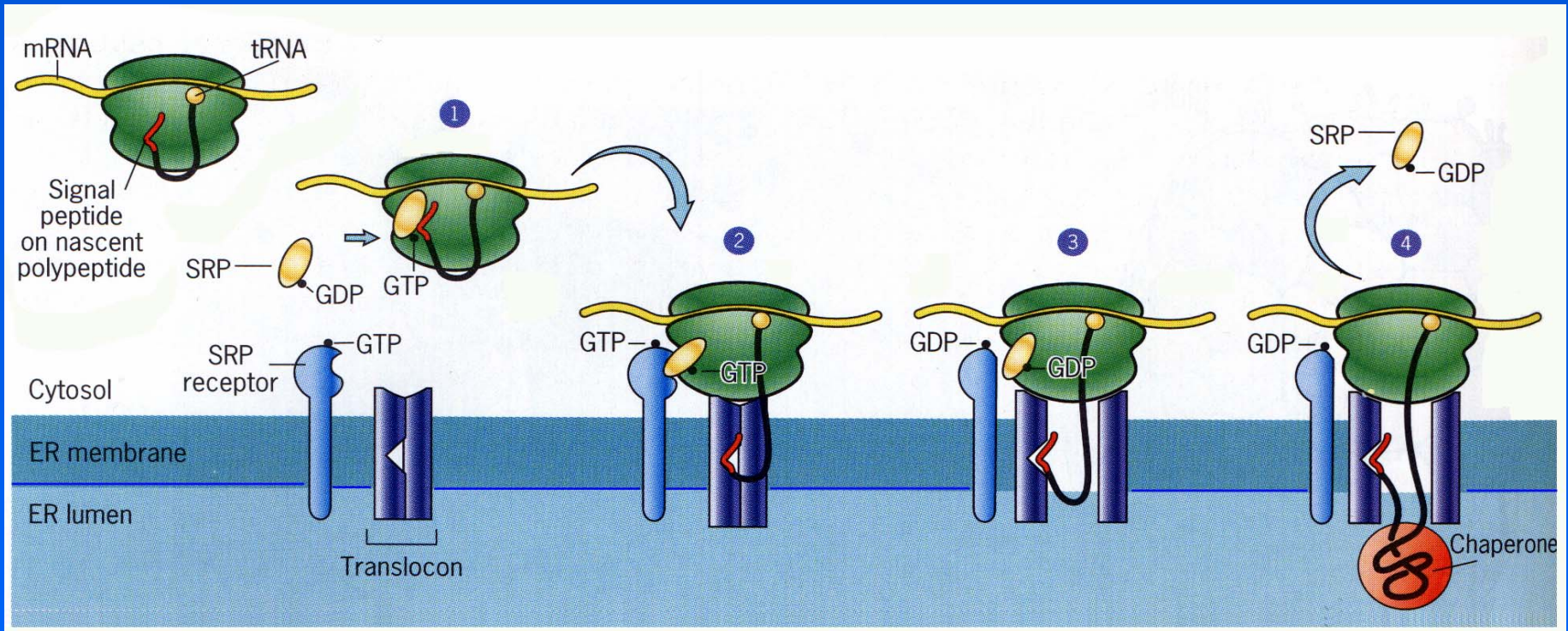
# Биосинтез белка на ЭПР



Три стадии – синтез сигнального пептида до контакта с мембраной (в цитозоле); образование комплекса рибосомы с транслоконом; завершение синтеза полипептида после прикрепления рибосомы к мембране ЭПР.



# Биосинтез секретiruемого белка

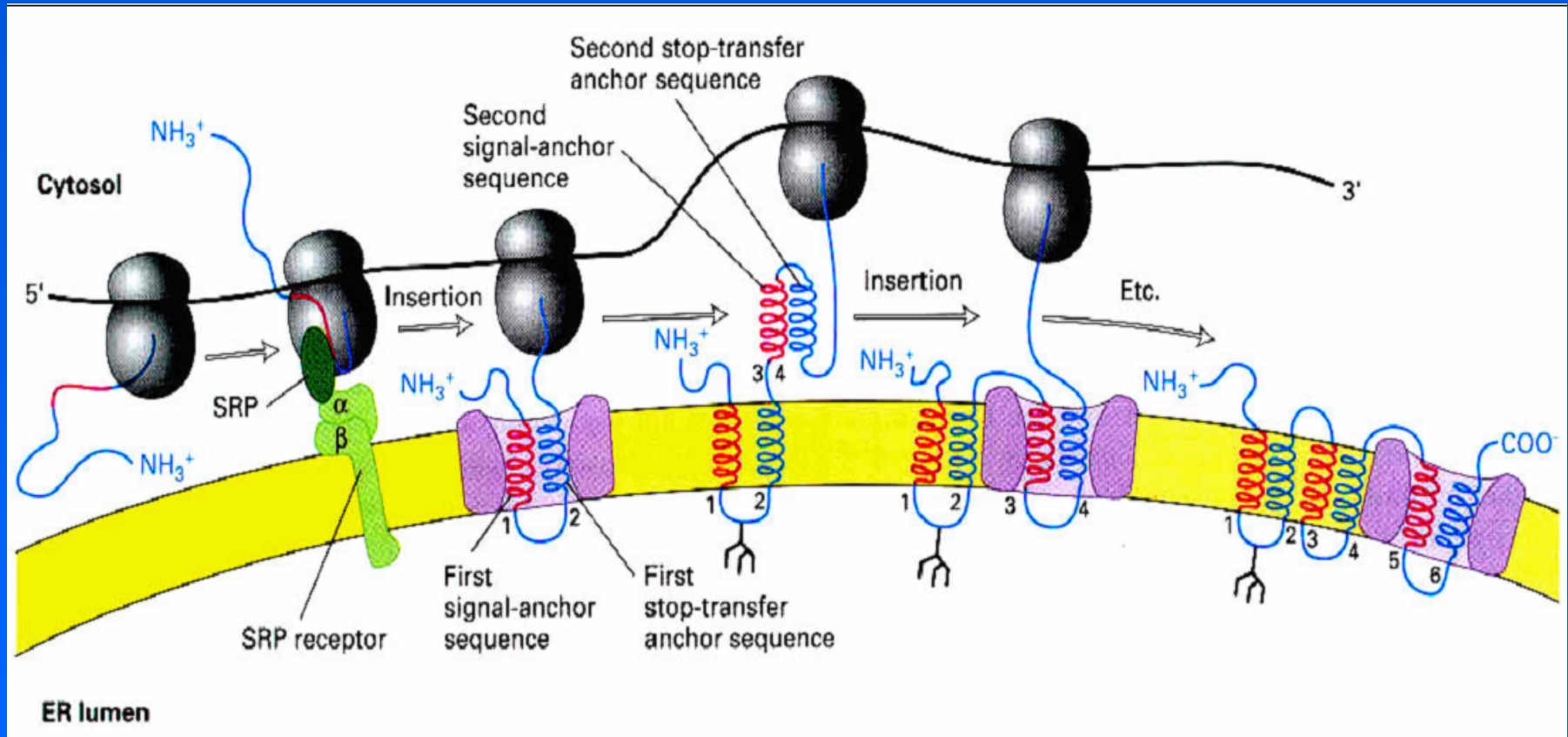


**SRP – нуклеопротеидный комплекс (РНП). Для взаимодействия с сигнальной последовательностью требует присоединение ГТФ, при отделении SRP от рибосомы и рецептора происходит гидролиз ГТФ.**

**Новосинтезированный белок после прохождения через транслокон сразу взаимодействует с шаперонами или укладывается в мембрану.**

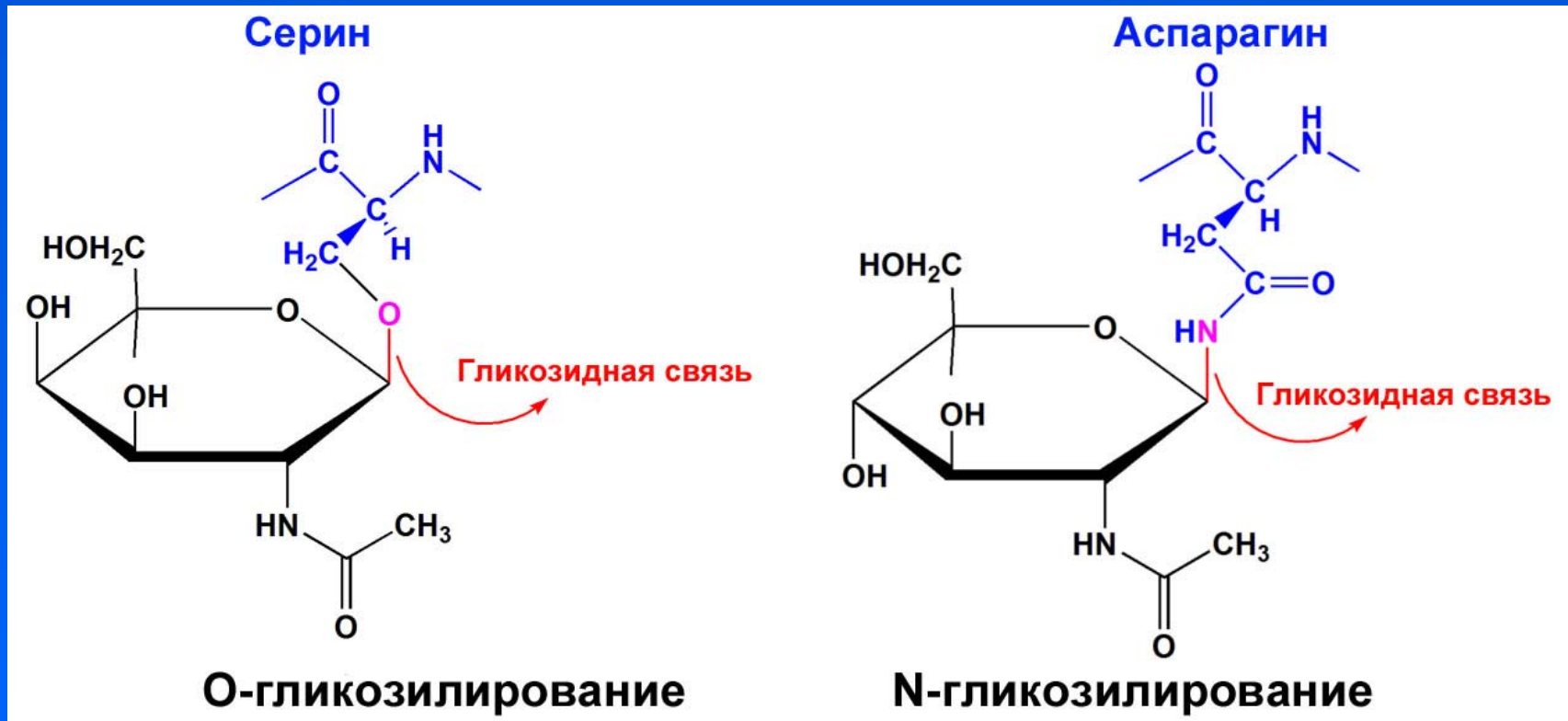


# Биосинтез сложного трансмембранного белка



Белок, имеющий несколько трансмембранных доменов, имеет несколько сигнальных последовательностей, каждая из которых обеспечивает взаимодействие рибосомы с транслоконом.

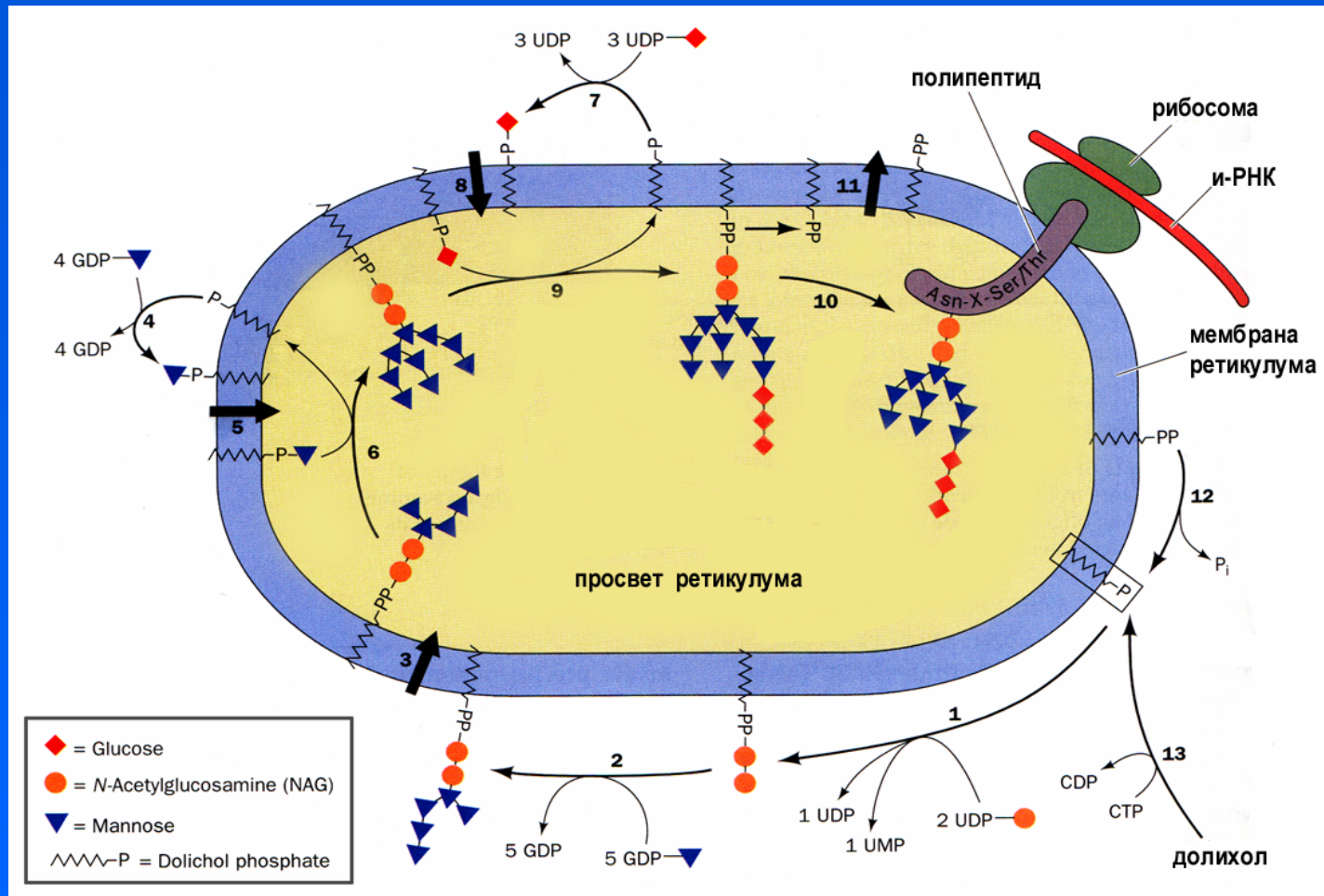
# Гликозилирование белков



**О-гликозилирование:** сахар присоединяется к атому кислорода на боковой цепи серина или треонина.

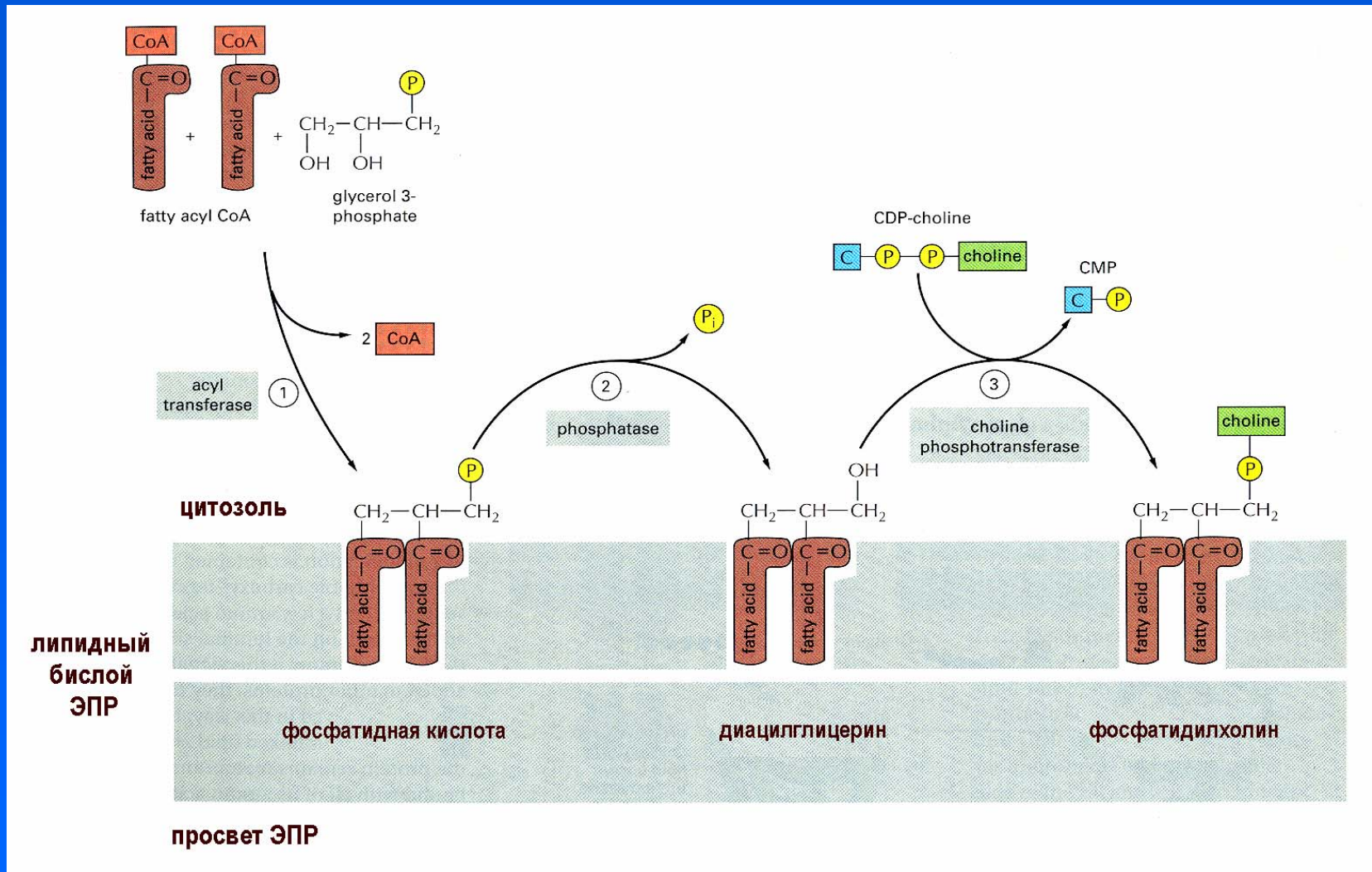
**N-гликозилирование:** сахар присоединяется к атому азота на аспарагине.

# Гликозилирование белков в ЭПР



Полипептиды надстраиваются олигосахаридами, которые переносятся через мембрану из цитозоля в просвет ЭПР.

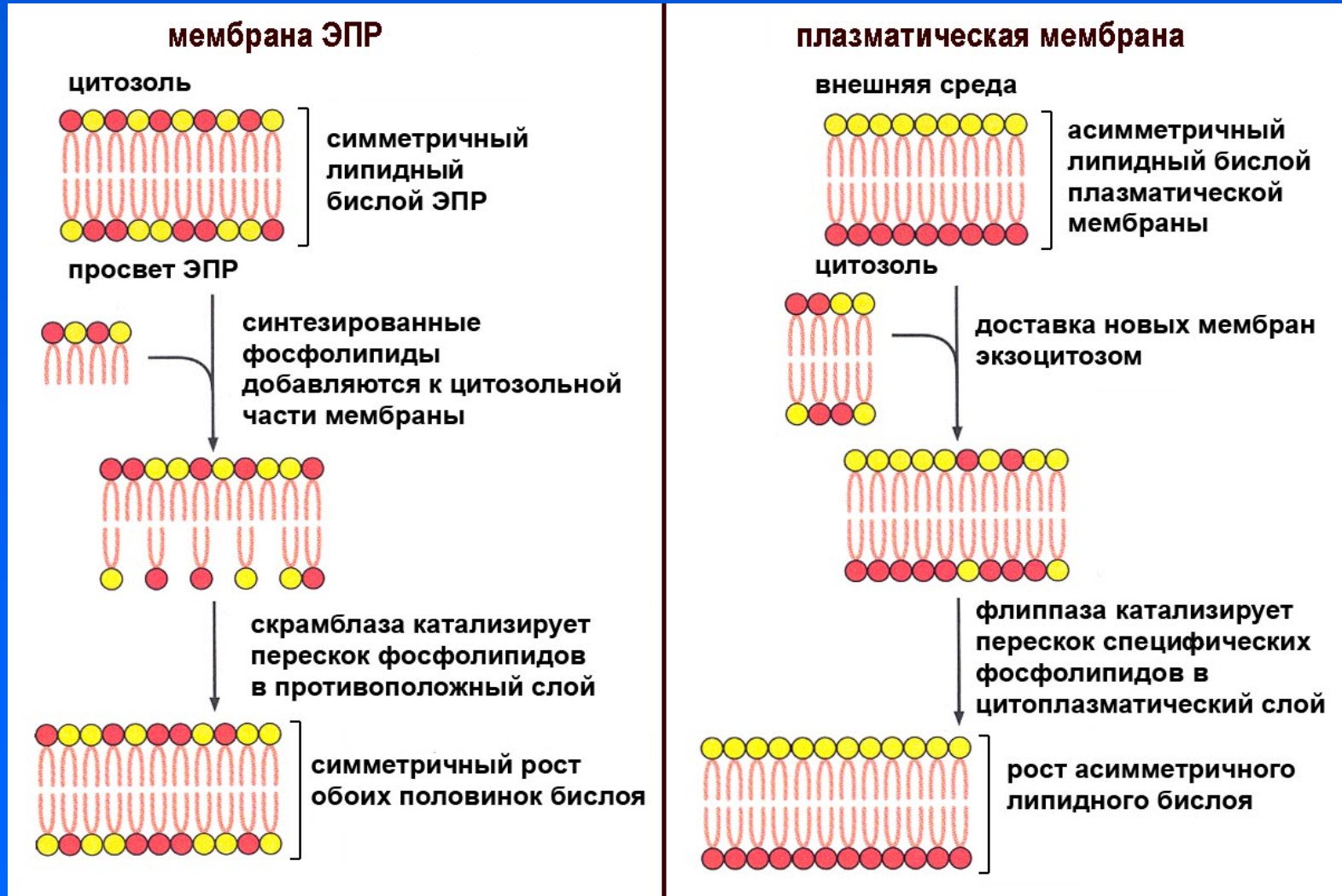
# Биосинтез липидов в ЭПР



Биосинтез триглицеридов происходит в основном в гладком ЭПР. Жирные кислоты часто поступают с пищей.

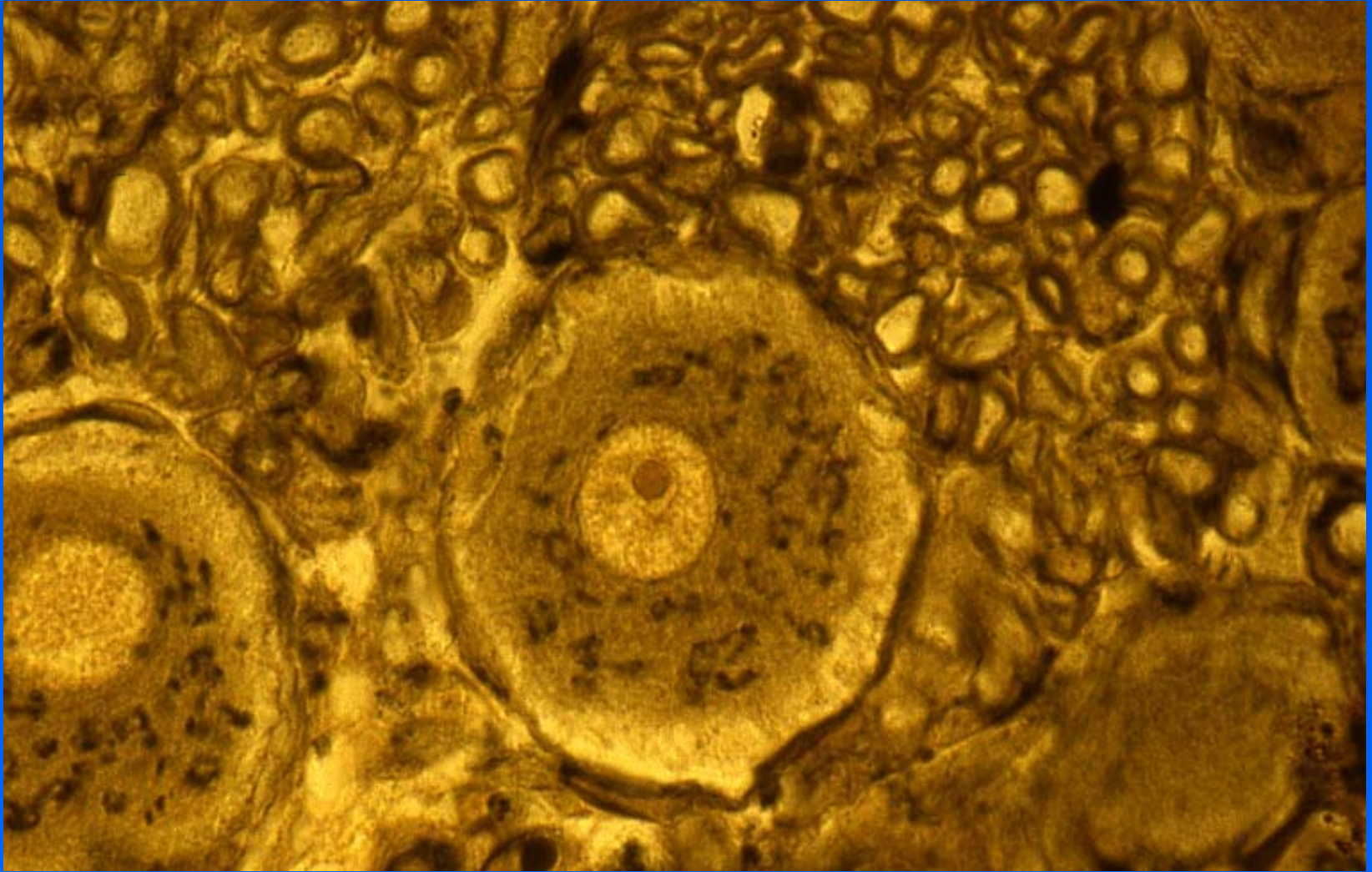


# Формирование и преобразование липидного бислоя



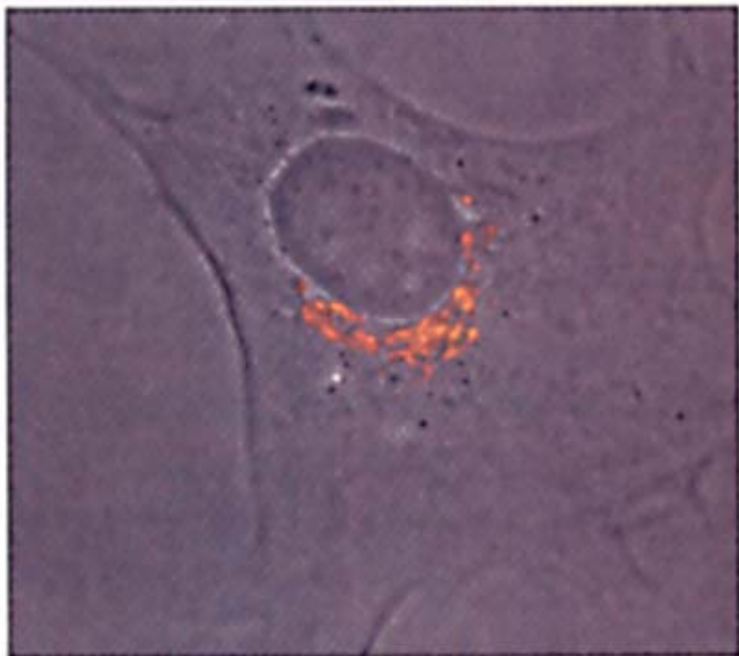


# Аппарат Гольджи, серебрение

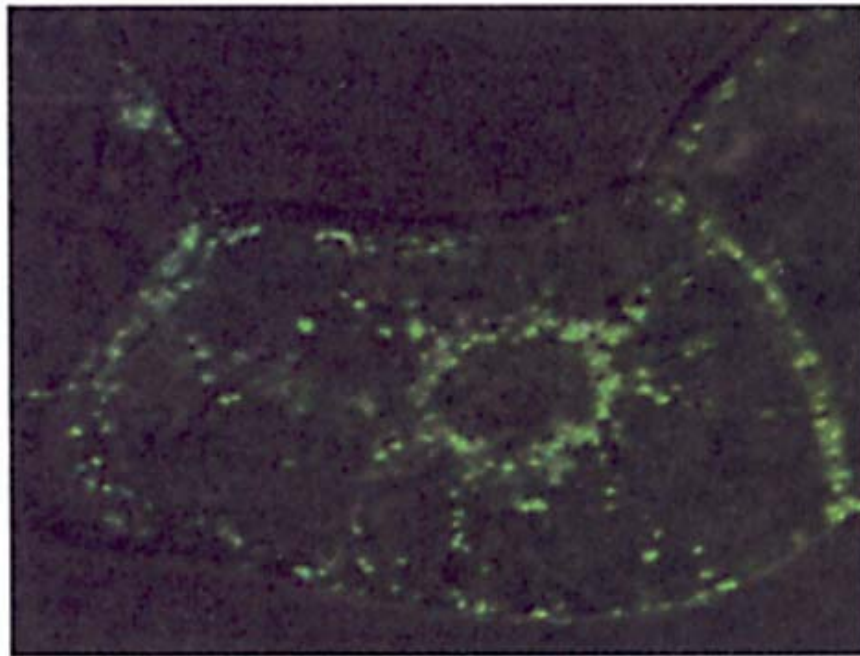


Открыт Камилло Гольджи в 1898 году

# Аппарат Гольджи, люминесцентная микроскопия



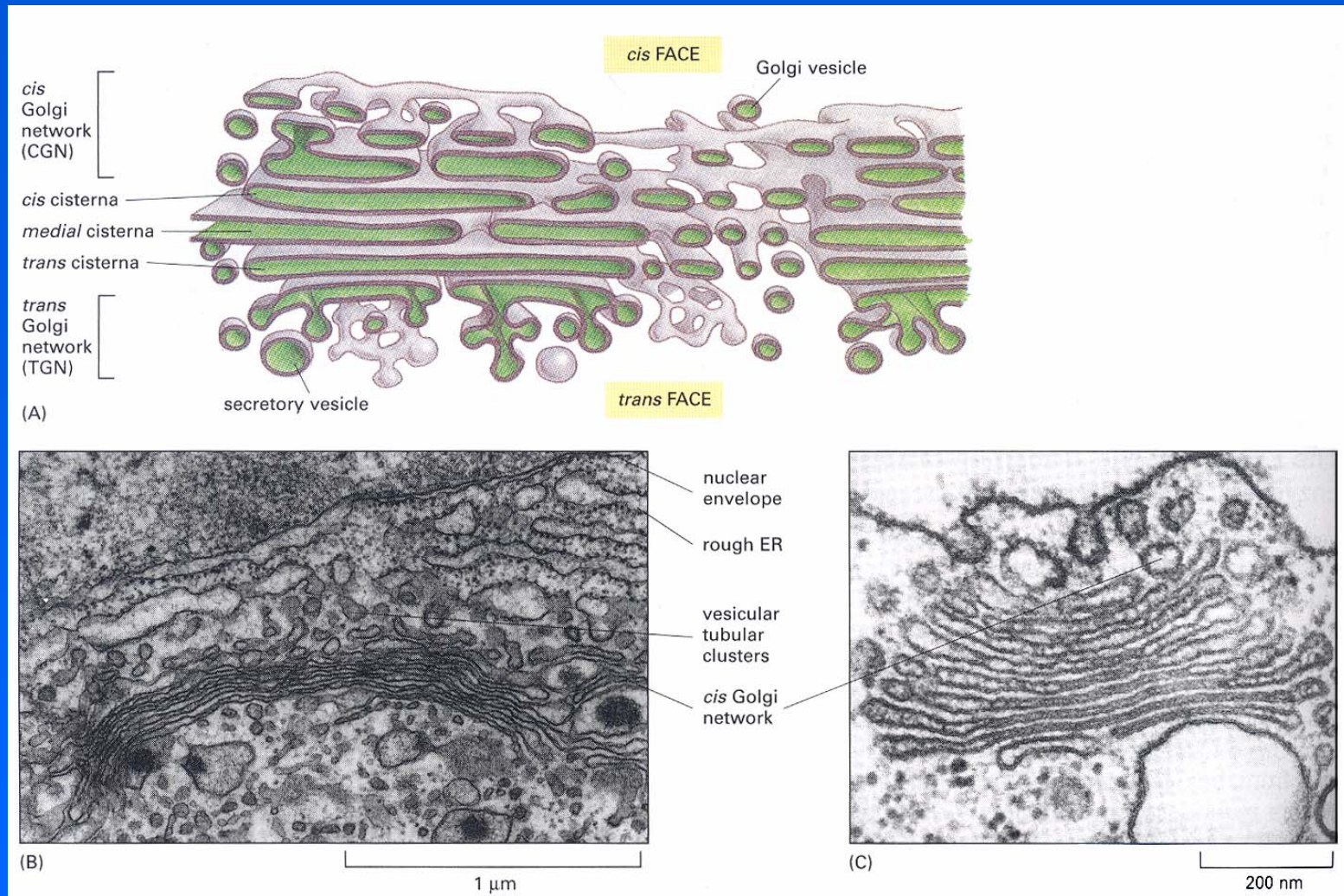
Животные



Растения



# Аппарат Гольджи: схема и ЭМ



**Структурно-функциональная единица АГ – диктиосома. Диктиосома – стопка плоских мембранных мешков (6-12), не соединяющихся друг с другом.**

# Основные функции аппарата Гольджи

Преобразование, упаковка и сортировка поступающих в него белков. Сортировка белков связанная с формированием у них сигнальных последовательностей.

Синтез и модификация углеводов (гликозилирование, фосфорилирование, сульфатирование). Формирование сложных гликопротеинов.

Образование трех типов мембранных компартментов: лизосомы, секреторные пузырьки (регулируемая секреция) и экзоцитозные пузырьки (конститутивная секреция, обновление плазматической мембраны).

Обеспечение обновления плазматической мембраны.

Формирование гликокаликса, клеточных стенок в растительных клетках и другого внеклеточного матрикса.

# Основные реакции в аппарате Гольджи

Фосфорилирование олигосахаридов на лизосомных белках.

Синтез глюкозаминогликанов – длинных неветвящихся полисахаридов.

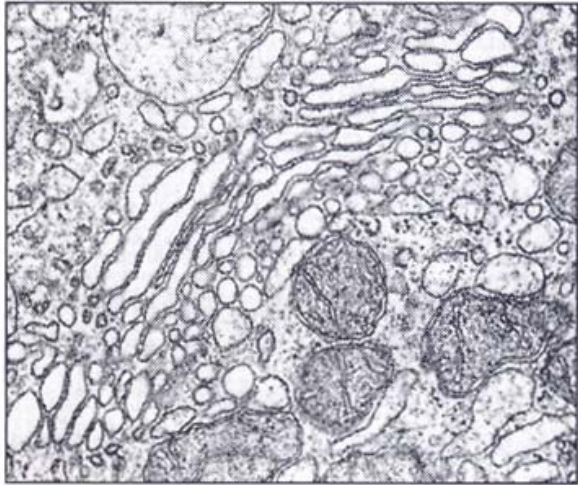
Присоединение маннозы и галактозы к белкам – формирование протеогликанов.

Сульфатирование протеогликанов.

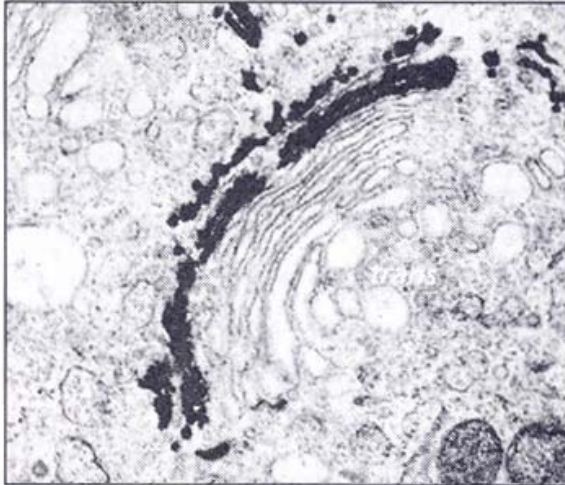
Формирование активных лизосомных ферментов (кислая фосфатаза).



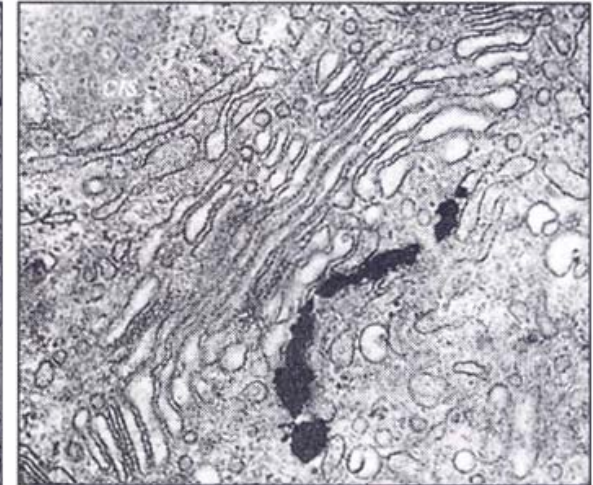
# Поляризация внутри диктиосомы



морфология



восстановление осмия –  
цис-Гольджи



кислая фосфатаза –  
транс-Гольджи

**Строение диктиосомы: цис-компаратмент, транс-компаратмент и промежуточный компартмент, которые отличаются спектрами основных реакций.**

# Перенос материала внутри ДИКТИОСОМЫ

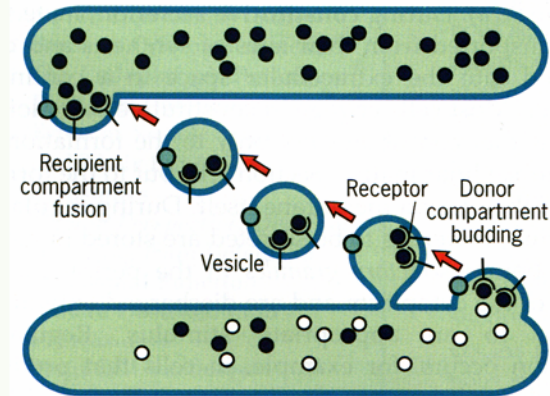
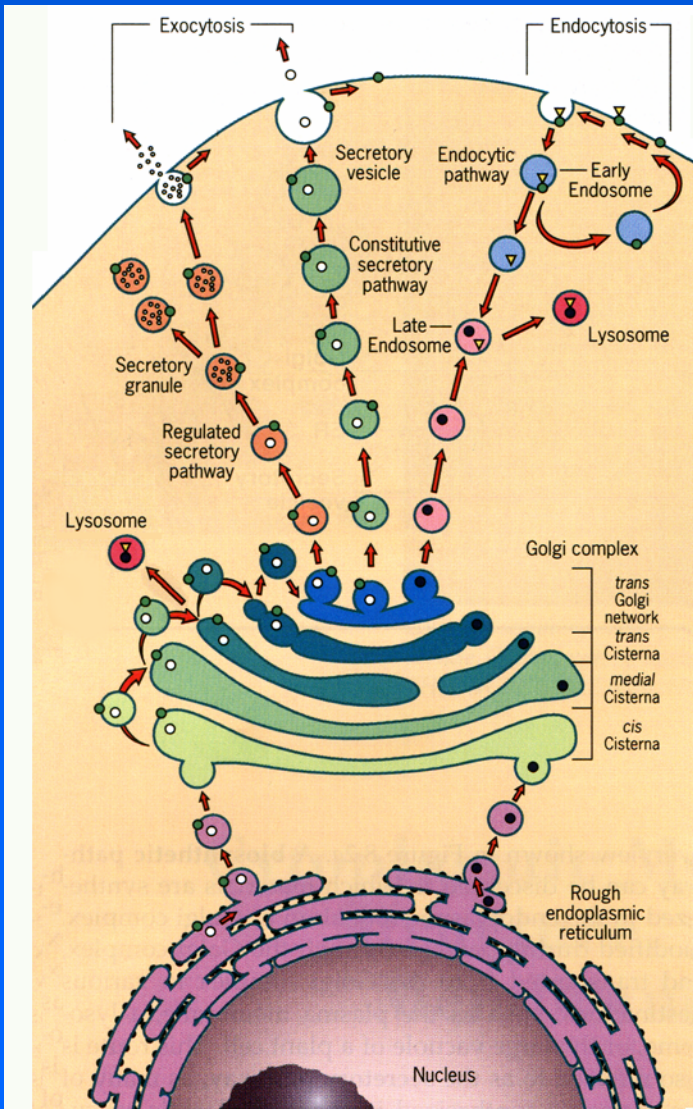
Две гипотезы:

Созревание цистерн. Каждая цистерна предполагается относительно нестабильной. Предполагается, что цис-цистерна возникает из пузырьков, приходящих из ЭПР, а транс-цистерна полностью распадается на пузырьки.

Везикулярный транспорт между цистернами. Цистерны предполагаются стабильными, перенос веществ между ними происходит только за счет транспортных пузырьков.

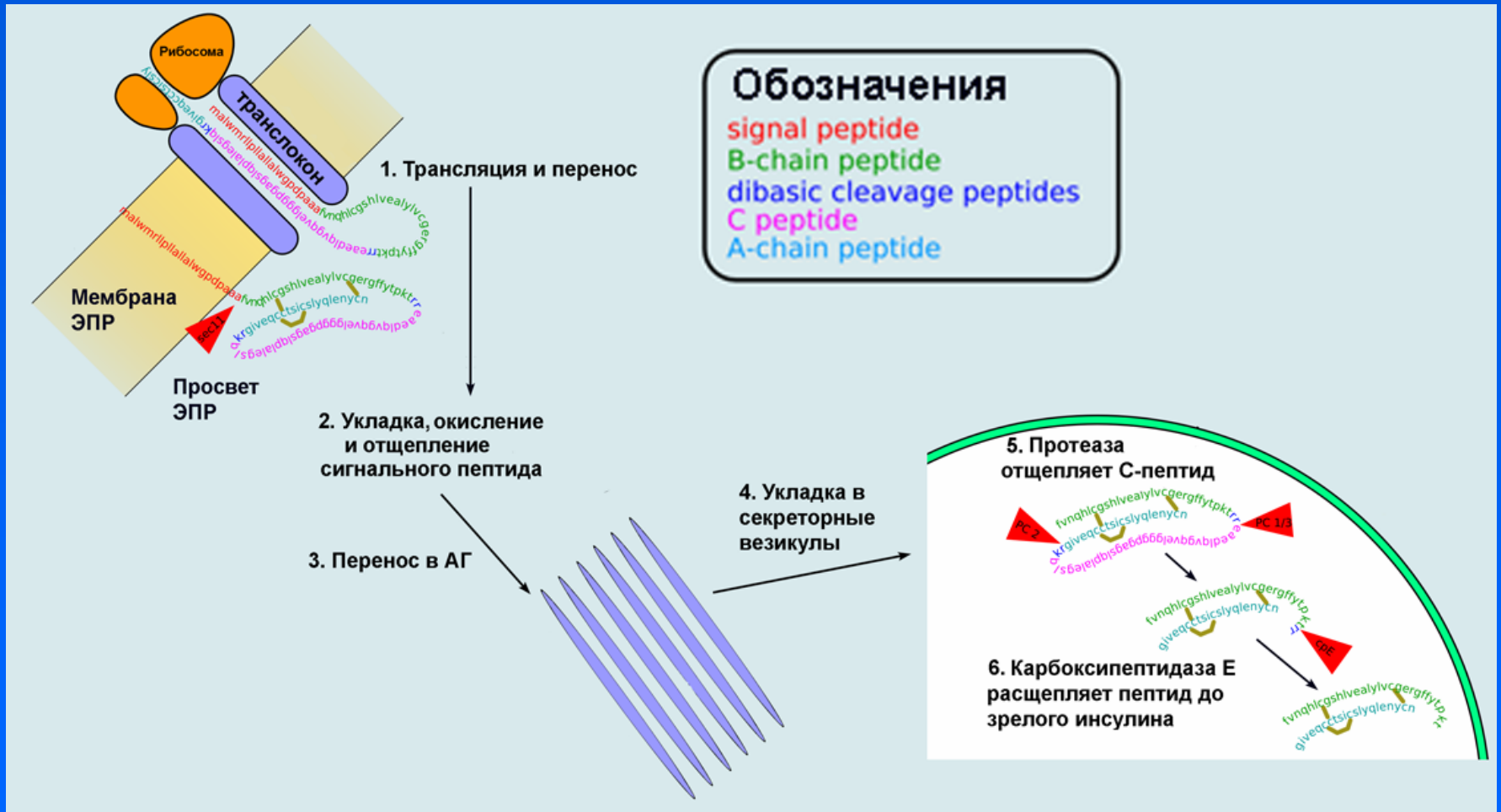
В настоящее время предполагается, что оба механизма могут сосуществовать: транспорт в виде пузырьков между цистернами существует, но время жизни отдельной цистерны меньше, чем время жизни диктиосомы.

# Перенос мембран в клетке



Этапы переноса  
содержимого цистерн

# Синтез и созревание белка на примере инсулина





# **Лекция 6**

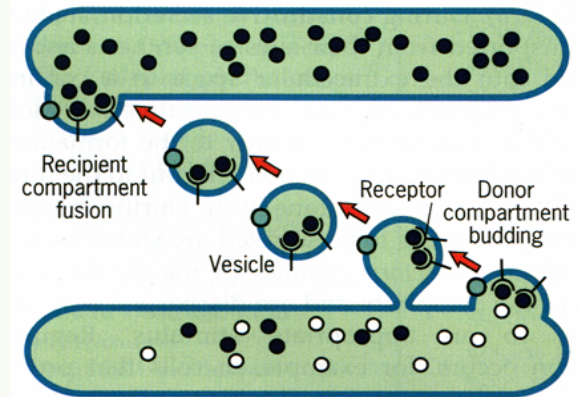
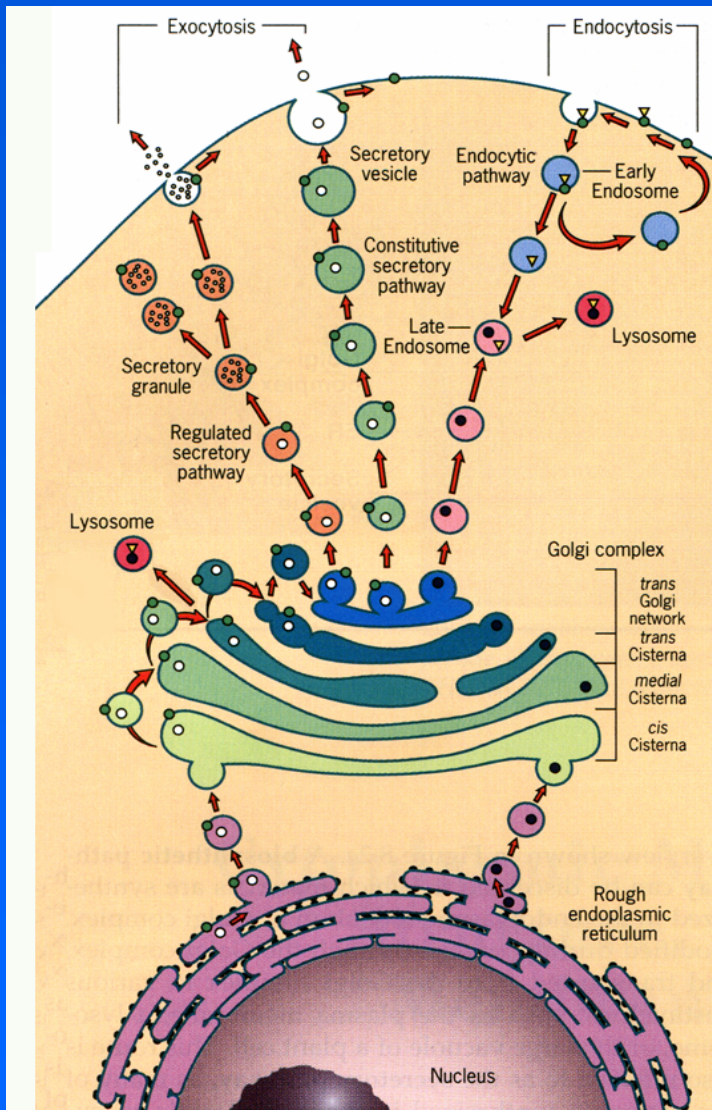
**Везикулярный транспорт**

**Лизосомы и Пероксисомы**

**Митохондрии – строение, окисление  
субстратов и синтез АТФ**



# Перенос мембран в клетке



Этапы переноса  
содержимого цистерн

# ЭКЗОЦИТОЗ

**Конститутивная секреция – постоянное выведение пузырьков наружу (обновление плазматической мембраны).**

**Регулируемая секреция – как правило, происходит в ответ на внешние стимулы, приводящие к входу кальция в цитоплазму.**

**Неканоническая секреция – выделение белков через интактную плазматическую мембрану.**

**Формирование микрочастиц:**

**Процесс, аналогичный регулируемой секреции, но при этом изменяются свойства плазматической мембраны и отделяются большие частицы (до 1 мкм), на поверхности которых присутствует фосфатилдилхолин.**

# Белки, участвующие в переносе пузырьков

Факторы рибозилирование АДФ (ARF) – ГТФ-азы с м.в. 20кД, регулирующие транспорт пузырьков. Растворимые белки, которые слабо взаимодействуют с мембранами.

Клатрин и адапторные комплексы (AP-1, AP-2, AP-3).

Комплексы COPI и COPII.

Кавеолыны – интегральные мембранные белки, образуют ямки диаметром около 50 нм, участвуют в эндоцитозе.

Динамин – белок, отвечающий за эндоцитоз и отделение пузырьков от аппарата Гольджи.

Rab-белки – полуинтегральные мембранные белки. Малые мономерные ГТФ-азы. Сопровождают различные формы пузырьков.

SNAREs – небольшие мембраносвязанные белки. Обеспечивают слияние мембран.

# Формирование транспортных пузырьков

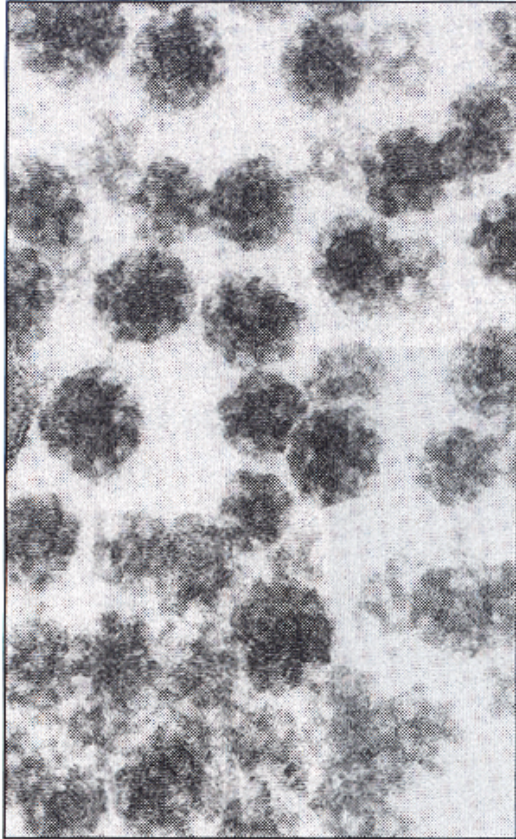
Процесс начинается с рекрутирования белков из цитозоля: сначала ARF, потом клатрин с адапторными белками или мультимеры COPI/COPII.

На второй стадии происходит упаковка содержимого пузырьков с внутренней стороны мембраны.

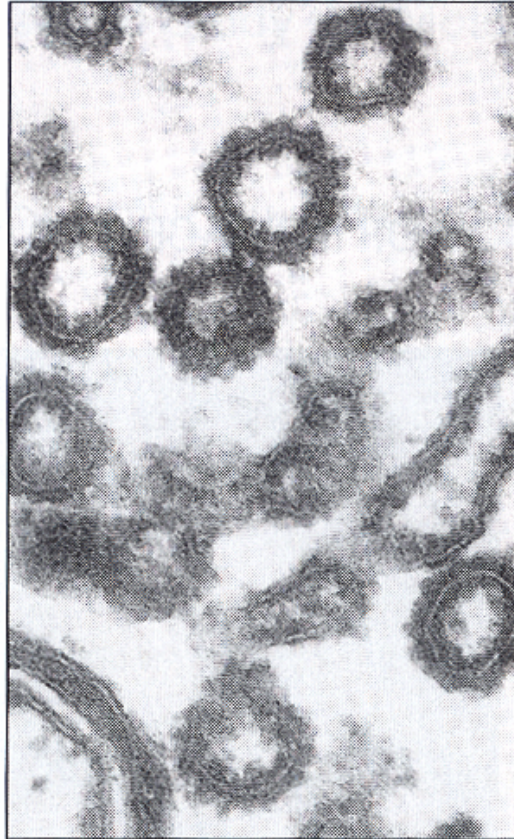
На третьей стадии – собственно почкование с помощью динамина.



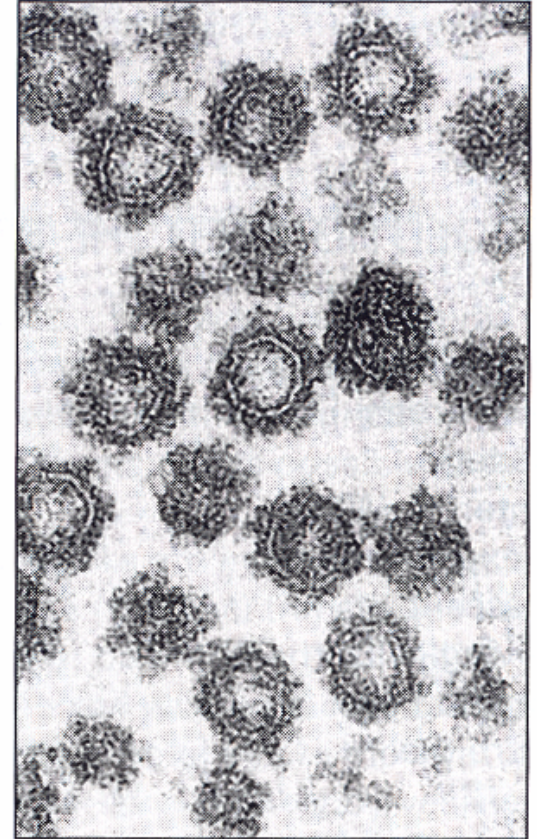
# Три основных типа окаймленных пузырьков



clathrin



COPI

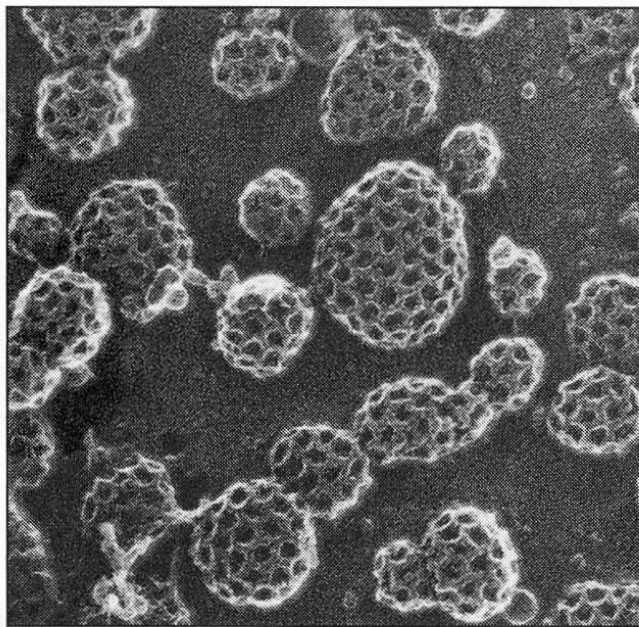


COPII

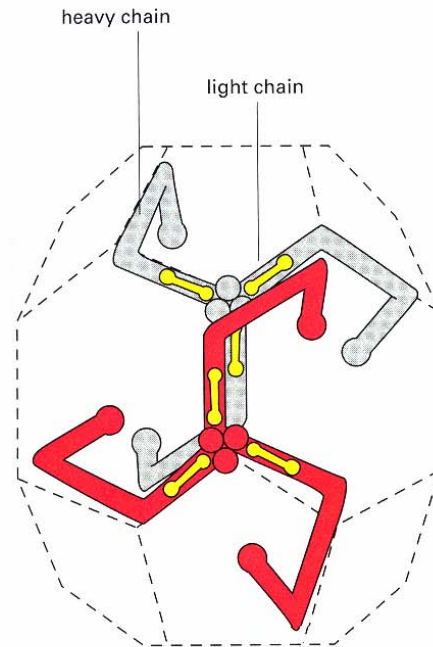
100 nm



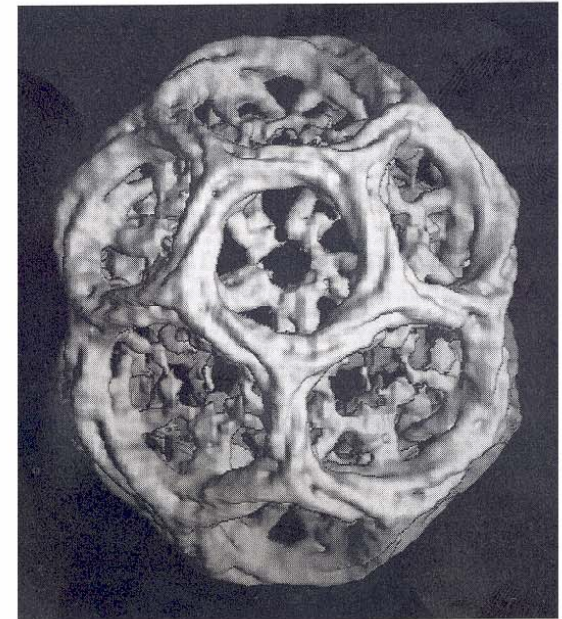
# Клатриновые скелеты транспортных везикул



0.2 μm



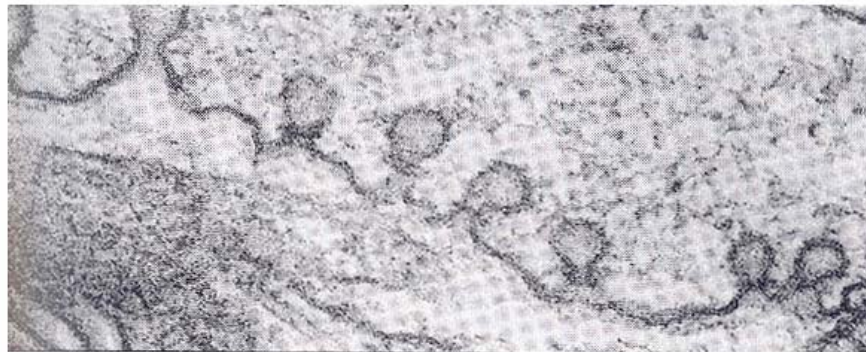
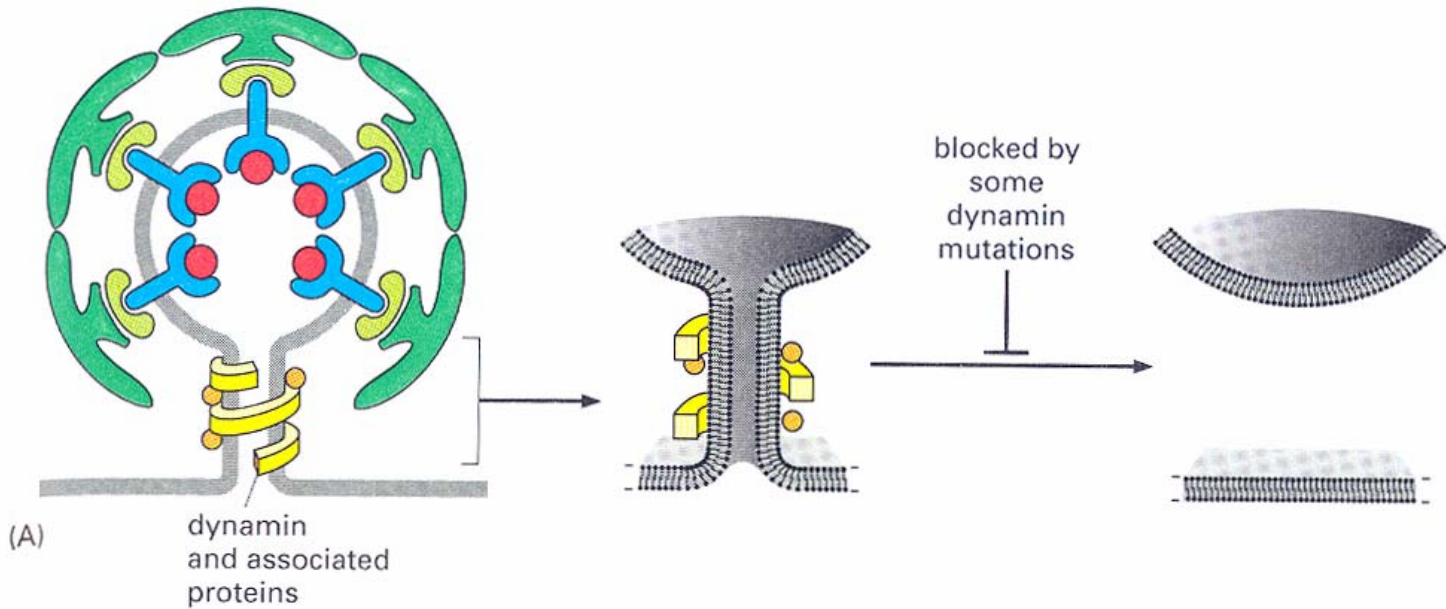
(B)



(C)

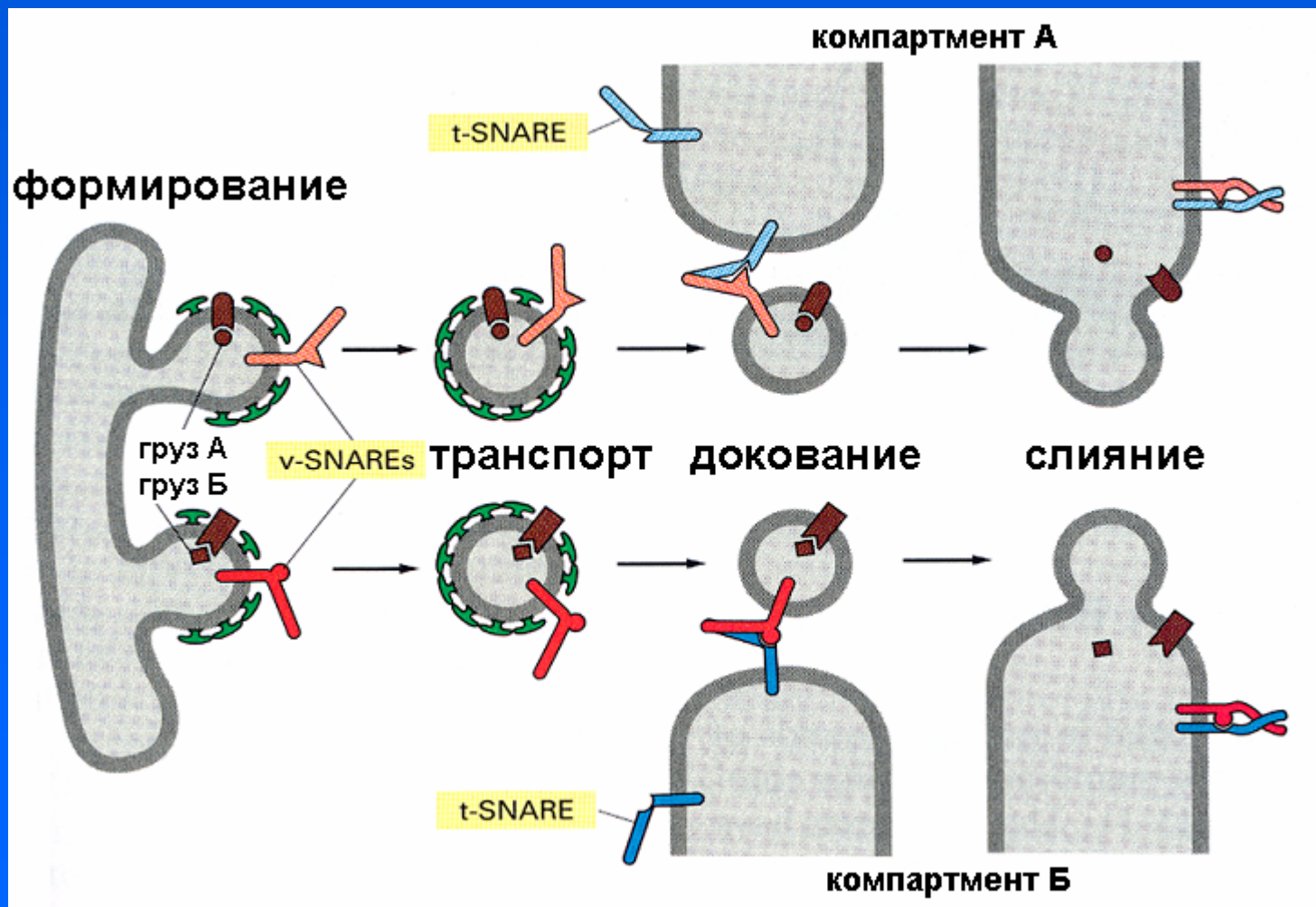
50 nm

# Почкование пузырьков



200 nm

# Докование транспортных пузырьков







# Транспорт пузырьков

Транспорт начинается в эндоплазматической сети – СОРII

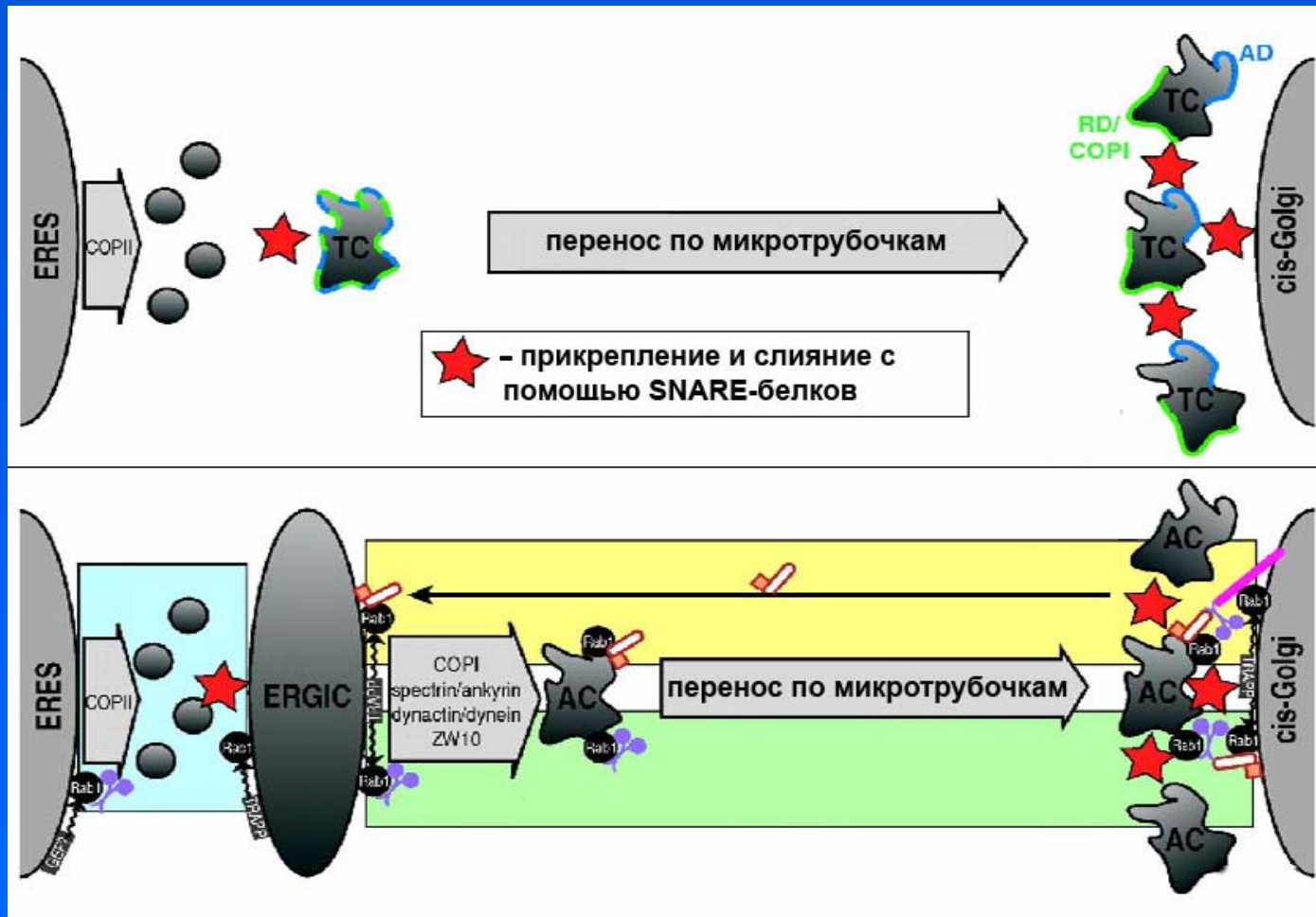
Перенос пузырьков между ЭПР и цистернами АГ происходит с помощью СОРI и СОРII через формирование промежуточных комплексов.

Формирование различных гранул в транс-Гольджи (включая первичные лизосомы) – клатрин и связанные с ним адапторные белки.

Обратный транспорт (формирование эндосом) – клатрин.



# Переход белков от ЭПР к АГ



**ERES – участки выхода из ЭПР; ERGIC – промежуточный компартмент; cis-Golgi – цис-компаратмент (первая цистерна) АГ. В переносе пузырьков участвует несколько специальных белков.**

# Перенос белков между ЭПР и АГ

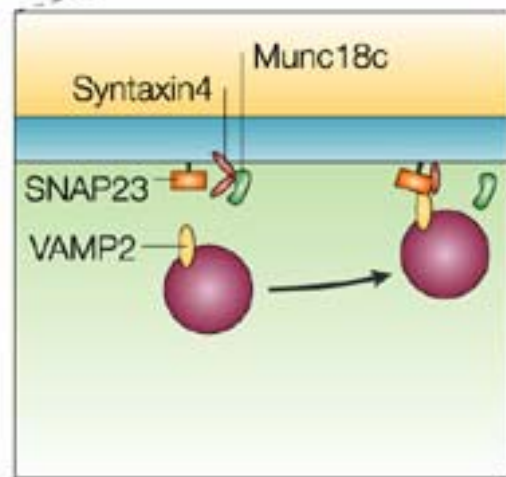
Перенос осуществляется в виде замкнутых пузырьков (животные) или через тубулярные выросты мембран (растения).

Этапы переноса – почкование, антероградный транспорт пузырька в другой отсек, причаливание (докование), слияние с акцепторной мембраной, разделение содержимого, ретроградный транспорт.

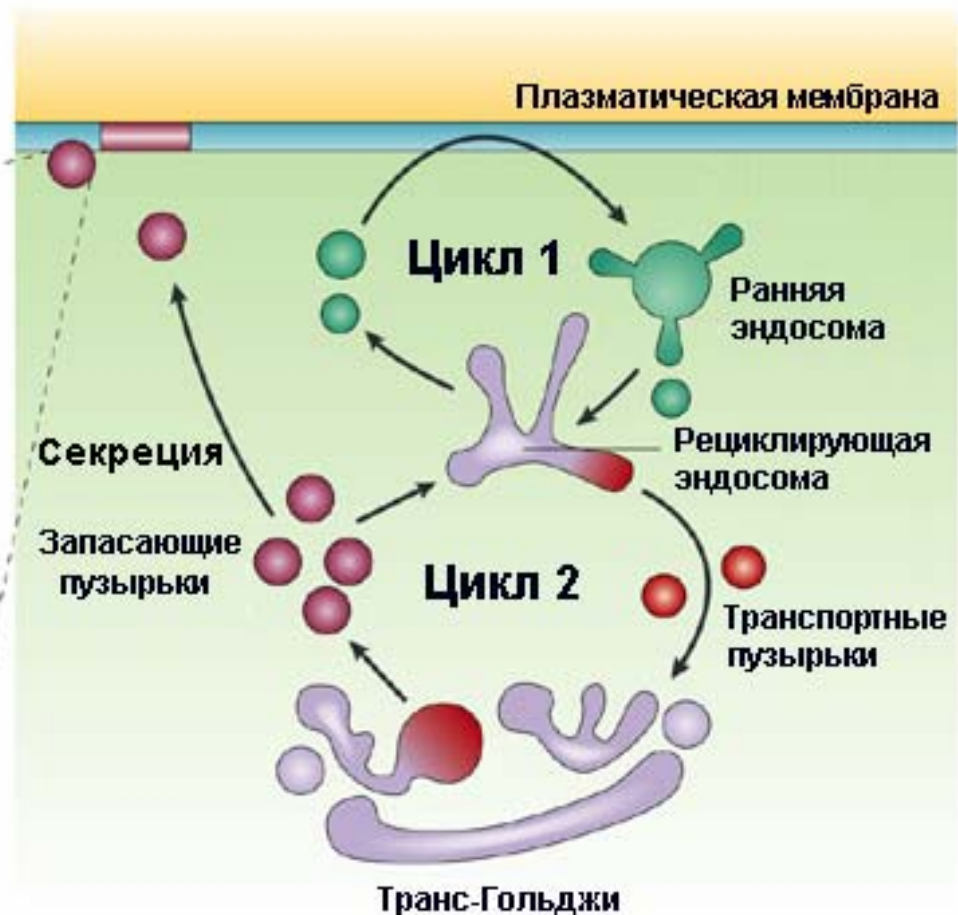
Перенос начинается в эндоплазматической сети в специальных местах – областях выхода (ERES), где собирается комплекс COPII. В промежуточном комплексе происходит перестройка пузырьков (замена COP II на COP I).

Транспорт пузырьков заканчивается докованием на цис-цистерне аппарата Гольджи с помощью SNARE белков (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment recceptor proteins).

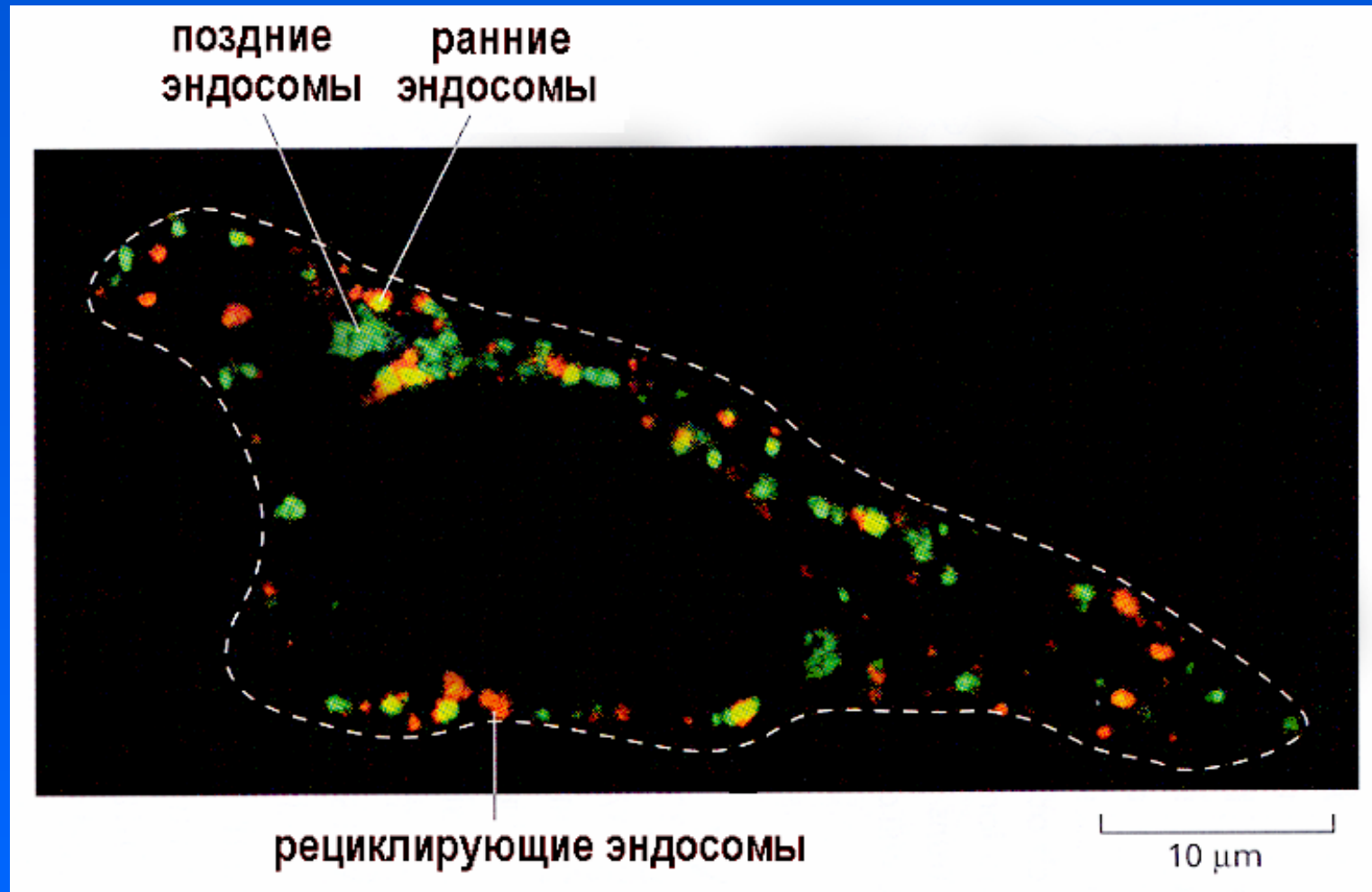
# Внутриклеточный оборот и секреция белков



Комплекс SNARE-белков

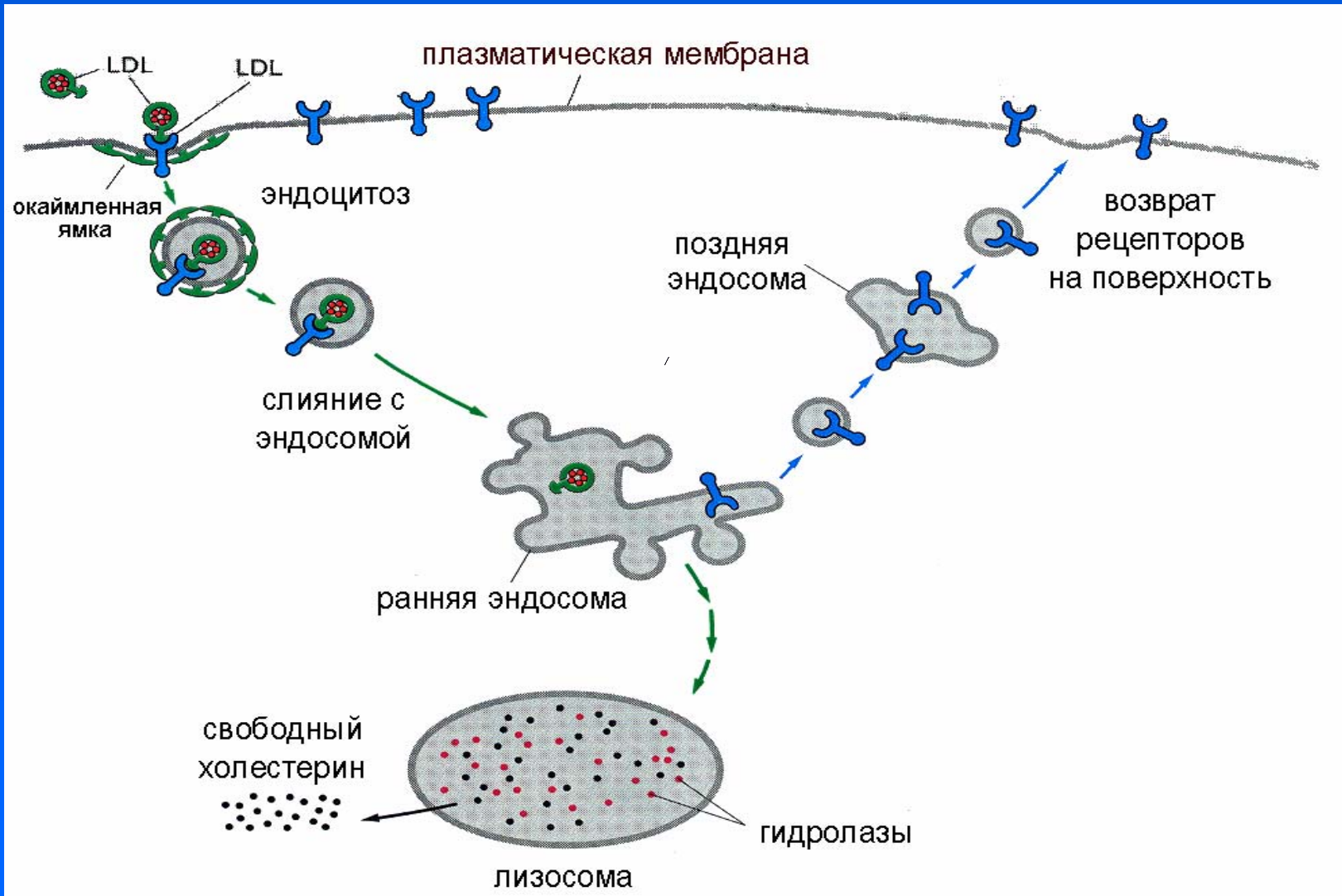


# Эндосомы в живой клетке



рН в эндосомах меняется в течение их цикла. Поздние эндосомы могут сливаться с лизосомами, и тогда их рН снижается до 5.

# Лиганды и рецепторы могут разделяться в эндосомах





# Эндоцитоз белков

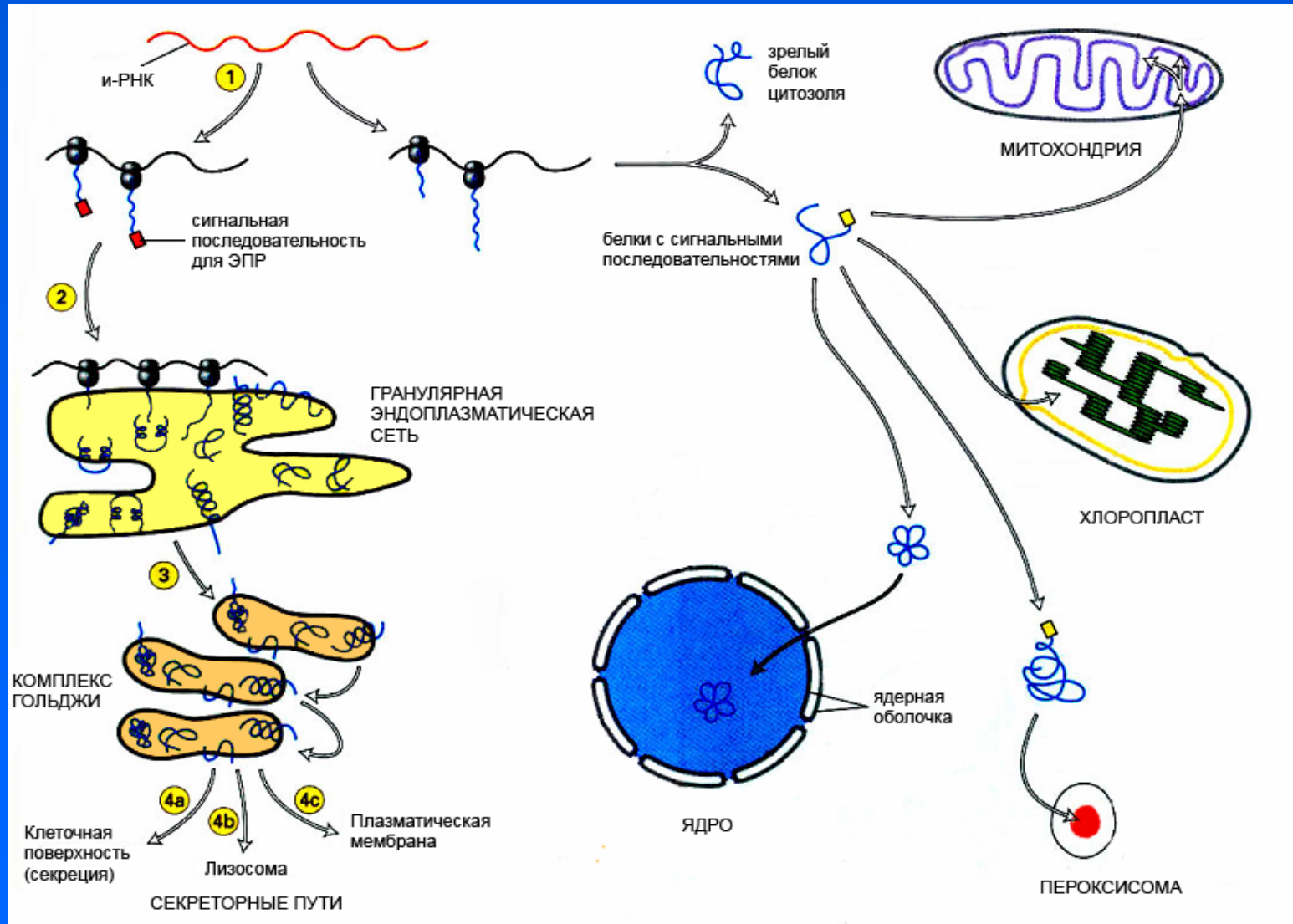
Белки узнаются рецепторами (углеводными компонентами) плазматической мембраны.

Кластеризация рецепторов – эндоцитоз – формирование эндосом – закисление внутренней среды и расщепление комплекса белок–рецептор – рециклирование рецепторов.

После этого возможны три варианта:

1. Формирование вторичной лизосомы и полный гидролиз белка.
2. Частичный гидролиз и формирование комплекса из пептидов на мембране (презентация антигена Т-клетками)
3. Отщепление субъединиц и их активация (рицин и другие белковые яды).

# Адресация белков в клетке



# Адресация белков в клетке

Сигнальная последовательность – как правило, располагается на N-конце, она может отщепляться после прохождения мембраны.

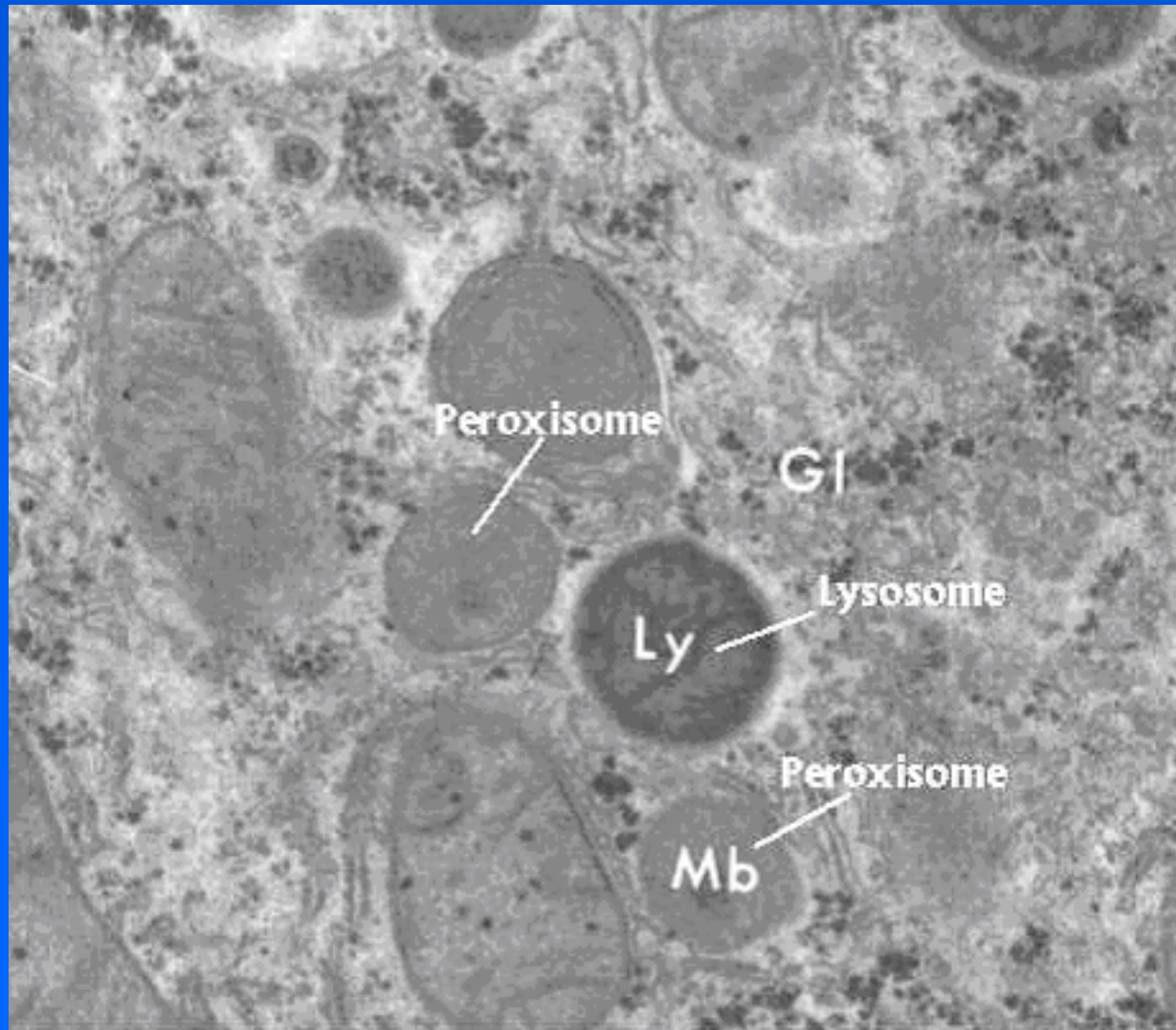
Сигнальная метка находится внутри последовательности, она нередко образуется в результате складывания молекулы в третичную структуру.

Длина сигнальной последовательности – от 5 до 30 аминокислот. Заряд: положительный (транспорт в ядро и митохондрии) или отрицательный (транспорт в ЭПР); гидрофобные а-к (экспорт из ядра, транспорт в ЭПР)

Сигнальные последовательности узнаются специальными рецепторами на поверхности органеллы.

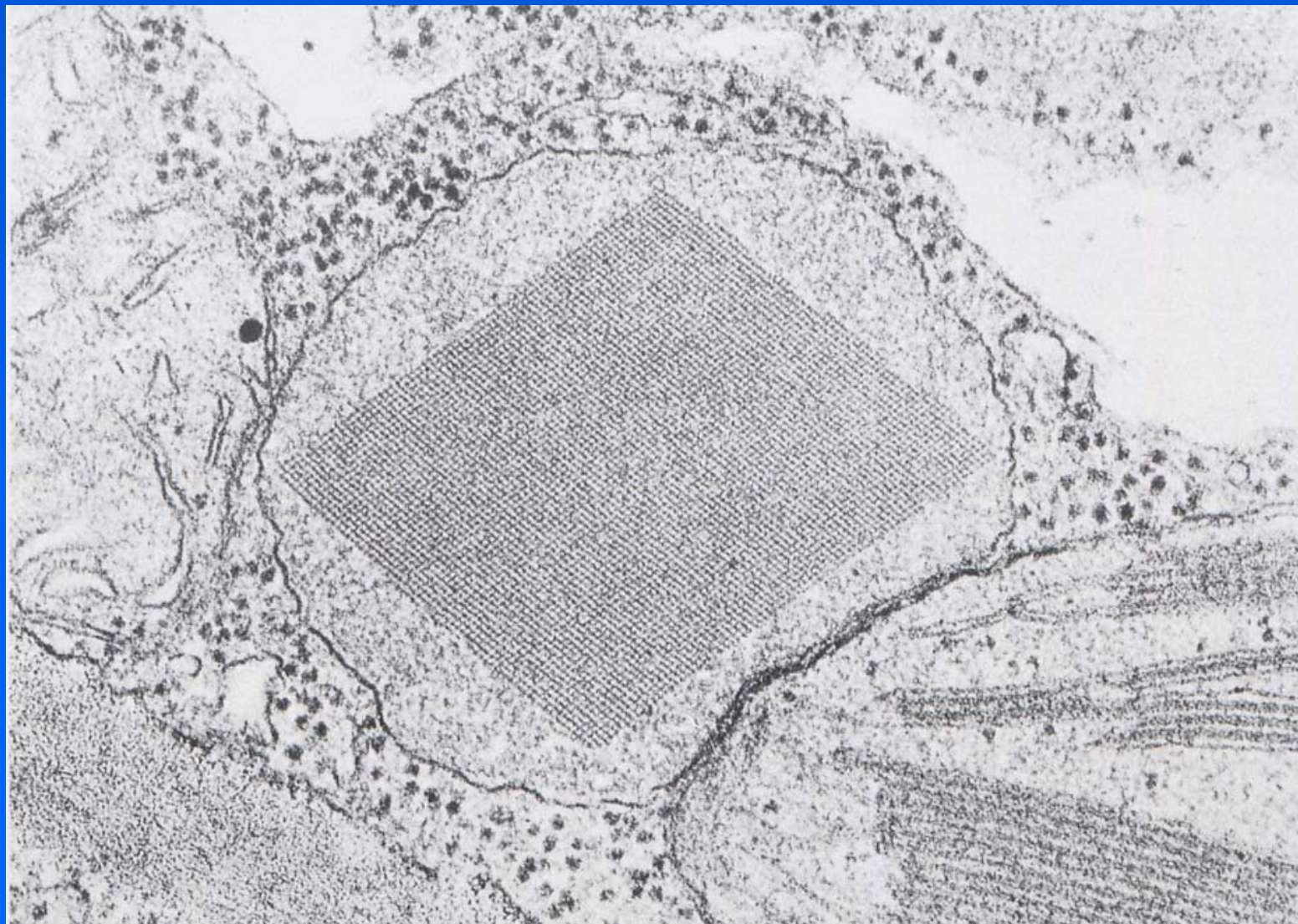
Перенос молекул энергозависим и обеспечивается специальными переносчиками, специфическими для каждой мембраны.

# Пероксисомы и лизосомы



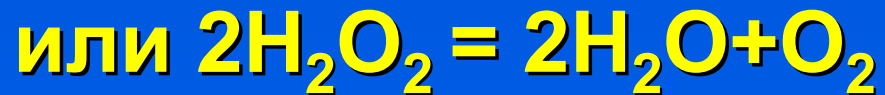
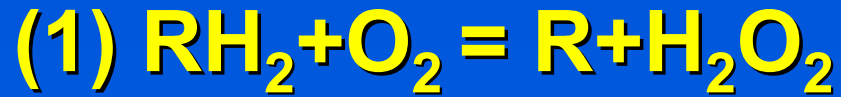


# Пероксисома в растительной клетке





# Пероксисомы



## Ферменты:

Каталаза

Уратоксидаза (нет у человека)

Оксидазы D-аминокислот

## Функции:

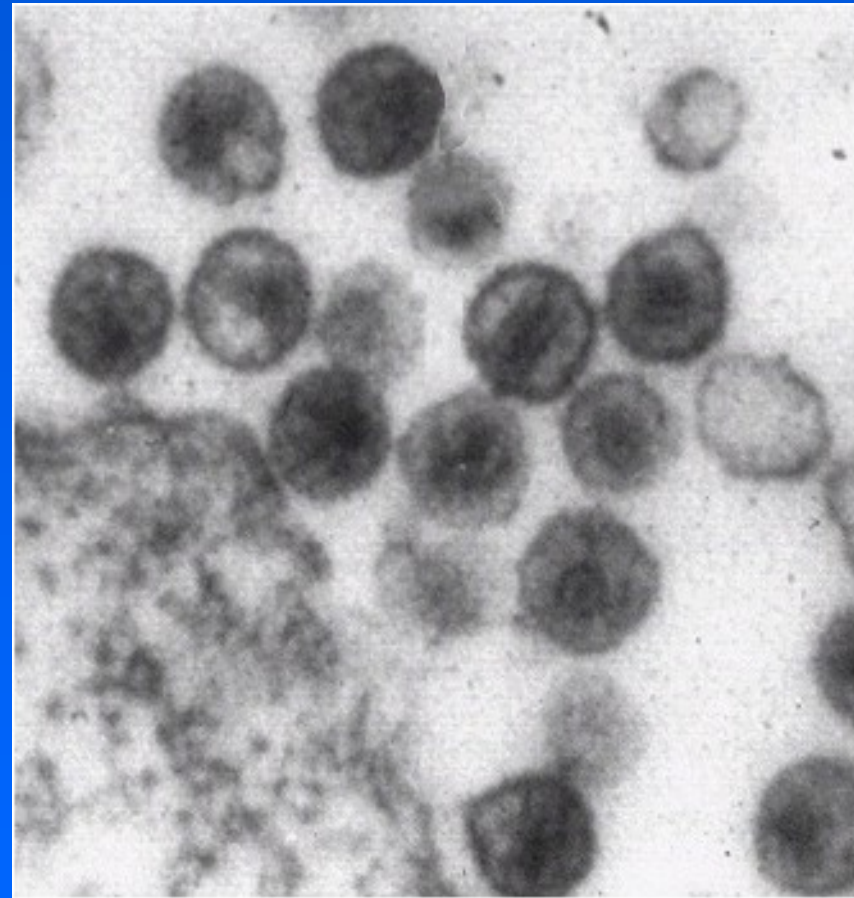
β-Окисление жирных кислот

Детоксикация

Фотодыхание

## Формирование:

непосредственно от ЭПР; имеют свои сигналы локализации



# Лизосомы

Открытие – де Дюв, 1950-е г.г.

Размер – 200-1500 нм. Окружены одинарной мембраной.

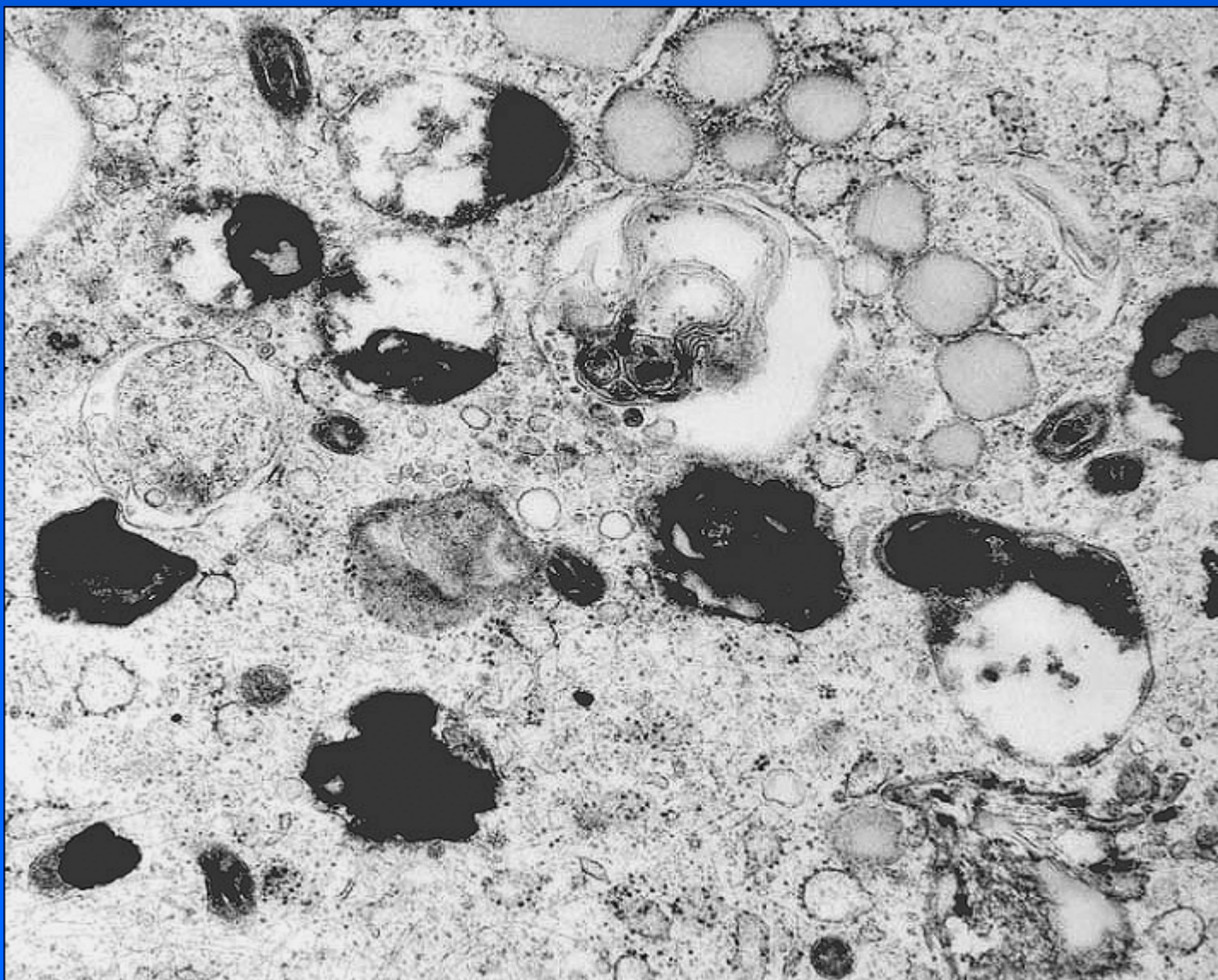
Ферменты: свыше 30 гидролаз (кислых) – протеазы, липазы, нуклеотидазы, полисахаридазы.

Функции: фагоцитоз; аутофагоцитоз; эндоцитоз, опосредованный рецепторами

Цикл: поздняя эндосома – первичная лизосома – вторичная лизосома – остаточное тельце

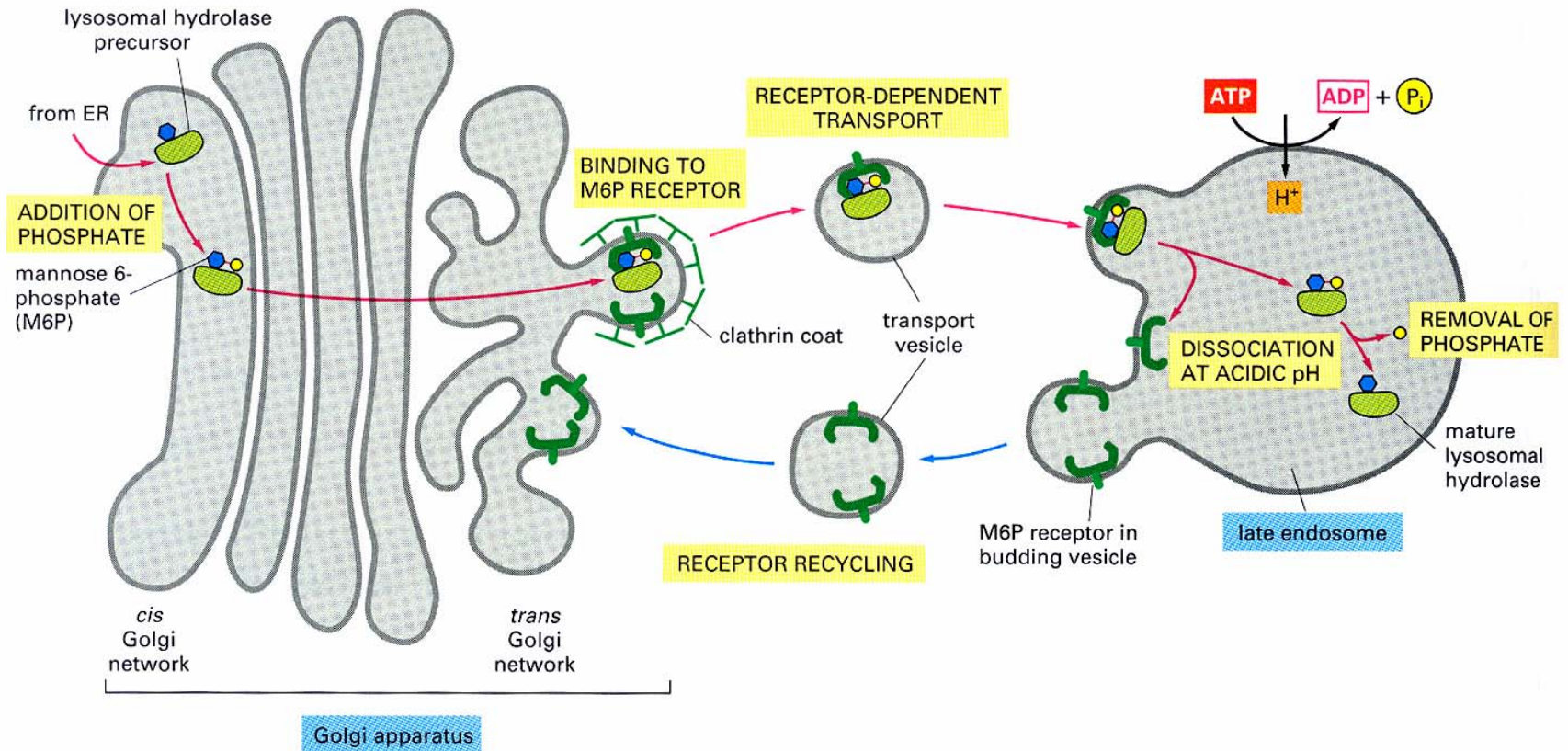
Патология: дефекты лизосомных ферментов – болезни накопления (болезнь Гоше); асбестоз и силикоз – накопление нерастворимых волокон и утечка ферментов

# Лизосомы, ЭМ

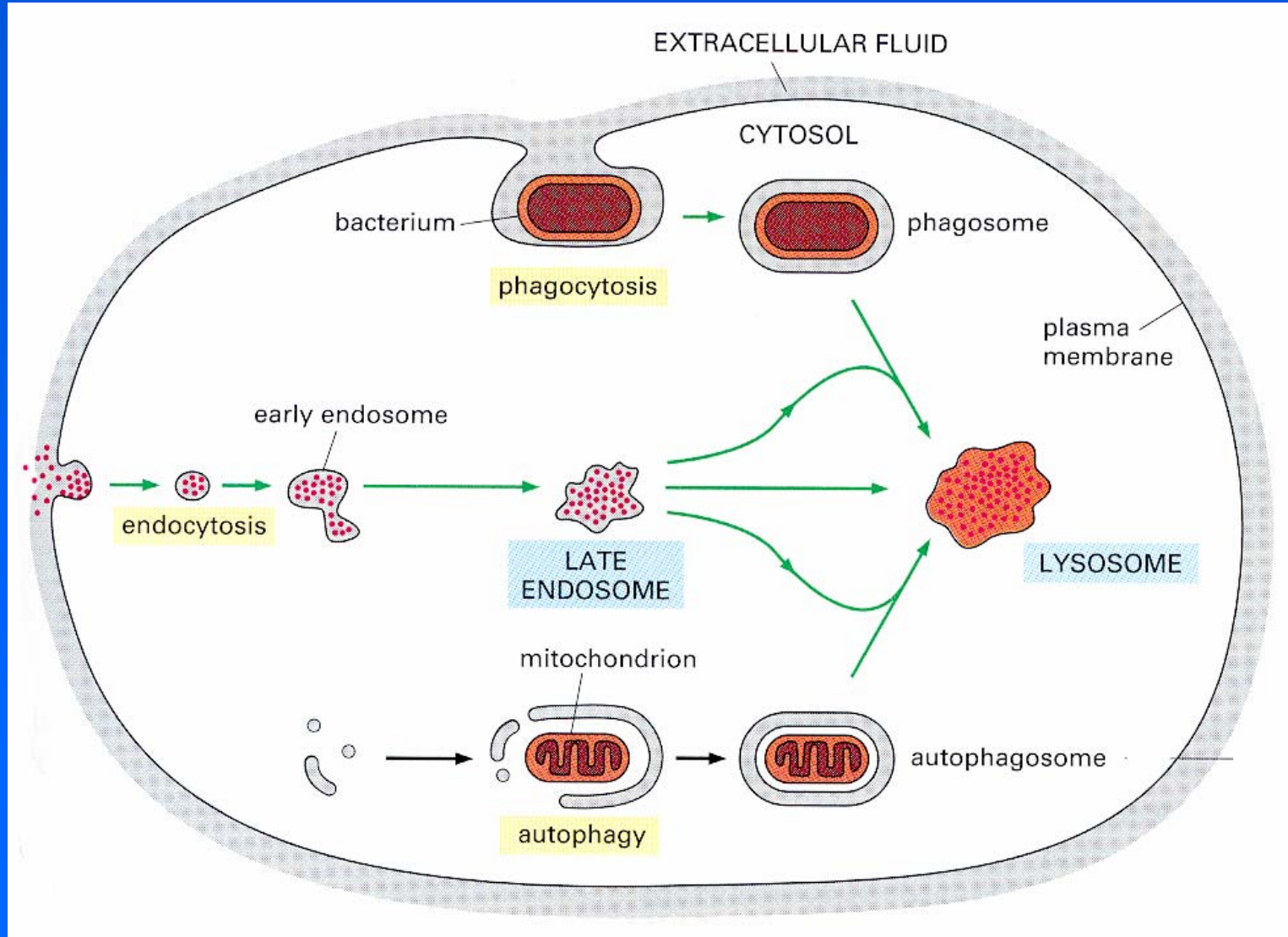




# Формирование первичной лизосомы (поздней эндосомы)

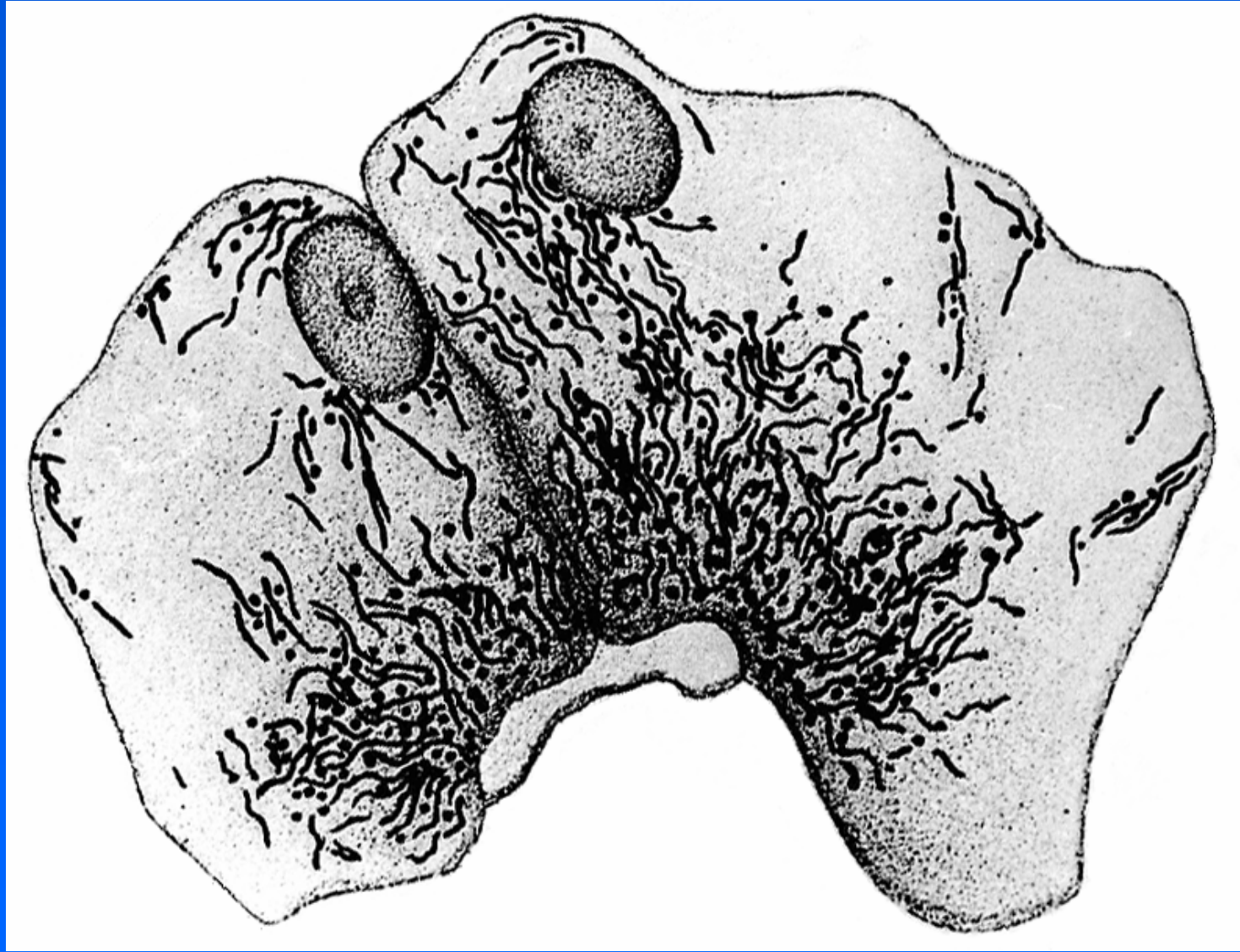


# Внутриклеточное «пищеварение»

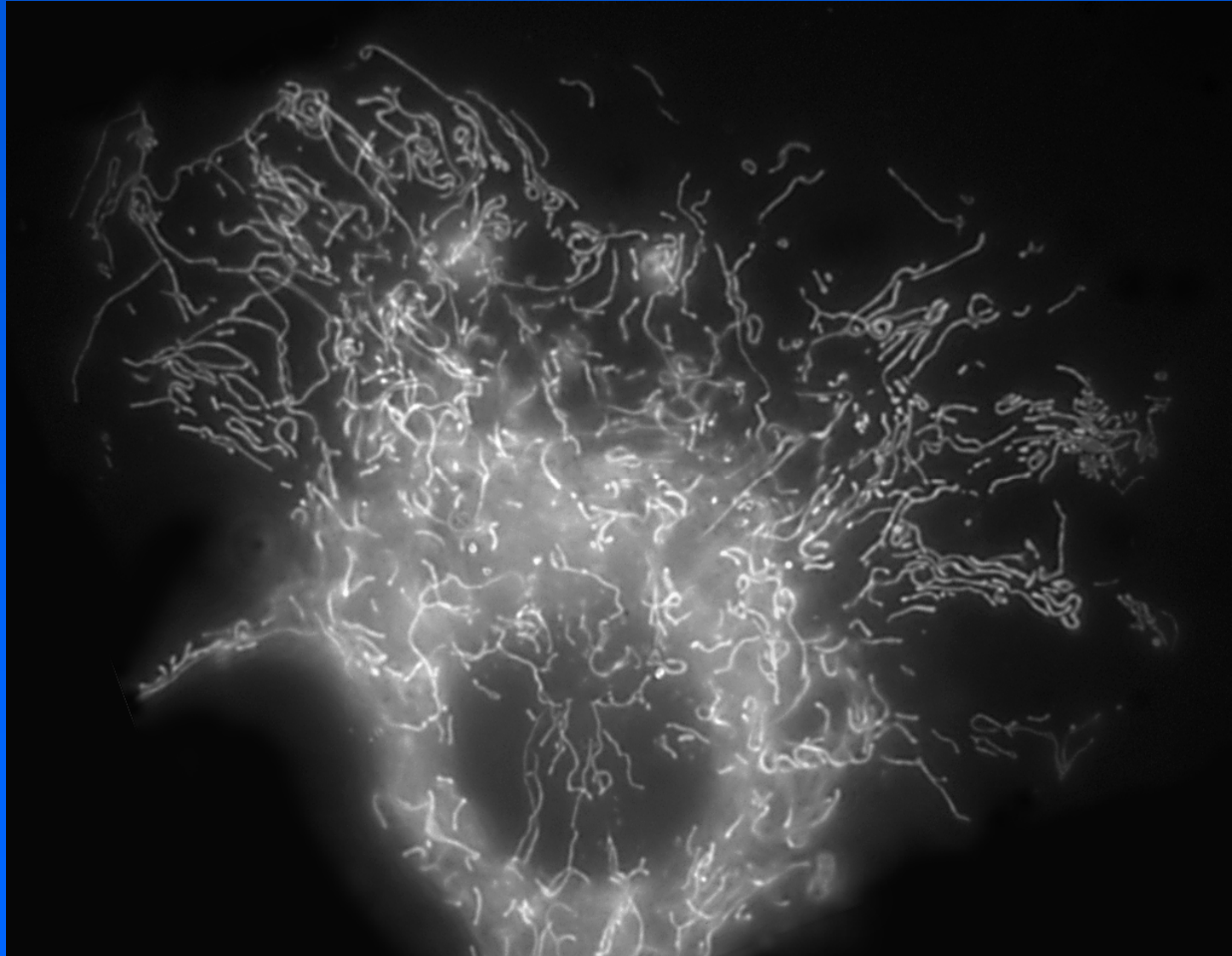




# Митохондрии – окраска по Альтману



# Митохондрии в живой клетке – окраска родамином 123



# Основные функции митохондрий

Окислительное фосфорилирование: создание протонного градиента на внутренней мембране; генерация АТФ в результате рассеивания протонного градиента; поддержание низкого уровня АДФ в клетке.

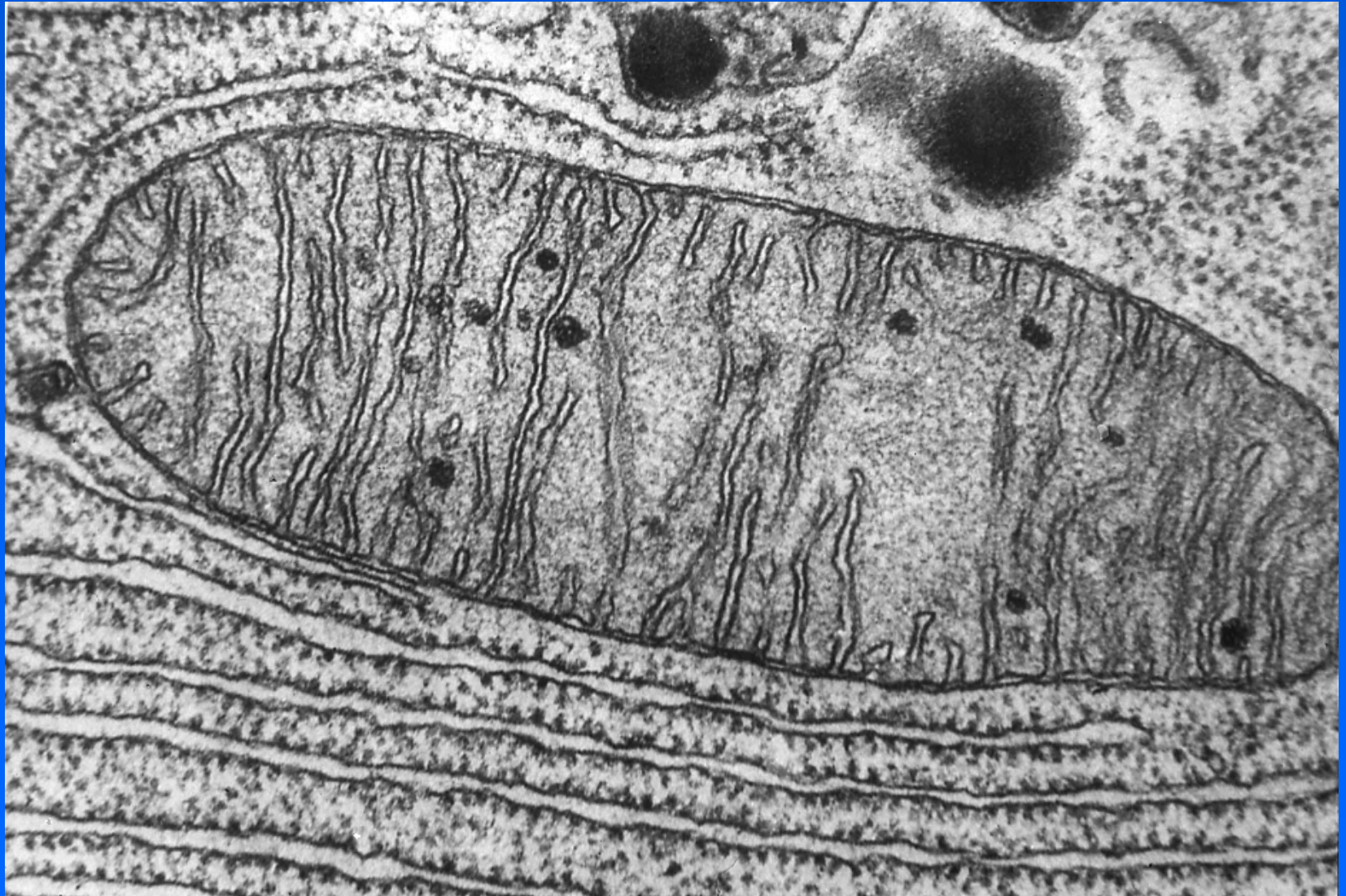
Регуляция уровня внутриклеточного кальция; депонирование кальция.

Регуляция апоптоза – зависимый от митохондрий путь.

Синтез некоторых митохондриальных белков и цитоплазматическая наследственность.



# Митохондрия – срез (ЭМ)



# Компоненты митохондрий

Наружная мембрана: гладкая; содержит мало белков (отношение липид/белок  $>2$ ); проницаема для веществ с молекулярным весом менее 10 кД.

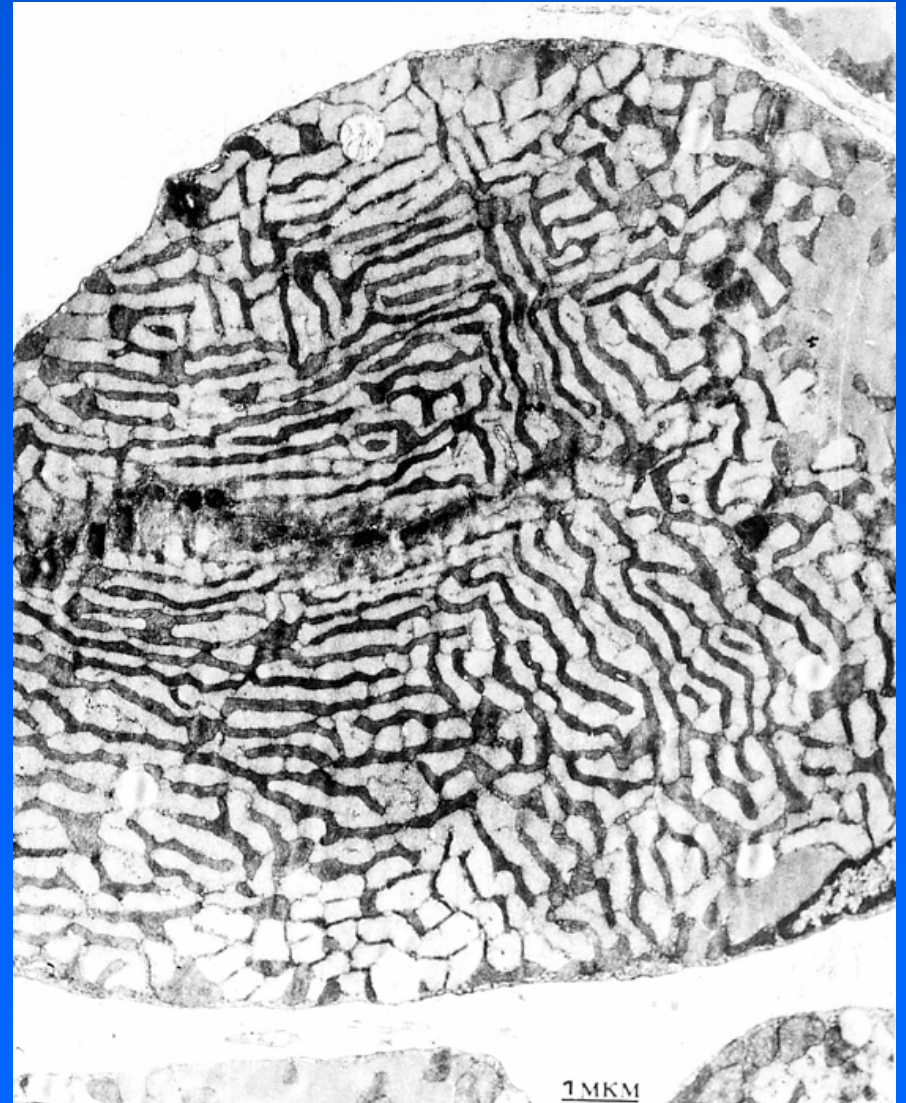
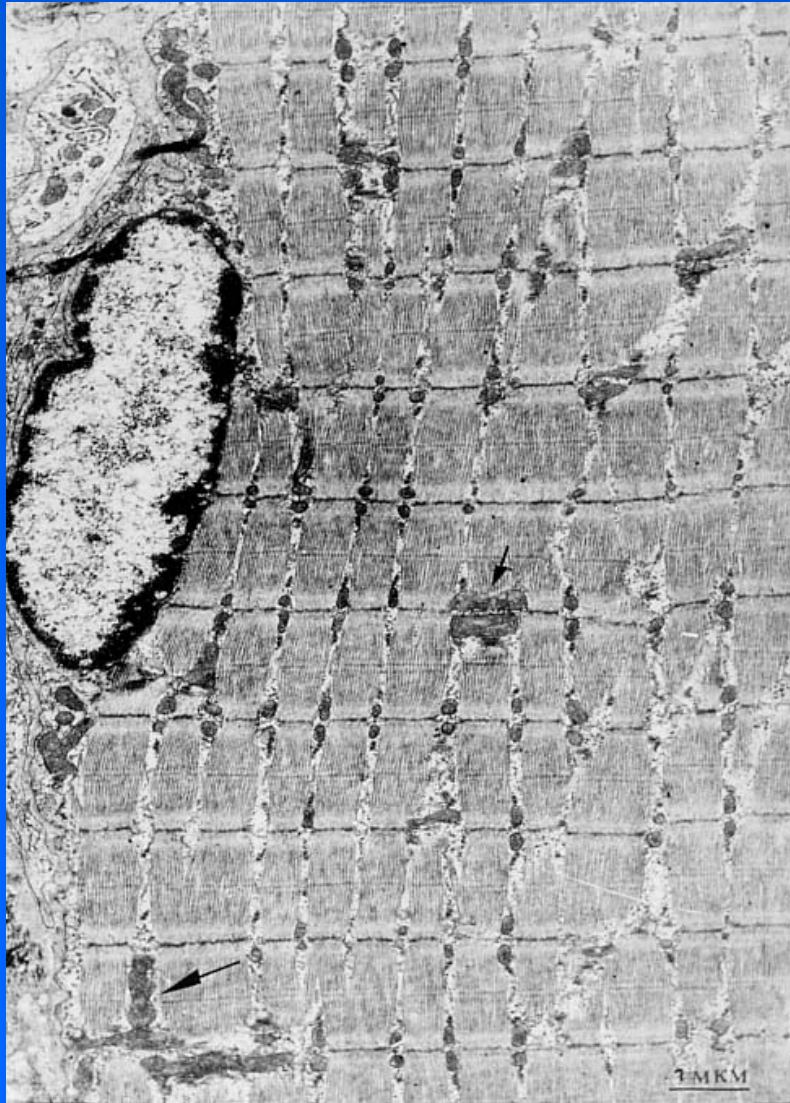
Внутренняя мембрана: складчатая (образует кристы); содержит много белков (отношение липид/белок  $\sim 3:7$ ); практически непроницаема для любых веществ; содержит цепь переноса электронов; в норме заряжена (-200 мВ).

Межмембранные контакты (поры) – области объединения наружной и внутренней мембран. Они обеспечивают избирательный перенос белков из матрикса в цитозоль и обратно.

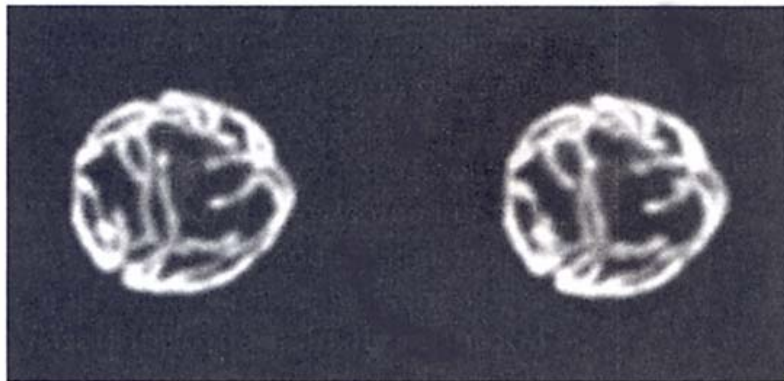
Матрикс – имеет щелочной pH; содержит белки цикла Кребса, нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) и рибосомы митохондрий; аккумулирует ионы кальция.



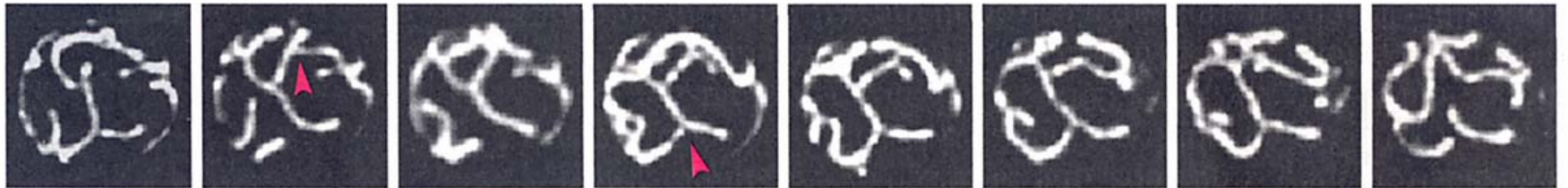
# Митохондрии в мышце - хондриом



# Деление и слияние митохондрий в живой клетке

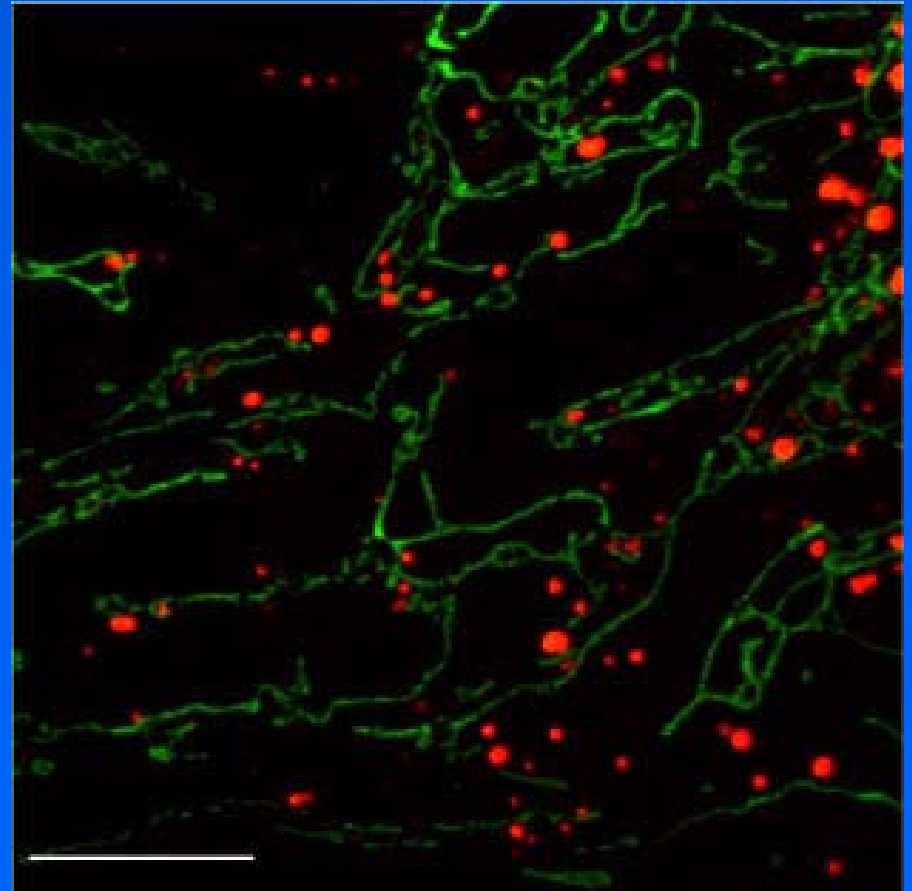


5  $\mu\text{m}$



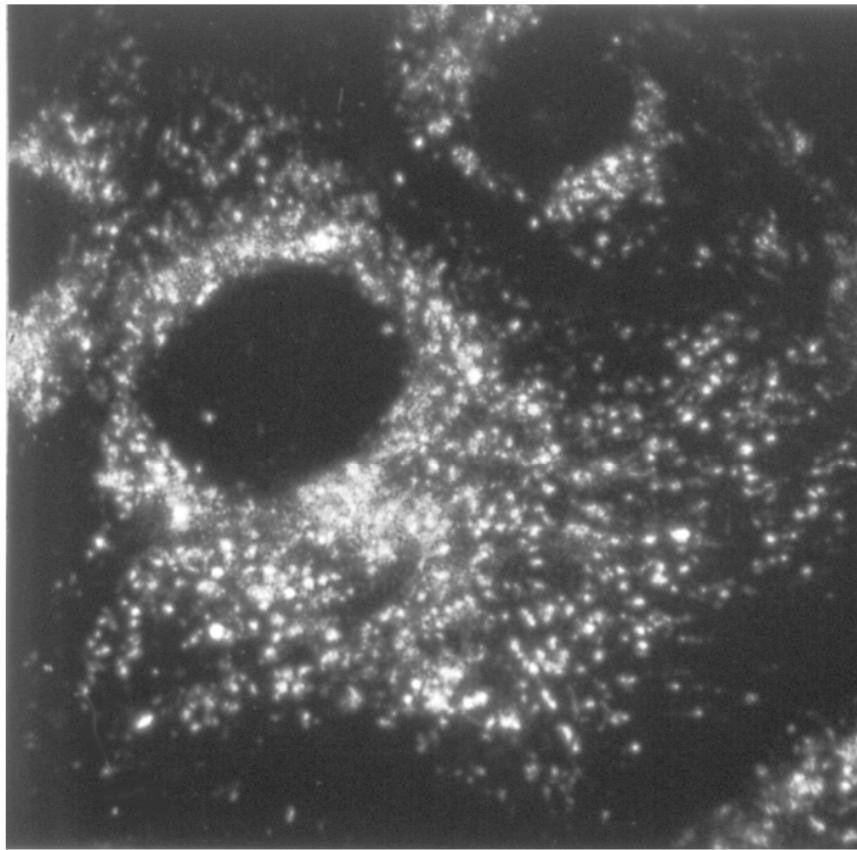
# Регуляция слияния и деления митохондрий

За слияние отвечают  
митофузины (mitofusins)  
За деление отвечают  
динамин-подобные белки

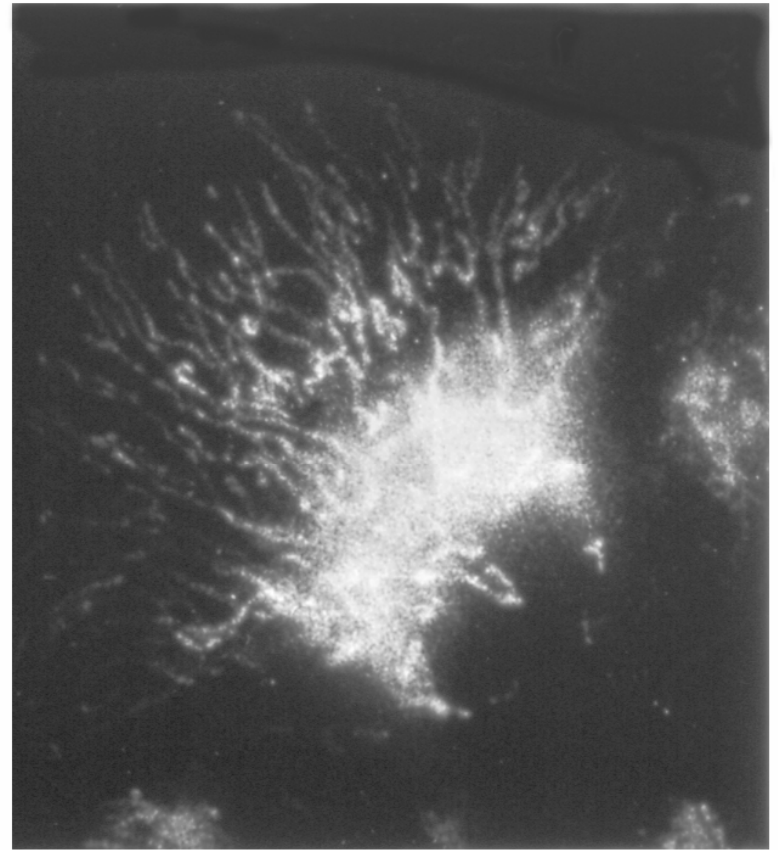




# Фрагментация митохондрий



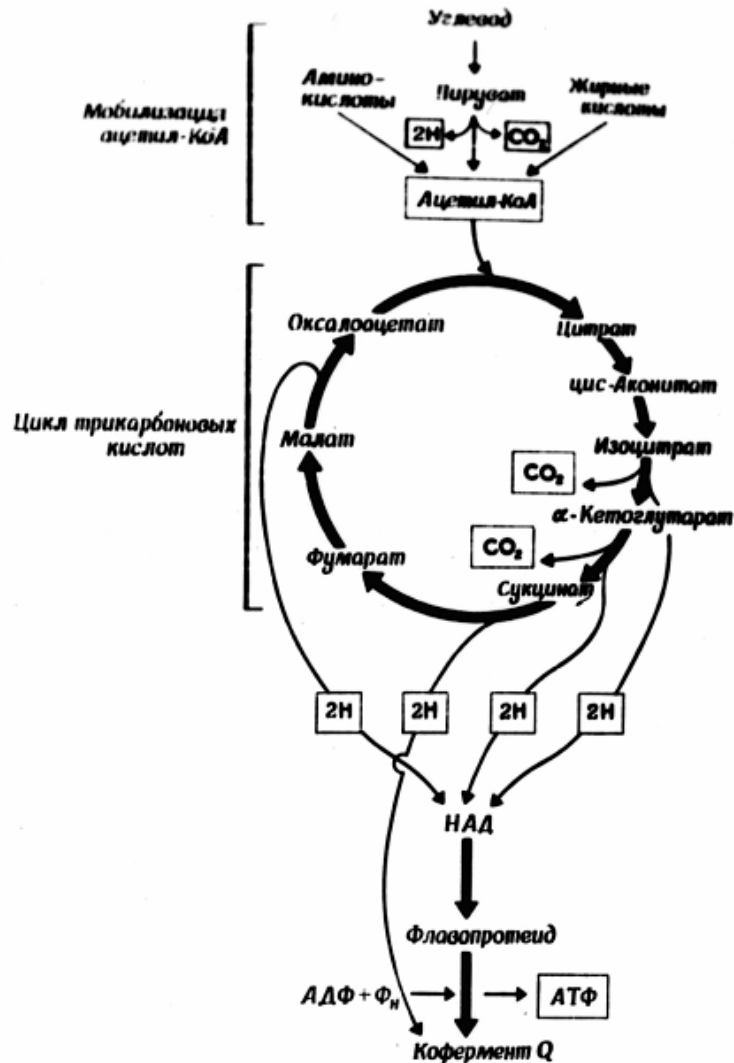
ДИАЗЕПАМ



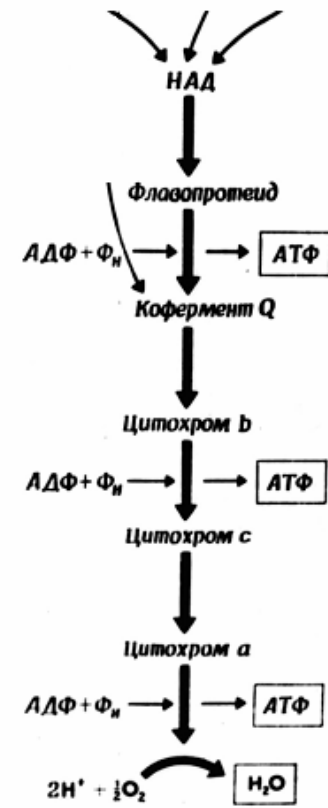
КОНТРОЛЬ

Для клетки важен баланс слияний и делений. Фрагментация митохондрий происходит при многих воздействиях, нарушающих работу ЭТЦ и АТФ-азы. Она позволяет элиминировать нарушенные органеллы или фрагменты органелл.

# Цикл трикарбоновых кислот

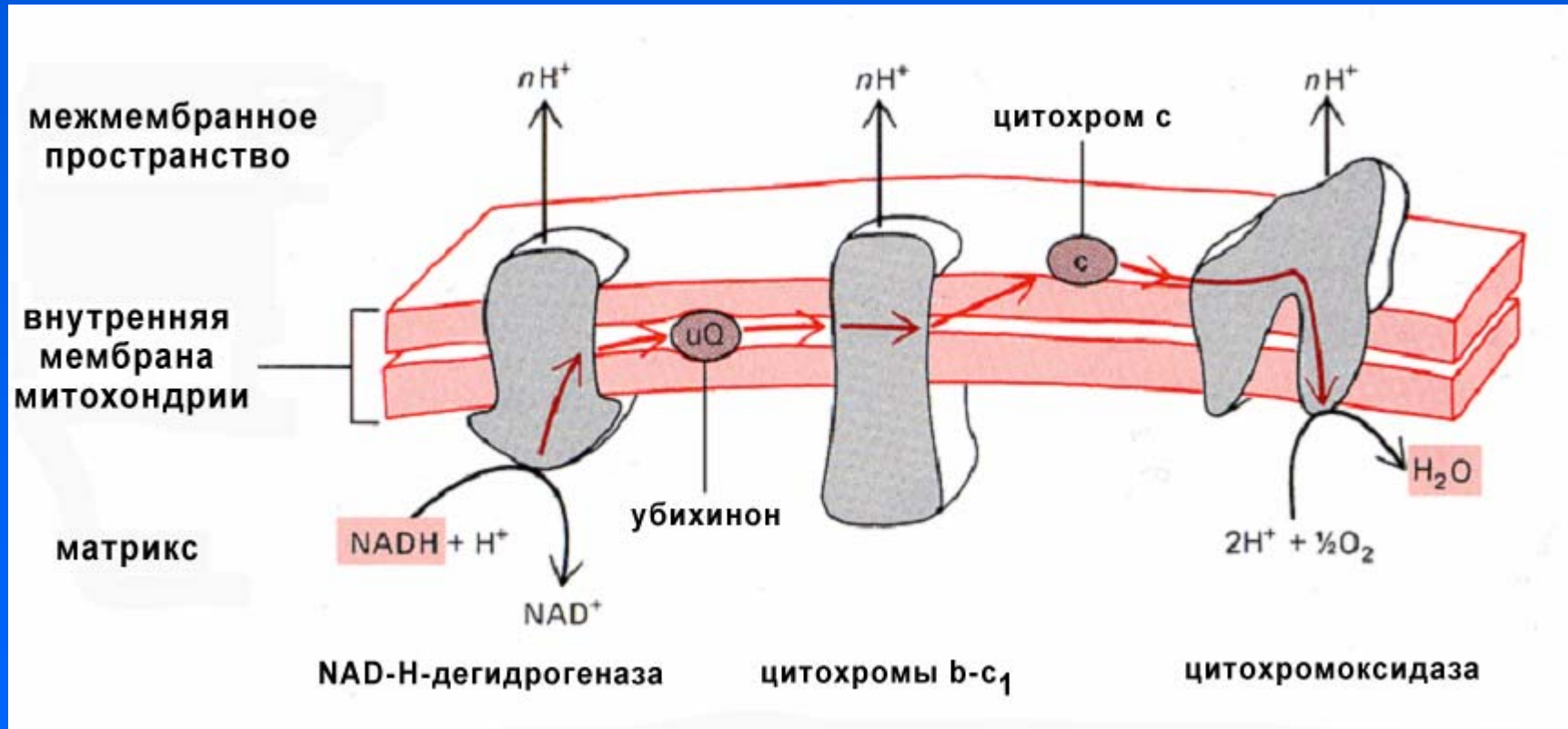


Перенос электронов и окислительное фосфорилирование



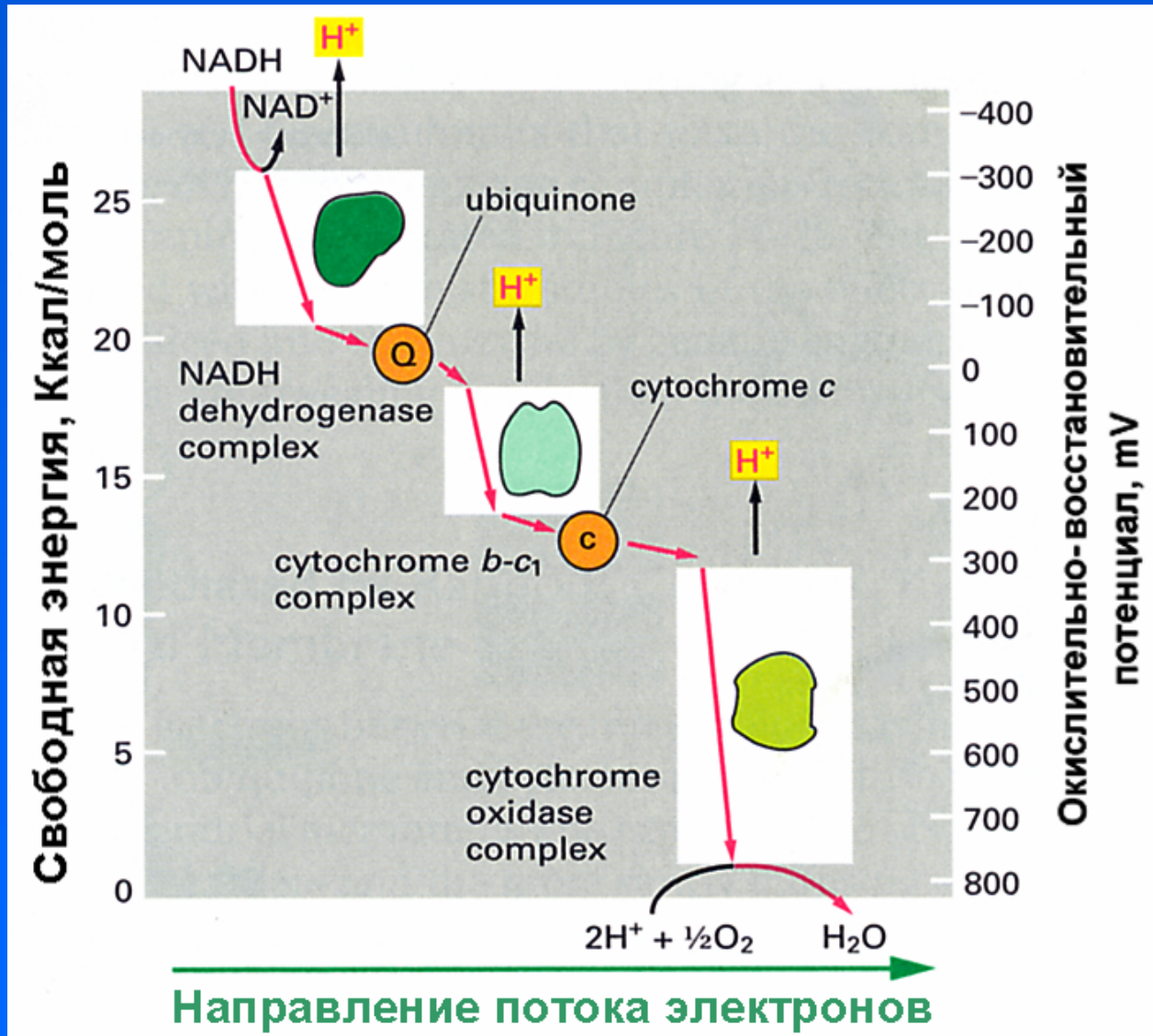


# Цепь переноса электронов в мембране митохондрии

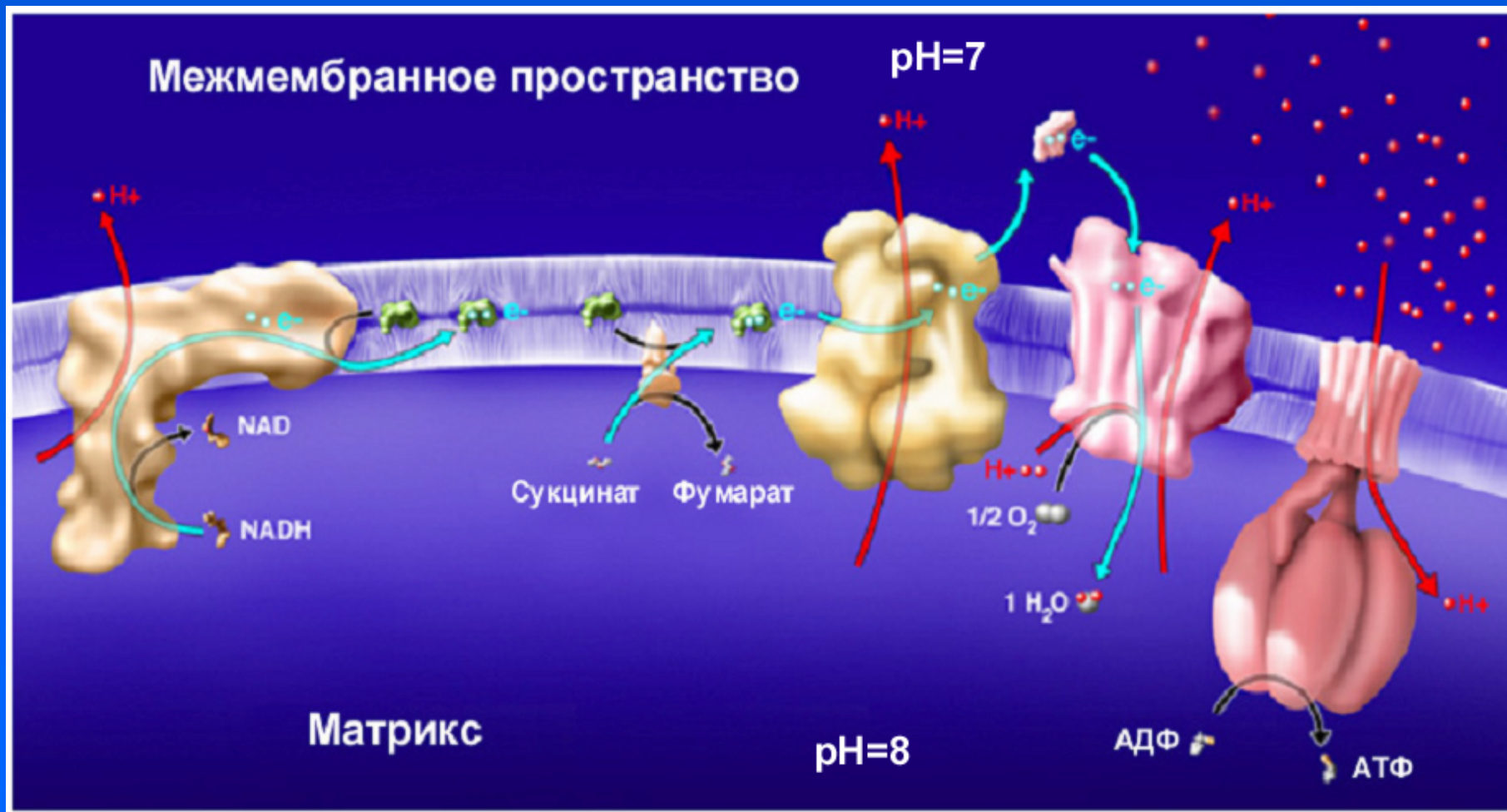


Показаны «пункты сопряжения» - белки, обеспечивающие квантованный перенос заряда ( $H^+$ ) через внутреннюю мембрану митохондрии.

# Цель переноса электронов



# Работа внутренней митохондриальной мембраны



# Электрохимический потенциал на мембране (уравнение Нернста)

$$\Delta\mu_{\text{H}^+} = \Delta\psi - 2.3R \cdot T/F \cdot \Delta\text{pH},$$

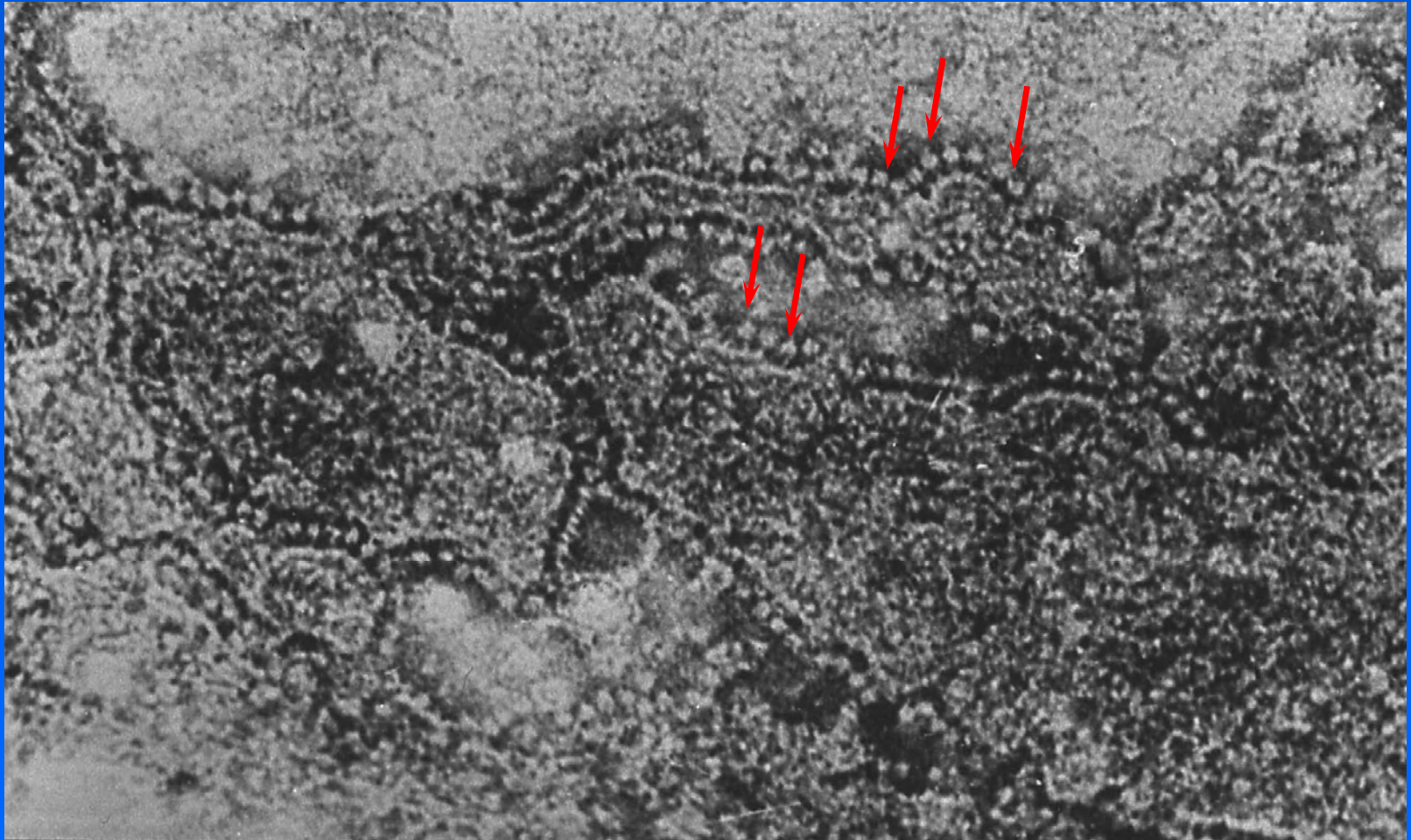
где  $\Delta\psi$  – разность потенциалов на мембране (в мВ);

$\Delta\text{pH}$  – разность показателей pH внутри и снаружи мембраны,

$2.3R \cdot T/F$  равно 59 мВ при температуре 25°C



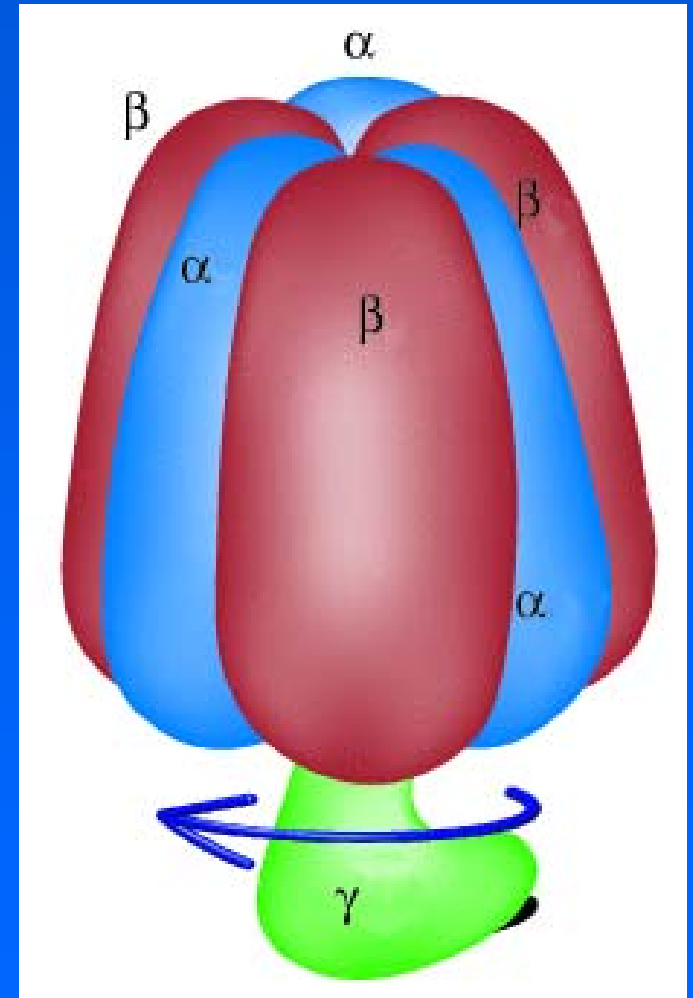
# Субмитохондриальные частицы – АТФ-аза (негативный контраст)



# АТФ-аза митохондрий и прокариот

АТФ-аза – миниатюрный электромотор. Ротор – гамма-субъединица; статор – три альфа- и три бета-субъединицы.

Вращение ротора в одну сторону приводит к гидролизу АТФ, а в противоположную – к синтезу АТФ (возможно только при наличии достаточного электрохимического потенциала на мембране).



# Митохондрии – обзор энергетических процессов

В матриксе идут реакции цикла Кребса и образуется ацетилкоэнзим А.

В кристах находятся ферменты цепи переноса электронов, которые обеспечивают поддержание электрохимического потенциала. «Пункты сопряжения» в электрон-транспортной цепи – ферменты, работа которых приводит к переносу иона водорода поперек мембраны. К.п.д. митохондрии – 55%.

При подавлении фосфорилирования через сброс потенциала (разобщение) в результате окисления органических веществ происходит выработка тепла (митохондрии бурого жира, разобщение с помощью жирных кислот).

АТФ и АДФ переносятся через внутреннюю мембрану одним переносчиком в противоположных направлениях (антипортер, работает за счет градиента концентрации АДФ).

Дыхательный контроль: скорость окисления регулируется концентрацией АДФ. При разобщении скорость окисления в цепи переноса электронов (потребление кислорода клеткой) возрастает в несколько раз.

# Митохондриальные яды

Разобщители – 2,4-ДНФ, FCCP, CCCP; жирные кислоты.

Ингибиторы 1 и 2 пунктов сопряжения в электрон-транспортной цепи – олигомицин; ротенон; антимицин А.

Ингибиторы цитохромоксидазы – азид; цианид.

Ингибитор АТФ-азы – нигерицин.



# Регуляция работы МИТОХОНДРИЙ

В клетках, живущих в условиях низкой концентрации кислорода, потенциал на внутренней мембране может поддерживаться за счет гликолиза и АТФ-азы, которая расщепляет АТФ в матриксе митохондрий.

В митохондриях бурого жира жирные кислоты обеспечивают рассеивание электрохимического потенциала.

АТФ-аза может ингибироваться в определенных условиях (напр., дефицит кислорода).

# Лекция 7

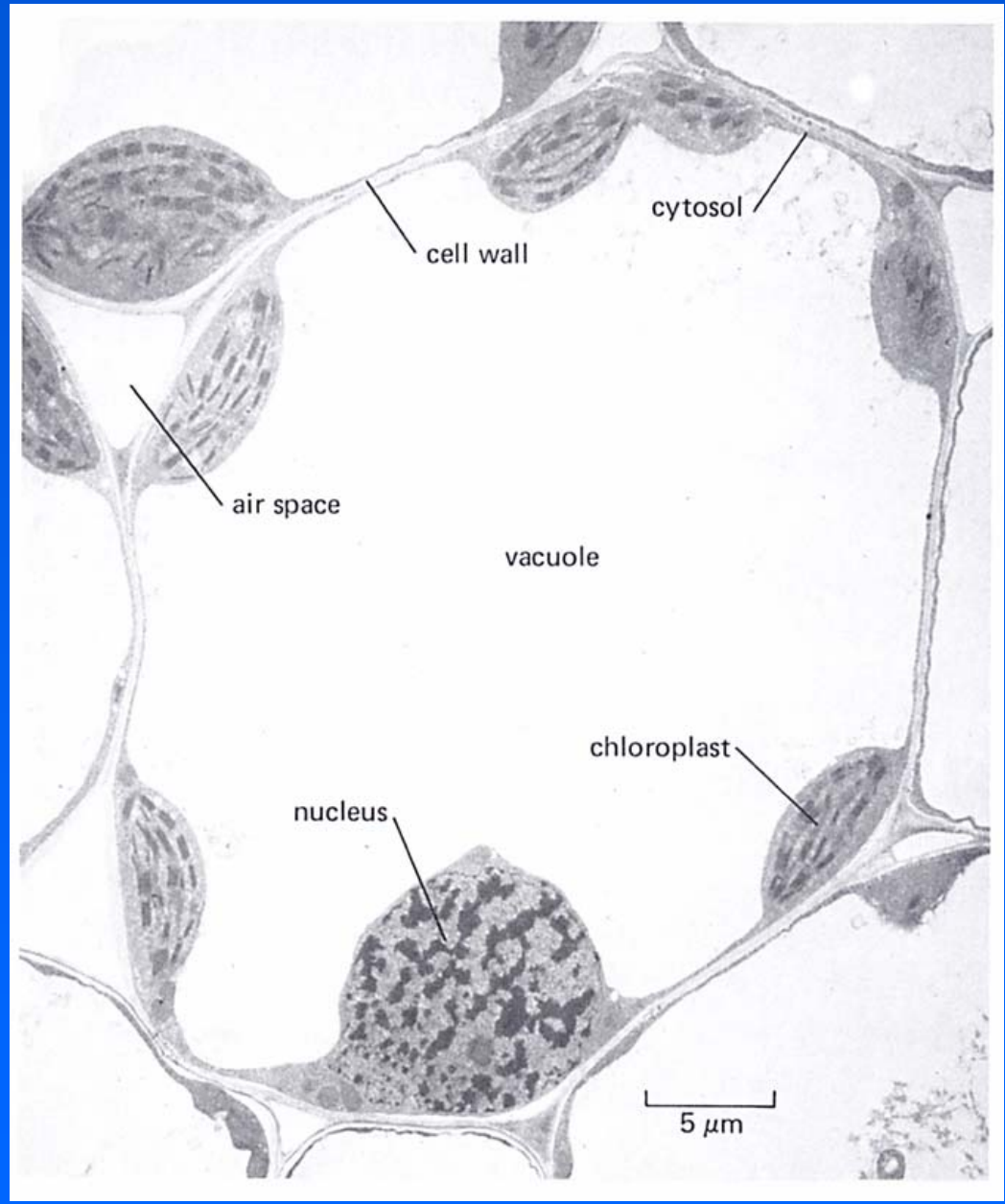
**Хлоропласты – строение и функции**

**Митохондрии и хлоропласты как  
полуавтономные органеллы**

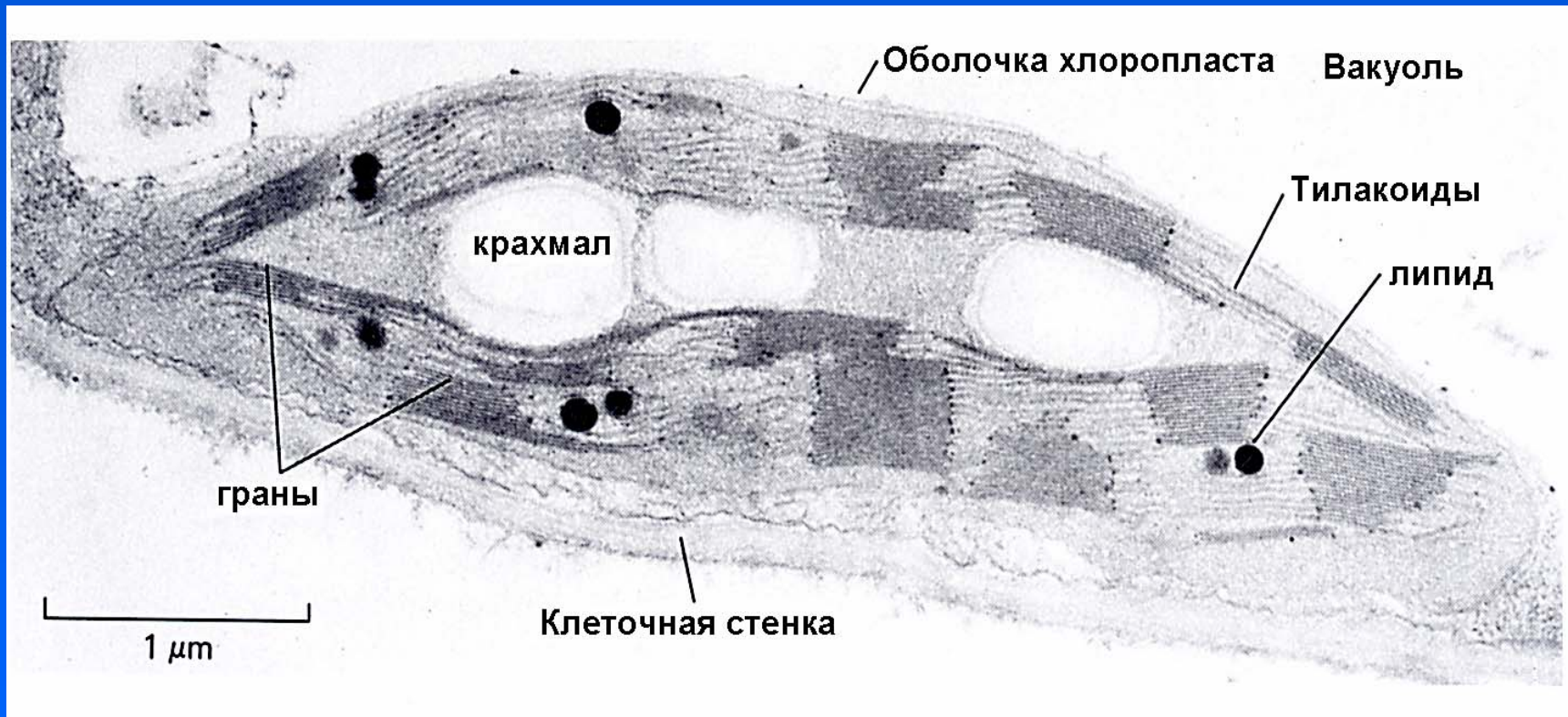
**Взаимодействие между клетками.**

- 1. рецепторы**
- 2. внутриклеточная передача сигнала**

# Растительная клетка с хлоропластами и вакуолью



# Хлоропласт, вид на срезе



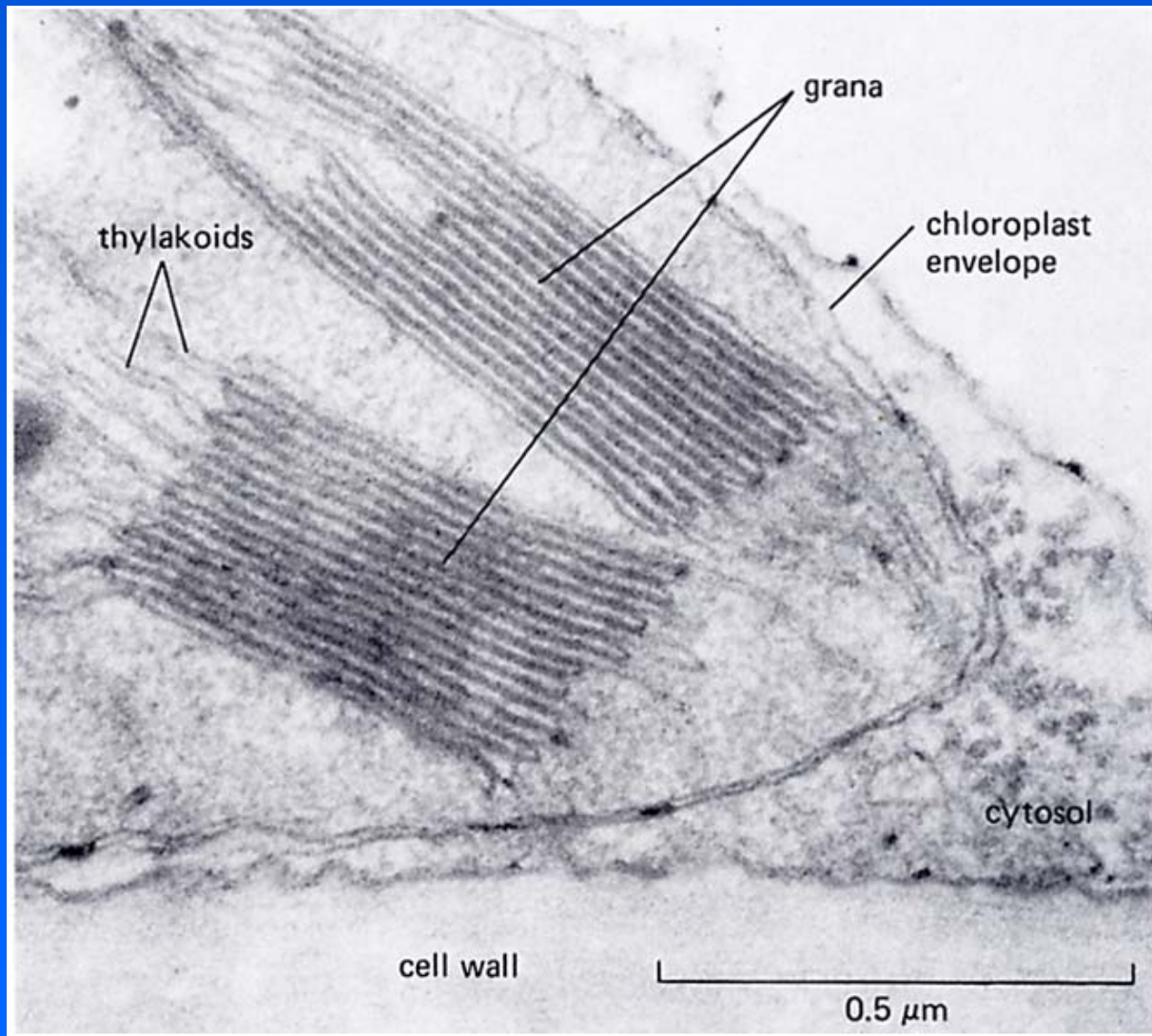
**Размеры хлоропласта – 2x10 мкм.**

**Количество в клетке – 10-100 штук.**

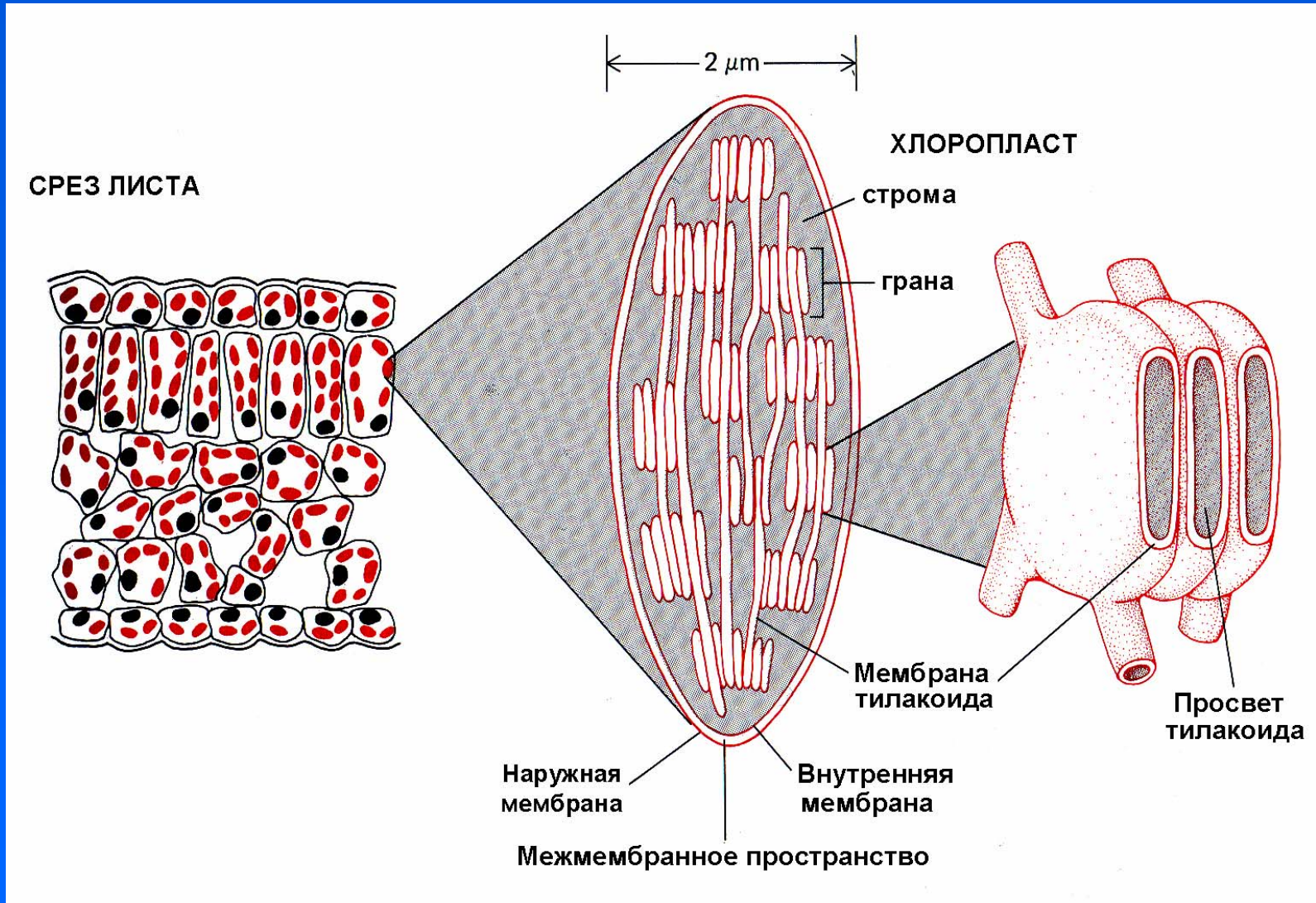
**Наружная мембрана может объединять хлоропласты в общую сеть.**



# Хлоропласт, детали структуры



# Схема организации хлоропласта



# Компоненты хлоропласта

Наружная мембрана: гладкая; высокопроницаемая.

Внутренняя мембрана: гладкая, практически непроницаема, содержит специализированные трансмембранные белки-переносчики (в частности, для углеводов).

Строма – содержит нуклеиновые кислоты (ДНК, РНК) и рибосомы хлоропласта; содержит большое количество метаболических ферментов; аккумулирует крахмал (амилоид). В ней происходит темновой этап фотосинтеза (фиксация  $\text{CO}_2$ ). Строма имеет слабо щелочной pH (~8).

Тилакоиды - мембрана граны – содержит фотосистемы, цепь переноса электронов и систему синтеза АТФ; на свету заряжена (электрохимический потенциал -200 мВ).

Матрикс тилакоида – имеет кислый pH (~5).

# Основы фотосинтеза

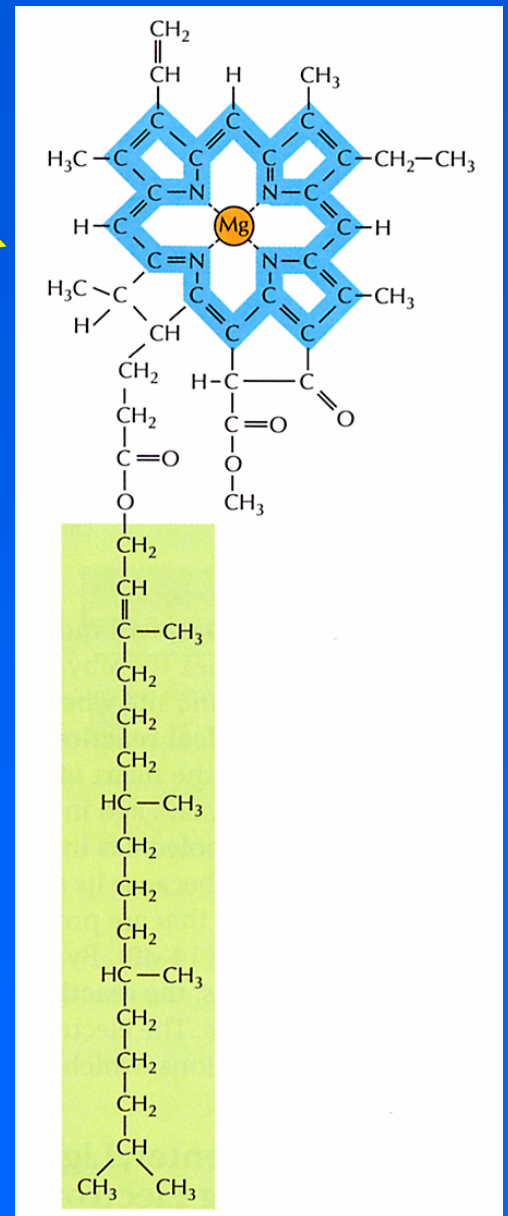
## Молекула хлорофилла

Преобразования энергии кванта света:

1. флуоресценция
2. резонансный перенос энергии
3. перенос электронов

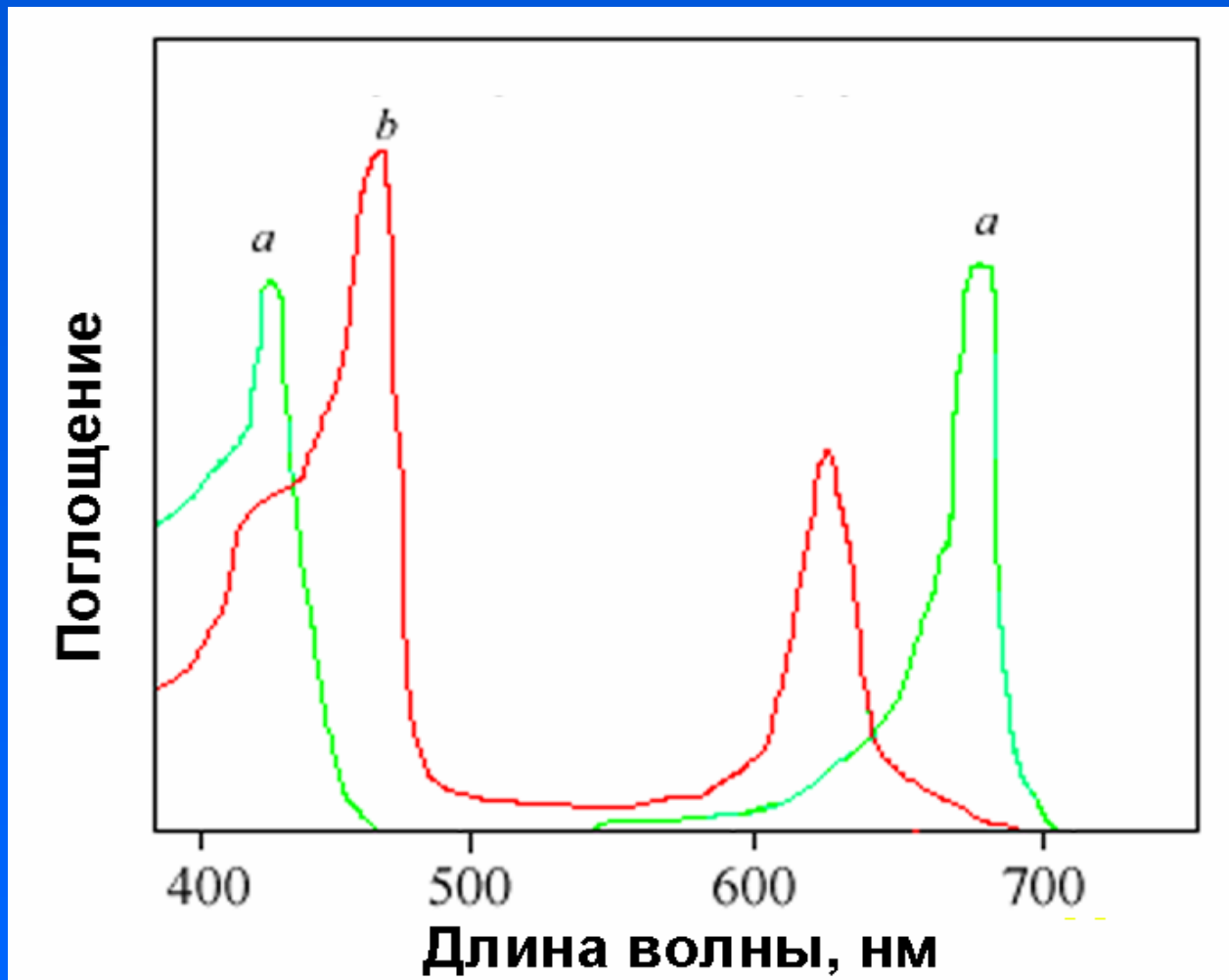
Строение фотосистемы:

1. антенный комплекс – хлорофилл (~400 молекул)+каротиноиды+белки
2. фотохимический реакционный центр (трансмембранный белок с двумя специальными молекулами хлорофилла)



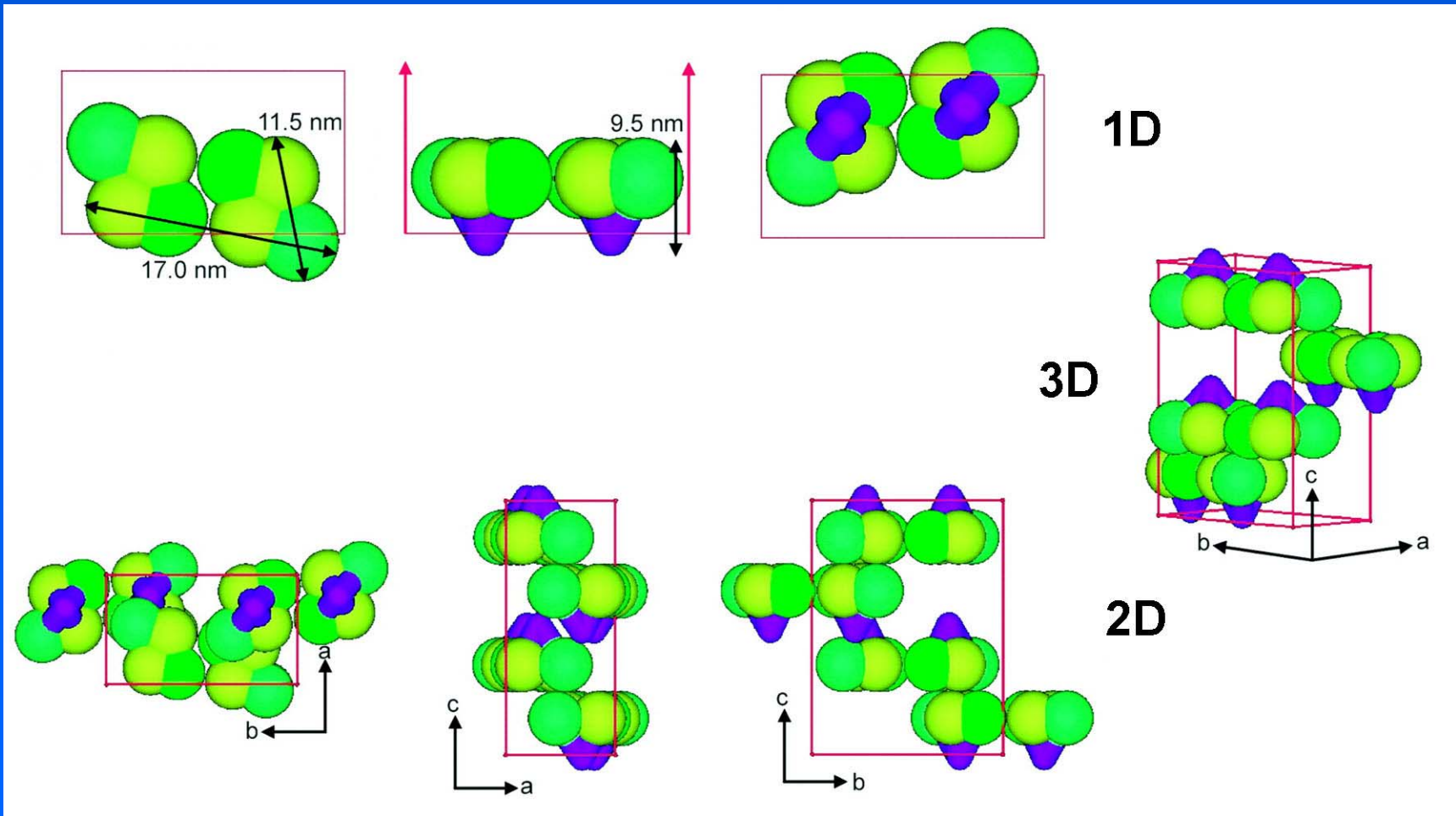


# Почему листья зеленые?



Спектры: а – хлорофилл а; б – хлорофилл б

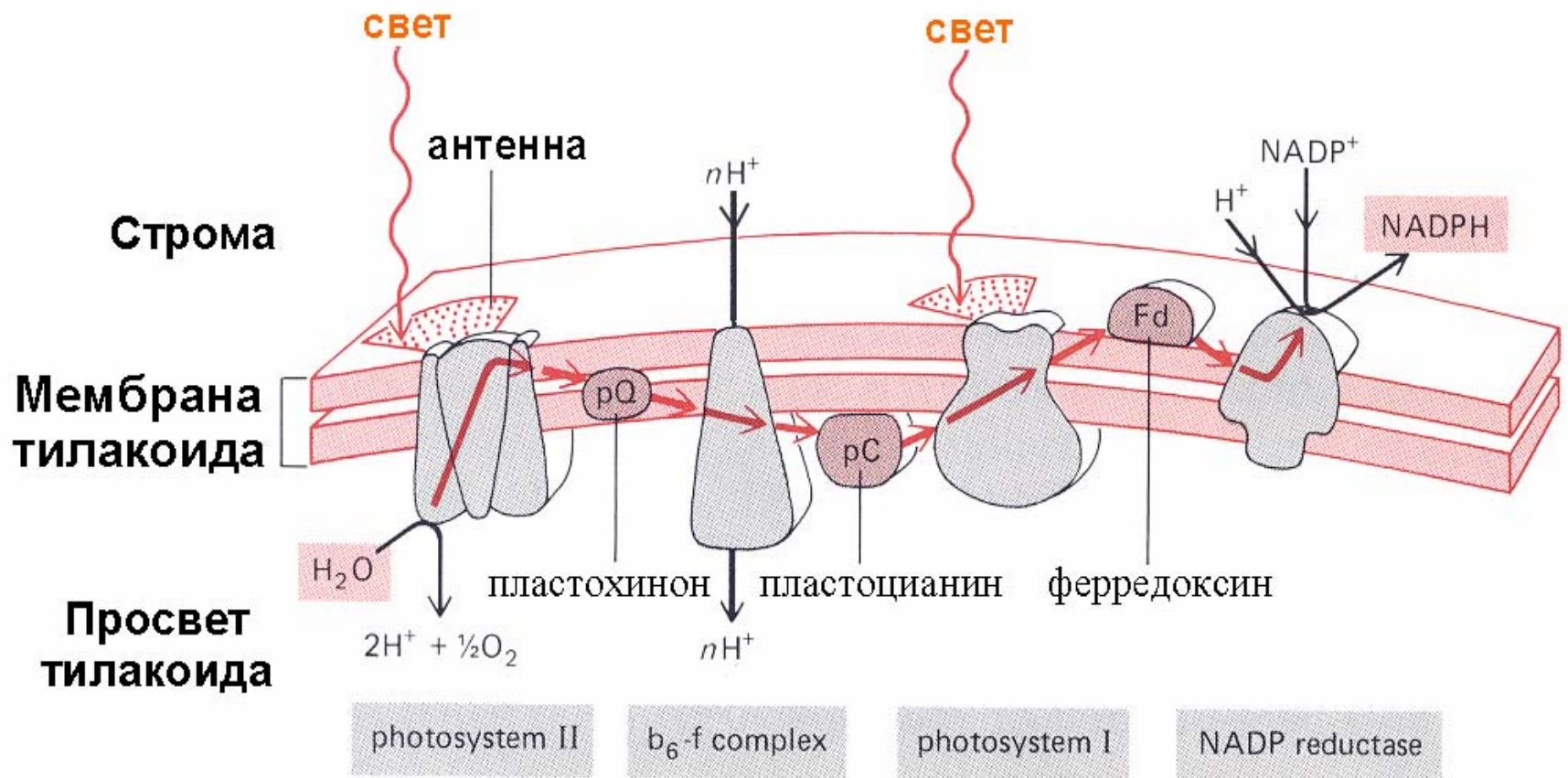
# Выделенная фотосистема II

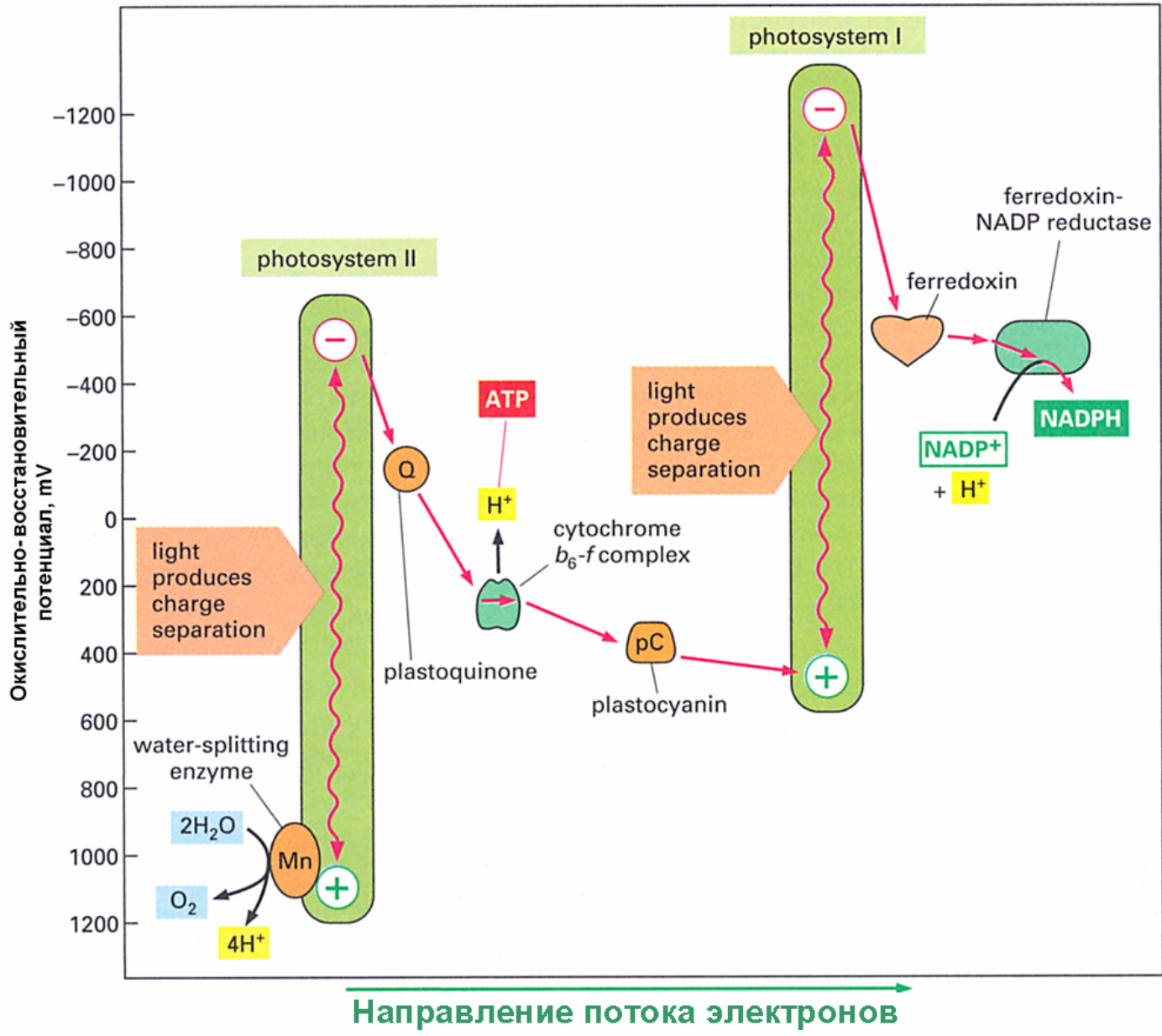


**Одномерные, двумерные и трехмерная проекции.  
Ось c указывает направление поперек мембраны.**

Из: Kuhl, H. et al. J. Biol. Chem. 2000;275:20652-20659

# Перенос электронов в мембране хлоропласта







# Основные реакции фотосинтеза

Световые реакции – перенос электронов через мембрану тилакоида и образование НАДФ-Н<sup>2</sup> и АТФ.

Участвуют: фотосистема 2 и фотосистема 1 (каждая состоит примерно из 200 молекул хлорофилла);  $b_6/f$  комплекс (протонная помпа).

Темновые реакции (фиксация  $CO_2$ ) – цикл Кальвина-Бенсона (пентозофосфатный цикл).

Основные стадии:

карбоксилирование пентозы до гексозы;

цепь реакций по восстановлению гексозы в полноценный углевод;

регенерация акцептора  $CO_2$ .

Для образования одной молекулы глюкозы необходимо 6 оборотов цикла.

# Дифференцировка хлоропластов

Пропластиды – бесцветные двумембранные структуры, диаметром 0,4-1 мкм, содержащие ДНК хлоропластов. Они содержатся в яйцеклетках растений.

Хлоропласты возникают из пропластид на свету (после прорастания семян). При формировании хлоропластов в пропластидах возникают складки внутренней мембраны и формируется трехмембранная система, содержащая граны.

Из пропластид могут возникать амилопласты, где запасается крахмал (картофель). На свету амилопласты могут превращаться в хлоропласты.

Хлоропласты могут дифференцироваться в хромопласты под воздействием ядерных продуктов. Хромопласты накапливают каротиноиды.

# Сравнение митохондрий и хлоропластов

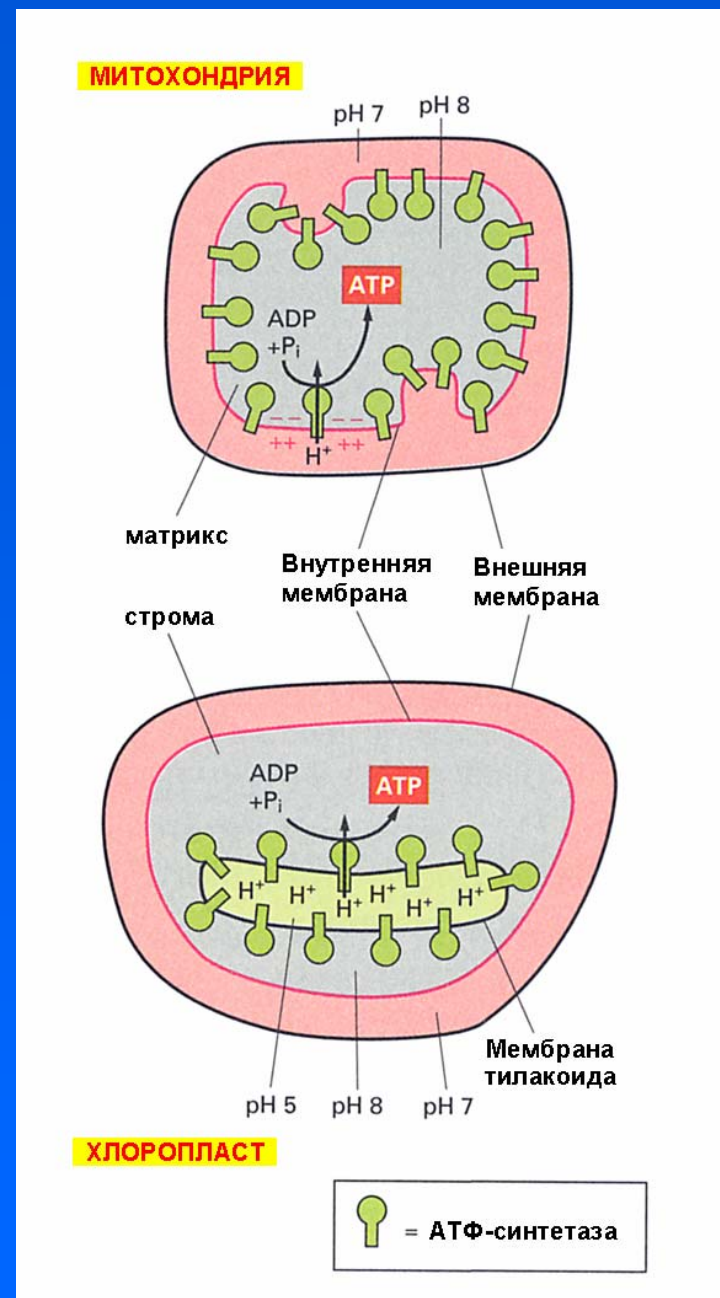
Первичные источники энергии

Цепь переноса электронов на мембране

Протонная помпа – синтез АТФ

Две мембраны/три мембраны

Автономная система биосинтеза белка (ДНК, РНК, рибосомы)



# Митохондрии и хлоропласты - наследственность

Происхождение органелл – симбиоз (слияние клеток и последующая редукция генома с переносом части генов в ядро). Митохондрии – из бактерий (типа риккетсий), хлоропласты – из цианобактерий.

Наследование митохондрий происходит только по материнской линии у животных, растений и грибов. Механизмы: разбавление или исключение отцовских митохондрий на стадии оплодотворения.

Наследование хлоропластов происходит только по материнской линии у цветковых растений.

У растений митохондриальная и хлоропластная ДНК часто обмениваются участками друг с другом.



# Митохондрии и хлоропласты: полуавтономность

Митохондрия: может функционировать без собственной ДНК, однако эффективность дыхания резко снижается.

У человека ряд наследственных заболеваний (встречаются крайне редко и передаются только по женской линии) связан с мутациями в митохондриальных белках.

Нарушение транспорта белков в митохондрии приводит к снижению эффективности их работы.

Хлоропласт: не может функционировать без собственной ДНК. Транспорт белков в хлоропласты обеспечивается развитой системой шаперон-подобных белков. Его нарушение приводит к резкому снижению эффективности фотосинтеза.

# Митохондрии и хлоропласты: нуклеиновые кислоты

Митохондрия: кольцевые молекулы ДНК – 16 кБ, кодируют 13 белков (часть рибосомных, электрон-транспортной системы и субъединица АТФ-азы), 22 тРНК и 2 рРНК. Митохондрии растений имеют геном в 10 раз больше. Имеют собственный генетический код. ~10 кольцевых молекул на одну митохондрию.

Хлоропласт: кольцевые молекулы ДНК – 120-200 кБ, содержат около 120 генов (часть рибосомных белков, некоторые ферменты фотосинтеза, все т-РНК, 3 р-РНК). Для трансляции используется ядерный генетический код, но и-РНК сильно трансформируются (аномальный процессинг).

Рибосомы органелл: в митохондриях 55S (меньше бактериальных); в хлоропластах – 70S (гомологичны бактериальным)

# Передача сигналов между клетками – общие замечания

У бактерий до 90% генов отвечают за белки, которые обеспечивают передачу сигналов между клетками.

У эукариот – похожее соотношение.

Принципы передачи сигнала: отрицательная обратная связь (быстрое затухание сигнала во времени) и положительный контроль внутри клетки (каскад усиления).

Цепь передачи сигнала строится модульно – одни белки уникальны, другие белки являются общими для разных сигнальных каскадов.

Система передачи сигнала устойчива к обычным колебаниям параметров внешней среды. Устойчивость сигнальных путей достигается за счет избыточности числа белков, вовлеченных к ним.

Белки, участвующие в передаче сигнала в цитоплазме, часто собираются во временные кластеры - трансдуктоны.

# Общие принципы межклеточной сигнализации

Все внешние сигналы распознаются клетками с помощью специальных молекул – рецепторов.

Рецепторы: наружные (большинство), цитоплазматические, ядерные.

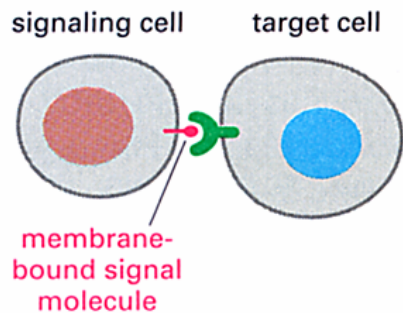
Каждая клетка имеет запрограммированный ответ на каждый сигнал.

Четыре типа передачи сигналов: контактные взаимодействия, паракриновые, синаптические, эндокринные.

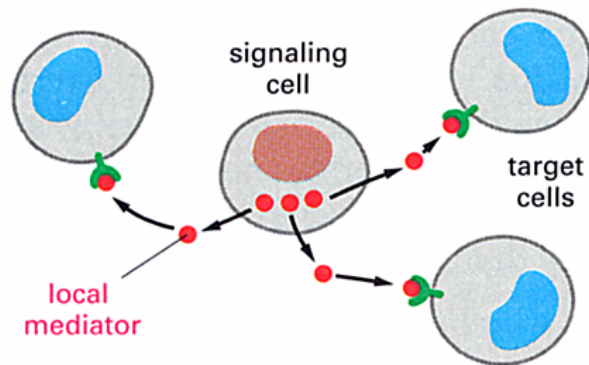
Высокопроницаемые контакты обеспечивают кооперацию клеток в одной ткани при генерации ответа на сигналы (например, сердечная мышца).

# Четыре типа межклеточных сигналов

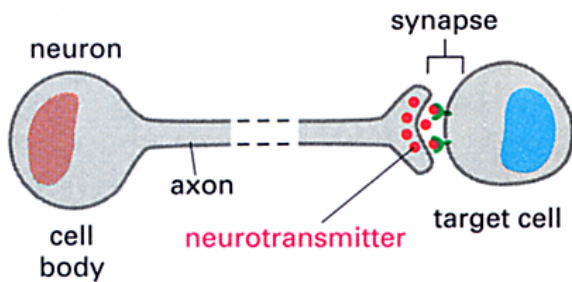
## контактный



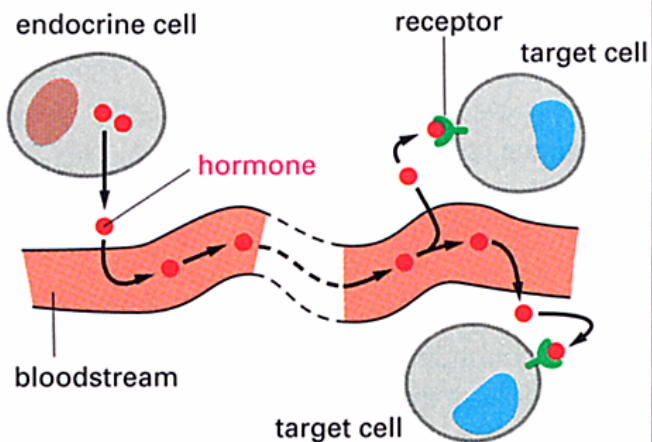
## паракриновый



## синаптический

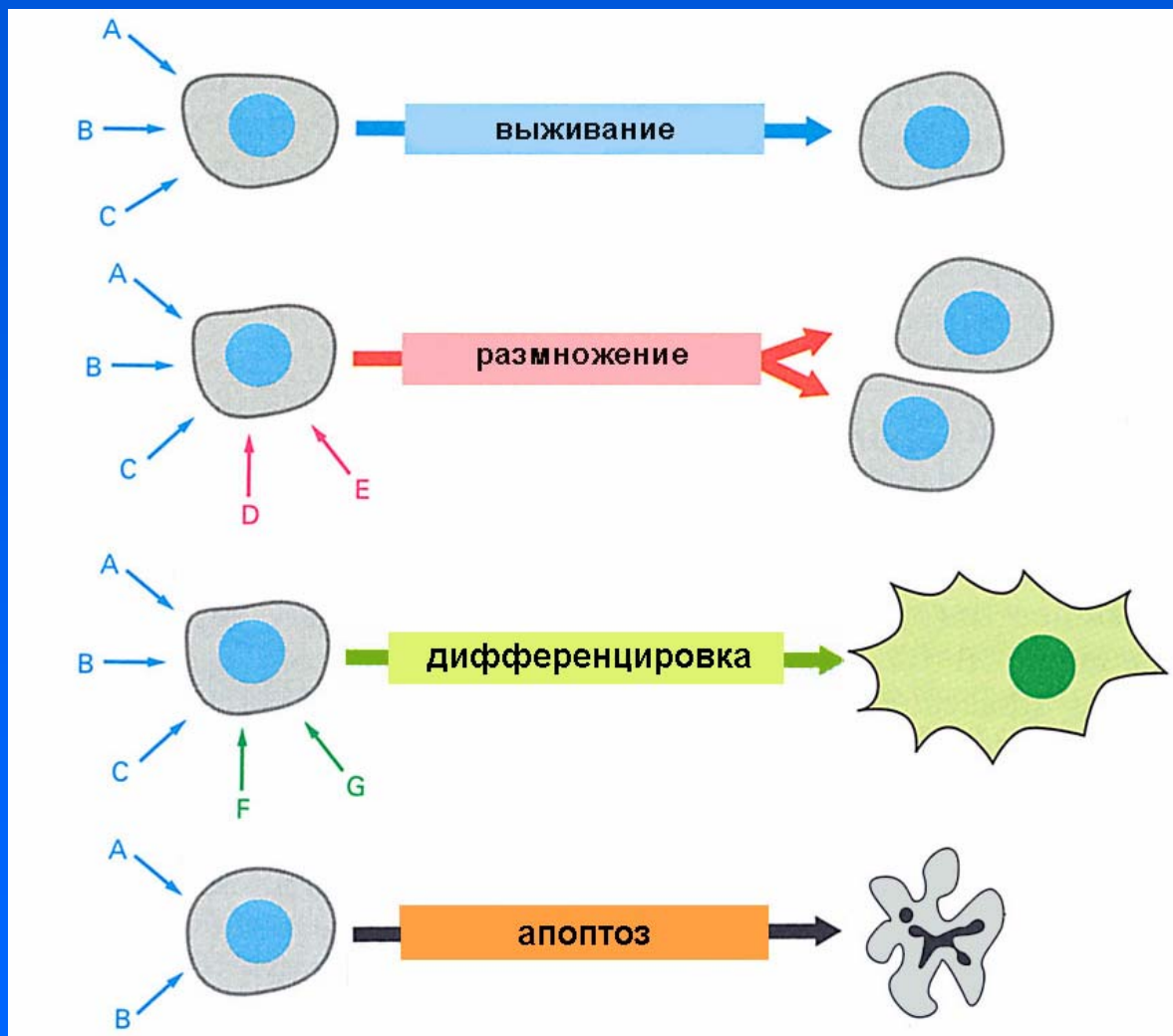


## эндокринный





# Четыре типа клеточных ответов



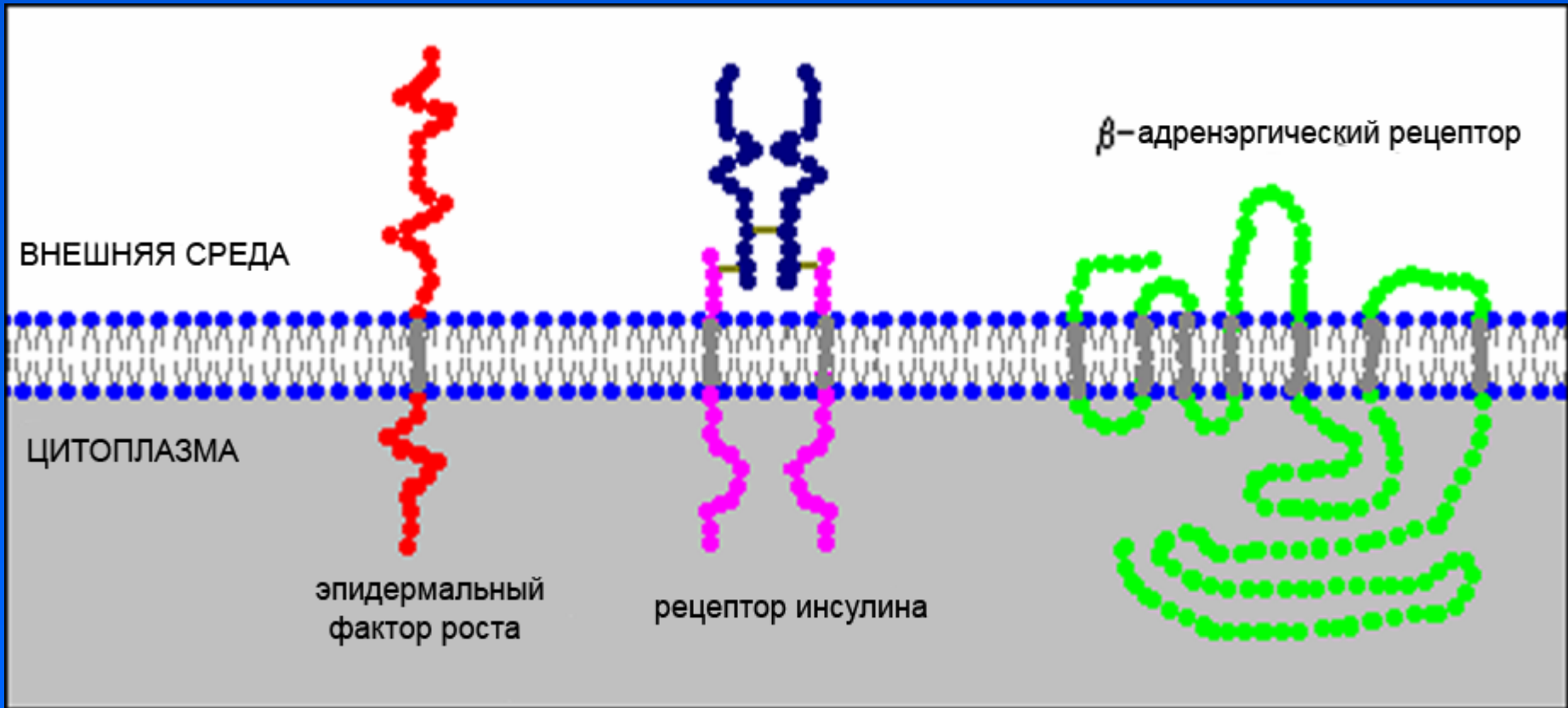
# Передача сигнала между растительными клетками

Фитогормоны – аналогичны гормонам животных. Стабильны во внешней среде, передают сигнал на большие расстояния.

Цитокинины – растительные (прокариотические) гормоны.

Передача сигнала цитокининами связана с трансфосфорилированием гистидин-аспарагин.

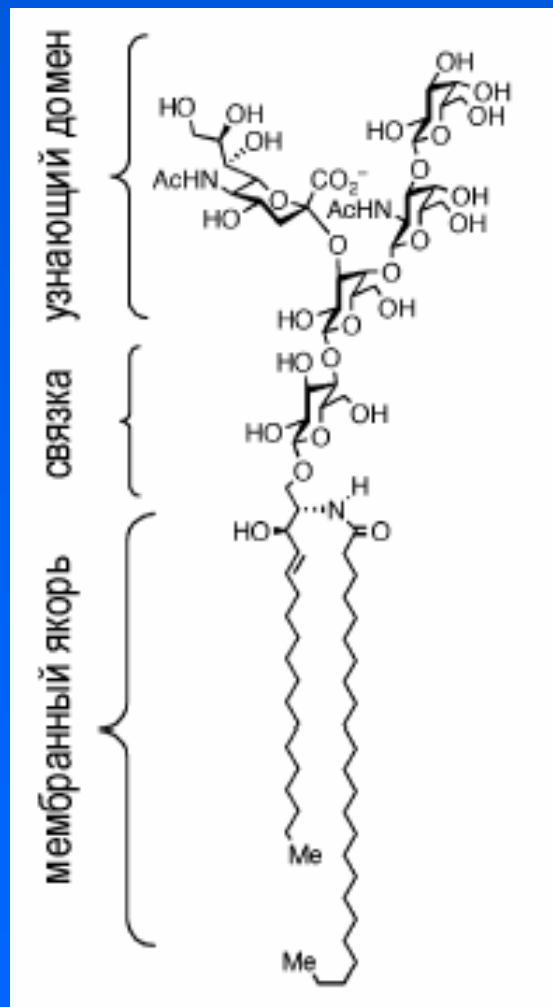
# Примеры поверхностных рецепторов



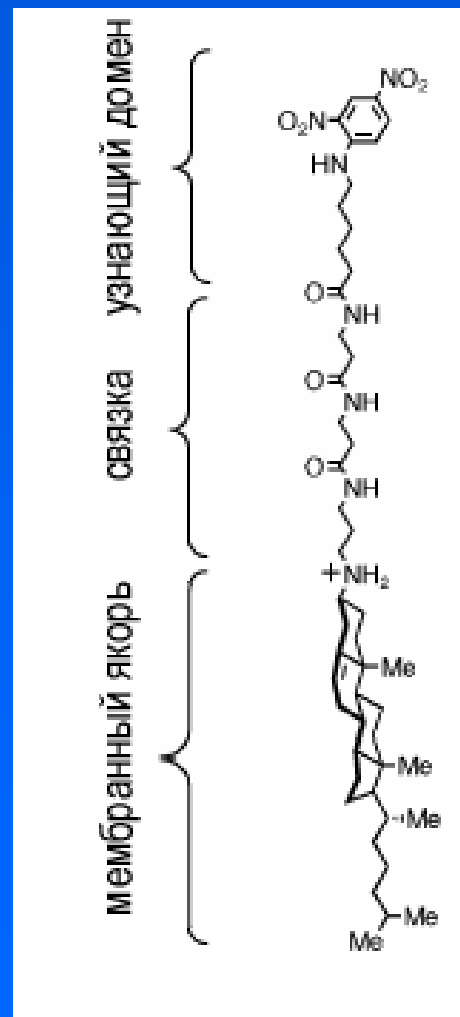
**Внеклеточный домен – отвечает за связывание лиганда;**  
**Трансмембранный домен – гидрофобный участок молекулы;**  
**Внутренний (цитоплазматический) домен – передача сигнала (эффектор)**

# Строение минимального рецептора

## Рецептор холерного токсина



## Синтетический рецептор антител к 2,4-ДНФ



# Взаимодействие лиганд-рецептор

Взаимодействие приводит к изменению конформации молекулы рецептора.

Передача сигнала сквозь мембрану: активация киназ; конформационное изменение, которое обеспечивает активацию G-белков, вход ионов кальция и проч.

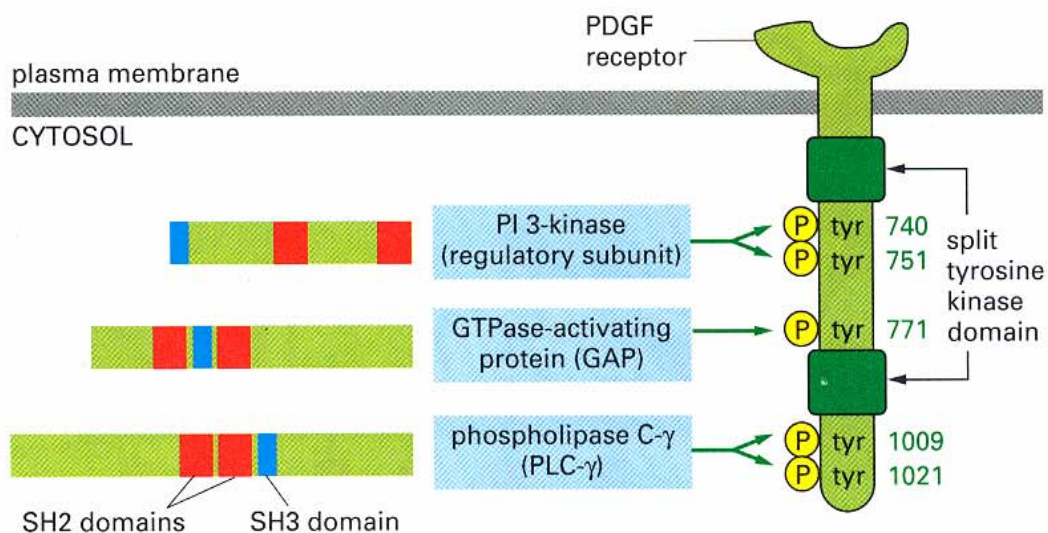
Рециркуляция рецептора:

- восстановление начальной конформации после высвобождения (диссоциации) лиганда на поверхности клетки или
- интернализация комплекса рецептора с лигандом и последующее отщепление лиганда в эндосомном цикле.

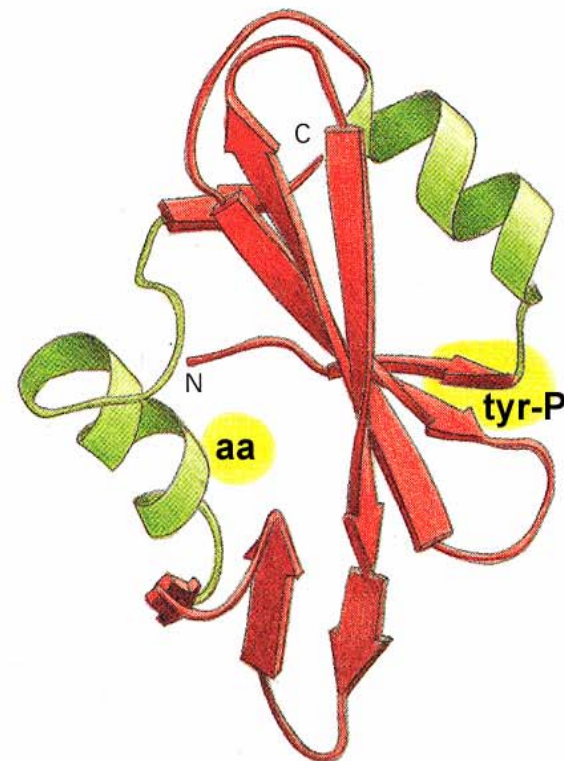


# Строение комплекса тирозин-киназного рецептора к фактору роста

## PDGF- рецептор



## SH2-домен



# Тирозин-киназы

2 группы – мембранные (связанные с рецепторами на плазматической мембране) и цитоплазматические.

6 семейств (генетически). У человека известно 90 тирозин-киназ (58 рецепторных и 32 цитоплазматических).

Принцип работы мембранных киназ – автофосфорилирование цитоплазматического домена, который содержит несколько сайтов (остатков тирозина)

# Ферменты, активируемые поверхностными рецепторами

Тирозин киназы (tyrosine kinases)

Гетеротримерные G-белки (heterotrimeric G proteins)

Малые ГТФ-азы (small GTPases)

Серин-треониновые киназы (serine/threonine protein kinases)

Фосфатазы

Киназы липидов

Гидролазы

# G-белки

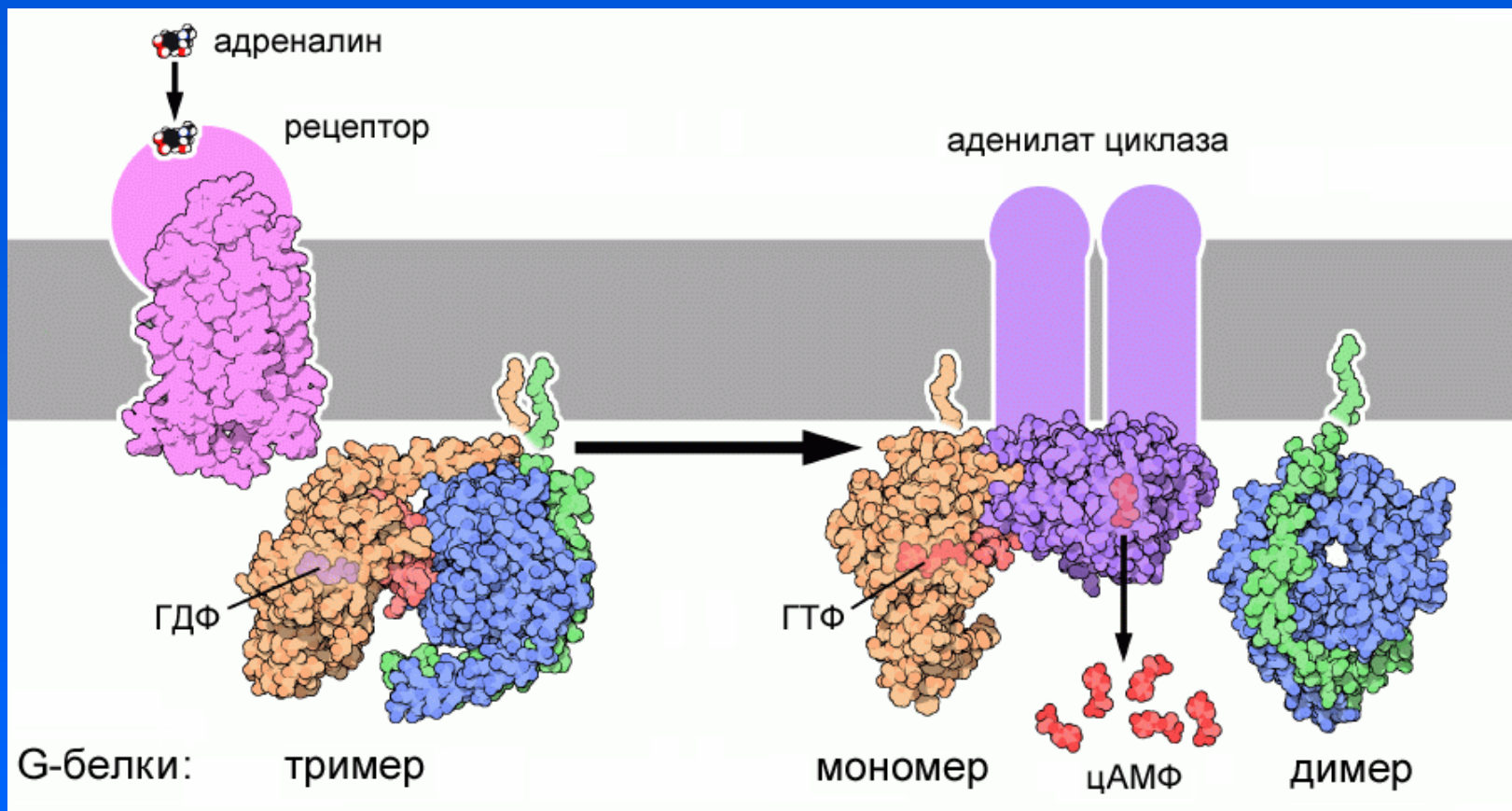
**G-белки: связывают ГДФ(неактивные)/ГТФ(активные)**

**Строение: тримеры, м.в. 17 кД**

**Принцип работы – в комплексе с ГТФ запускают внутриклеточные сигнальные каскады**

**Каскады с участием G-белков: аденилатциклаза – цАМФ-зависимая протеинкиназа; инозитол-3-фосфатный путь; серин-треониновая фосфатаза; тирозин-киназа**

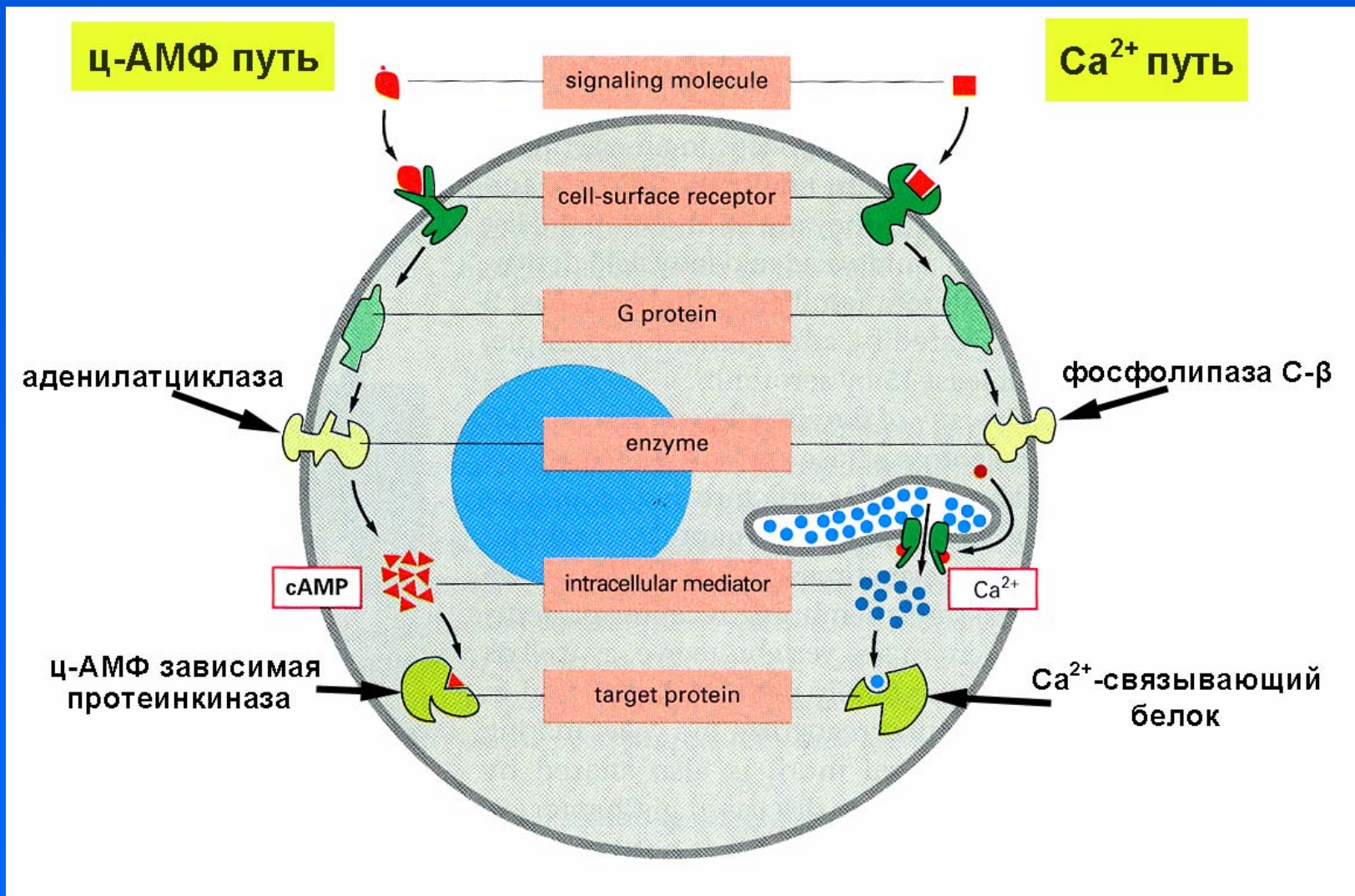
# Пример работы G-белков



Активированный гормоном рецептор активирует тримерный G-белок – замена ГДФ на ГТФ приводит к диссоциации тримера и ГТФ-мономер активирует аденилатциклазу, что приводит к синтезу ц-АМФ.



# Сигнальные пути G-белков



# Интегрины

Гетеродимерные белки, каждый имеет один трансмембранный домен. Располагаются в мембране постоянно (не рециклируют).

Внешние домены сильно гликозилированы.

Не имеют собственной киназной активности, но взаимодействуют с киназами в процессе передачи сигнала.

Взаимодействуют с внеклеточным матриксом (снаружи) и с цитоскелетом (внутри).

Осуществляют механо-химическое сопряжение.

Кластеризуются при передаче сигнала.

Могут быть активируемыми (клетки крови) или конститутивно активными (эпителий).

Передают сигналы для всех типов клеточных ответов.

# Toll-подобные рецепторы (TLR)

Функционируют в мембране виде димеров. Каждая молекула имеют один трансмембранный домен. В структуре имеют много последовательностей богатых лейцином.

Запускают иммунный ответ (млекопитающие), апоптоз (растения). Присутствуют в большинстве клеток позвоночных и во многих типах клеток беспозвоночных животных.

Не имеют собственной киназной активности, работают через адапторные белки, запуская киназный каскад реакций. Функционируют в виде димеров (гомо- и гетеро).

Эволюционно консервативны. Они «узнают», аналогично иммуноглобулинам, консервативные молекулы у бактерий и вирусов (флагеллин, липополисахариды бактерий, двуспиральную РНК вирусов, метилированные ГЦ-богатые участки ДНК и т.п.).

# Лекция 8

**Передача сигналов  
(окончание)**

**Апоптоз**

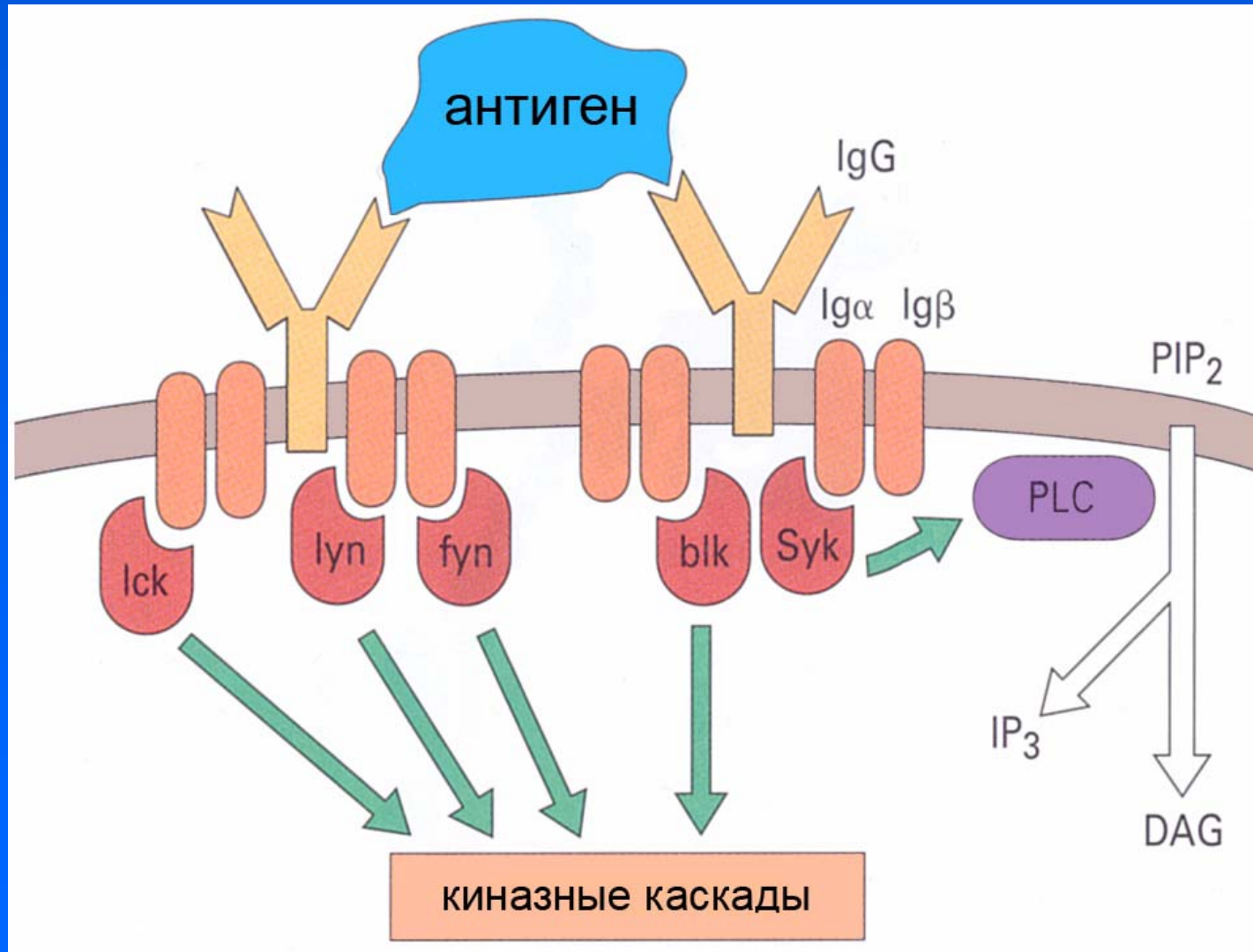
**Клеточный цикл**

# Каскад передачи сигнала

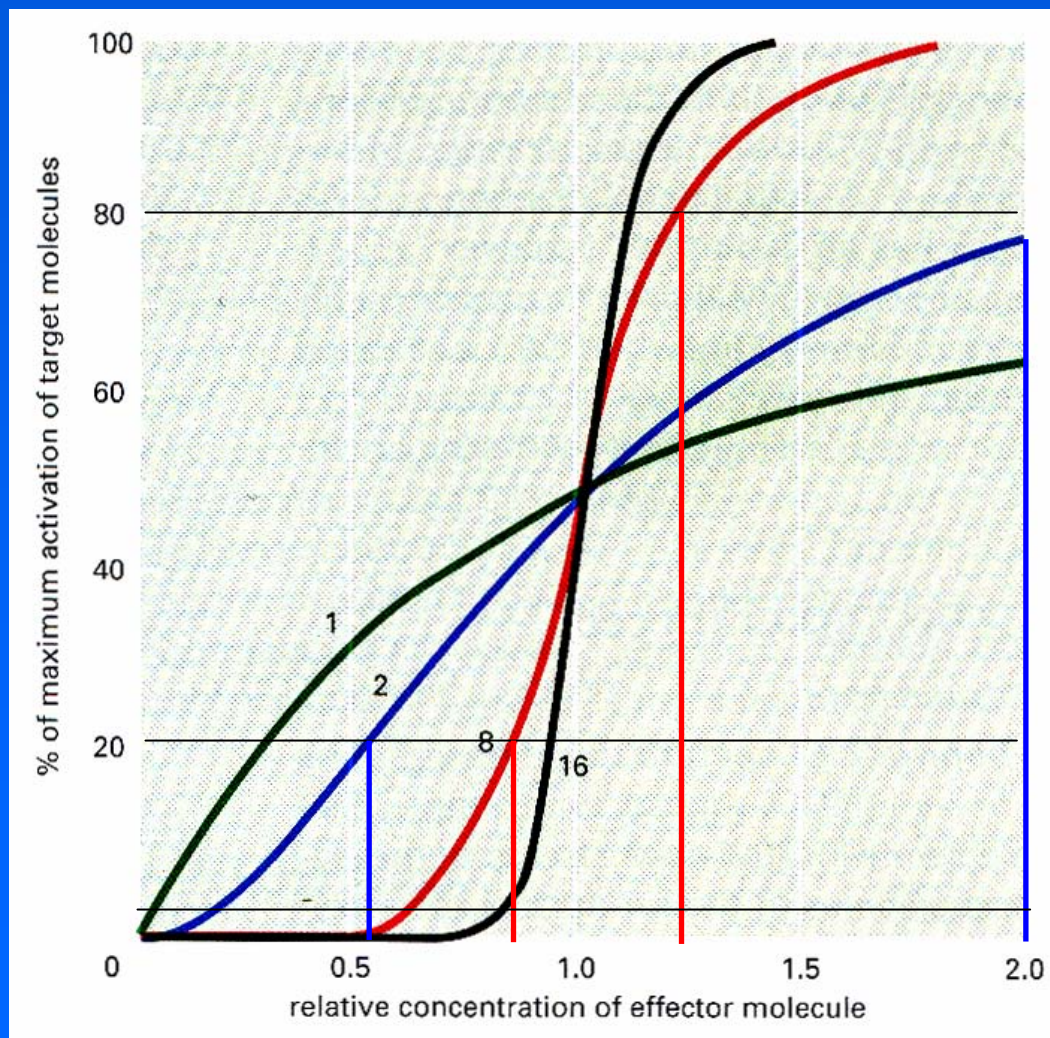




# Рецептор В-лимфоцита (BCR)



# Чувствительность к концентрации лиганда зависит от числа молекул в кластере



# Ядерные рецепторы

Строение - димеры (гомодимеры, гетеродимеры).

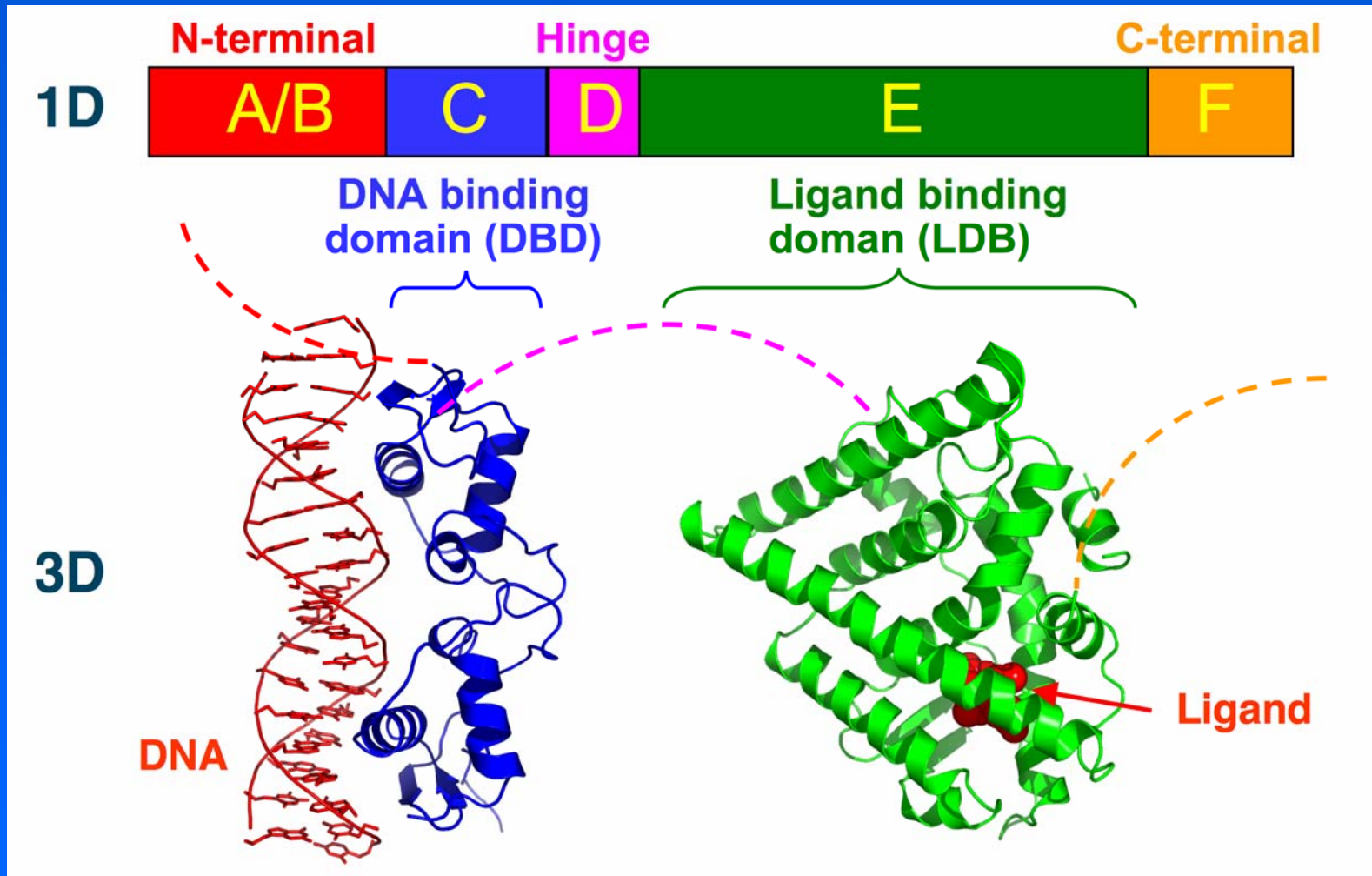
Лиганды к ядерным рецепторам – гормоны водорастворимые и водонерастворимые.

Принцип работы: комплексы лиганд-рецептор связываются со специфическими участками ДНК.

Рецепторы содержат домен, активирующий транскрипцию.

Каскад усиления: первичный ответ (индукция транскрипции одного или нескольких генов), затем вторичный ответ (индукция транскрипции многих генов).

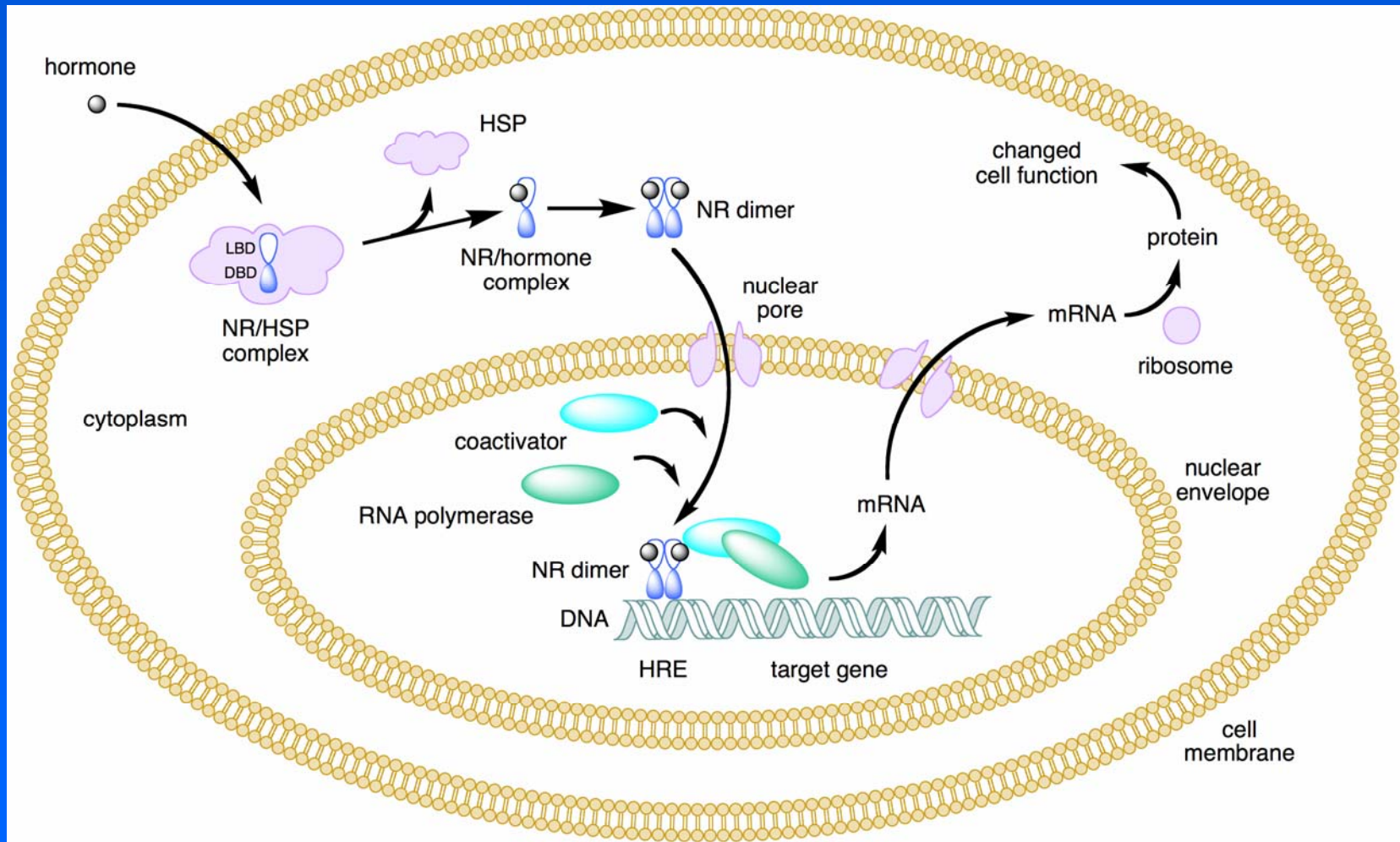
# Структура ядерного рецептора



Домены: N-концевой; ДНК-связывающий; шарнир; лиганд-связывающий; С-концевой.



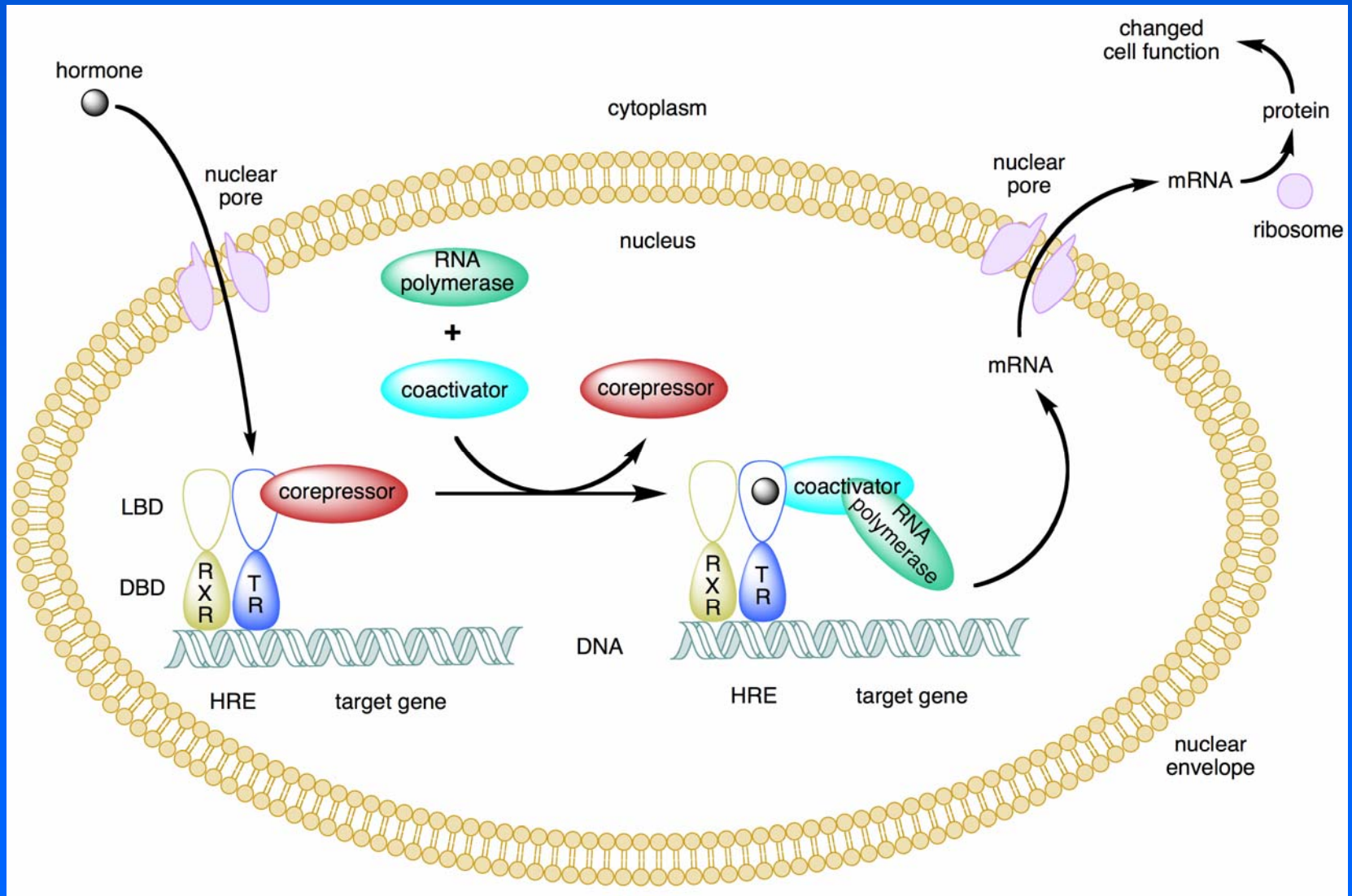
# Ядерные рецепторы, I типа



**Входят в ядро только после взаимодействия с лигандом**

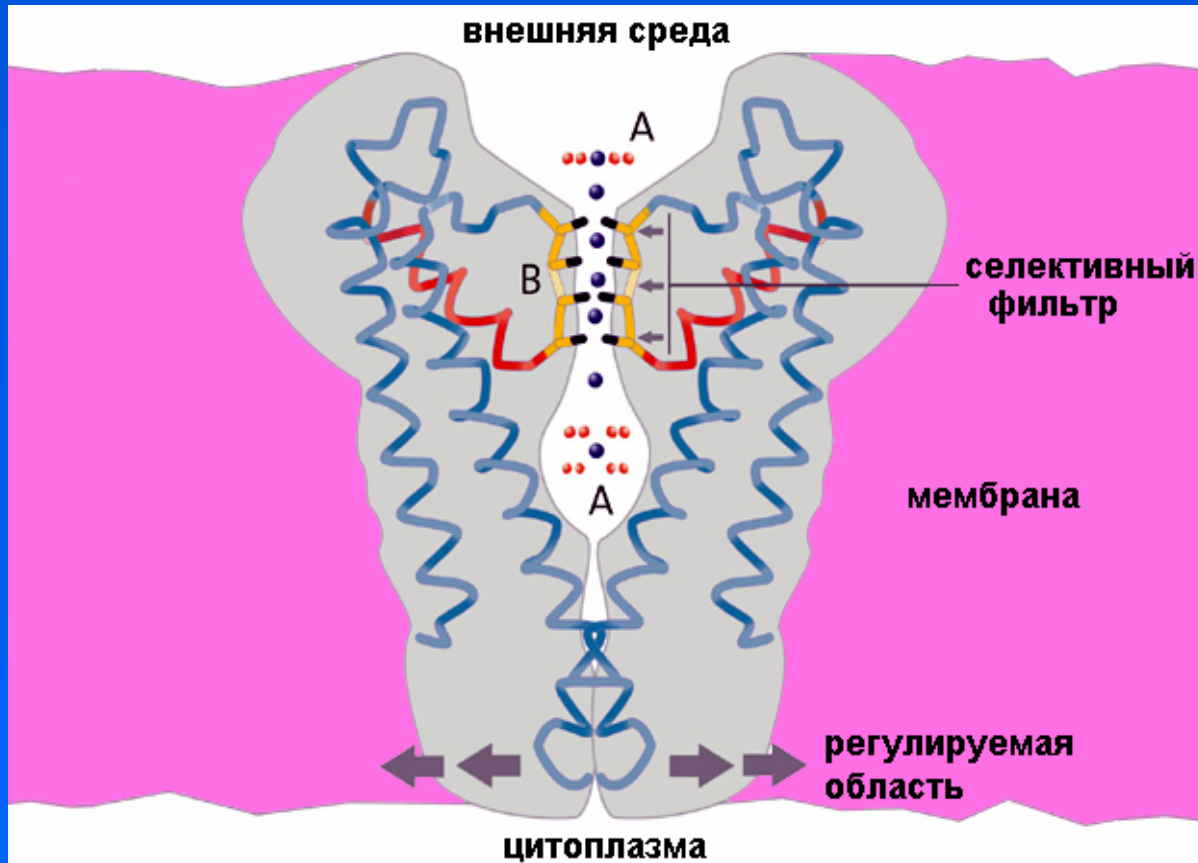


# Ядерные рецепторы II типа



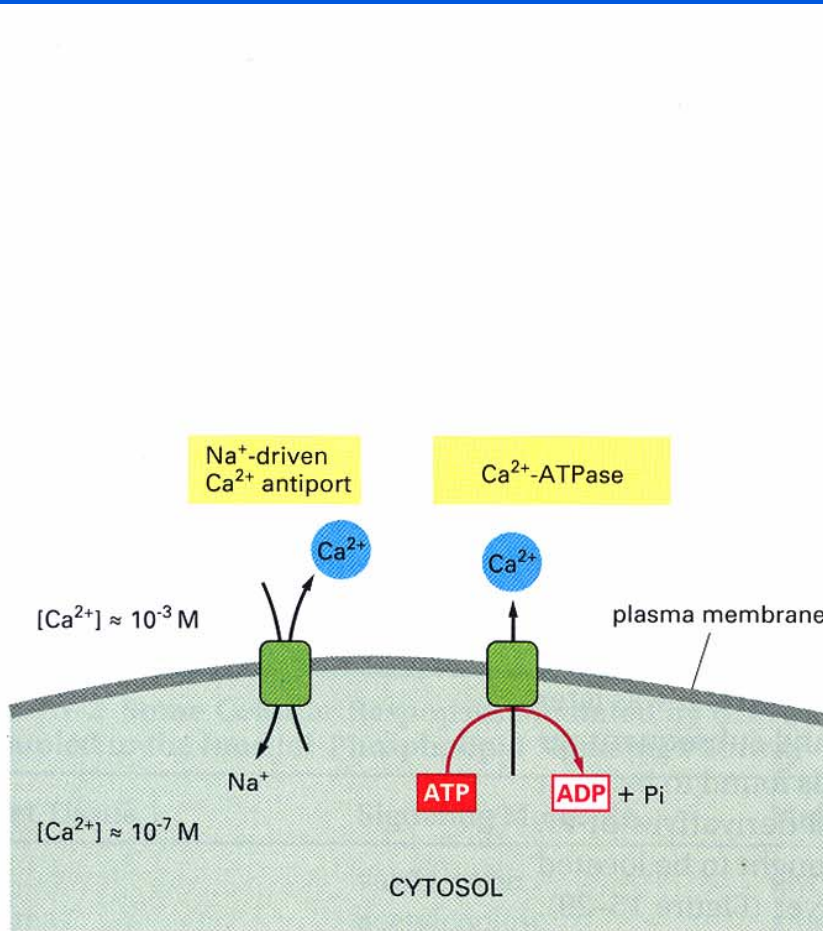
Постоянно находятся в ядре. Активируются гормоном.

# Ионный канал

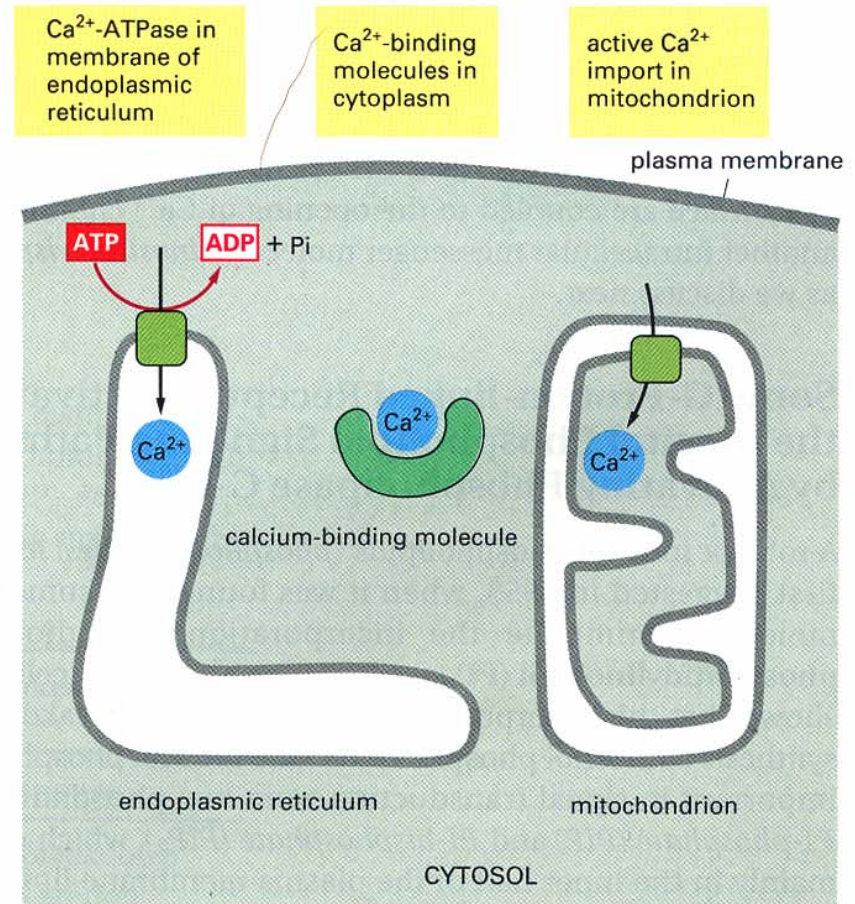


Канал представляет собой рецептор (область связывания лиганда не показана на схеме), состоящий, как правило, из нескольких субъединиц. Транспорт ионов (строение внутреннего просвета ионного канала) регулируется (вкл/выкл) за счет взаимодействия рецептора с лигандом.

# Клетка поддерживает низкую концентрацию ионов кальция



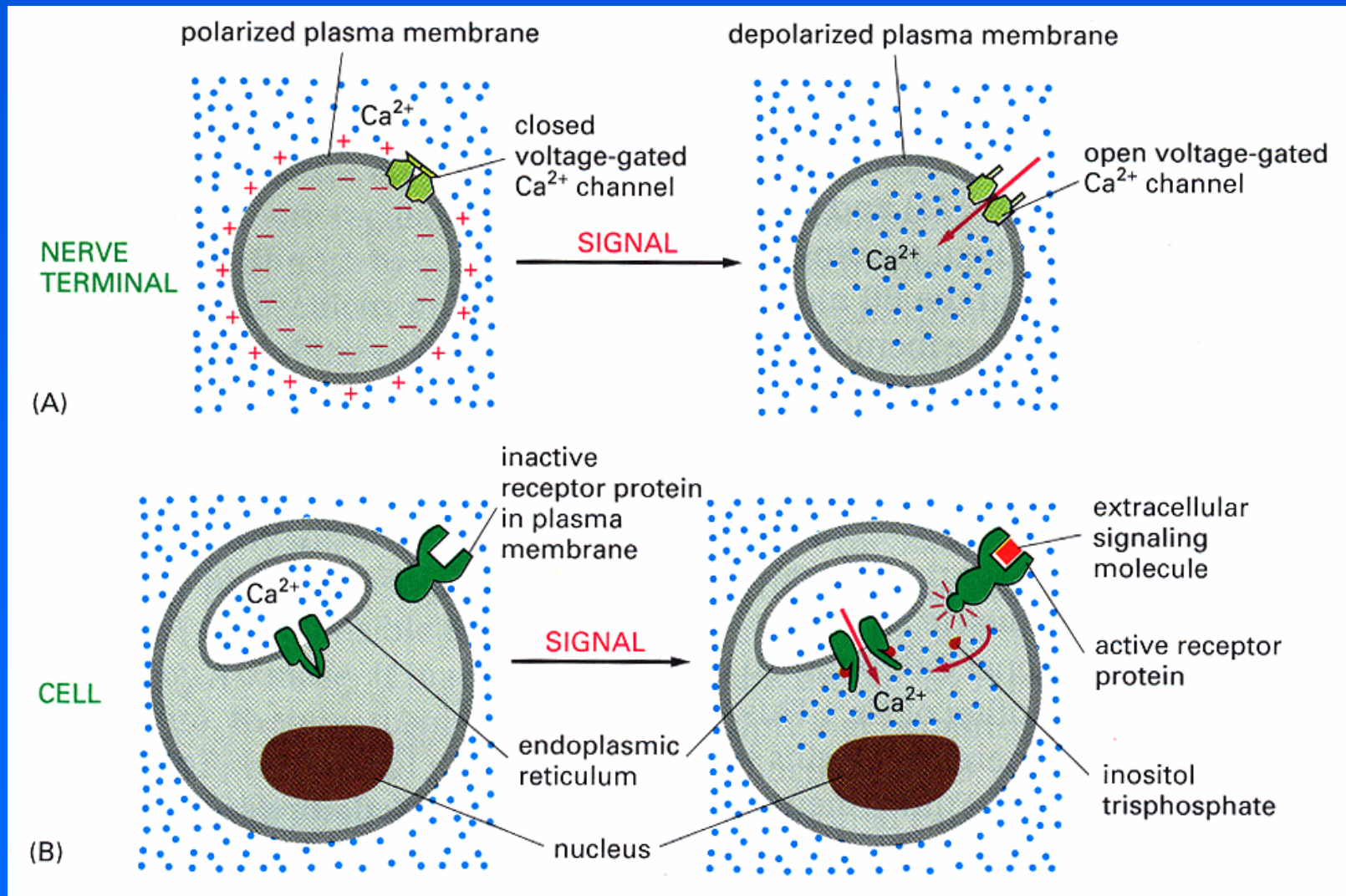
(A)



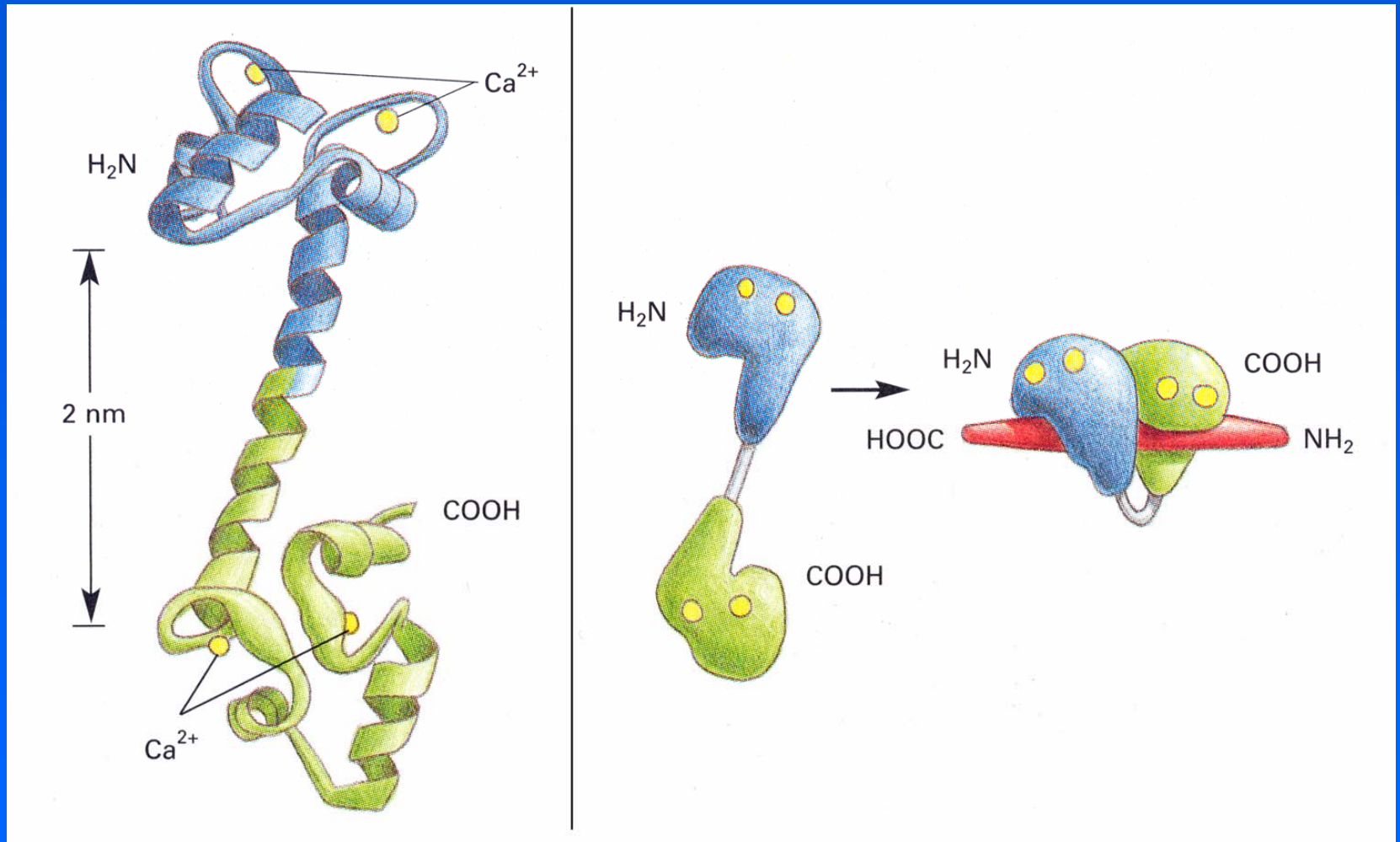
(B)



# Концентрация кальция в цитоплазме повышается различными путями



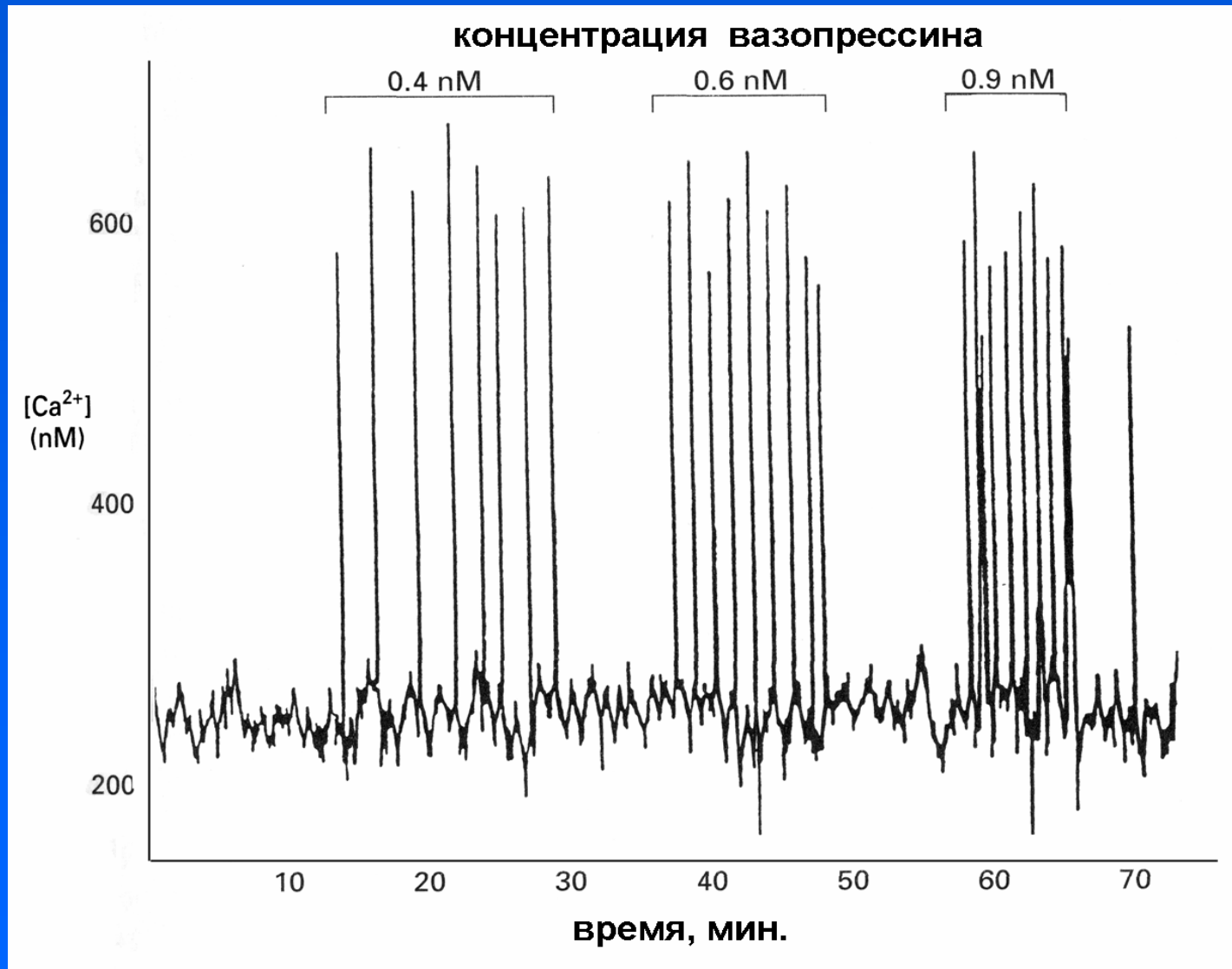
# Кальций-кальмодулин



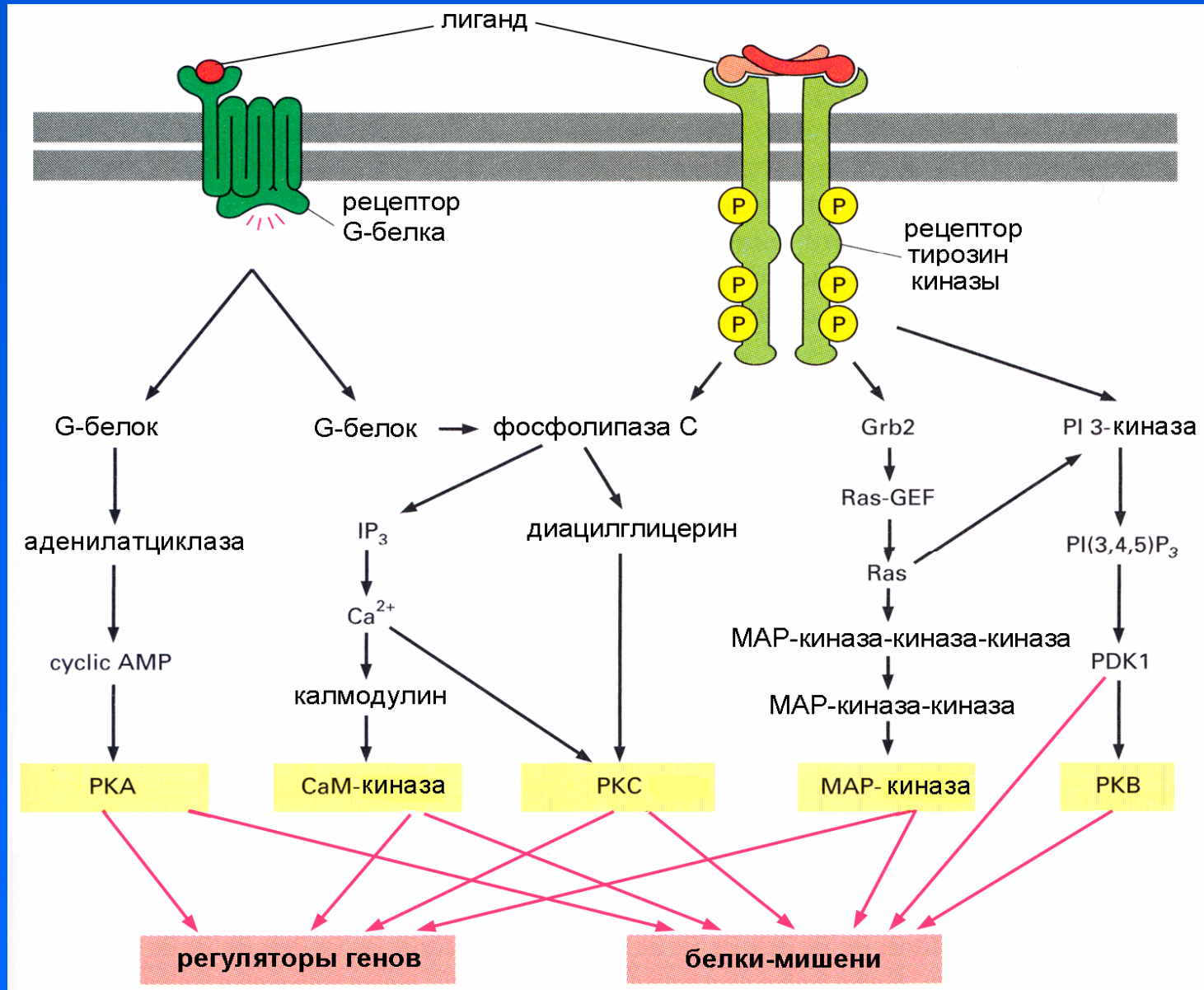
При связывании с ионами кальция молекула резко изменяет свою конформацию и связывается с белками-мишенями



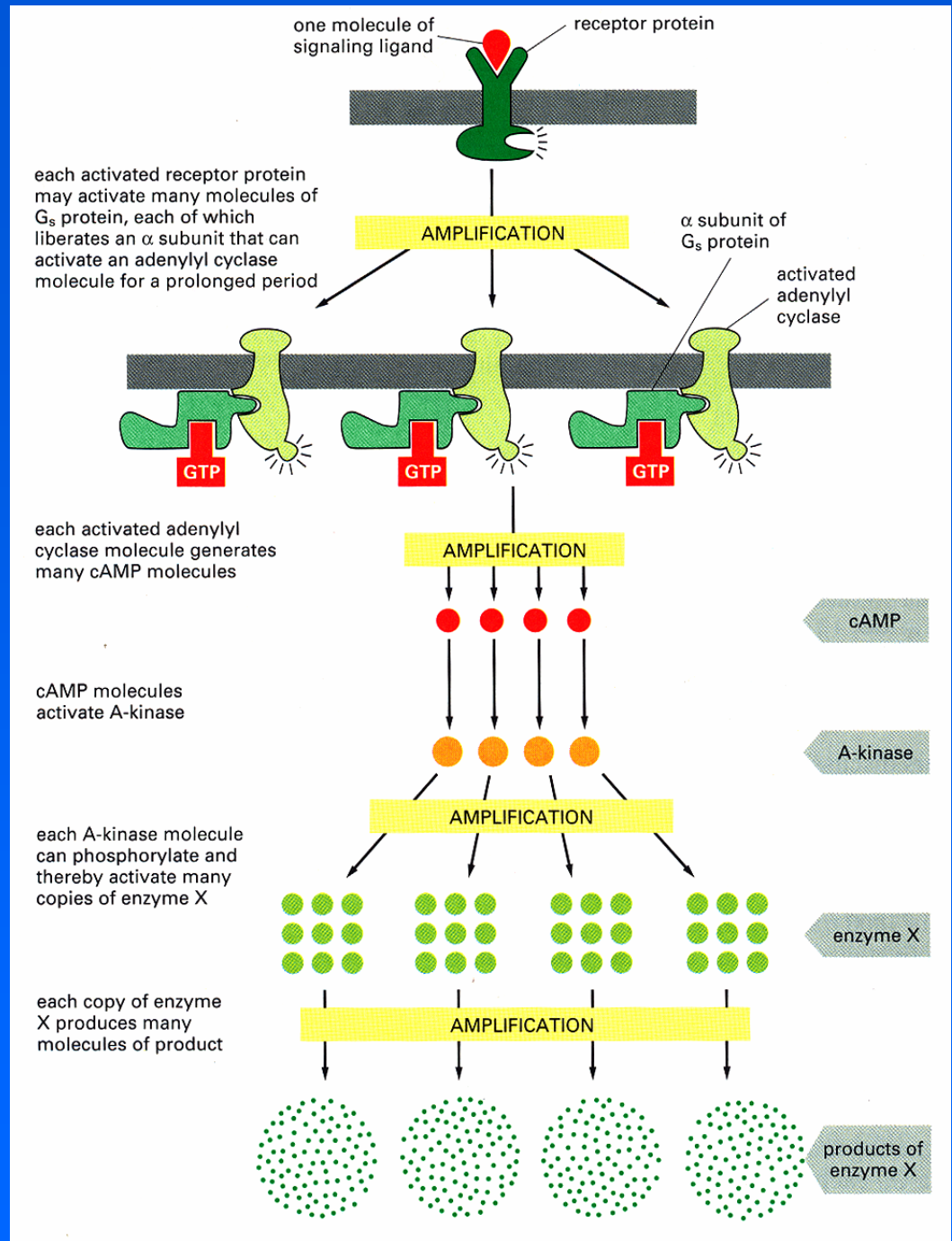
# Колебания концентрации кальция



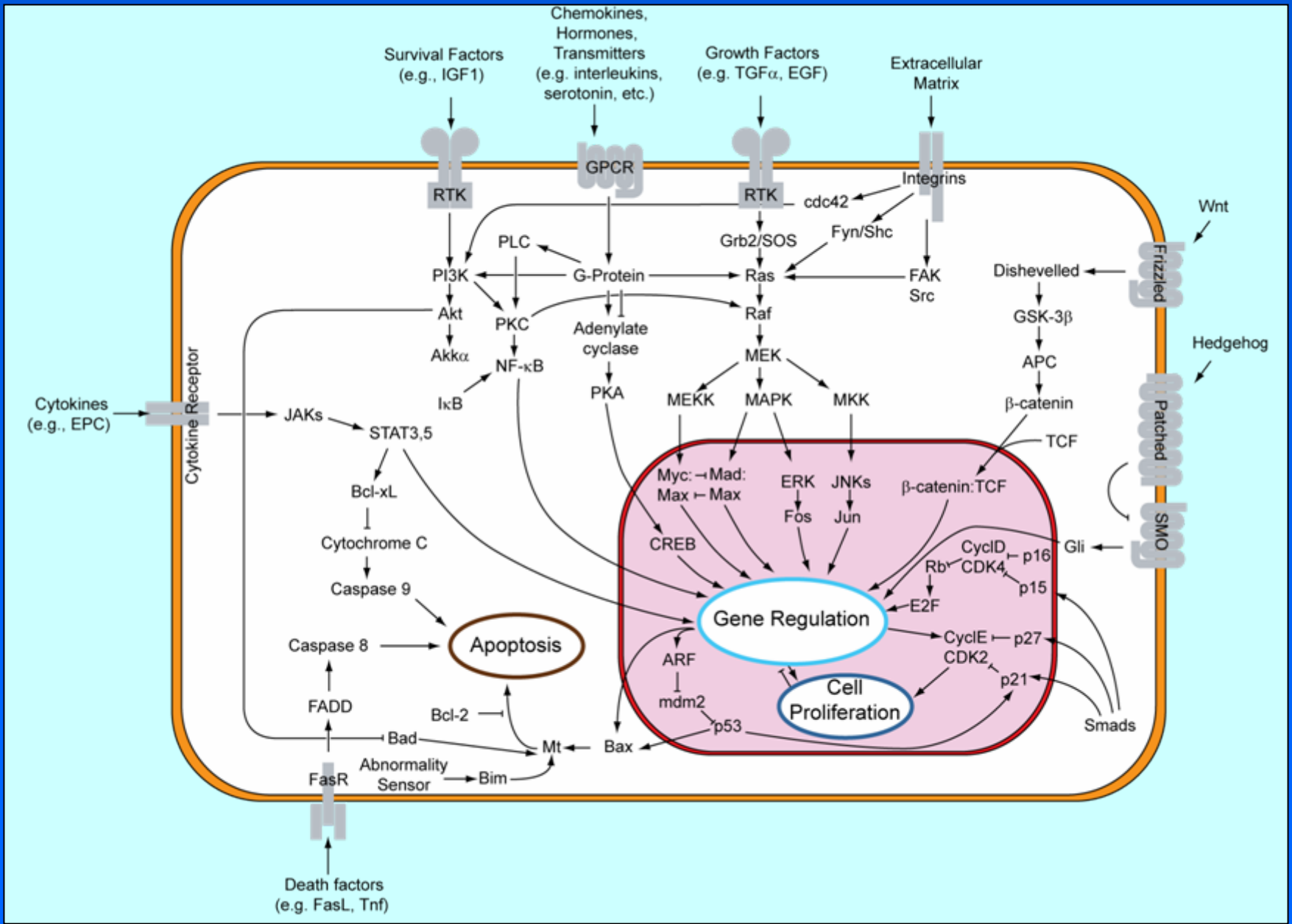
# Основные сигнальные пути



# Внутри клетки сигнал множественно усиливается (до $10^7$ раз)



# Основные сигнальные каскады



**Апоптоз –  
программируемая  
гибель клеток**



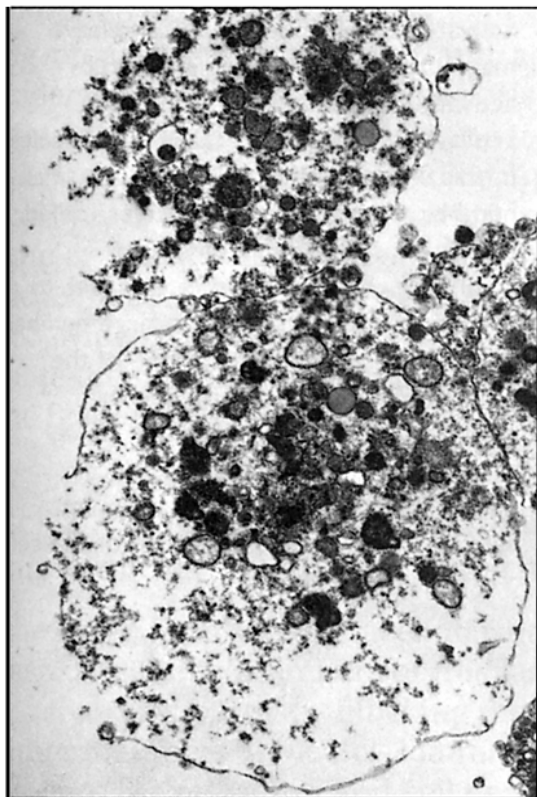
# Апоптоз и некроз

**Некротическая гибель поврежденной клетки: набухание органелл, потеря целостности мембраны, индукция воспаления. Процесс непрограммируемый, гибель происходит быстро.**

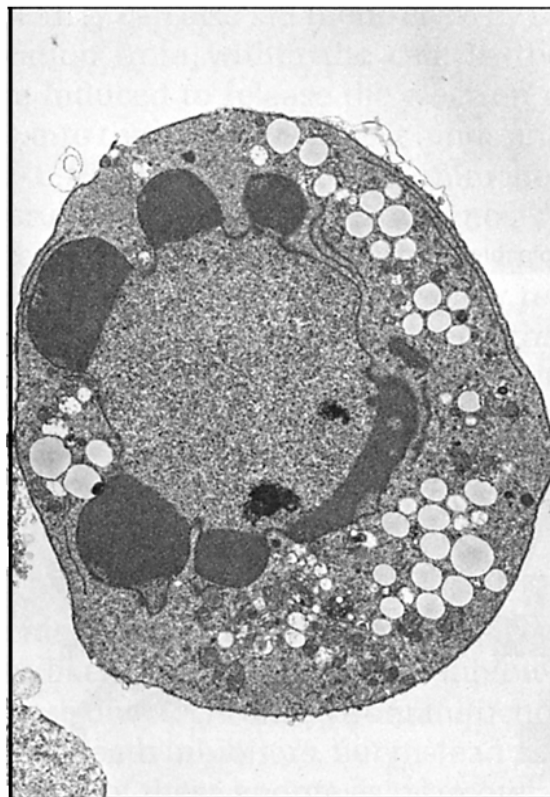
**Апоптоз: съеживание и “вскипание” поверхности; фрагментация клетки и ее фагоцитоз в отсутствие воспаления. Процесс запрограммированный, относительно медленный и происходит при сохранении целостности плазматической мембраны.**

**Некроптоз – программируемая клеточная гибель при подавлении программы апоптоза.**

# Некроз и апоптоз - ЭМ

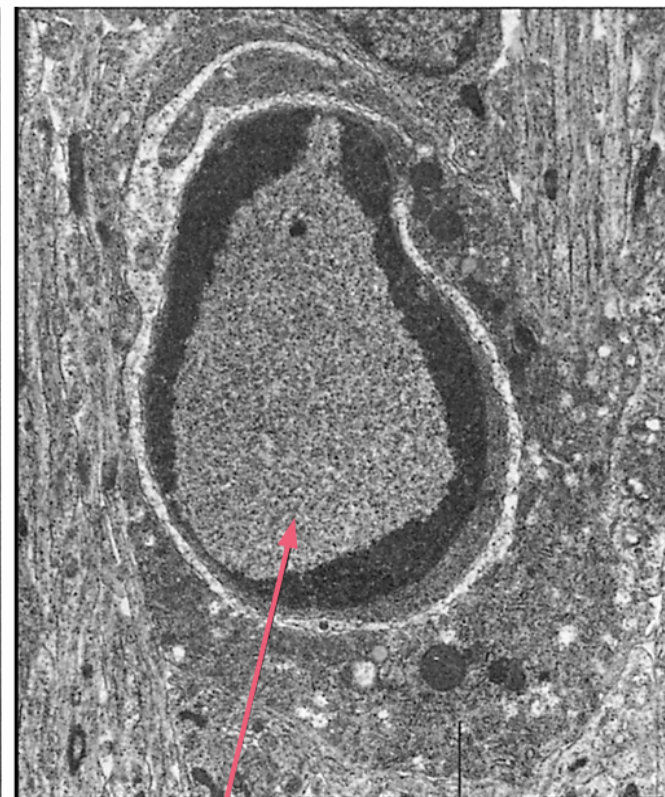


некроз



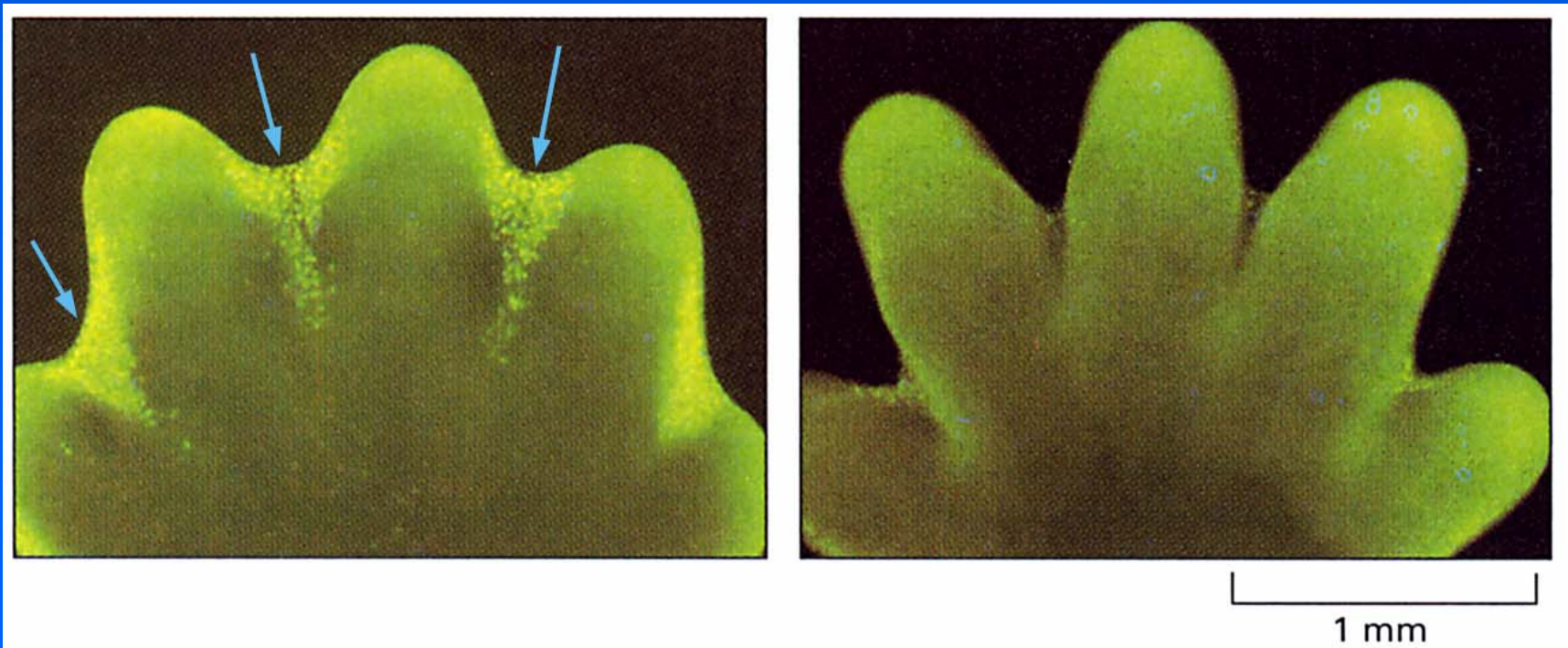
апоптоз

10 μm



фагоцитирующая клетка

# Апоптоз при развитии конечности



**Желтые пятна – скопления клеток, проходящих апоптоз**

# Индукция апоптоза

**Внешний путь – Fas и TNF-рецептор (фактор некроза опухоли). Рецепторы связываются с Fas-лигандом (на поверхности другой клетки) и TNF соответственно.**

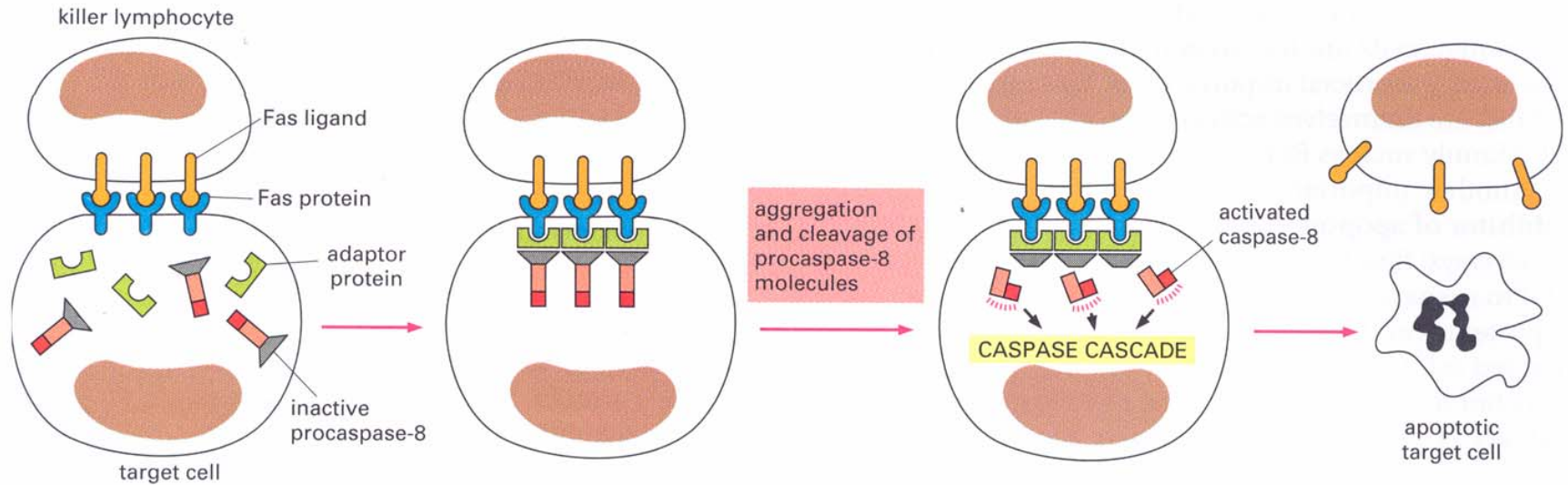
**Внутренний путь (основной) – активация каспаз в результате выхода цитохрома С из митохондрий и нарушения комплекса Bcl-2-Araf-1 (1-й фактор активации ферментов апоптоза).**

**Второй внутренний путь – неспецифическое повреждение комплекса Bcl-2-Araf-1 активными формами кислорода (ROS – reactive oxygen species).**

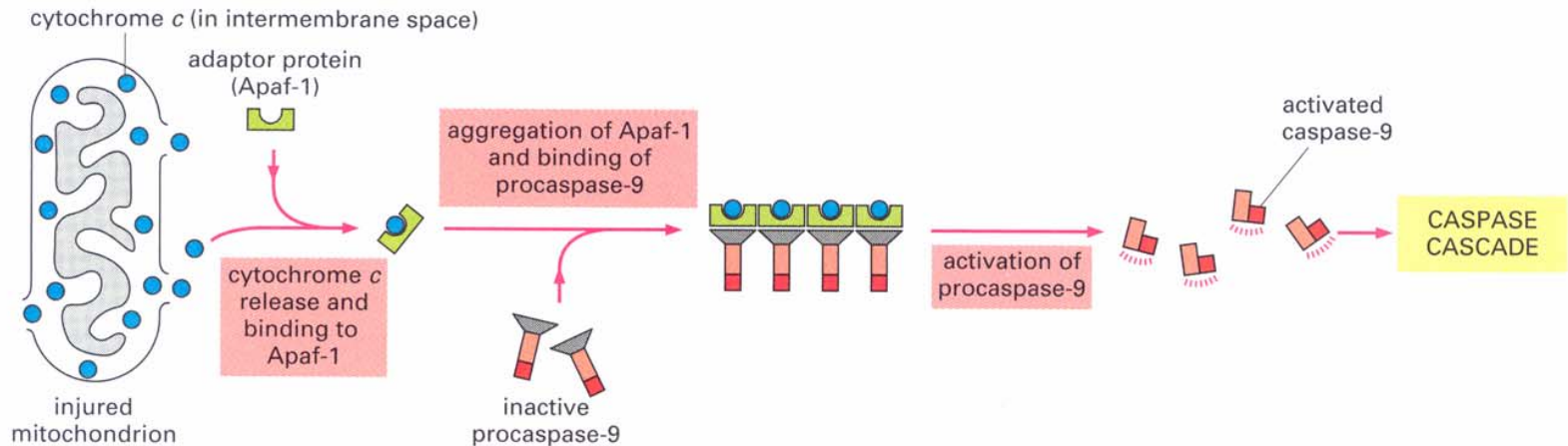


# АПОПТОЗ – ОСНОВНЫЕ ПУТИ

## Внешняя активация



## Внутренняя активация





# Каспазы

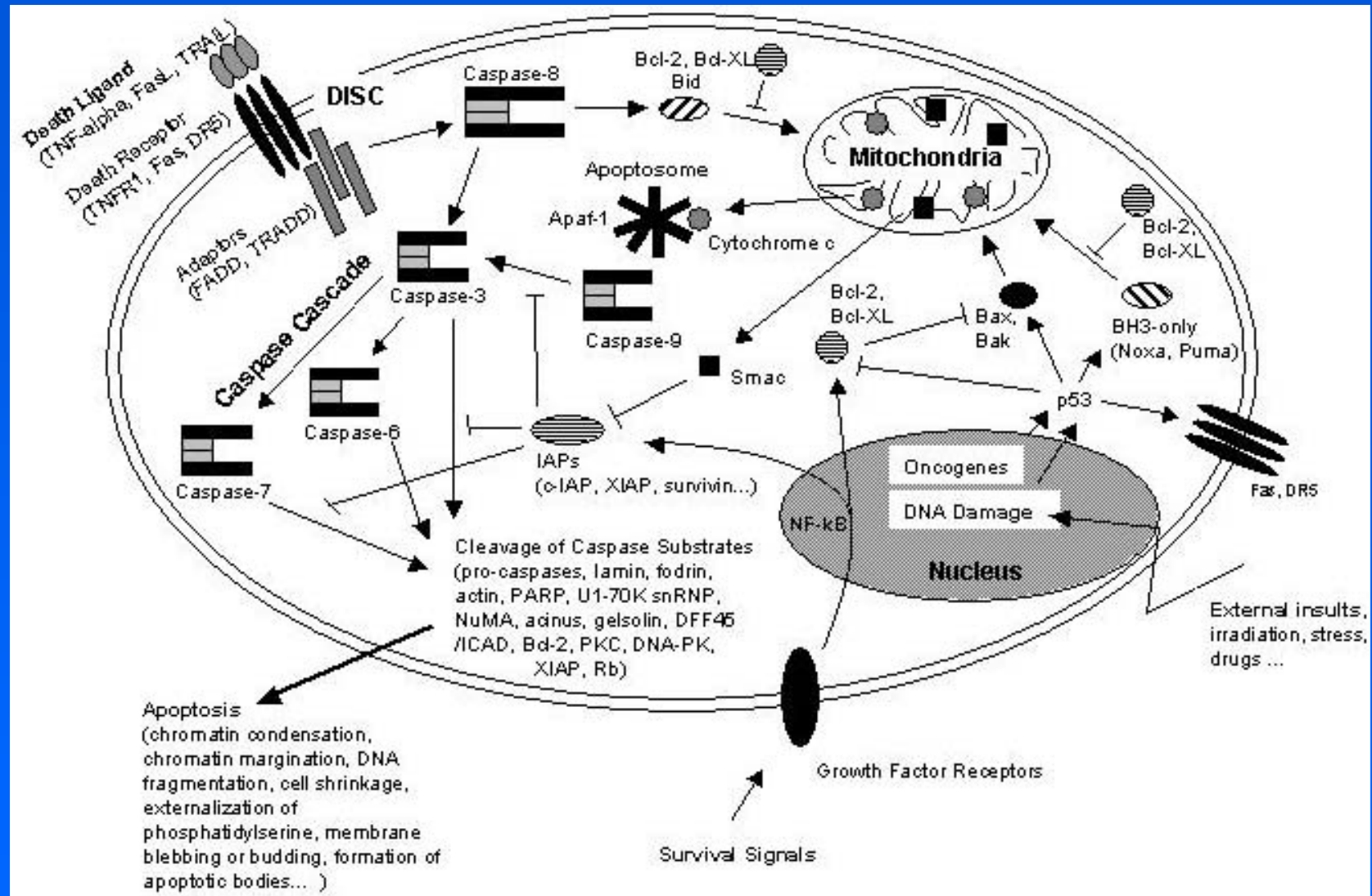
Семейство цитоплазматических ферментов со сходной протеолитической активностью.

Синтезируются и накапливаются в виде прокаспаз, которые не обладают протеолитической активностью.

В нормальной клетке неактивны. Активируются за счет фосфорилирования и отщепления фрагментов молекулы.

Активированные каспазы расщепляют белки на полипептиды по некоторым остаткам аспарагина.

# Апоптоз – общая схема



# Апоптоз – последовательность основных событий

Выход цитохрома C из митохондрий, активация p53 или образование комплекса с Fas/TNF-рецептором.

Активация прокаспазы (8-й или 9-й) и последовательная активация других каспаз (запуск каспазного каскада).

Деградация хроматина: расщепление и частичный гидролиз ДНК.

Появление фосфатидилсерина на поверхности плазматической мембраны и налипание на нее аннексина V.

Съезживание клетки и «вскипание» поверхности (нарушение цитоскелета).

Фрагментация клетки и ее поглощение соседями (фагоцитоз).

# Физиологическая роль апоптоза

Регуляция численности клеточных популяций в эмбриогенезе – удаление избыточных клеток.

Удаление клеток во взрослом организме без возникновения очага воспаления.

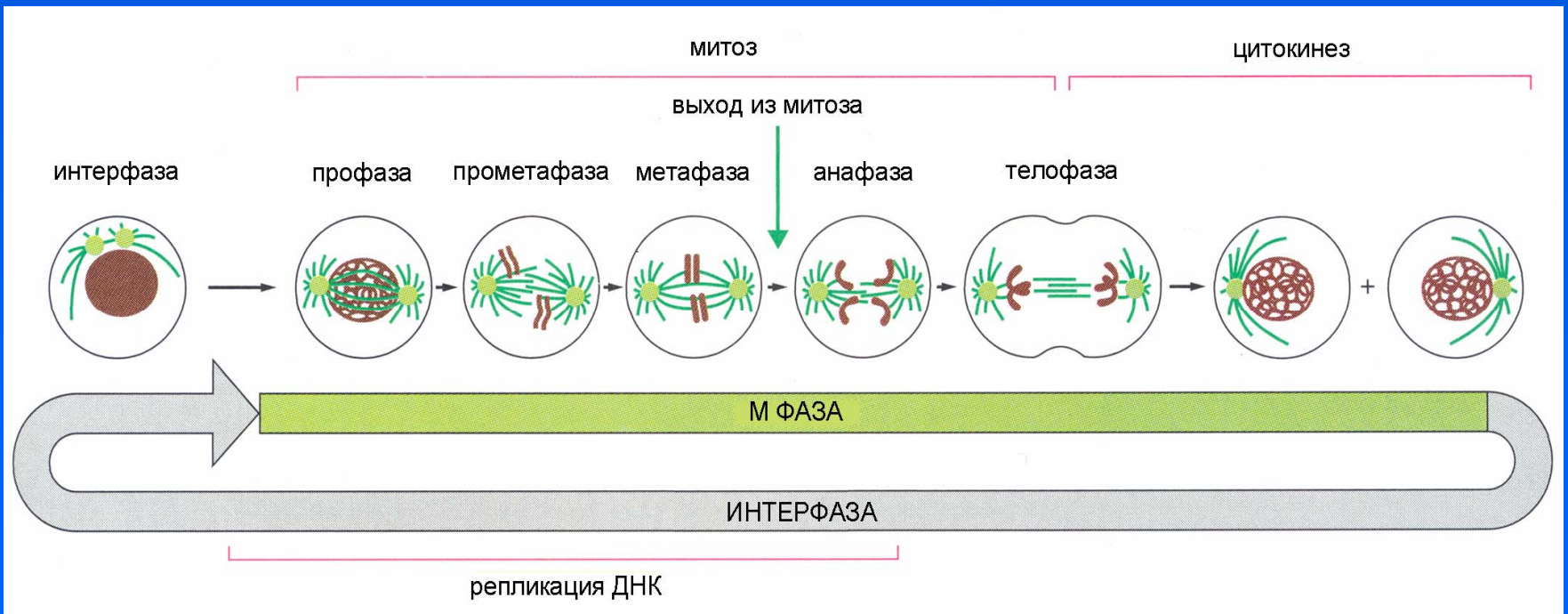
Контроль размножения клеток через контрольные (сверочные) точки.

Борьба организма с вирусными инфекциями.

# Клеточный цикл и его регуляция



# Клеточный цикл: митоз и интерфаза



# Фазы клеточного цикла

Клеточный цикл: митоз и интерфаза.

Интерфаза: общая продолжительность (в соматических клетках млекопитающих) – около суток.

Интерфаза подразделяется на периоды  $G_1$ , S (синтез ДНК) и  $G_2$  – опыты с импульсным мечением ДНК (Говард и Пелк).

$G_1$  (пресинтетический) – наиболее вариабельный период.

S-период – 6-8 часов.

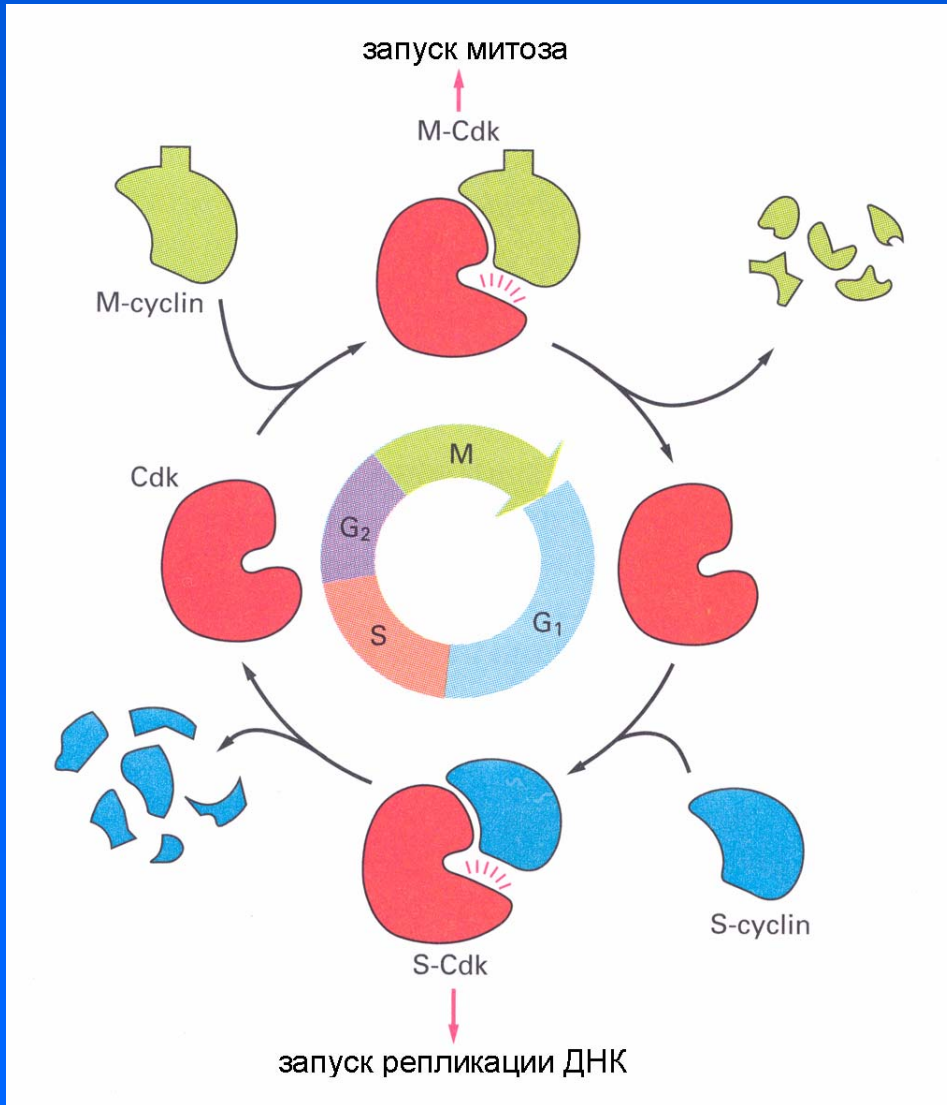
$G_2$  (постсинтетический период) – от 3 до 6 часов.

Рост клетки – наиболее быстрый в  $G_2$  периоде.

Во время митоза транскрипция подавляется на 100%, трансляция – более чем на 90%.

Выход из/вход в клеточный цикл происходит, как правило,  $G_1$ -периоде.

# Основной регуляторный комплекс клеточного цикла



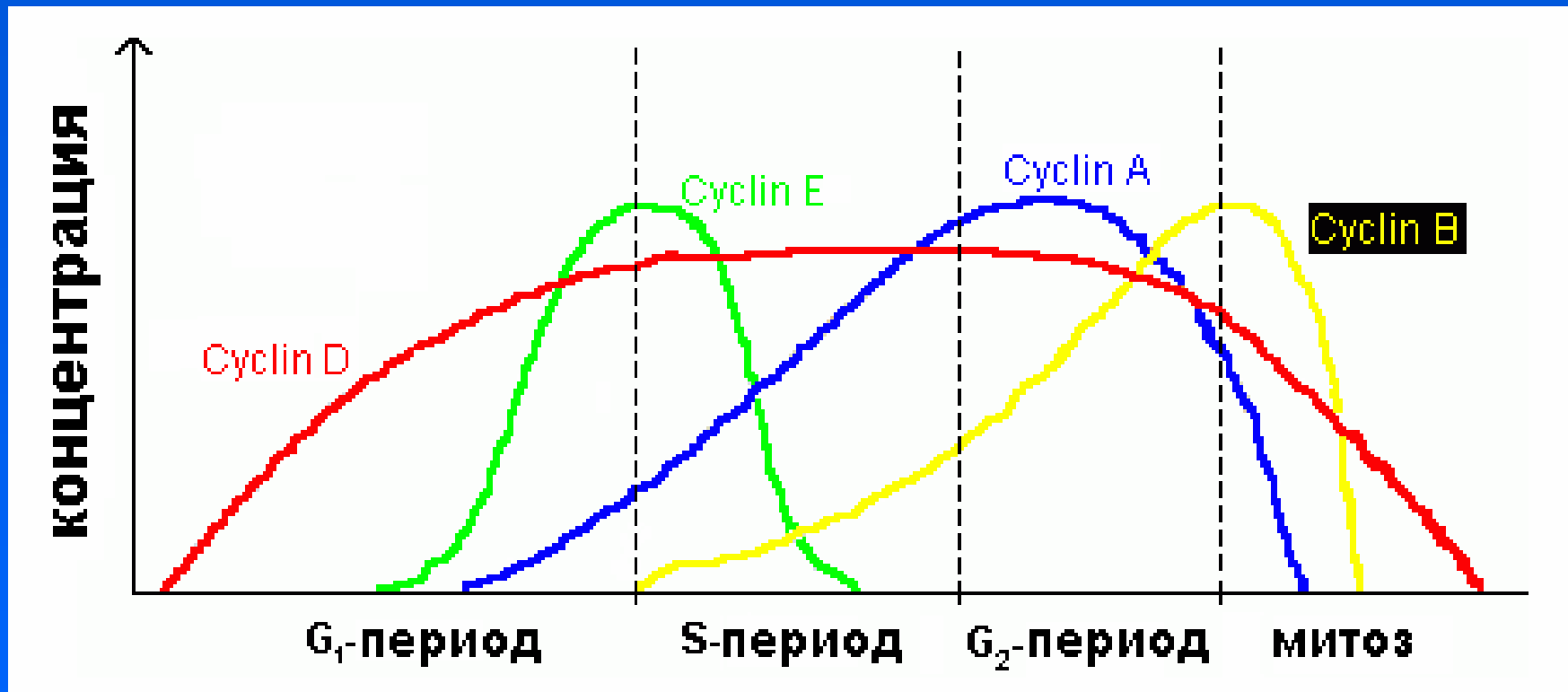
**Cdk** – циклин-зависимые киназы

**M-cyclin** (митотический) – циклин В

**S-cyclin** (синтез ДНК) – циклины D и E

**Cdk** стабильны, а многие циклины – нет (после синтеза быстро деградируют в протеасомах).

# Уровень экспрессии циклинов в клеточном цикле



**Быстро деградируют циклины E, A и B.  
Относительно стабилен циклин D.**

# Последовательность работы циклинов в клеточном цикле

Последовательность работы циклинов:

В  $G_1$  периоде синтезируется циклин D – формируется комплекс CDK4/CDK6/cyclin D – активируется ген ретинобластомы (Rb) – активация группы факторов транскрипции E2F – синтез нескольких белков (циклин A, циклин E, ДНК-полимераза и проч.) – формирование комплекса CDK2/cyclin E – начало синтеза ДНК (S-фазы). Затем синтез циклина B – комплекс CDK1-cyclin B – окончание  $G_2$  периода и запуск митоза (конденсация хромосом и распад ядерной оболочки).



# Взаимодействие циклинов и циклин-зависимых киназ

Циклины не обладают каталитической активностью.

Циклин-зависимые киназы неактивны без комплекса с циклинами.

Активация комплексов киназа-циклин носит нелинейный характер, что обеспечивает гиперчувствительность к сигналам.

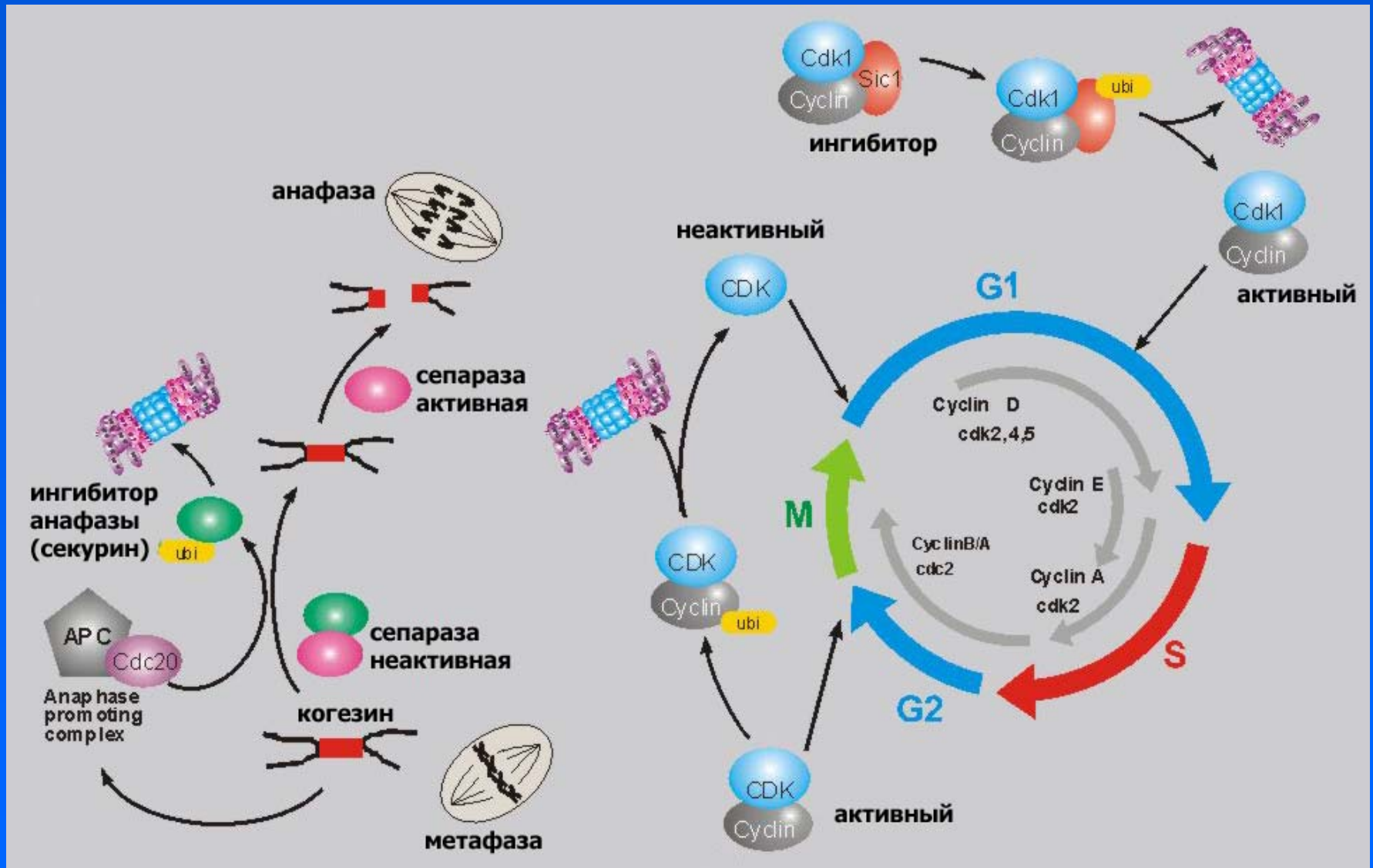
Последовательность работы основных циклинов:

В ответ на пролиферативный стимул синтезируется циклин Д. Он связывается со специальной киназой, и запускает синтез транскрипционных факторов, которые обеспечивают синтез циклина Е, циклина А и ферментов для синтеза ДНК.

Циклин Е связывается с киназой и запускает S-фазу.

Циклин Б связывается с киназой и запускает профазу. Выход из митоза происходит при разрушении комплекса циклина Б с киназой.

# Клеточный цикл – общая схема



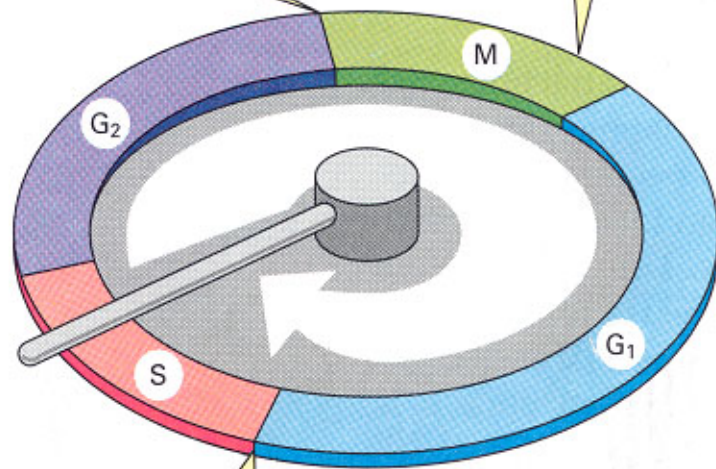
# Клеточный цикл – контрольные точки

запуск митоза (профазы)

запуск анафазы

ВХОД М

ВЫХОД М



ВХОД S

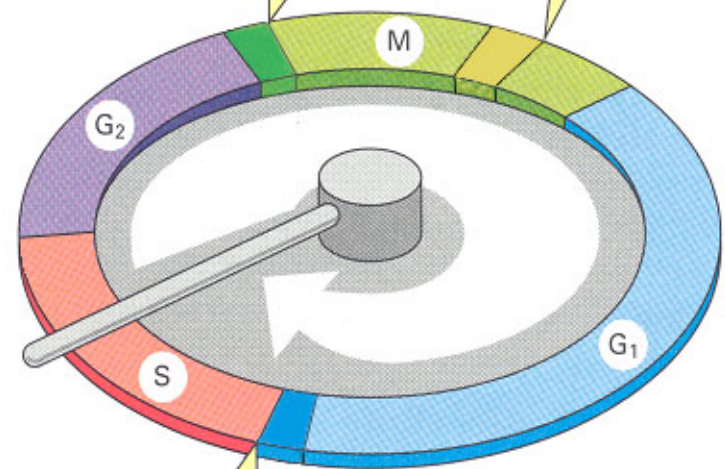
запуск репликации ДНК

контрольная точка G<sub>2</sub>

метафазная  
контрольная точка

ВХОД М

ВЫХОД М



ВХОД S

контрольная точка G<sub>1</sub>

# Контрольные точки

$G_1/S$  – инициация синтеза ДНК и окончание ее репарации.

Контролируется: отсутствие повреждений ДНК. Непрохождение – задержка синтеза ДНК (на время репарации).

$G_2/M$  – начало митоза: конденсация хромосом, распад ядерной оболочки, формирование веретена деления, подавление транскрипции и трансляции.

Контролируется: полнота репликации ДНК, отсутствие повреждений ДНК. Непрохождение ведет к задержке деления.

Анафазная (APC) – запуск анафазы (расхождение кинетохоров), деконденсация хромосом, формирование ядерной оболочки, инициация транскрипции и трансляции.

Контролируется: все ли хромосомы прикреплены обоими кинетохорами к противоположным полуверетенам.

Непрохождение – митотический блок.

# Переход $G_0$ - $G_1$

$G_0$ -период – фаза «покоя». Переход клеток в  $G_0$  происходит при дифференцировке (как правило, необратимый) или при недостатке ростовых факторов.

Выход из  $G_0$ : спонтанный и регулируемый (индуцируемый). Он начинается с синтеза циклинов. Выход из  $G_0$  в культивируемых клетках происходит быстро, он индуцируется ростовыми факторами. *In vivo* может занимать много времени.

Выход из/вход в пролиферацию (клеточный цикл) происходит, как правило,  $G_1$ -периоде. Он контролируется специальными белками. В  $G_0$  –периоде клеткой не синтезируются циклины и циклин-зависимые киназы, но сохраняется активность комплекса APC/Cdh1.

Маркеры клеточного цикла – белки, отсутствующие в  $G_0$ -периоде. Один из наиболее распространенных – Ki-67.





# Контрольные точки S-фазы

В S-фазе присутствуют три контрольные точки:

Контроль целостности молекулы ДНК (наличие разрывов)

Контроль остановки репликативной вилки

Задержка начала митоза при неполной репликации ДНК

# **G<sub>2</sub> –период и контроль вступления в митоз**

**Комплекс Cdk1 и циклина B (гетеродимер) – фактор созревания (MPF – maturation promoting factor). MPF был открыт в 1971 г. в дробящихся ооцитах ксенопуса. Позднее была показана его универсальность в соматических клетках.**

**Мишени фактора созревания:**

- конденсины (конденсация хромосом в профазе);**
- белки, ассоциированные с микротрубочками (перестройка интерфазной сети в веретено деления);**
- ламины (деградация ядерной оболочки);**
- гистоны H1 и H3;**
- фрагментация АГ;**
- ингибирование миозина.**

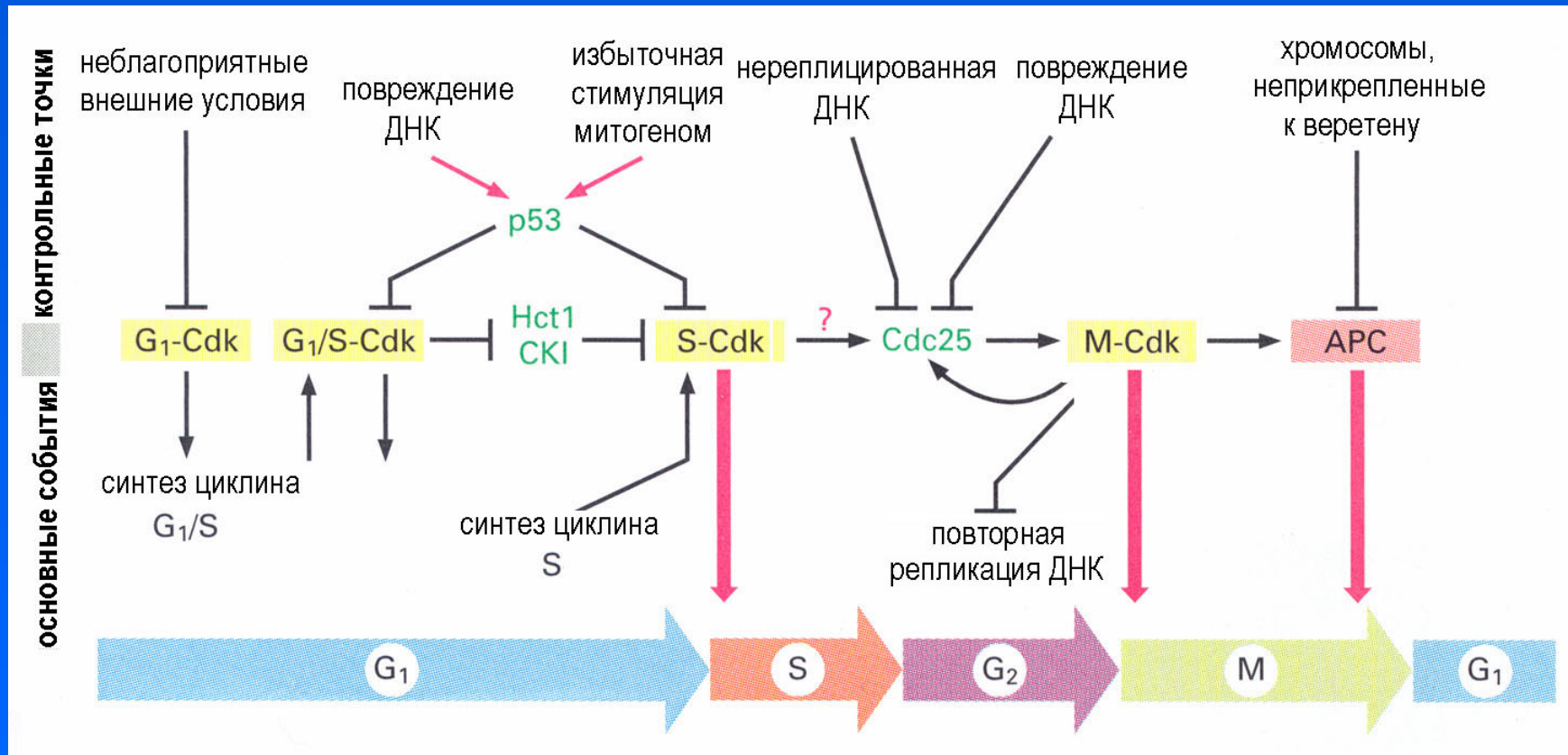
# Контрольная точка в митозе

Контрольная точка находится в метафазе. Ключевое событие – биполярное закрепление всех кинетохоров и растяжение их. При недостаточном растяжении сестринских кинетохоров клетка остается в метафазе на неопределенное время.

Этот механизм обеспечивает точность разделения хромосом. Частота потерь хромосом у дрожжей – 1 на 100000 делений. В культуре ткани – в 20-100 раз выше.

После растяжения всех кинетохоров комплекс Mad2 покидает их и активирует APC (начало анафазы).

# Клеточный цикл – общая схема регуляции



**Вхождение в цикл (движение по G<sub>1</sub>-фазе), как правило, регулируется внешними сигналами, дальнейшее движение по клеточному циклу (S - M) – последовательными внутренними сигналами.**



# Регуляция клеточного цикла

Вход в цикл из фазы покоя ( $G_0$ ) регулируется внешними и внутренними сигналами.

Выход из цикла (в фазу  $G_0$ ) после митоза может регулироваться внешними и внутренними сигналами.

Выход из цикла после начала подготовки к S-фазе регулируется через индукцию апоптоза.

Продолжительная задержка клеток вне фазы  $G_0$  ведет к апоптозу.

В клетках многоклеточного организма неправильная регуляция входа в клеточный цикл дает раковую опухоль.

# Особенности клеточного цикла при дроблении

Не происходит роста зародыша, а в результате делений дробления объем отдельных клеток уменьшается.

Синтез ДНК идет на всех репликациях одновременно.

Не функционируют контрольные точки в интерфазе – только митотическая.

Трансляция многих белков идет на иРНК, синтезированных до оплодотворения.

В результате периоды  $G_1$ ,  $S$  и  $G_2$  укорачиваются, и  $G_2$ -период может практически отсутствовать. Общая продолжительность цикла может сокращаться до нескольких минут (дрозофила и некоторые др. беспозвоночные).

Переключение с дробления на нормальный клеточный цикл происходит в районе 10-12 деления.

# Клеточный цикл, апоптоз и рак

Основные причины возникновения раковой опухоли – неконтролируемая пролиферация клеток, подавление их апоптоза и изменение свойств, позволяющее клеткам жить в другом микроокружении.

Неконтролируемая пролиферация возникает за счет:

- избыточного синтеза белков, стимулирующих движение по клеточному циклу (онкогенов).
- подавления дифференцировки размножающихся клеток.

Подавление апоптоза происходит за счет:

- нарушения сигнальных путей индуцирующих апоптоз (перестройка рецепторов и/или сигнальных каскадов).
- нарушения баланса про- и анти-апоптотических белков.

Метастазирование происходит за счет изменения поверхностных рецепторов

**Дифференцировка  
клеток; клеточное  
старение и рак.  
Стволовые клетки.**

# Лекция 9

**Цитоскелет:**

**Актин и микрофиламенты**

**Тубулин и микротрубочки**

**Промежуточные филаменты**



# Компоненты цитоскелета

Актин и микрофиламенты (5-7 нм) - консервативны

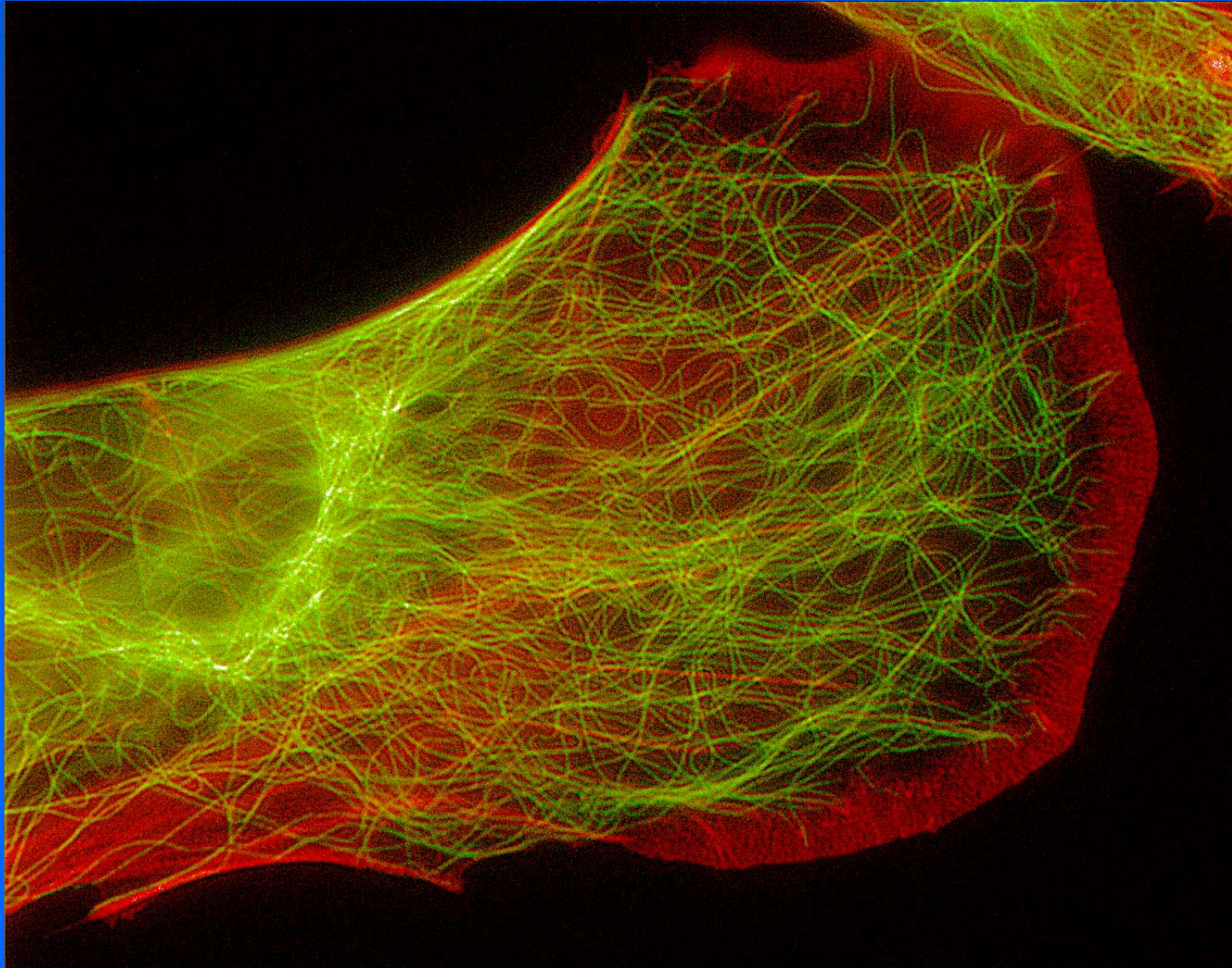
Тубулины и микротрубочки (24 нм) - консервативны

Промежуточные филаменты (10-11 нм) –  
эволюционно лабильны, тканеспецифичны у  
позвоночных.

Микрофиламенты и микротрубочки полярны –  
свойства противоположных (плюс и минус)  
концов различаются, как правило, нестабильны.

Промежуточные филаменты обмениваются  
субъединицами по всей длине, они неполярны и  
стабильны.

# Расположение МТ и актина в фибробласте (in vitro)



# Актин и микрофиламенты

Актин (м.в. 42 кД) является одним из мажорных белков цитоплазмы.

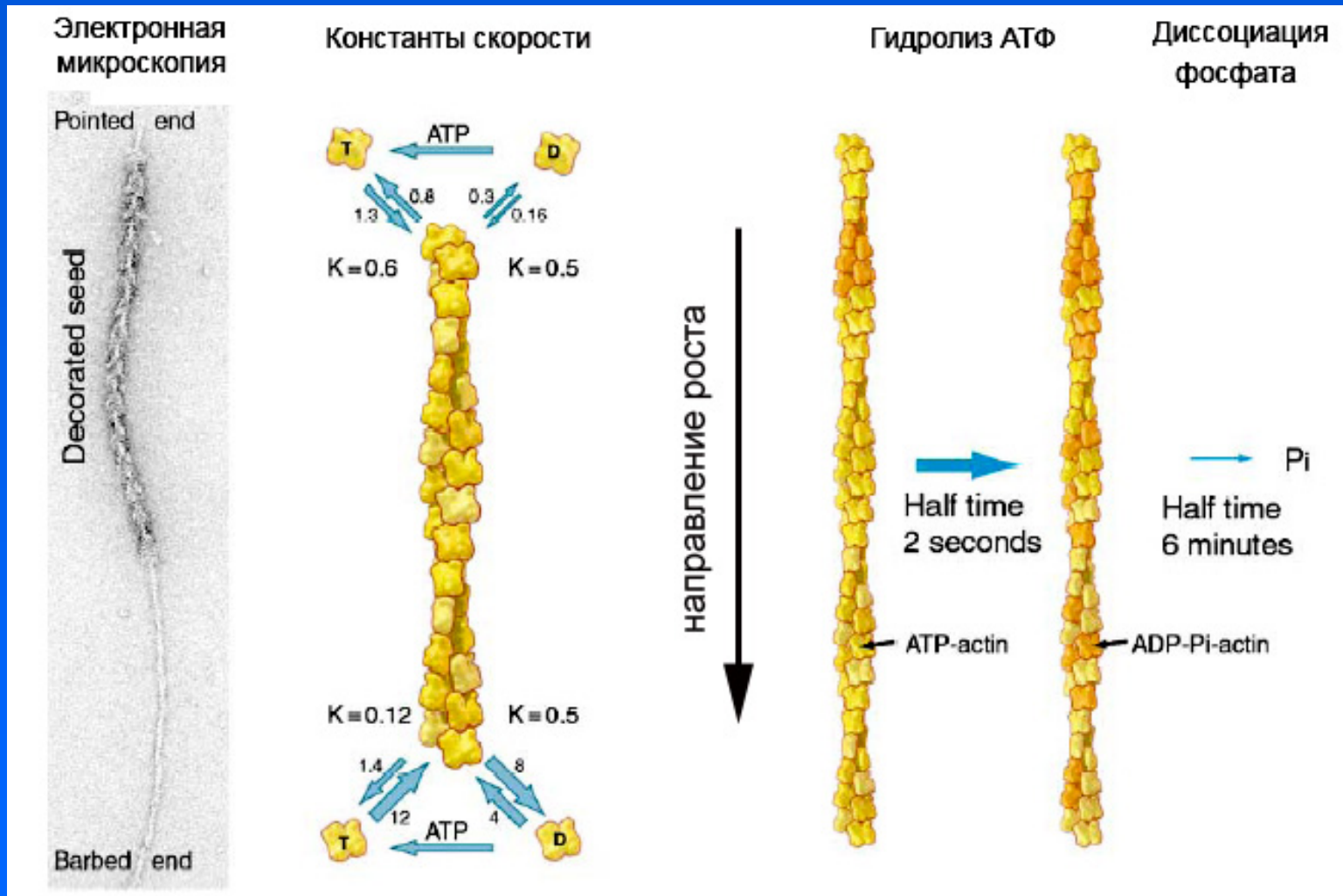
Актин полимеризуется за счет гидролиза АТФ.

Полимер актина (F-актин) называется микрофиламент .

Микрофиламенты полярны – рост (полимеризация) происходит преимущественно на плюс-конце (barbed end).

Существует около 60 белков, специфически связывающихся с актином. Актин-связывающие белки регулируют (большинство – подавляют) полимеризацию актина и пространственную организацию микрофиламентов (одиночные филаменты, пучки, сеть).

# Структура микрофиламента



**Barbed end – плюс конец, pointed end – минус конец**



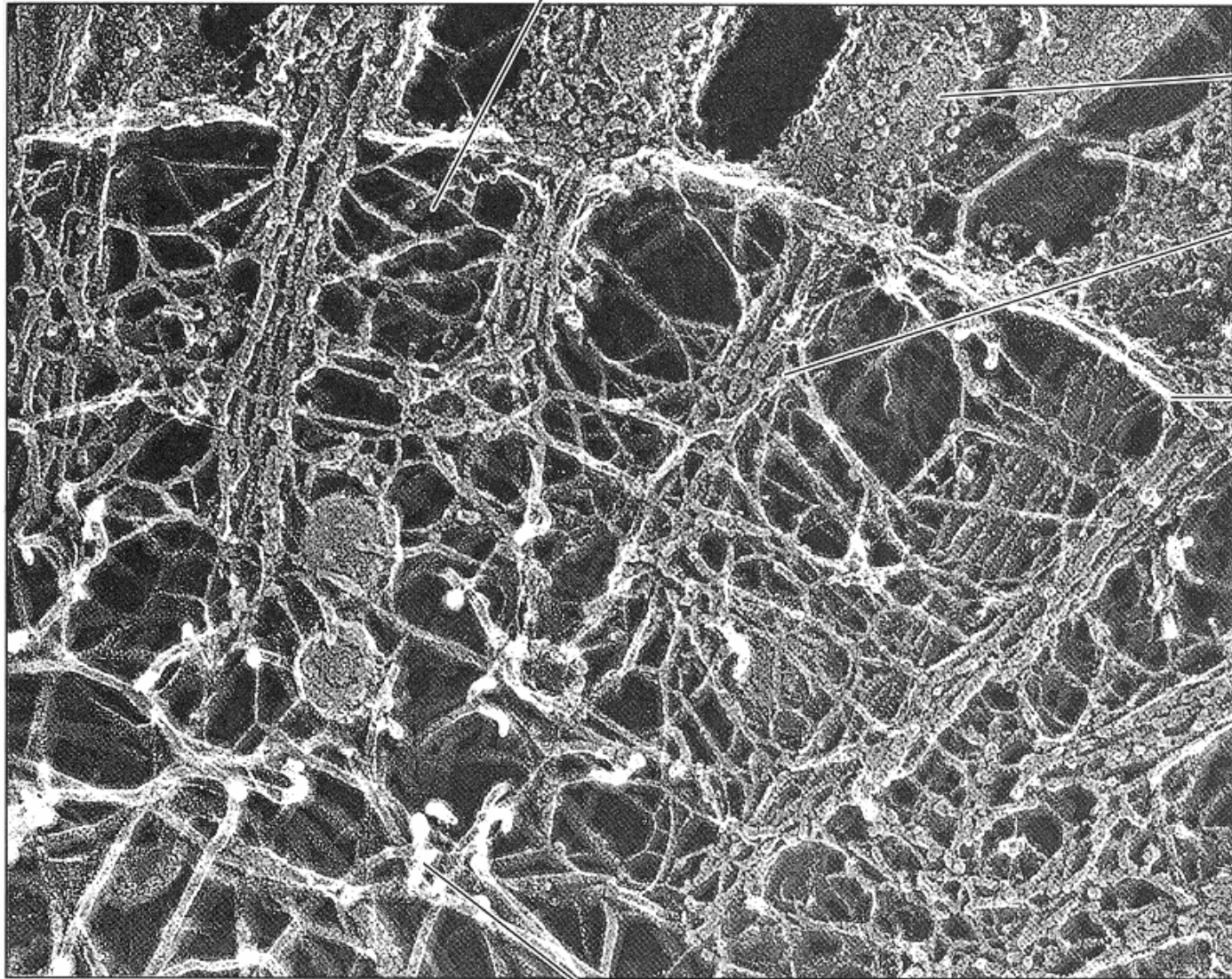
spectrin cross links

microvillus

actin  
filament  
bundle

plasma  
membrane

terminal  
web

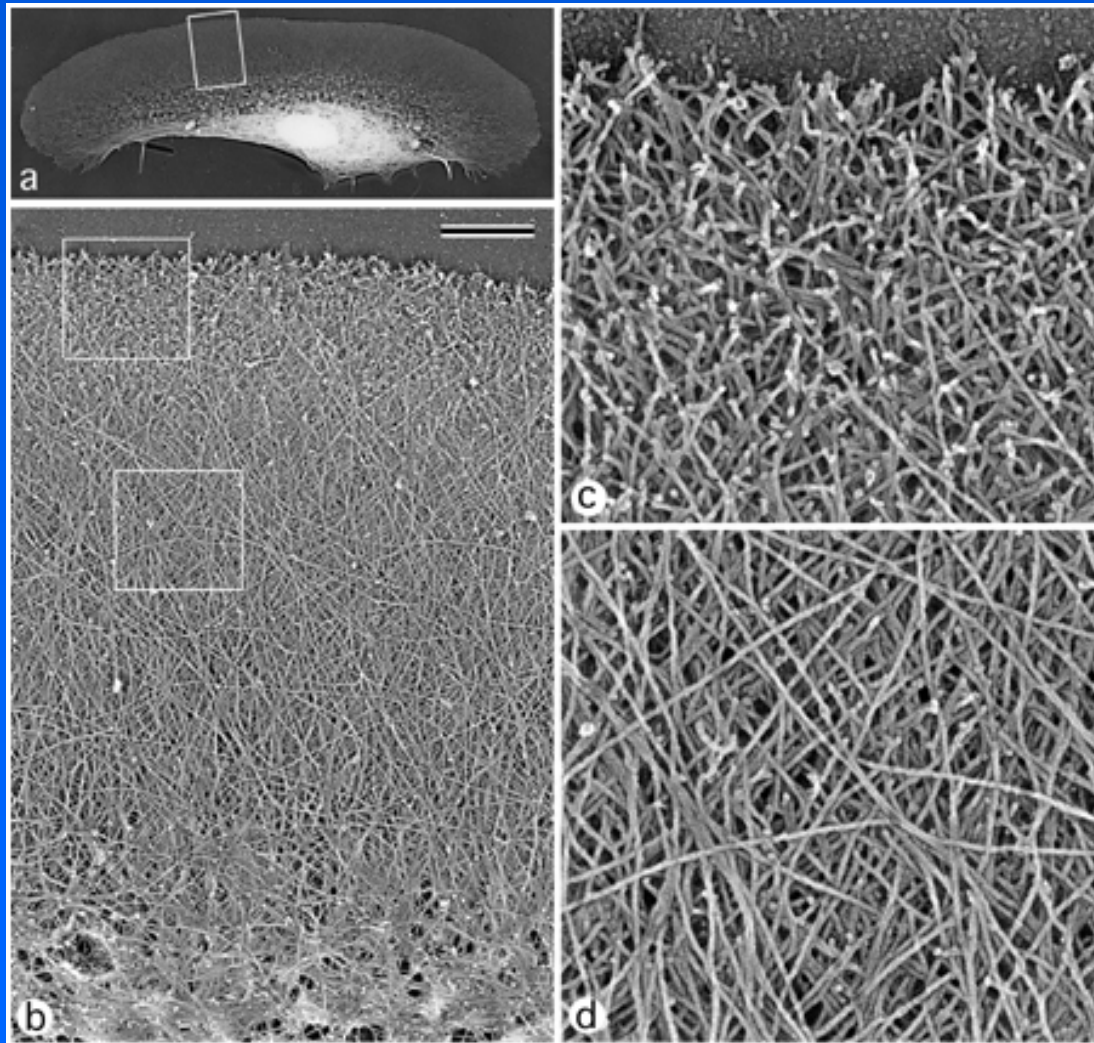


0.2  $\mu$ m

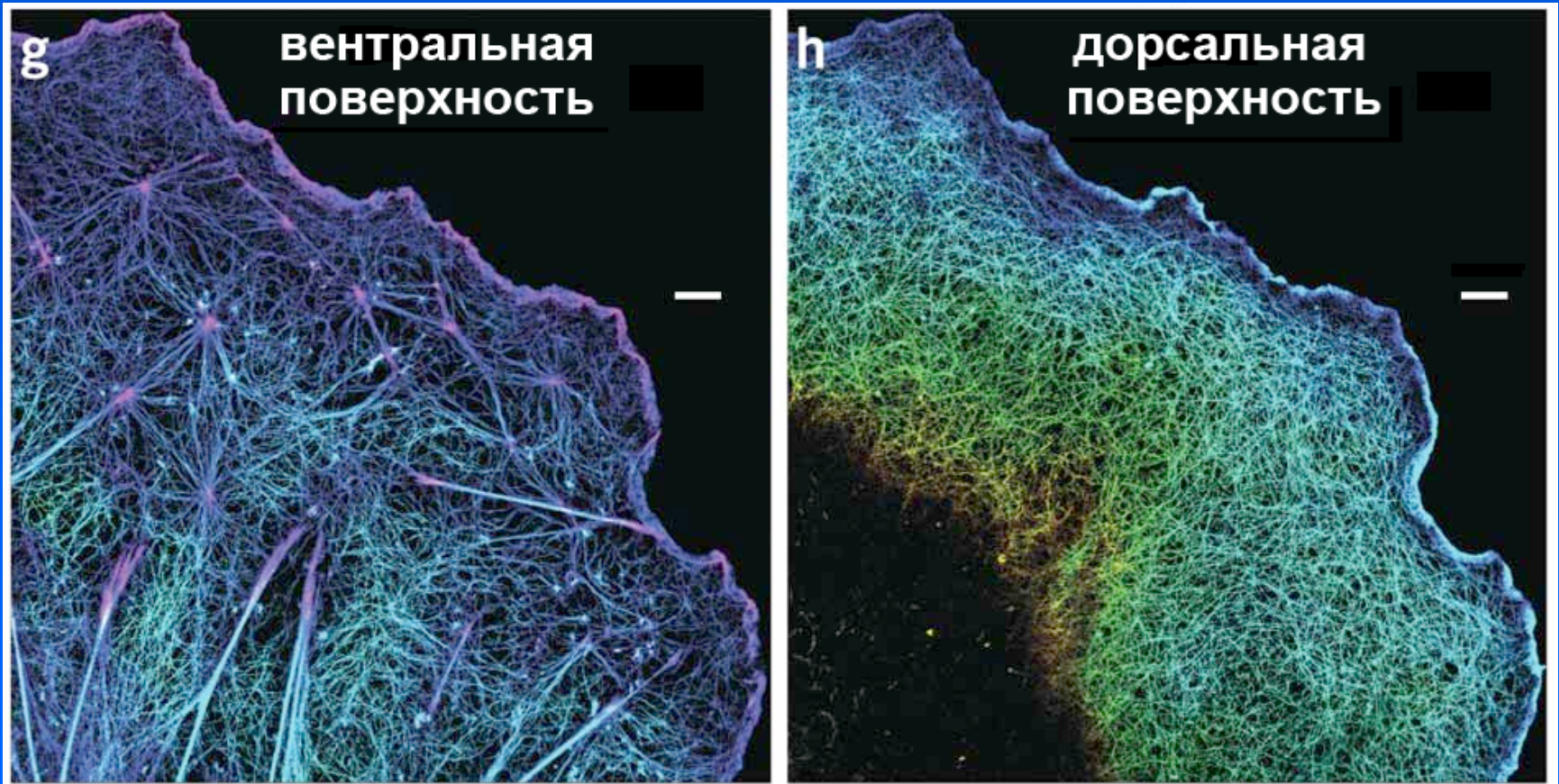
intermediate filaments



# Организация актиновых филаментов в кератоците



# Организация актиновых филаментов в ламелле



- STORM микроскопия, 2012



# Организация актина на краю клетки

Микрофиламенты на краю клетки могут образовывать параллельные пучки и сеть. Край распластанной клетки: стабильный (микрофиламенты идут вдоль поверхности) и активный (микрофиламенты упираются в мембрану под углом  $0-35^\circ$ ). На активном краю возникают филоподии и ламеллоподии.

Филоподия (пучок) имеет диаметр около 0,1 мкм, ее длина достигает нескольких мкм.

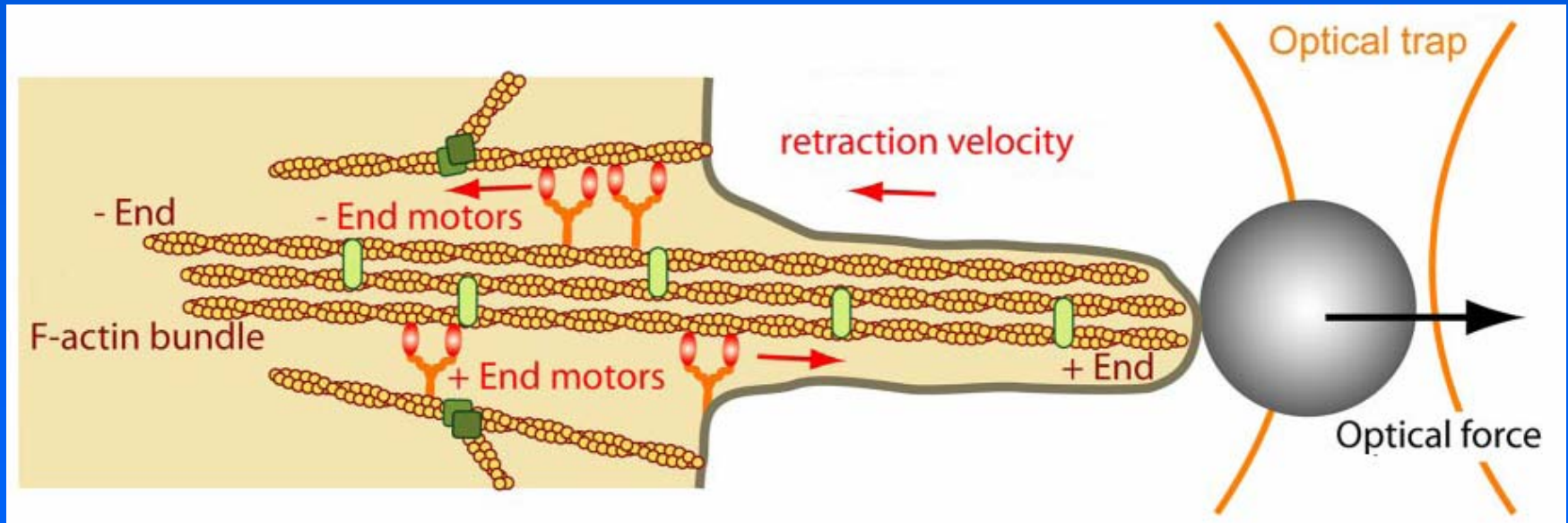
Время жизни свободной филоподии – около 1 секунды; прикрепленная к субстрату филоподия натягивается; свободная филоподия втягивается.

Ламеллоподия (сеть) имеет ширину до нескольких десятков мкм, толщину около 0,2 мкм, длину – несколько мкм.

Время жизни свободной ламеллоподии – около 10 секунд; прикрепленная ламеллоподия натягивается и остаётся тонкой, свободная (неприкрепившаяся) ламеллоподия втягивается (раффлинг).

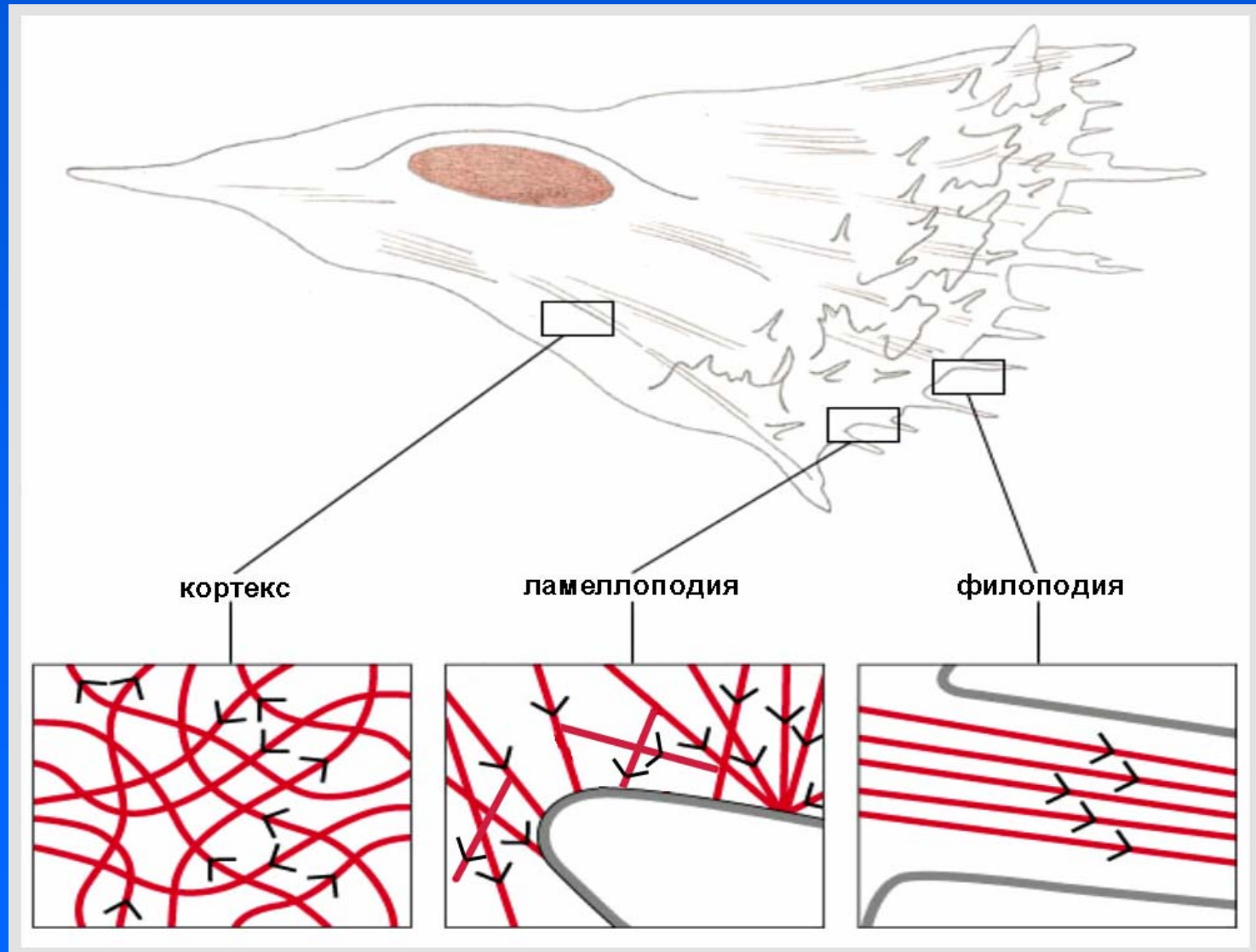
Последовательно выдвигающиеся и прикрепляющиеся к субстрату ламеллоподии формируют ламеллу – уплощенную часть клетки, которая может иметь протяженность в десятки мкм.

# Филоподии быстро втягиваются



Филоподии быстро полимеризуются и затем втягиваются, развивая усилие около 10 пН. Усилие обеспечивается пучком микрофиламентов и, вероятно, миозинами.

# Организация микрофиламентов в цитоплазме фибробласта



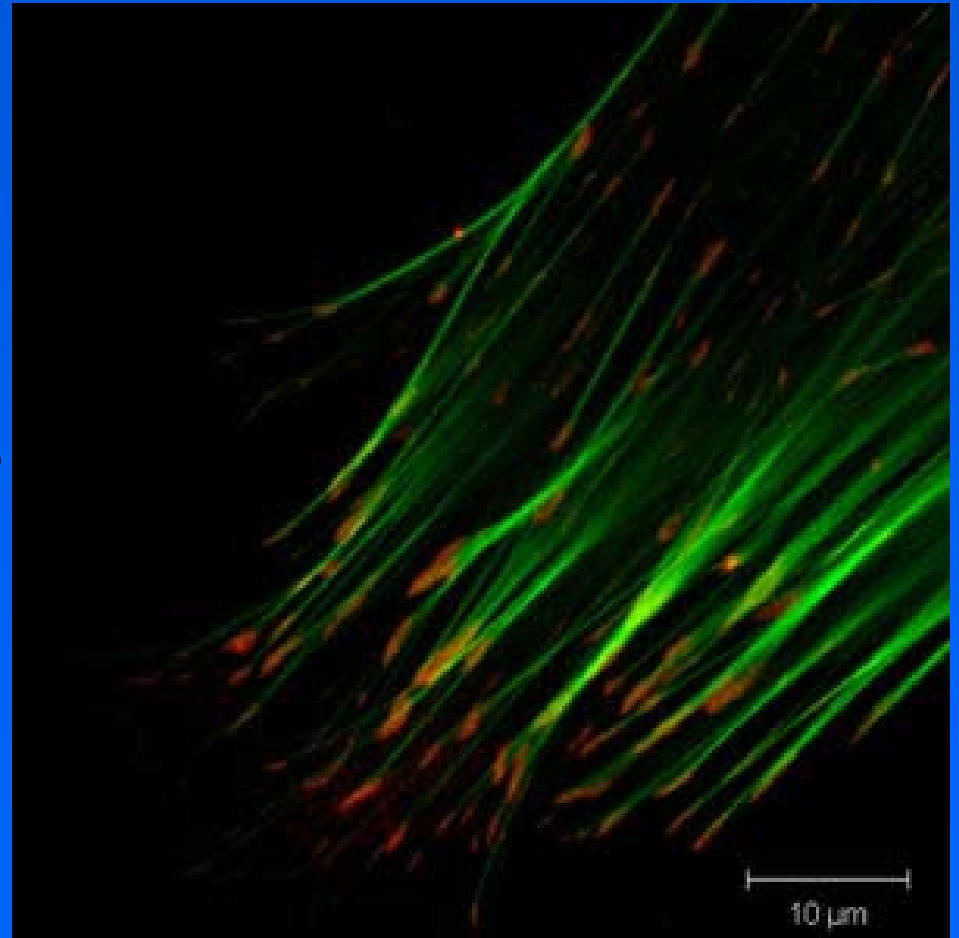


# Фокальные контакты и стресс-фибриллы

ФК (красные) - трансмембранные комплексы, индуцирующие рост пучков микрофиламентов (стресс-фибрилл - зеленые).

ФК обеспечивают заякоривание белков на мембране и механохимическое сопряжение.

Стресс-фибриллы обеспечивают механическое натяжение.



# Структура фокального контакта

Незрелый контакт – интегрины, талин, паксиллин.

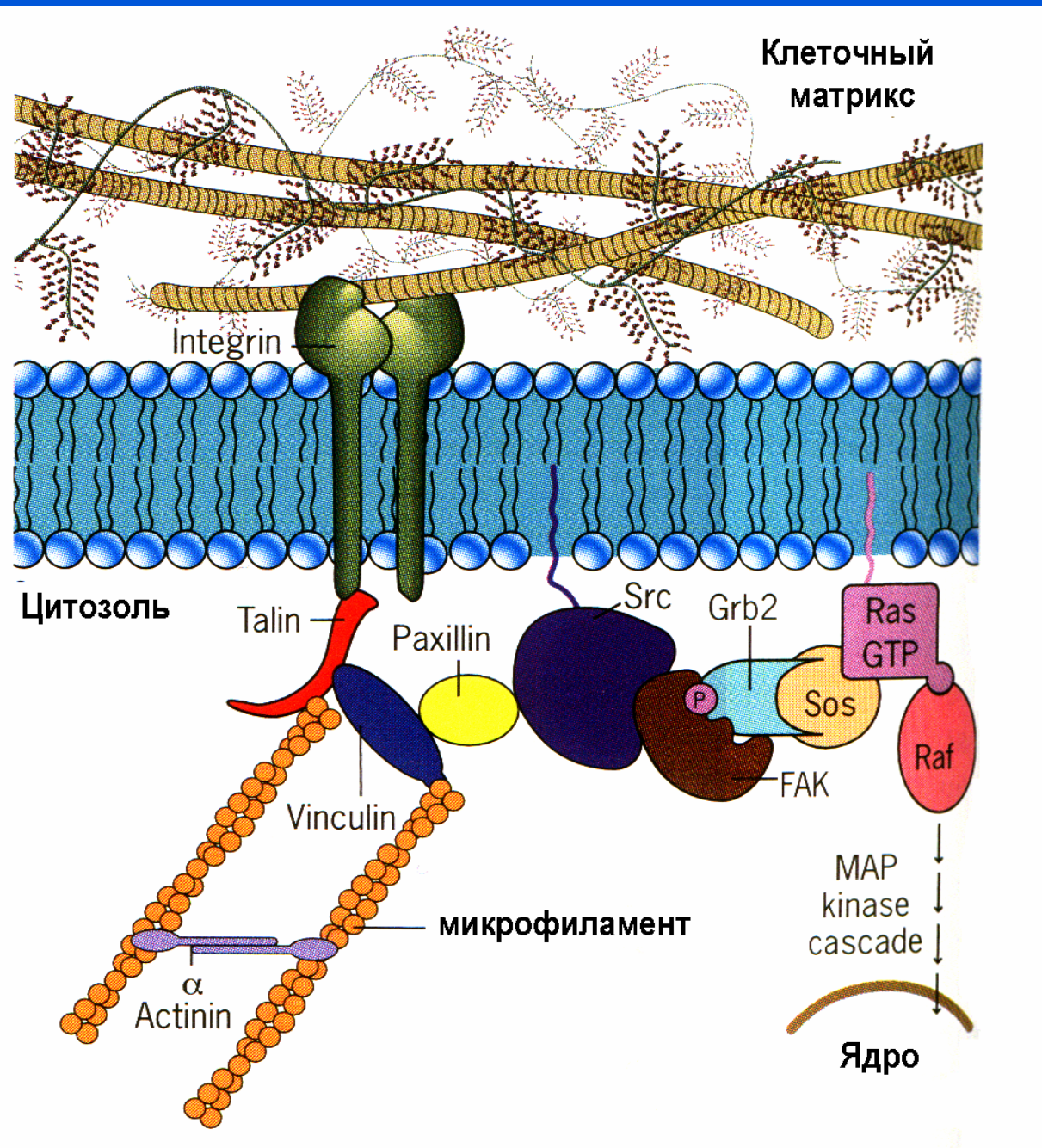
Зрелые контакты – добавляется много белков (зиксин и др., всего более 50).

Цитоскелетная часть – актин-связывающие белки: альфа-актинин, филламин, винкулин.

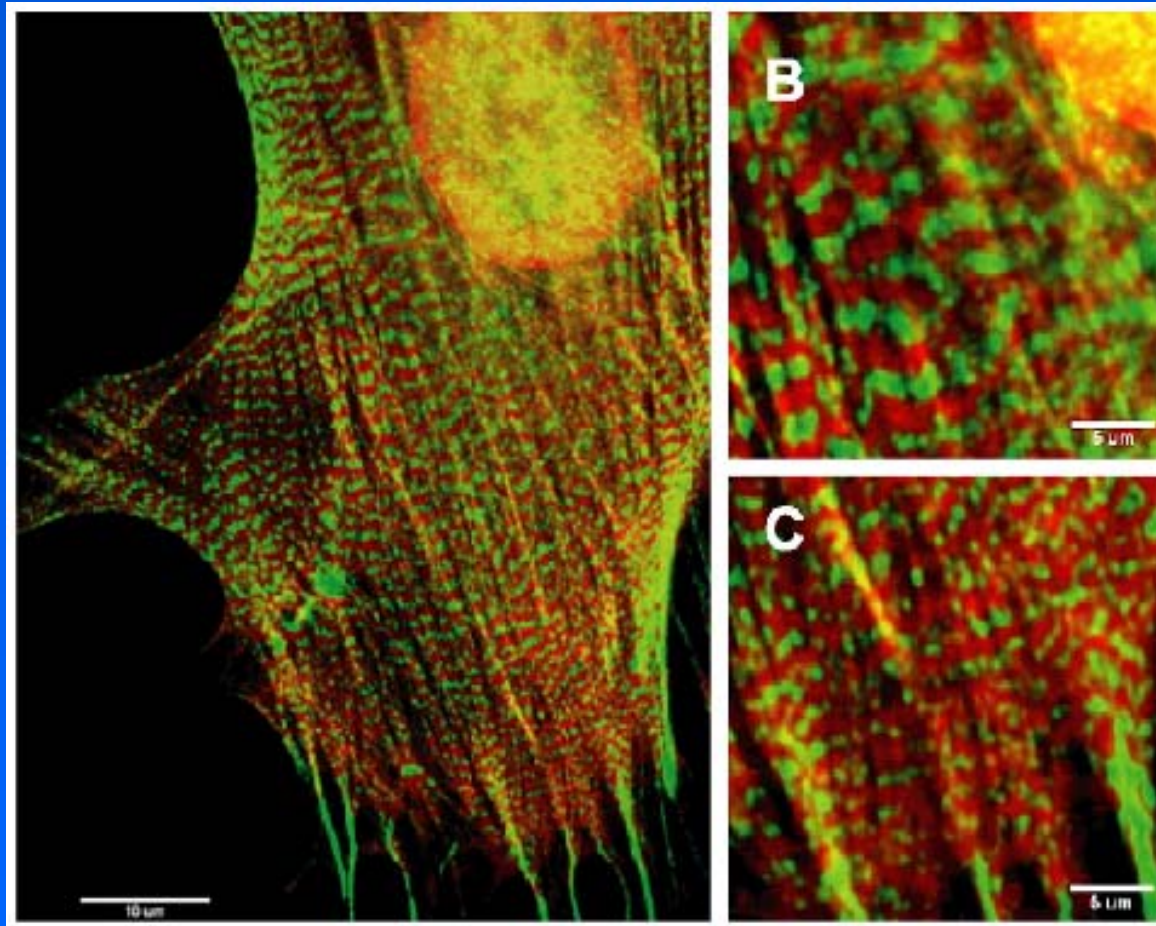
Форма и размер контакта:

Первичные контакты – диаметром 0,3-0,5 мкм

Зрелые контакты – до 5 мкм в длину.



# Стресс-фибриллы



Стресс-фибриллы – параллельные пучки микрофиламентов, содержащие миозин (красный) и альфа-актинин (зеленый)



# Основные функции микрофиламентов

Актиновые филаменты образуют сплошной кортекс (трехмерную сеть) под мембраной, обеспечивая механическую прочность клетки и компенсируя осмотическое давление.

Пучки микрофиламентов заякоривают мембранные белки и формируют фокальные контакты.

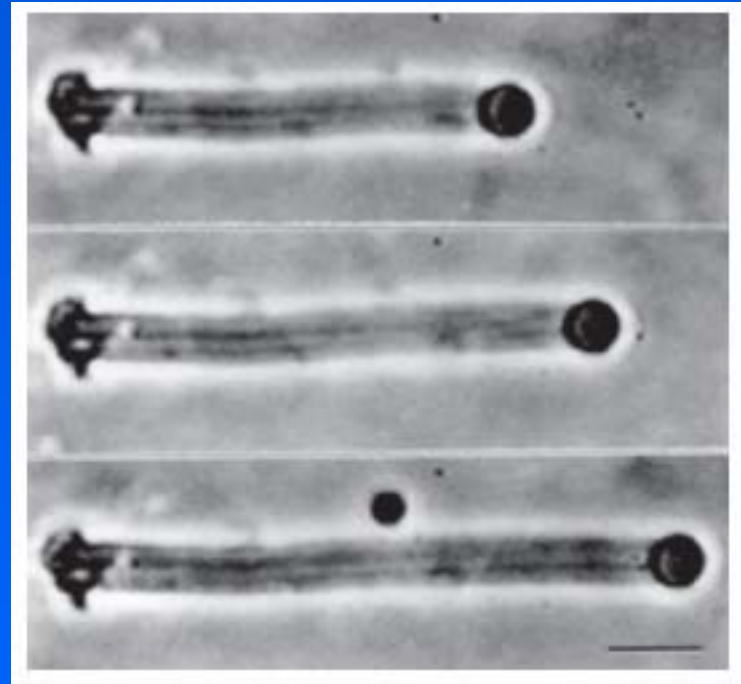
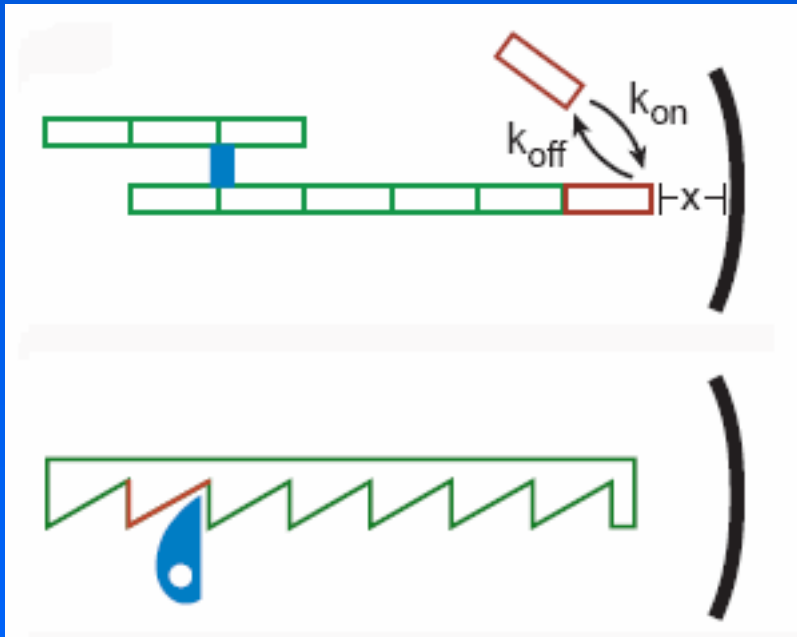
Взаимодействие актина с миозином создает внутриклеточные сократимые структуры (например, мышечные волокна).

Быстрая полимеризация актина обеспечивает выдвигание переднего края клетки.

Пучки микрофиламентов, состоящие из актина и актин-связывающих белков, создают натяжение внутри клетки – стресс-фибриллы.



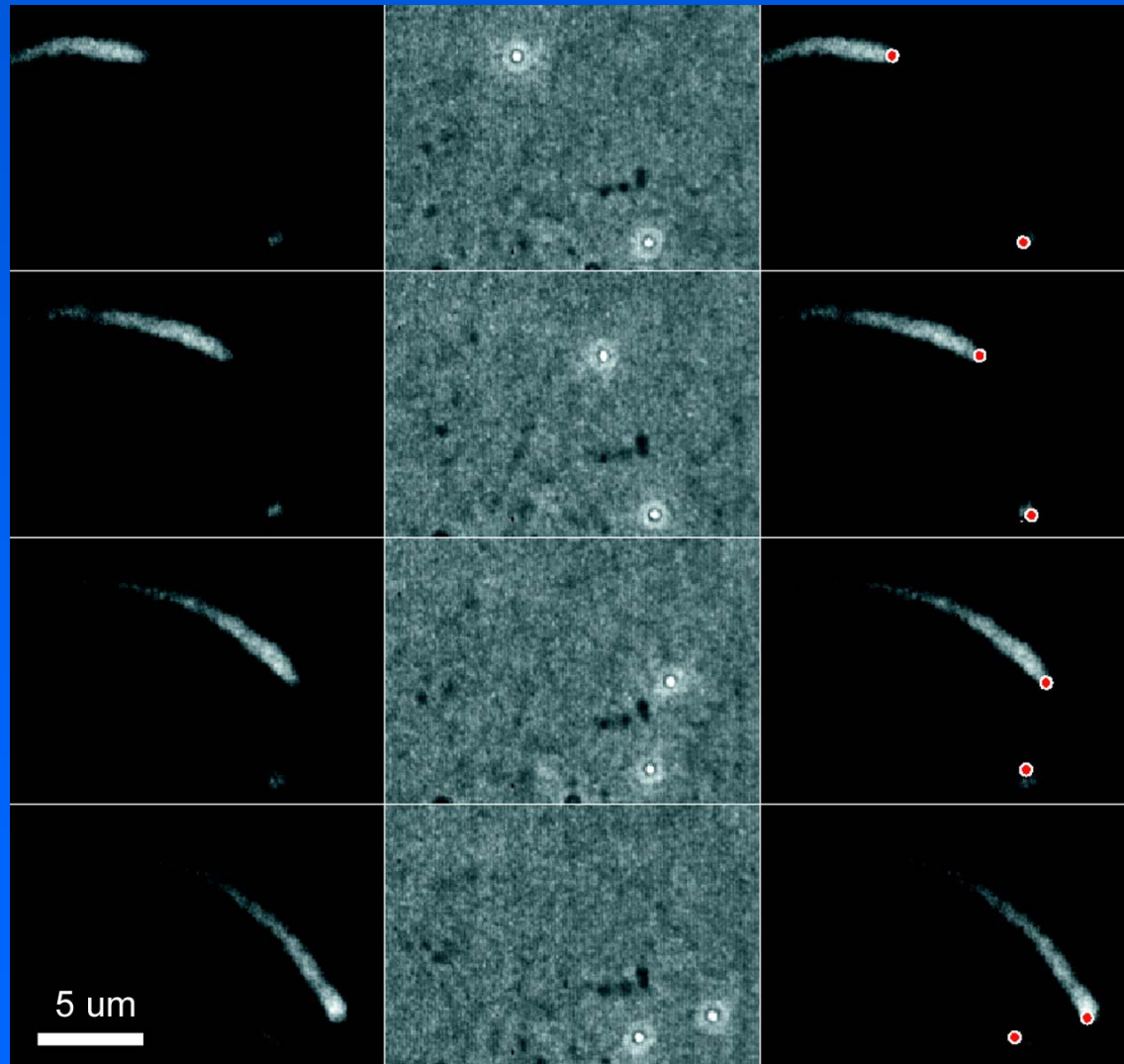
# Броуновская трещотка



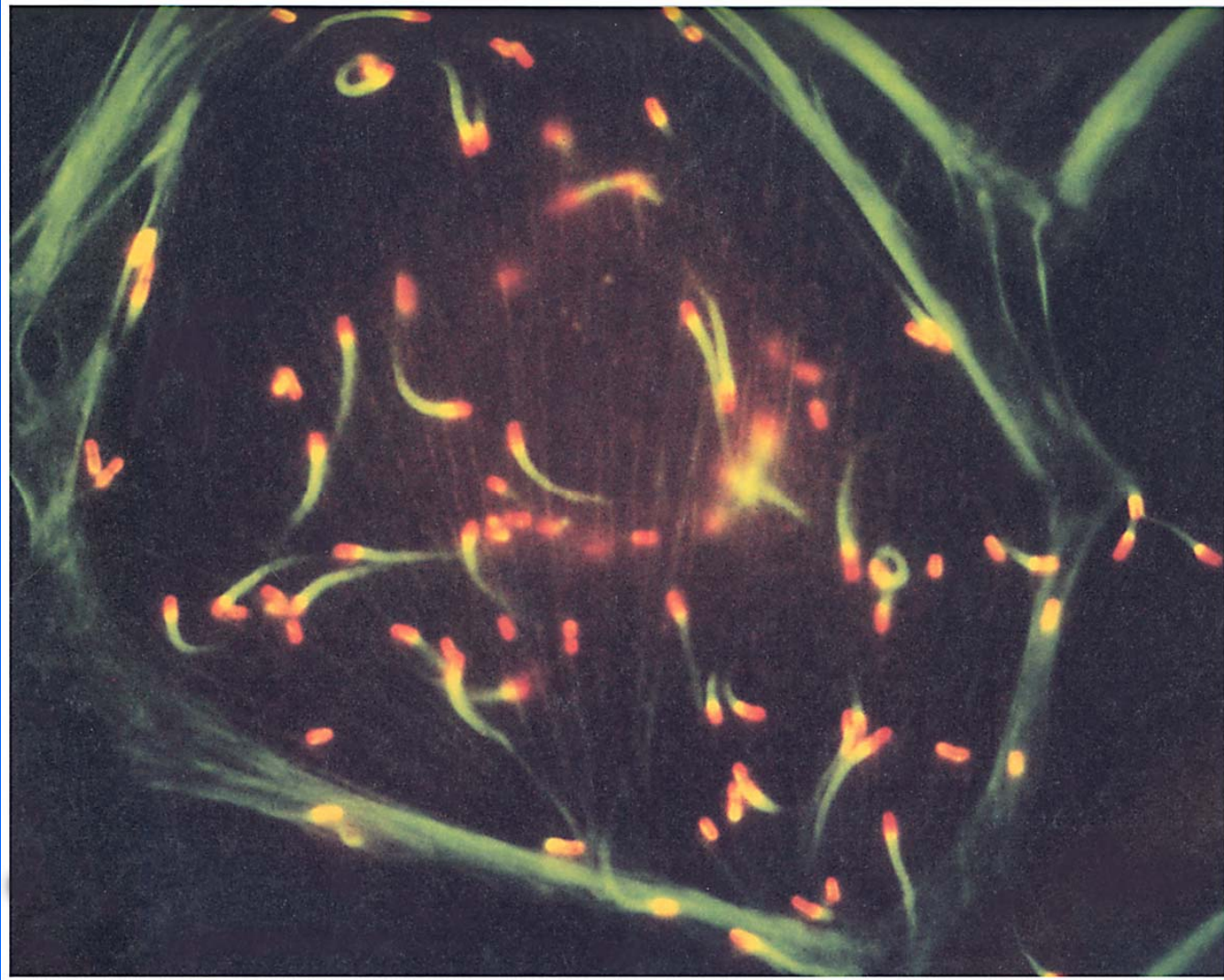
Храповой механизм (трещотка) поддерживается за счет энергии гидролиза АТФ

# Движение частиц в бесклеточной среде

Скорость -  
9 мкм/мин



# Движение *Listeria* в цитоплазме



# АКТИН И ОСМОС

Кортикальный полимеризованный слой актина взаимодействует с плазматической мембраной и противостоит онкотическому давлению, поддерживая сложную форму животной клетки.

Локальная деполимеризация микрофиламентов под мембраной приводит к образованию вздутия (пузыря).

Реакция клеток на гипотоническую среду: сначала набухание, а затем сжатие (активный процесс).

Практически лишенные цитоскелета эритроциты в слабо гипотонической среде легко разрушаются, тогда как ядерные клетки сохраняют свою жизнеспособность.

# Специфические ингибиторы микрофиламентов

Цитохалазины В, D – дезорганизуют микрофиламенты в хаотичную систему коротких фибрилл. Приводят к нарушению формы клетки и уменьшению ее механической прочности. Воздействие обратимо. Используются для получения кариопластов и цитопластов.

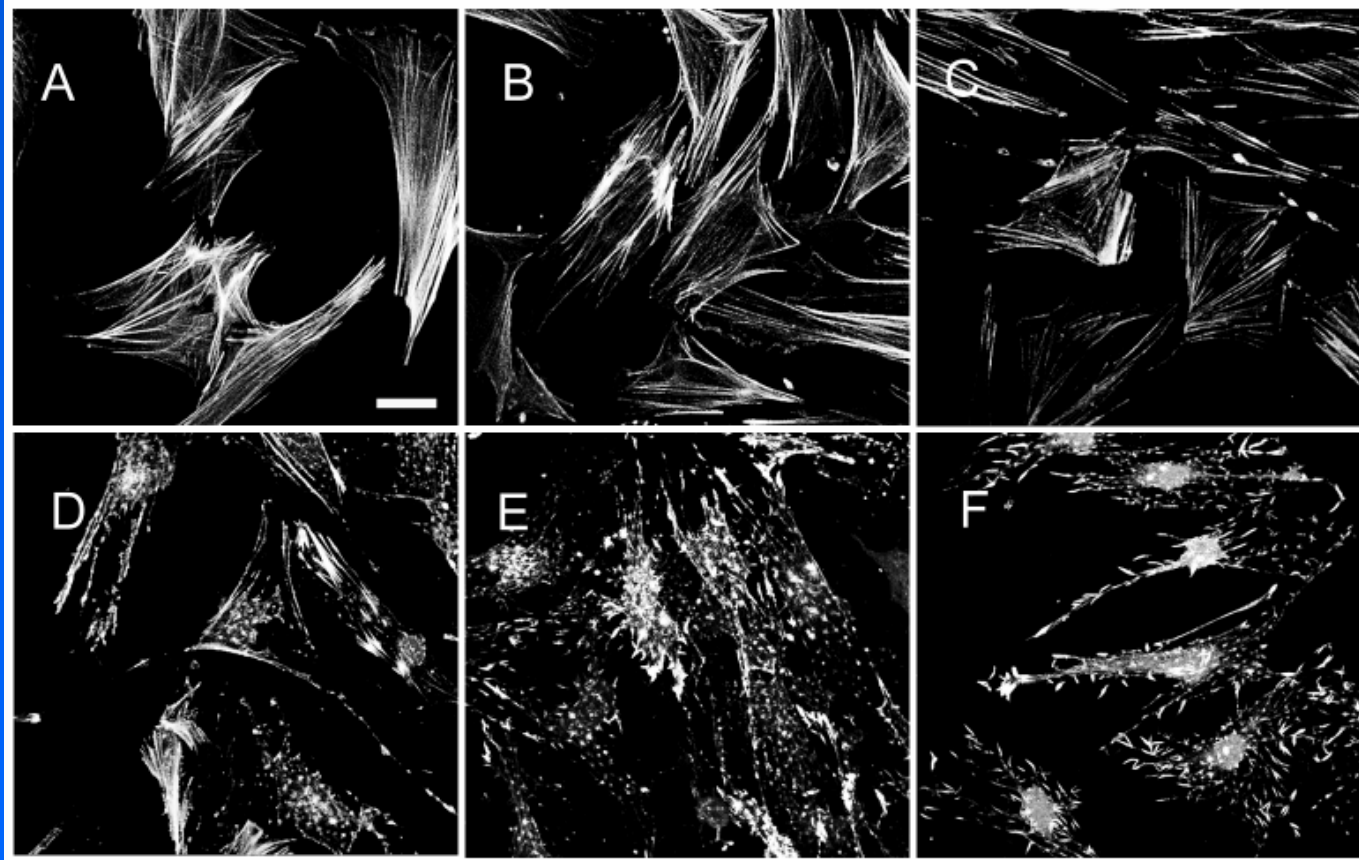
Латрункулин А – связываясь с G-актином деполимеризует микрофиламенты. Воздействие обратимо. Приводит к уменьшению ее механической прочности и нарушению формы клетки.

Фаллоидин (яд бледной поганки) – стабилизирует микрофиламенты, взаимодействуя с F-актином.

Частичная деполимеризация микрофиламентов летальна на уровне организма, но обратима на уровне отдельных клеток.



# Деполимеризация микрофиламентов



**Актиновые филаменты обратимо деполимеризуются в живых клетках специфическими ядами – цитохалазинами В и Д и латрункулинами А и В.**

# Миозины

Структура молекулы миозина: тяжелая цепь, легкая цепь (одна или несколько).

АТФ-связывающий центр миозинов эволюционно консервативен.

Шейка (necklace) – область, содержащая кальмодулин-связывающий домен.

Хвост тяжелой цепи – вариабелен.

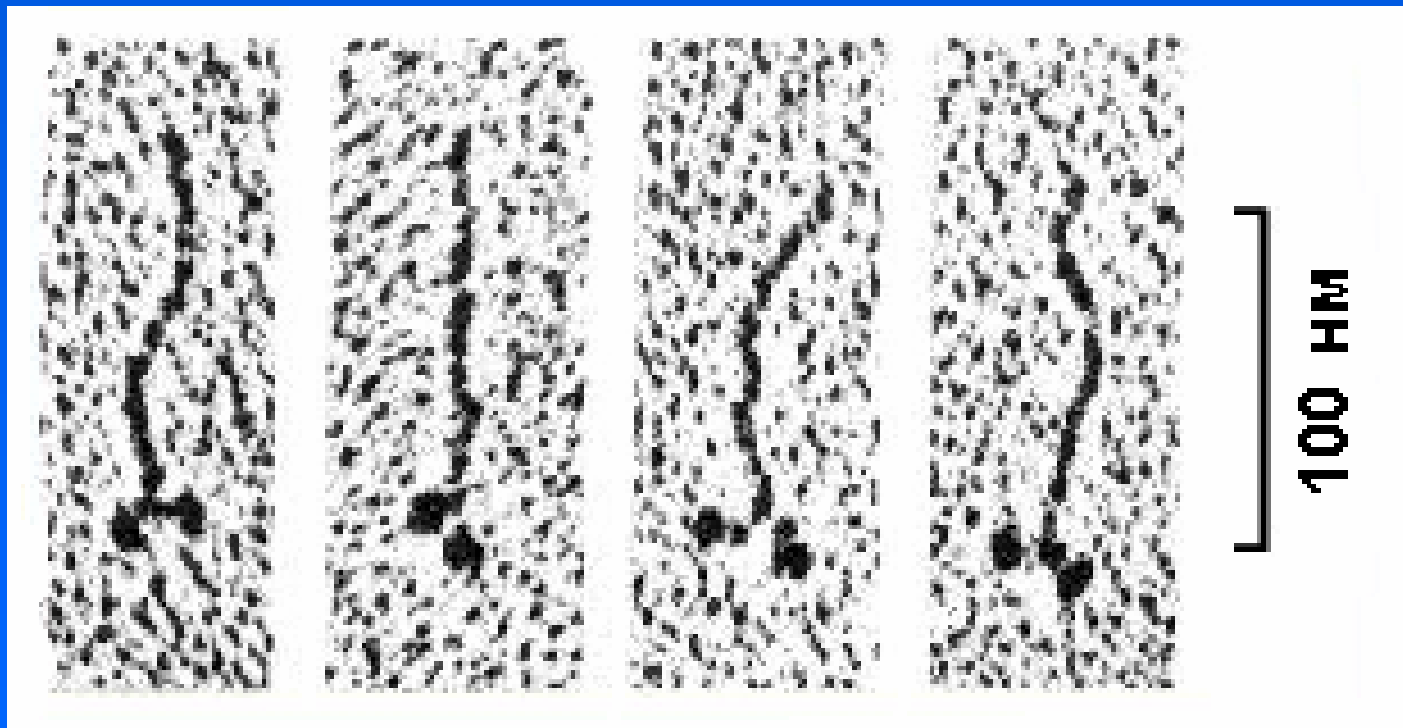
Как правило молекула миозина представляет собой гомодимер.

АТФ-азная активность тяжелой цепи миозина стимулируется актином.

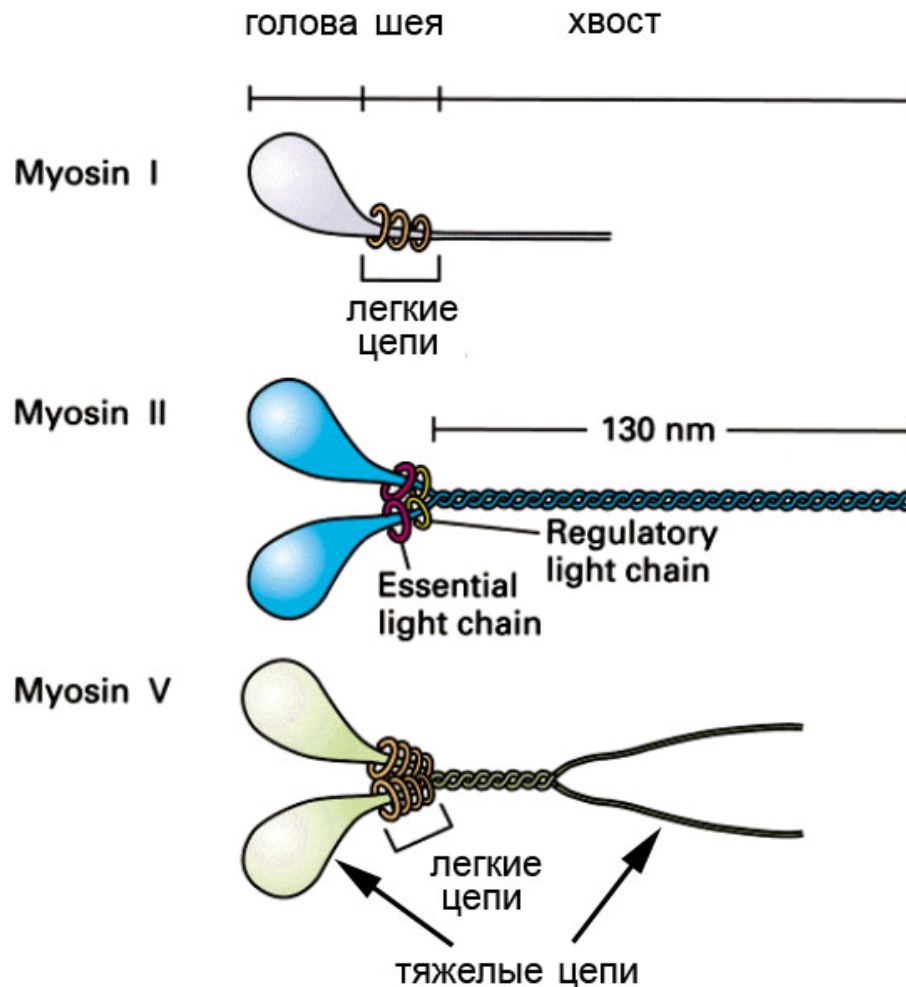
Связывание с актином стимулируется кальцием (через кальмодулин и аналогичные белки).

Миозины представлены семействами генов (более 15), экспрессия которых видо- и тканеспецифична.

# Молекула миозина, электронная микроскопия



# Молекулы миозинов



Легкие цепи миозина ассоциированы с шейей тяжелых цепей

Миозины II и V могут образовывать биполярные димеры

Миозин II - мышечный

Миозины I и V связываются хвостами с мембранами



# Миозины и движение вдоль микрофиламентов

Локомоторный цикл миозина идет с гидролизом АТФ. Шаг – 8 нм; развиваемое усилие – 1-5 пН.

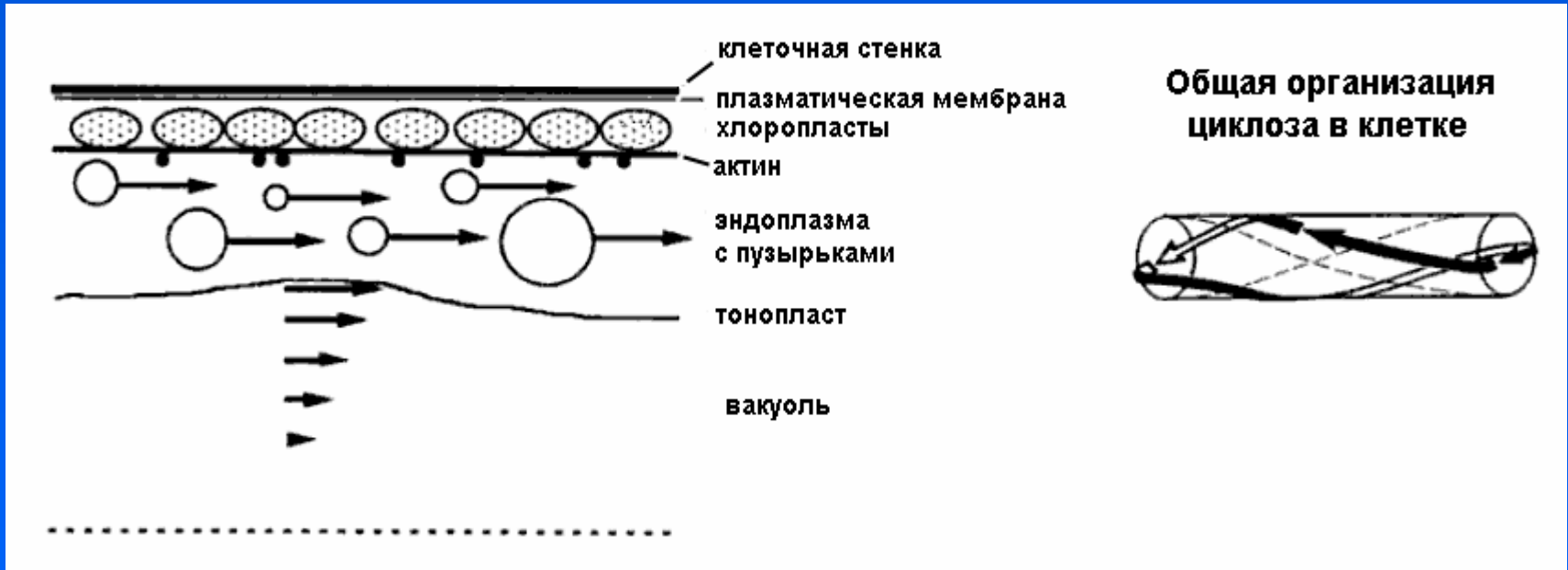
Движение малопроециивно (в клетках животных) – расстояние переноса вдоль актинового филамента составляет менее 1 мкм. Скорость движения – от 0,04 мкм/с до 5 мкм/с.

Движение процессивно (в клетках растений) – расстояние переноса составляет несколько мкм, скорость движения – 5-60 мкм/с.

Миозин может образовывать биполярные полимерные комплексы, которые обеспечивают движение микрофиламентов навстречу друг другу (мышечное сокращение, сокращение кортекса).

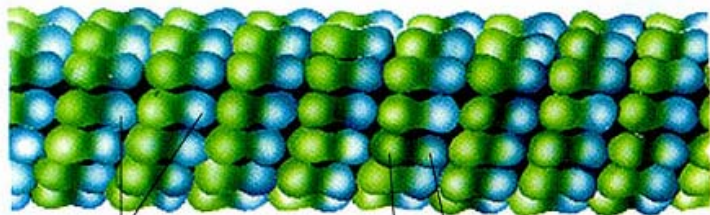
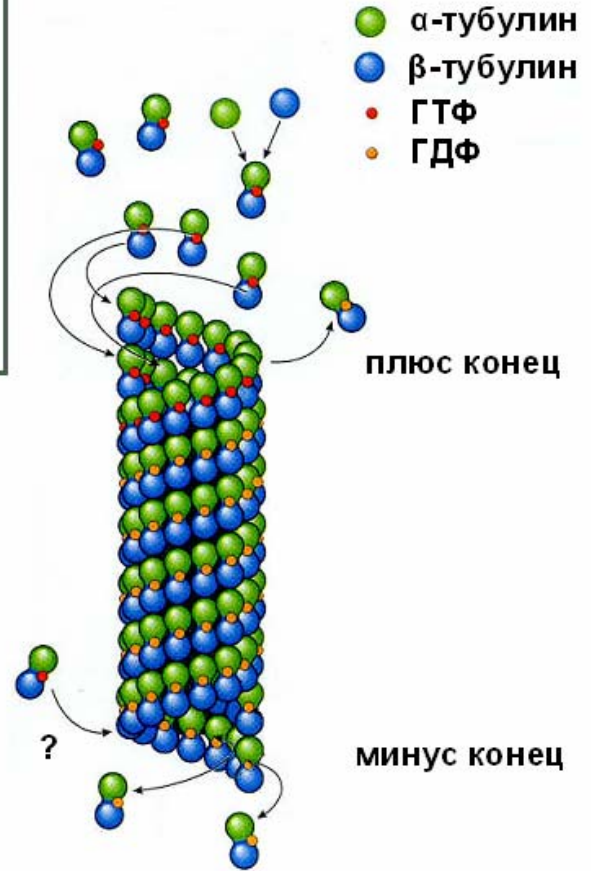
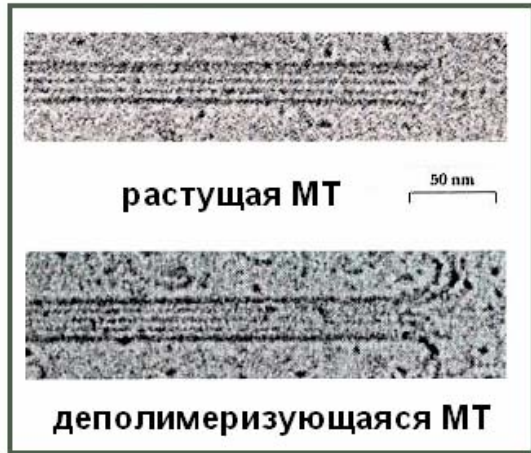
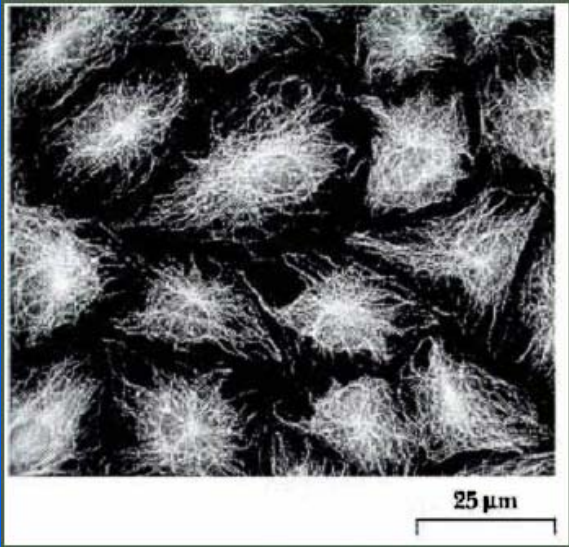


# Циклоз у Chara



**Под эктоплазмой с неподвижными хлоропластами располагаются пучки актина, вдоль которых с помощью миозина в эндоплазме движутся многочисленные пузырьки. Внутри вакуоли движение быстро затухает.**

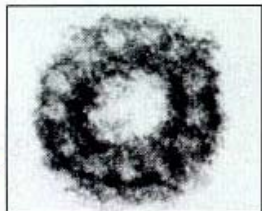
# Микротрубочки – расположение и структура



гетеродимер  $\alpha$ -тубулин  $\beta$ -тубулин



поперечный срез





# Микротрубочки – основные свойства

$\alpha$ - и  $\beta$ -тубулины (м.в.  $\sim 55$  кД) являются мажорными белками цитоплазмы и эволюционно консервативны. Гетеродимер тубулина (110 кД) имеет два ГТФ-связывающих центра.

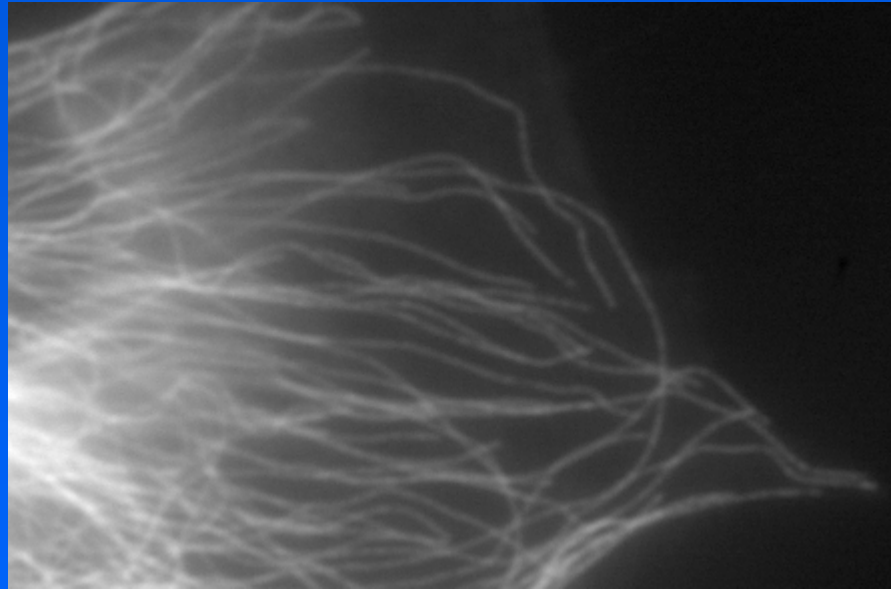
Гетеродимеры тубулина полимеризуются при  $37^\circ\text{C}$  с гидролизом одной молекулы ГТФ. Вторая молекула ГТФ гидролизуется позднее, уже в составе микротрубочки.

Микротрубочки быстро деполимеризуются при низкой температуре, высокой (1 мМ) концентрации кальция и при воздействии специфических ядов (колхицин, нокодазол, винбластин)

Микротрубочки полярны – рост и укорочение идут на одном (плюс) конце. Минус конец стабилен или разбирается.

В равновесных условиях (в клетке и *in vitro*) отдельные МТ растут и укорачиваются с плюс конца либо находятся в паузе; продолжительность фаз роста и укорочения составляет секунды, переход между фазами происходит быстро.

# Динамическая нестабильность МТ



**Динамика микротрубочек в ламелле фибробласта.**  
Микротрубочки видны в результате микроинъекции в клетку флюоресцентно меченного тубулина. Фильм демонстрируется с ускорением в 30 раз.

# В интерфазных клетках находятся длинные микротрубочки

Число микротрубочек в клетке (50-5000) определяется числом затравок для их полимеризации.

Рост микротрубочек в интерфазной клетке описывается как случайное блуждание плюс-конца в ограниченном пространстве.

Плюс концы микротрубочек могут стабилизироваться (защищаться от деполимеризации) специальными белками.

Многие подвижные клетки имеют радиальную систему микротрубочек с одним центром схождения. Минус концы свободных микротрубочек в таких клетках нестабильны.

Эпителиальные клетки, как правило, имеют продольную систему микротрубочек (между апикальной и базальной поверхностями). Минус концы свободных микротрубочек стабильны.





# Белки, ассоциированные с микротрубочками

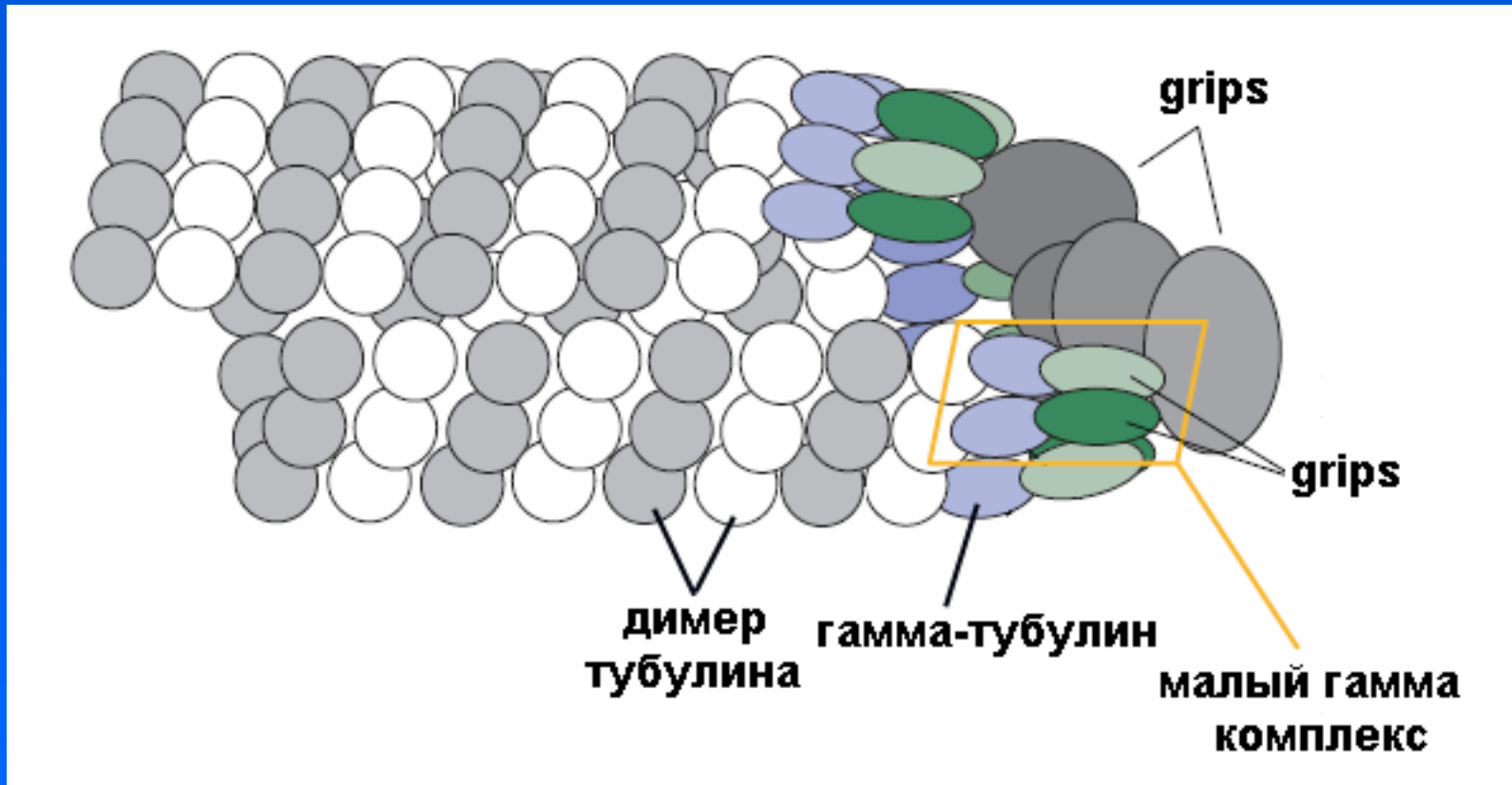
Моторные белки – динеин (dynein) и кинезины (kinesins).

Латерально связанные белки (MAPs – microtubule associated proteins) – тканеспецифичны.

Белки, связанные с плюс концами растущих микротрубочек (CLIP-170; семейство EB; CLASP)

Затравки для роста микротрубочек – гамма-тубулиновый комплекс ( $\gamma$ -TuRC)

# Гамма-тубулин – модель затравки



Затравка (большой гамма-тубулиновый комплекс) обеспечивает образование МТ – трехспиральную закладку и 13 протофиламентов

# Микротрубочки в клетке – основные свойства

Микротрубочки нестабильны и обмениваются (в основном на плюс конце) с пулом растворенного тубулина.

Соотношение мономер/полимер составляет примерно 1:1,5.

Рост микротрубочек обеспечивается специфическими затравками, число которых в клетке ограничено.

Время полубновления микротрубочек в митозе – около 20 с, в интерфазе – 3-20 мин.

МТ обеспечивают быстрый и анизотропный транспорт в цитоплазме клетки.

Осцилляции плюс-концов МТ обеспечивают динамические взаимодействия их с клеточным кортексом (фокальными контактами).

# Микротрубочки в клетке – расположение и динамика

Микротрубочки в клетках животных подразделяют на свободные и ассоциированные с центром организации микротрубочек. В последнем случае минус-конец МТ защищен от деполимеризации. Свободных МТ много, если их минус-концы стабильны.

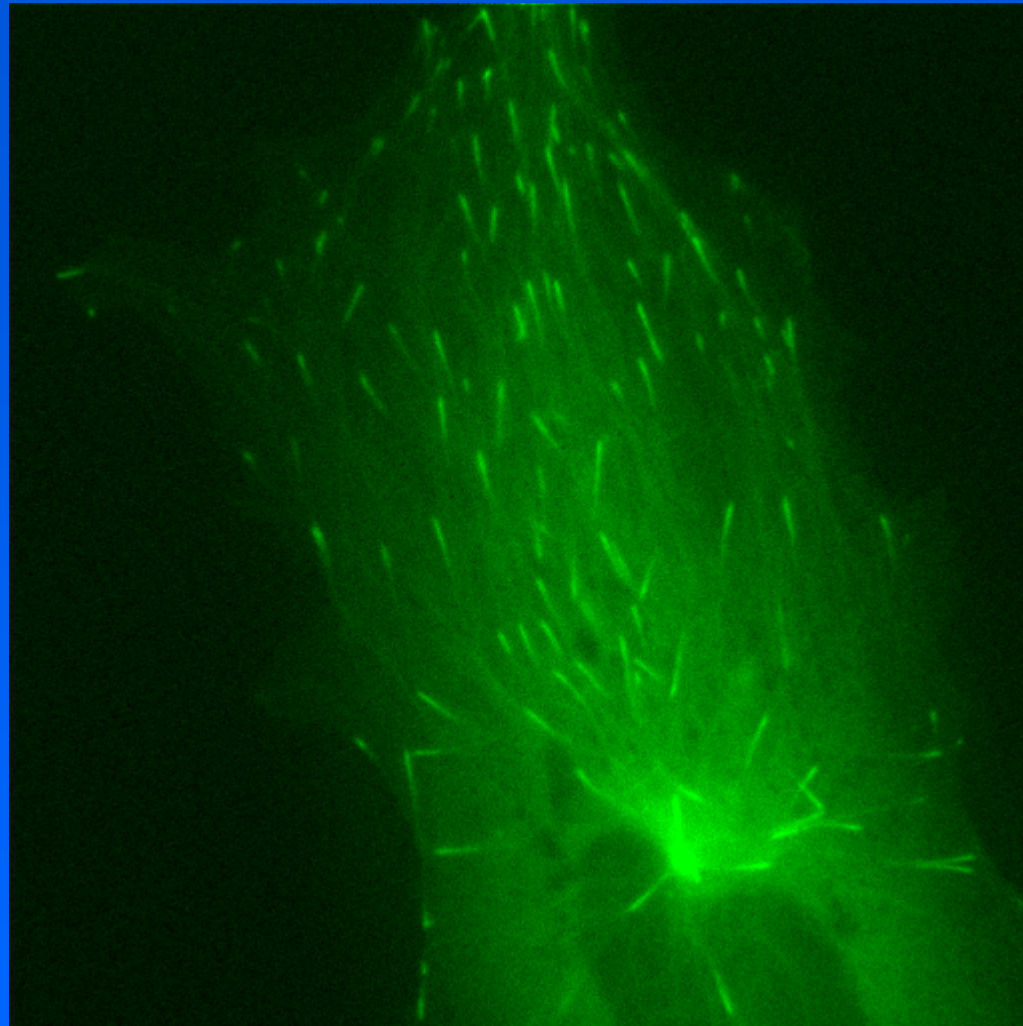
Большинство плюс концов микротрубочек в клетках животных направлены к краю клетки; минус концы сосредоточены в центральной части клетки.

Параллельные микротрубочки могут образовывать пучки (нейроны, солнечники).

Микротрубочки у растений очень нестабильны – они быстро деполимеризуются с минус конца. Часто образуют пучки, расположенные вдоль плазматической мембраны.

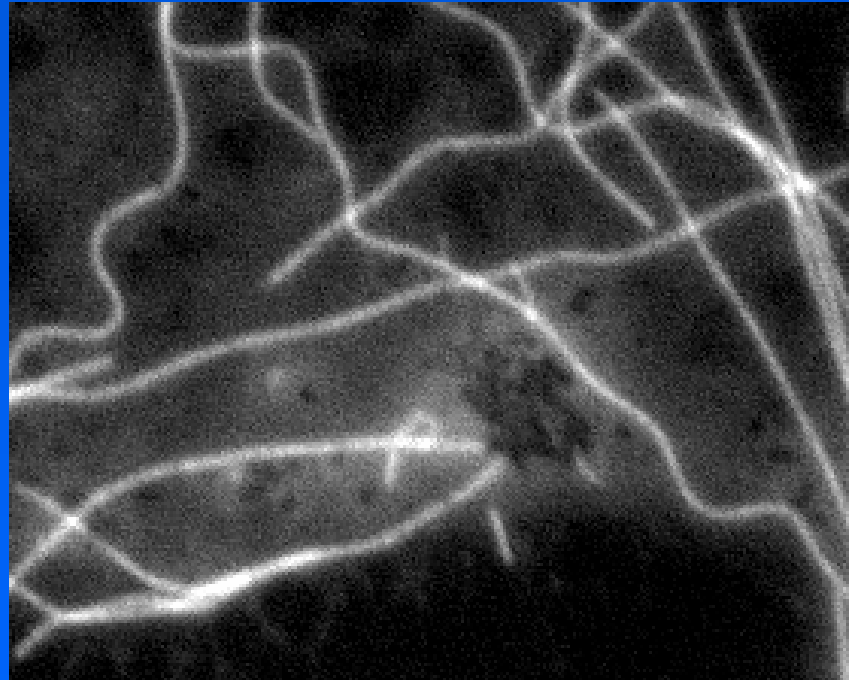
Во время деления микротрубочки на периферии клетки деполимеризуются и остаются только в составе веретена.

# Рост микротрубочечек в живой клетке





# Нуклеация микротрубочек



# Специфические ингибиторы микротрубочек

Колхицин (колцемид), нокодазол – деполимеризуют микротрубочки, связываясь с растворенным тубулином. В низких дозах подавляют динамическую нестабильность микротрубочек.

Винбластин (винкристин) – деполимеризуют микротрубочки, связываясь с тубулином и формируя паракристаллы тубулина.

Таксол (паклитаксел) – стабилизирует микротрубочки, взаимодействуя с тубулином и уменьшая константу деполимеризации. В низких дозах подавляет динамическую нестабильность.

Все ингибиторы уже в низких дозах (концентрация 10-50 нМ) останавливают клеточное деление.

Нарушения системы микротрубочек на уровне клетки обратимы. На уровне организма деполимеризация микротрубочек вызывает острую лучевую болезнь.

# Лекция 10

**Транспорт по микротрубочкам**

**Центриоль и центросома**

**Деление клетки (митоз)**

# Основные функции микротрубочек

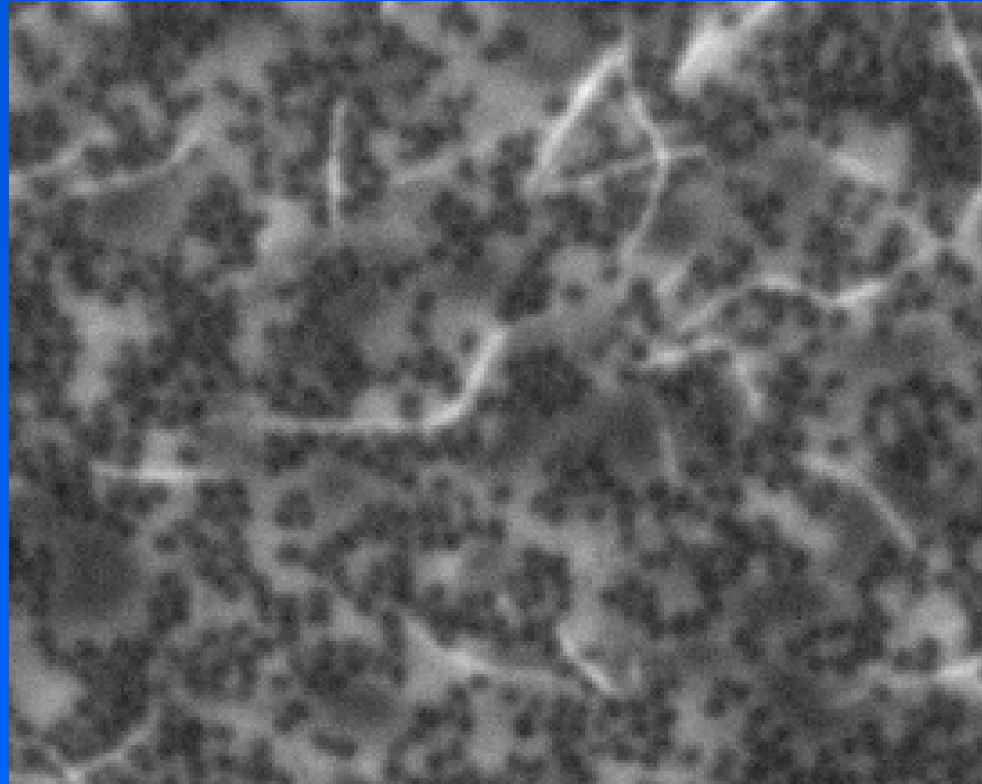
**В отсутствие микротрубочек многие клетки могут жить продолжительное (возможно – неограниченное) время, но не могут делиться.**

**Организация веретена деления клеток.**

**Организация анизотропного транспорта в цитоплазме и поляризация клеток.**

**Формирование длинных клеточных отростков (нейроны).**

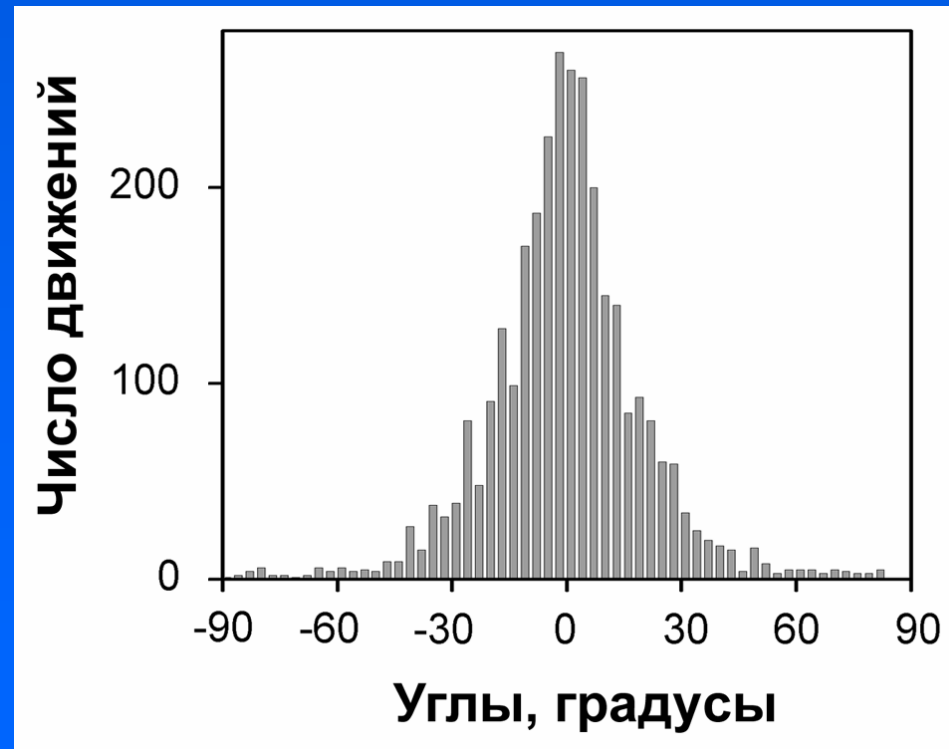
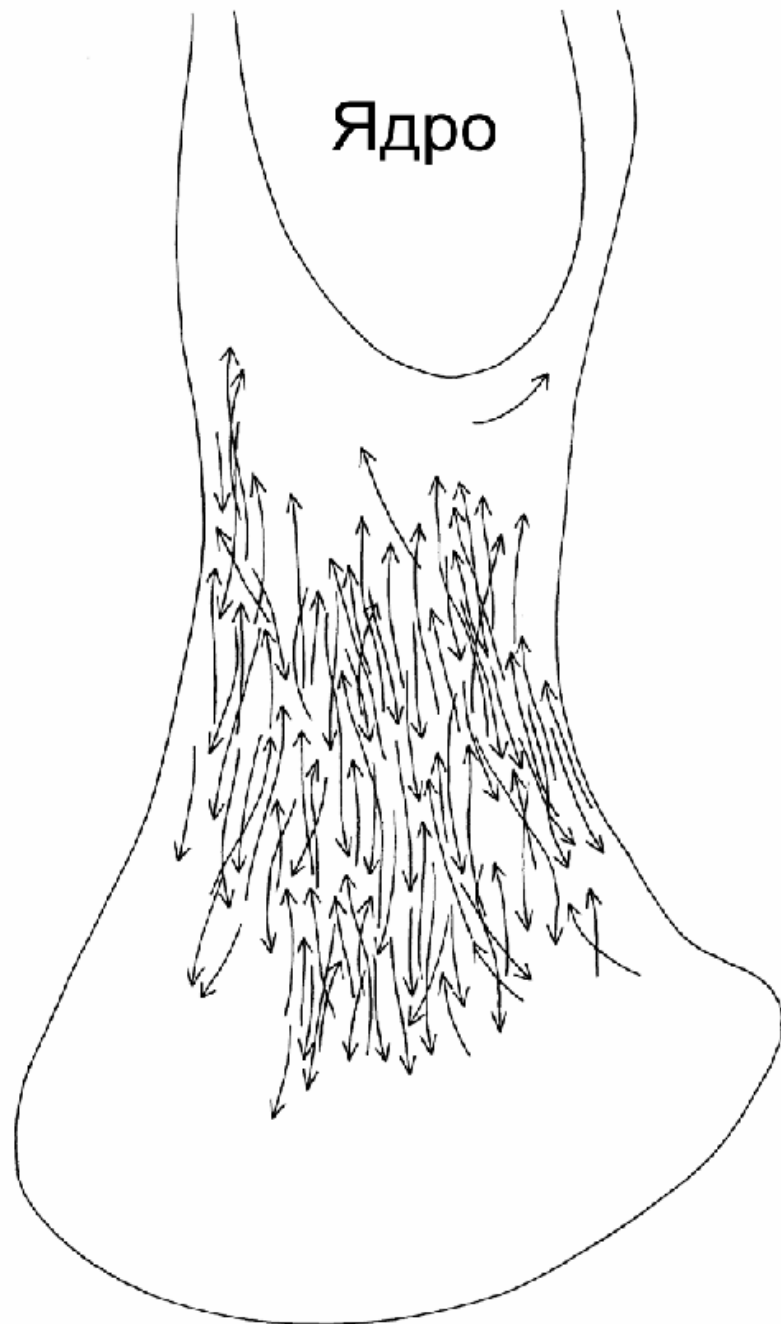
# Транспорт вдоль МТ



**Перенос пигментных гранул вдоль микротрубочек в помощью динеина, стимулируемый адреналином (фрагмент меланофора рыбы).**



# Анизотропия транспорта в цитоплазме



# Моторные белки, ассоциированные с микротрубочками

АТФ-азная активность всех моторных белков стимулируется взаимодействием с тубулином.

Локомоторный цикл идет с гидролизом АТФ. Шаг – 8 нм (один димер тубулина). Шаг направлен вдоль протофиламента.

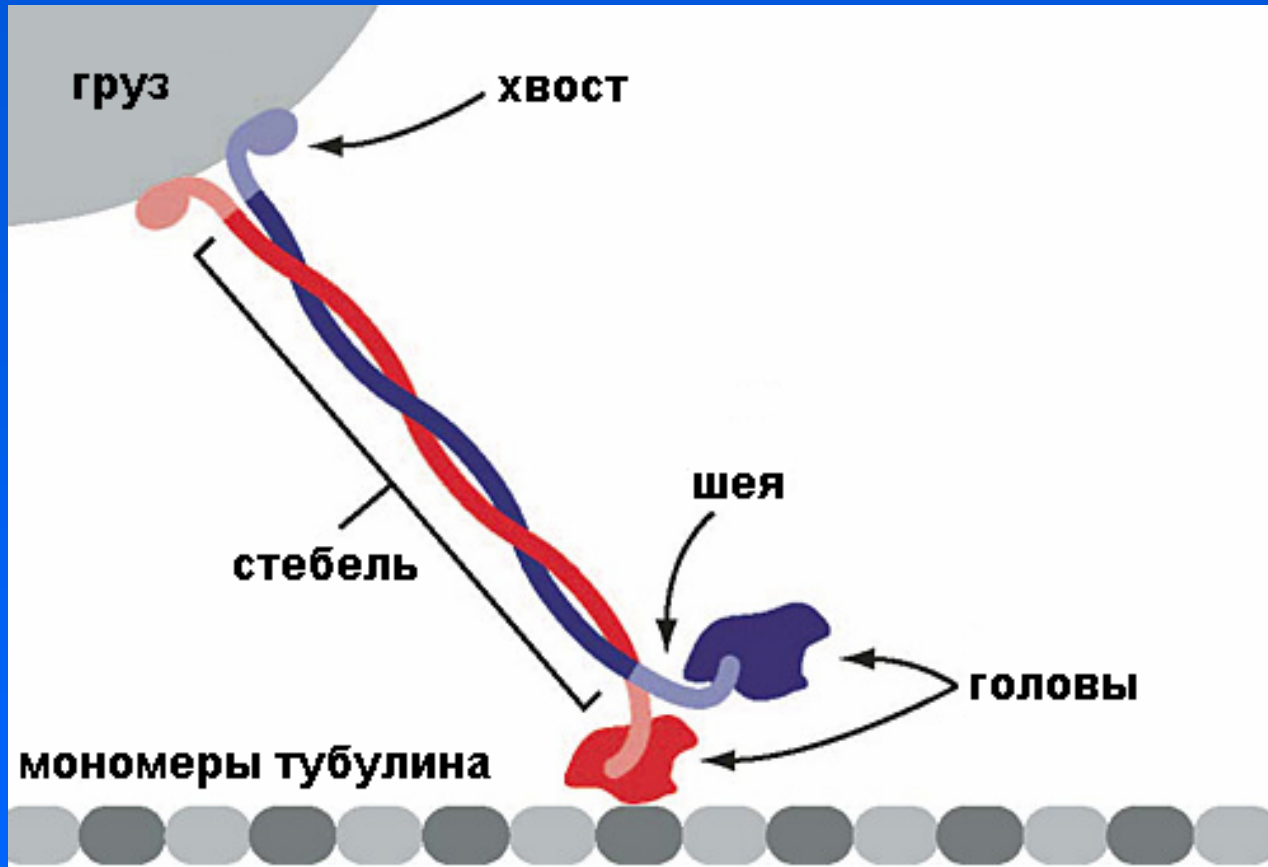
Движение с помощью моторов однонаправленно и процессивно – среднее расстояние переноса составляет 3-10 мкм.

В большинстве случаев моторный комплекс представлен димером с двумя головами.

Кинезины (суперсемейство белков) прямо взаимодействуют с поверхностью МТ, большинство движутся к плюс концу.

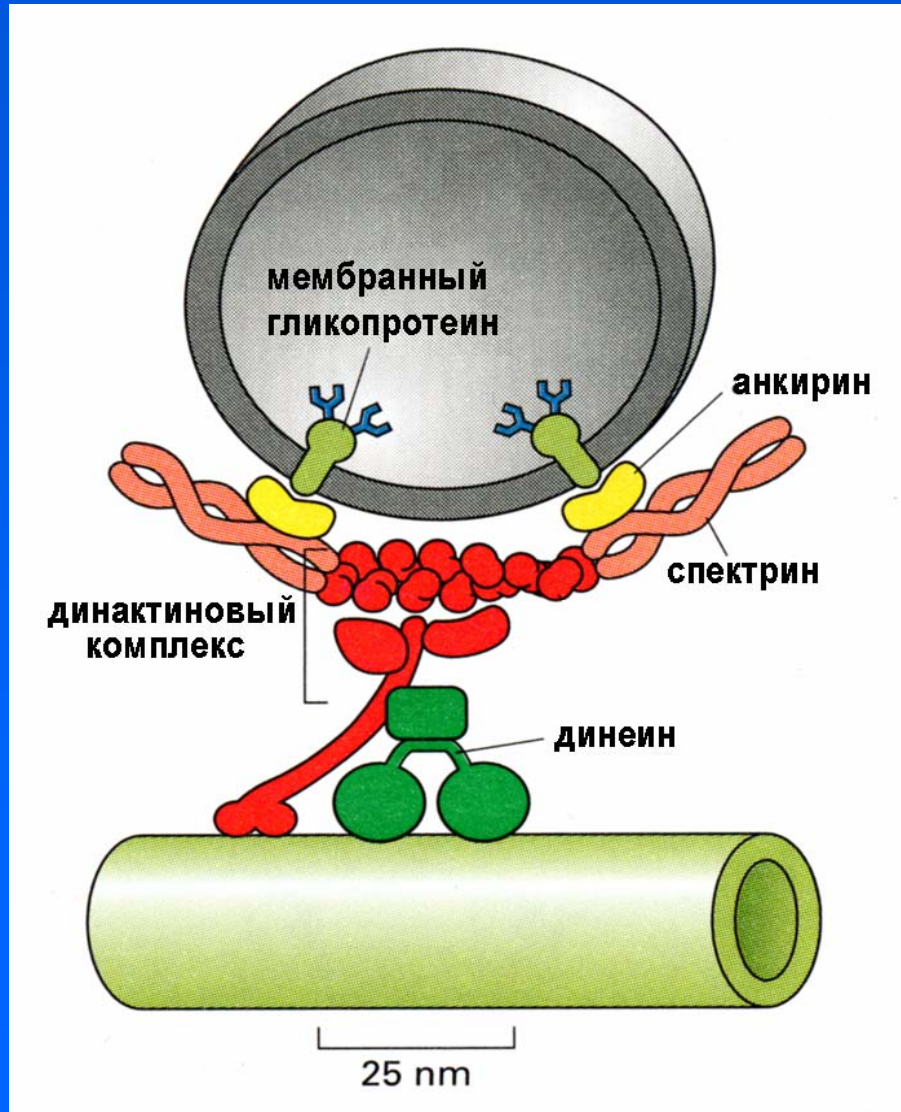
Динеины – цитоплазматический (один) и ресничные (много разных). Для взаимодействия с МТ используют дополнительные белки. Движутся всегда к минус концу.

# Структура кинезина



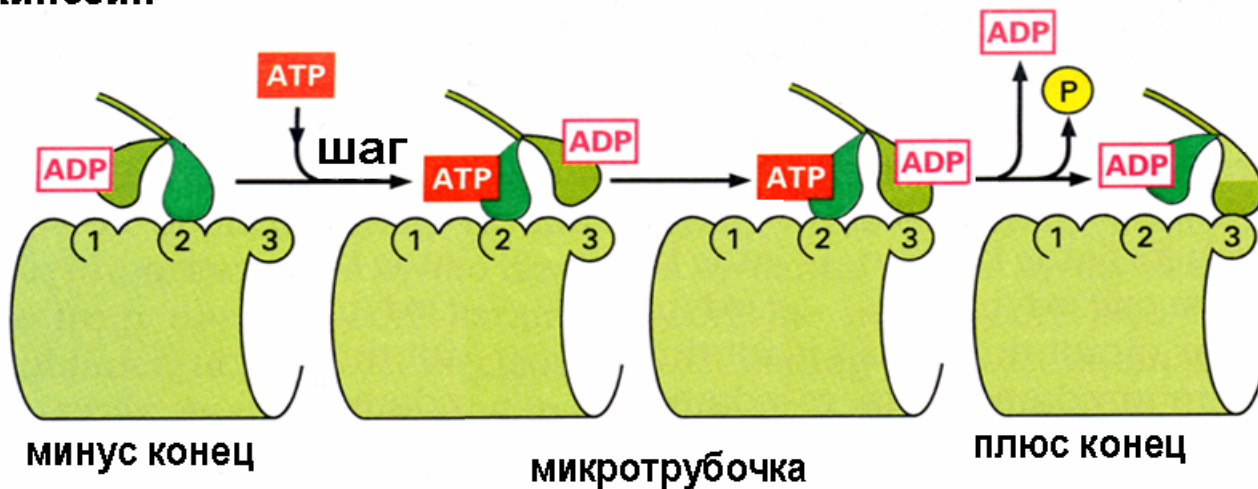
**В большинстве случаев кинезин – димер, который движется к плюс концу вдоль микротрубочки.**

# Структура динеинового комплекса

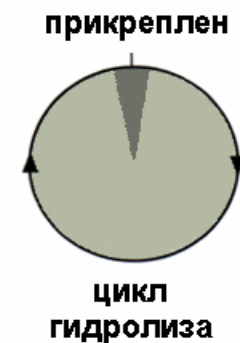
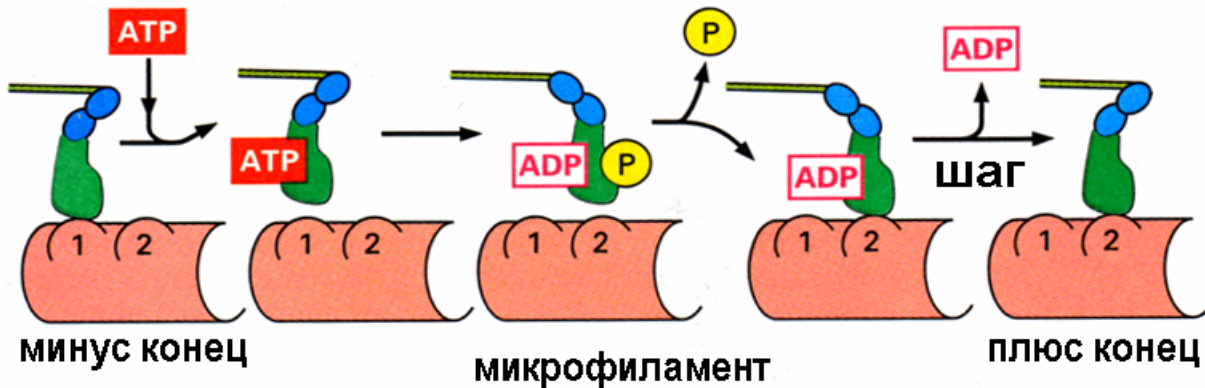


# Сравнение кинезина и миозина

## КИНЕЗИН



## МИОЗИН





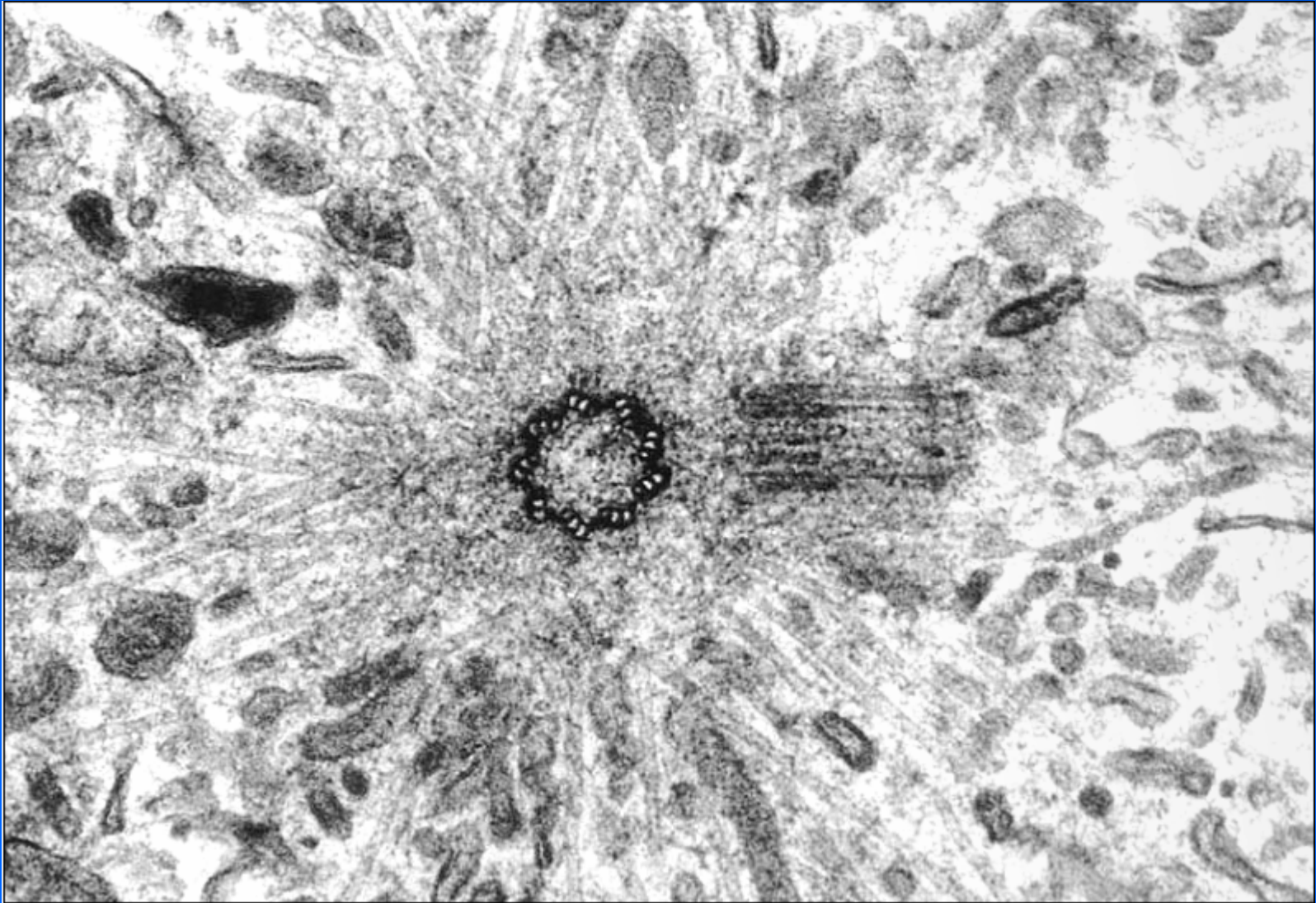
# Внутриклеточная подвижность

Движение по актину (миозин) – небольшие (менее 1 мкм) смещения у животных, процессивное движение (циклоз) у растений.

Движение по микротрубочкам – процессивное (сальтаторные движения) у животных и неprocessивное у растений. Во время движения происходит координация молекул моторных белков.

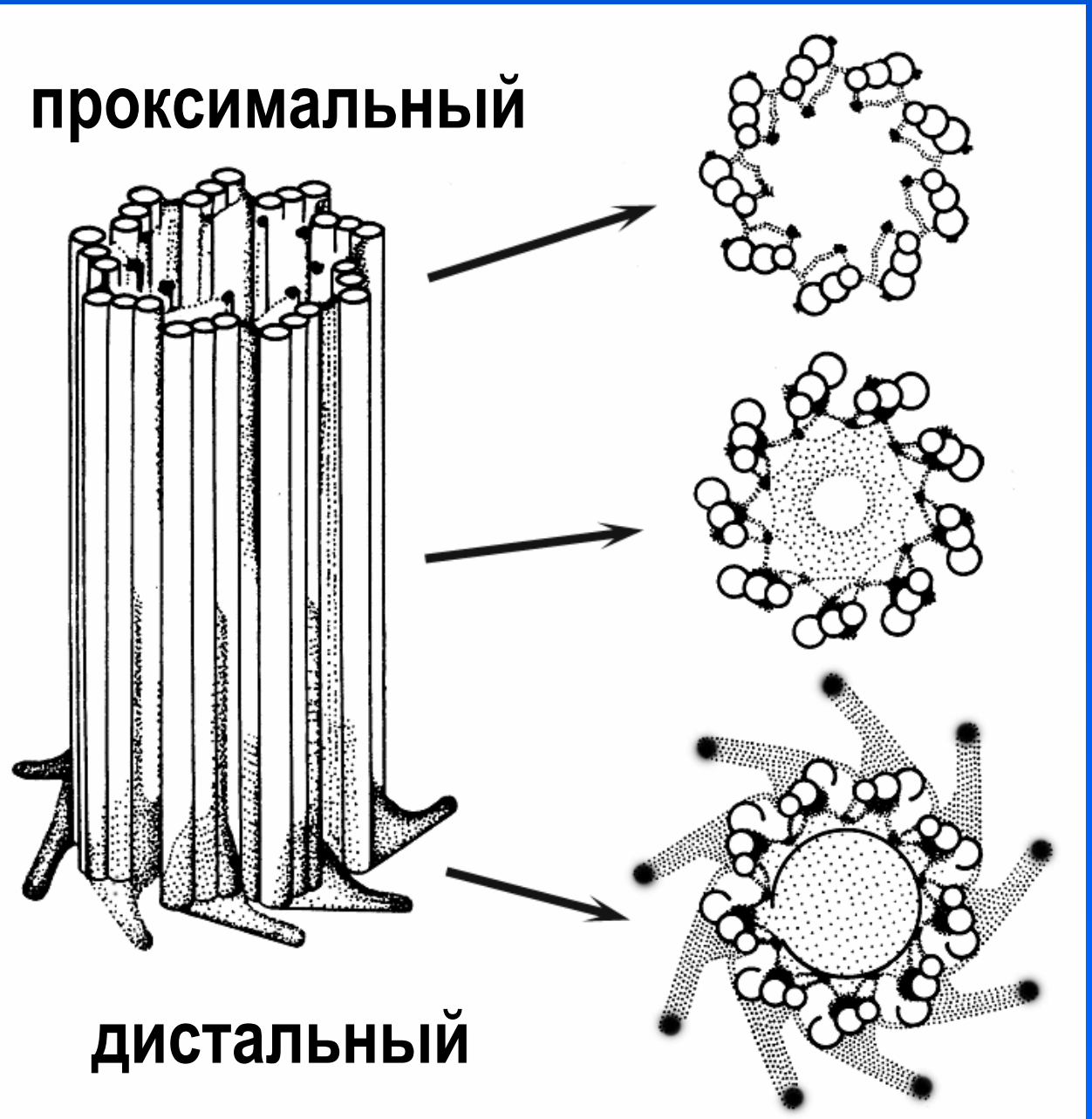
Во время деления микротрубочки обеспечивают сначала сальтаторные движения хромосом, а потом медленное процессивное расхождение хромосом.

# Центриоли в митозе – полюс веретена

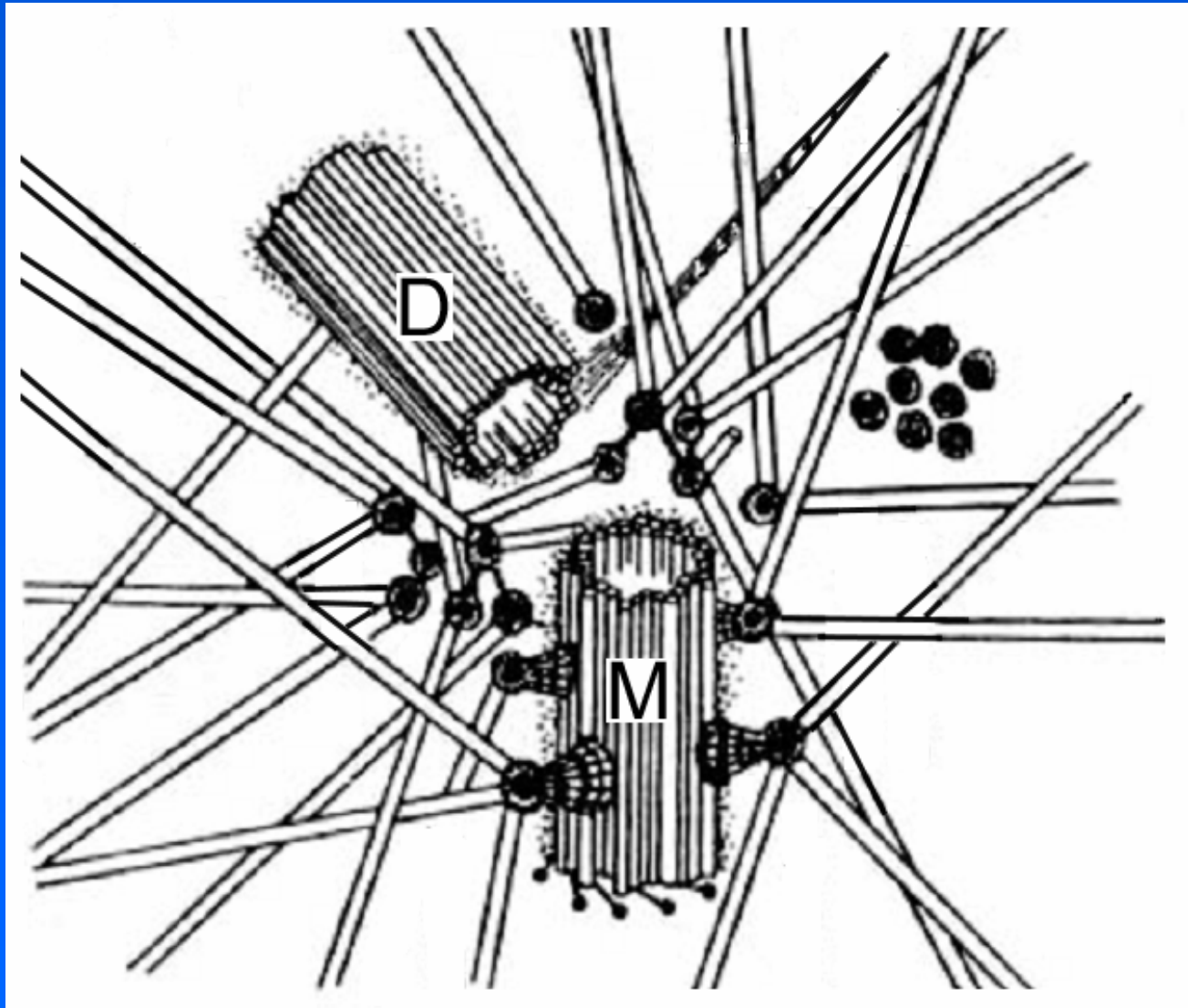


# Структура зрелой центриоли

( $d=0.2$  мкм;  
 $L=0.4$  мкм)



# Центросома в интерфазе



# Компоненты centrosомы

Две центриоли – материнская и дочерняя

Центры нуклеации микротрубочек – сателлиты на материнской центриоли и свободные центры

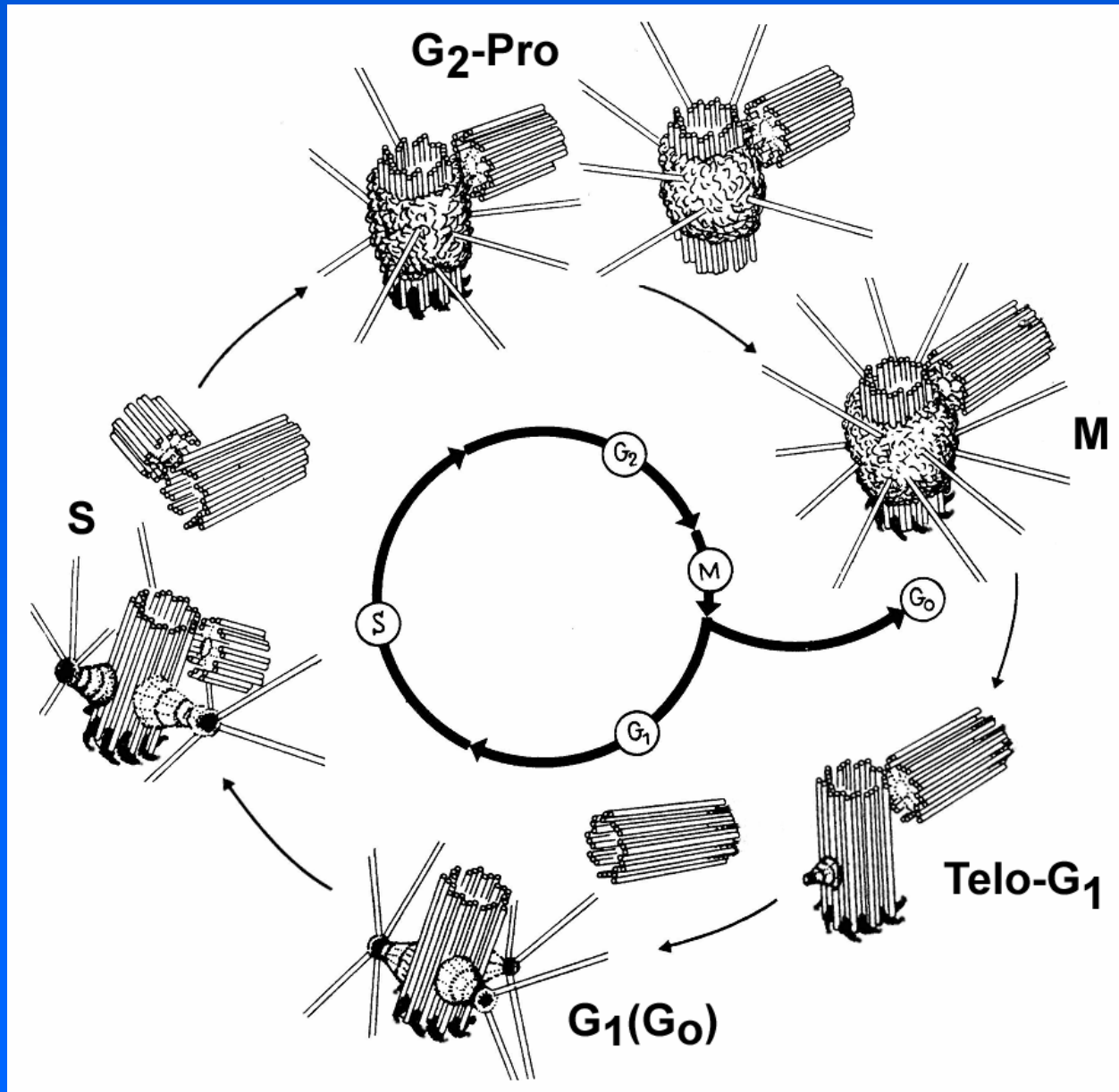
Короткие микротрубочки

В centrosоме аккумулируются различные белки

Структура компактной centrosомы поддерживается за счет входящих в ее состав белков, взаимодействующих с микротрубочками



# Центриольный цикл



# Репликация centrioles

Удвоение – две дочерних centrioles формируются одновременно вблизи двух материнских (перпендикулярно их оси). Процесс регулируется циклинами и запускается одновременно с синтезом ДНК (в S-фазе).

Рост (элонгация) дочерних centrioles заканчивается перед делением.

Созревание centrioles (перестройка цилиндра) занимает весь следующий клеточный цикл и не завершается, если клетка выходит из цикла (в G<sub>0</sub> период). Таким образом, формирование зрелой centrioles занимает полтора клеточных цикла (от S-фазы до середины следующего митоза).

В клетках, лишенных centrioles, они могут образовываться *de novo*. Этот процесс подавляется при наличии centrioles.

# Центросома – динамический центр клетки

В интерфазной клетке две центриоли (материнская и дочерняя) сближены и образуют одну центросому. Белки центросомы (гамма-тубулин, нинеин, динеиновый комплекс) инициируют рост микротрубочек и стабилизируют минус концы микротрубочек, чем поддерживают их радиальную сеть.

В клетках с радиальной системой микротрубочек центросома располагается в центре цитоплазмы. Она перемещается при смене поляризации и направления движения клеток.

Во время деления возникают две центросомы, которые служат местами инициации роста многочисленных микротрубочек.

# **Промежуточные филаменты – основные характеристики и свойства**

**Молекулярный вес мономеров – как правило, около 60 кД.**

**Диаметр филаментов – 8-11 нм; длина около 1 мкм.**

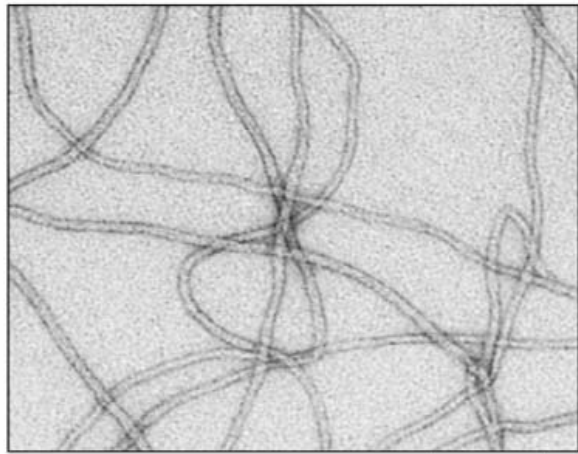
**Обмен субъединицами происходит по всей длине.**

**Стабильны – время полубмена составляет часы.**

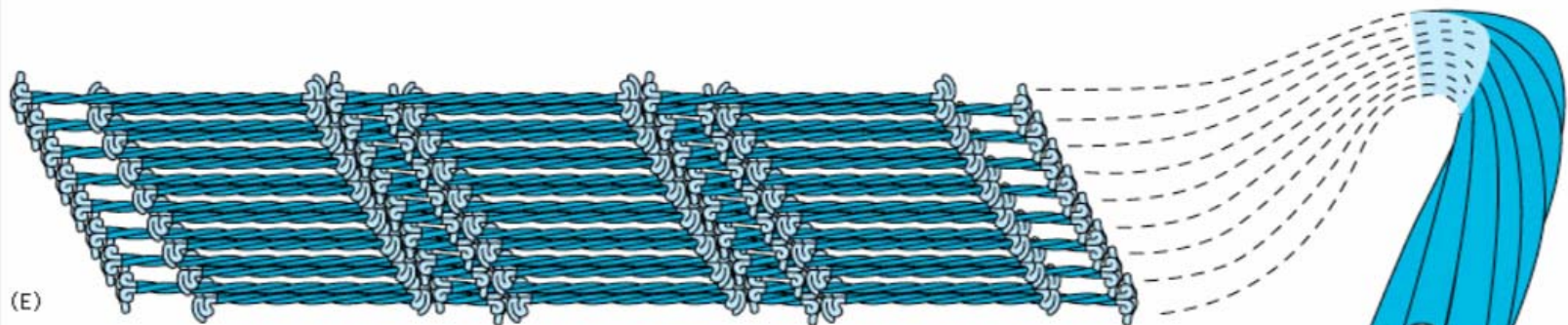
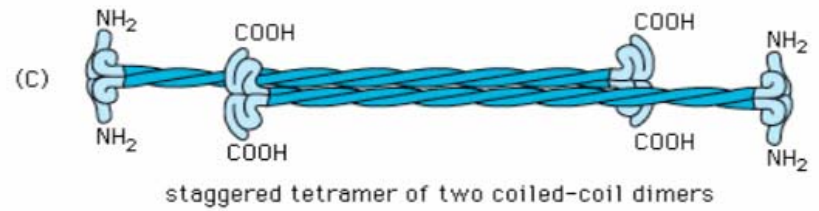
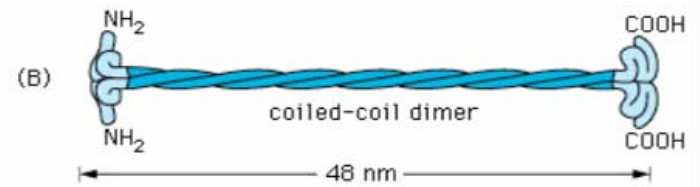
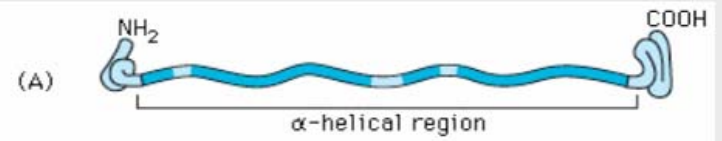
**Образуют пучки параллельных филаментов.**

**Белки ПФ тканеспецифичны.**

**Ингибиторы полимеризации ПФ неизвестны.**



0.1  $\mu\text{m}$



eight tetramers twisted into a rope

10 nm



# Типы промежуточных филаментов

**Виментин (ламин В) – содержится во всех клетках млекопитающих**

**Десмин – мышечные клетки**

**Кератины – различные виды эпителиев (около 20 белков)**

**Нейрофиламенты – встречаются только в нейронах (триада белков 70, 140 и 210 кД)**

**Глиальный кислый белок – клетки нейроглии**

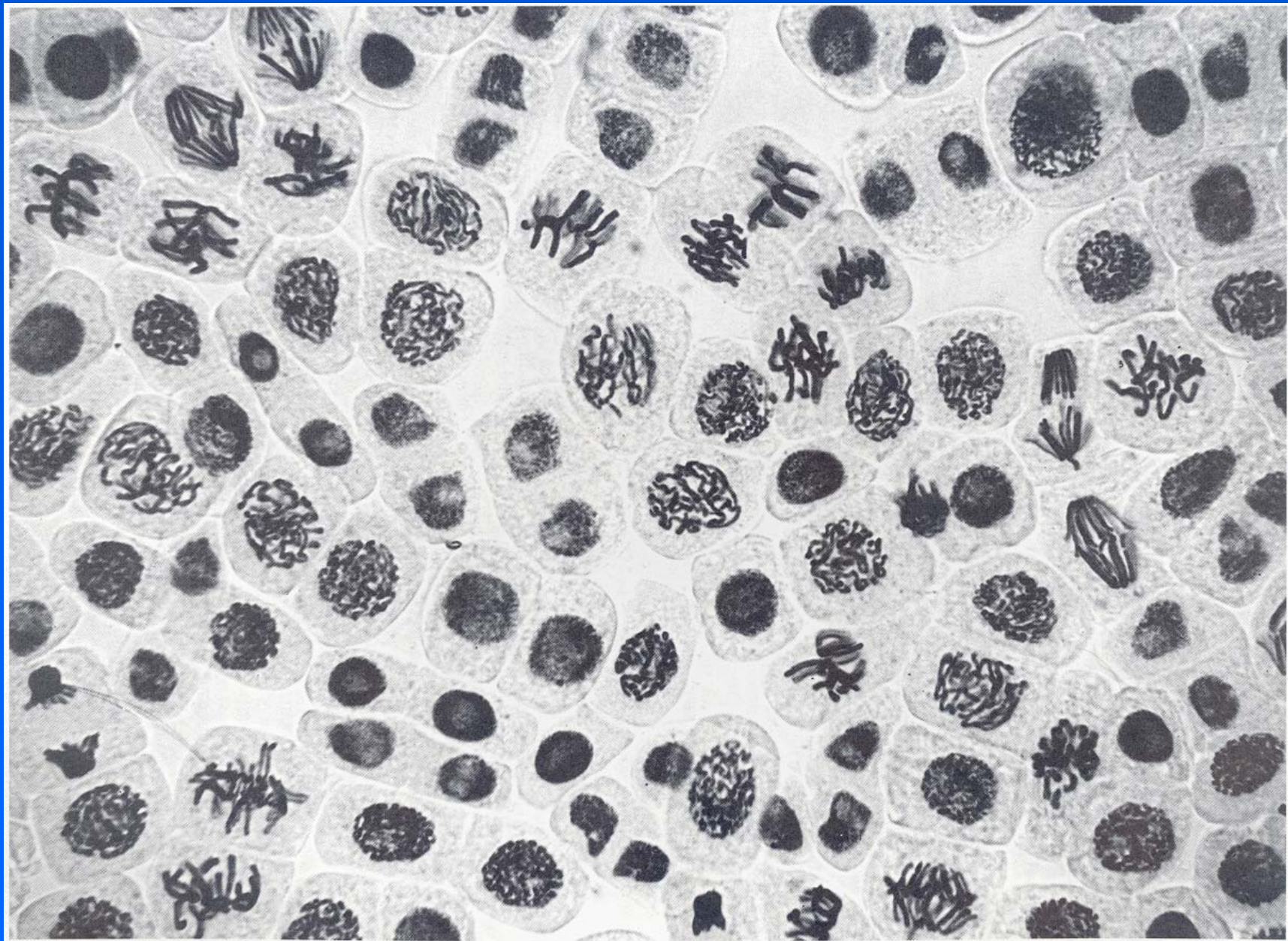
# МИТОЗ И ЦИТОКИНЕЗ

Митоз – часть клеточного цикла, в которой происходит разделение ядра и расхождение удвоившейся ДНК.

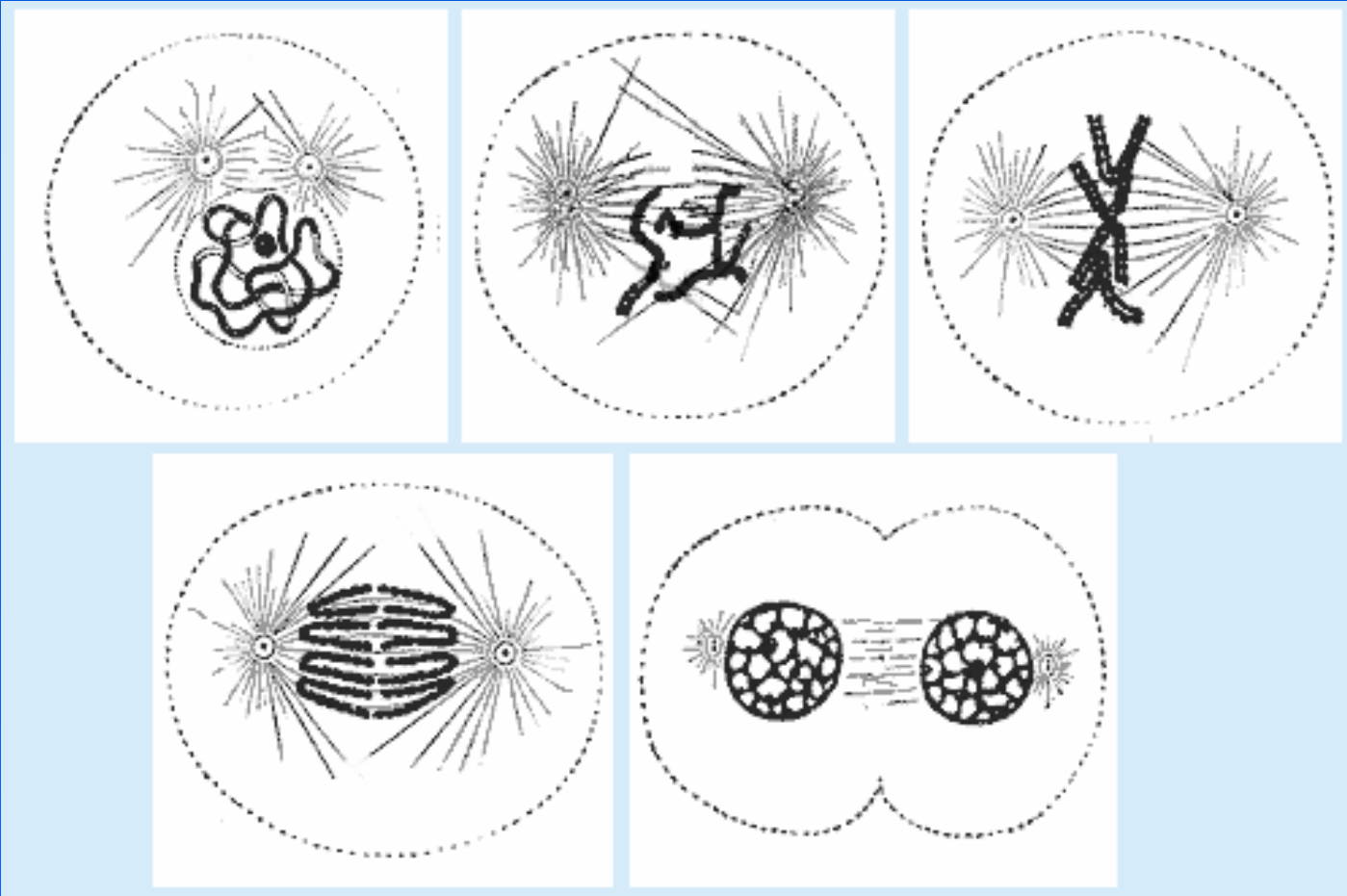
Расхождение молекул ядерной ДНК у эукариот всегда происходит через конденсацию хроматина с формированием компактных хромосом и с помощью специализированного аппарата – веретена деления.

Как правило, митоз сопровождается разделением тела клетки – цитокинезом. Митоз без цитокинеза приводит к возникновению двуядерной клетки.

Механизмы, обеспечивающие расхождение хромосом (кариокинез) и цитокинез различны.

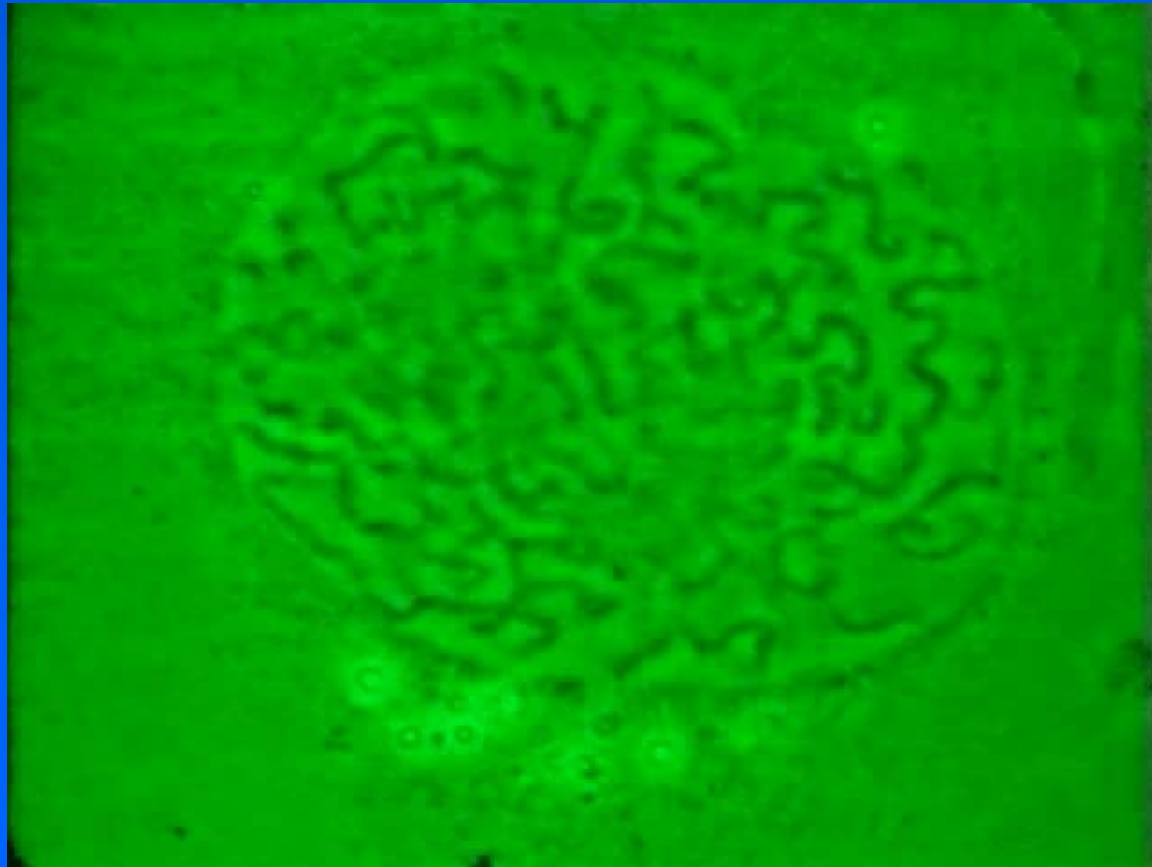


# Фазы митоза – схема





# Митоз в клетке тритона





# Фазы митоза

**Профаза – конденсация хромосом, формирование звезд (животные) или пучков из микротрубочек (растения) в цитоплазме. Остановка транскрипции.**

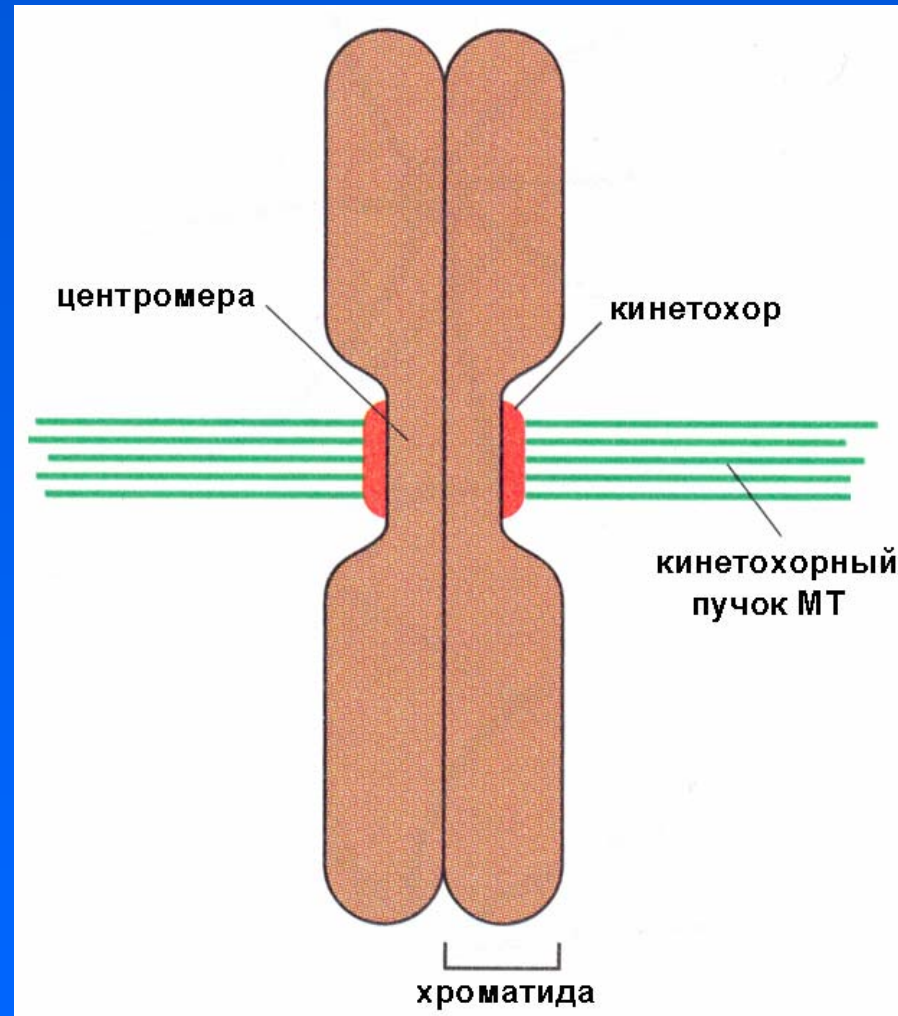
**Прометафаза – разрушение ядерной оболочки, формирование митотического веретена и начало движения хромосом**

**Метафаза – формирование пластинки (закрепление хромосом на экваторе) и натяжение кинетохорных пучков МТ**

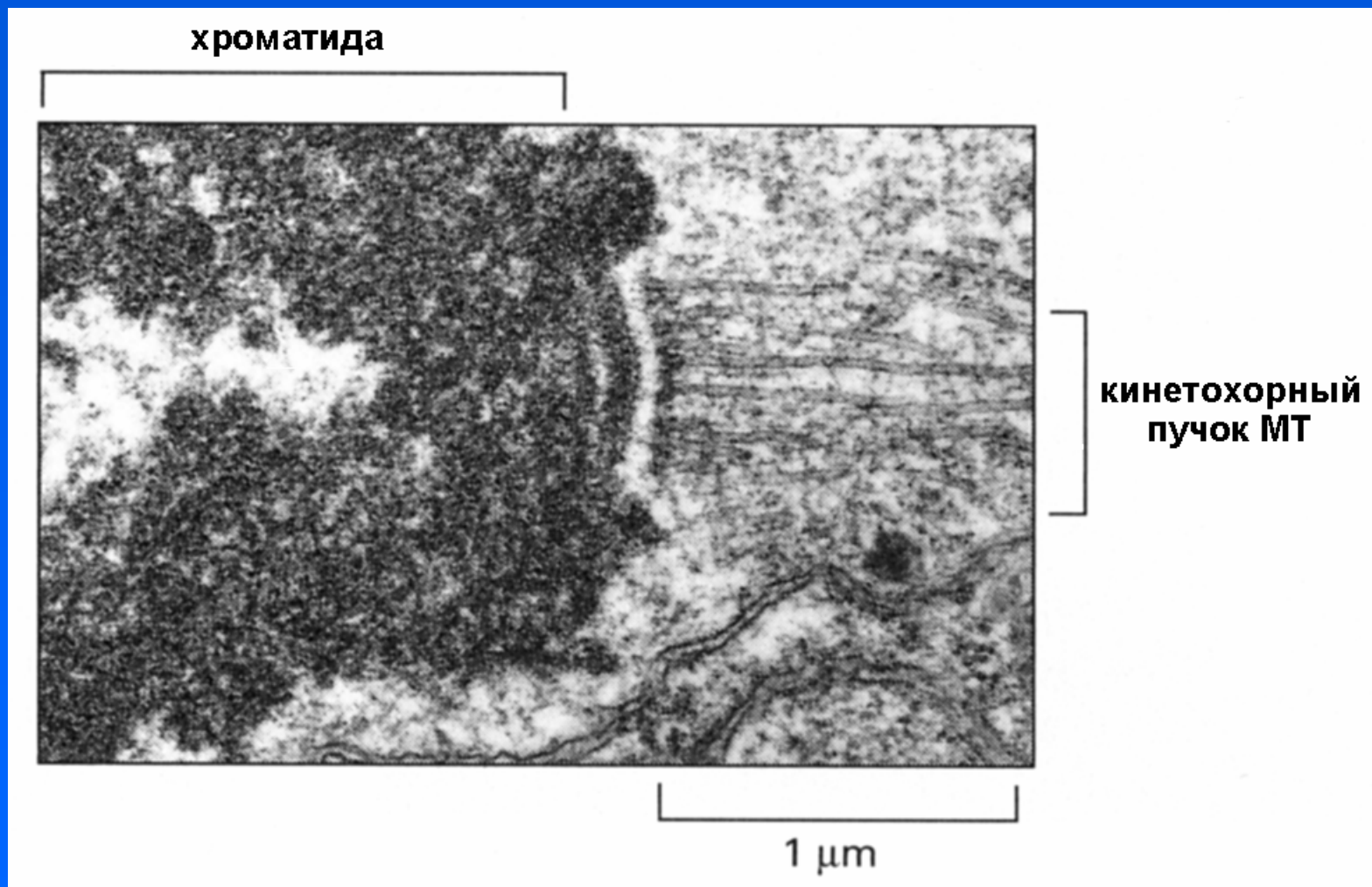
**Анафаза – расхождение хромосом и полюсов, начало формирования перетяжки (фрагмопласта) и ядерной оболочки**

**Телофаза – деконденсация хромосом, и формирование ядерной оболочки; распад веретена деления и формирование остаточного тельца (животные) или фрагмопласта (растения)**

# Структура хромосомы (схема)



# Структура хромосомы - ЭМ



# Кинетохор и центромера

Центромера – первичная перетяжка в хромосоме. Во время митоза на ней формируется кинетохор.

Центромерная ДНК – от нескольких десятков до нескольких тысяч нуклеотидов. В ее состав может входить сателлитная ДНК. Центромерный хроматин наиболее устойчив к деконденсации.

Центромера содержит специальные белки – CENP-A (модифицированный гистон H3) и другие.

Белки кинетохора – конститутивные (группа CENP), которые присутствуют в течение всего клеточного цикла и митотические (присутствуют только в митозе).

# Кинетохор

Полноценный кинетохор формируется только в прометафазе и разрушается в телофазе.

Трехслойная структура кинетохора – полусфера (в прометафазе), затем диск (в мета- и анафазе), диаметром 0.2-1 мкм и толщиной около 0.1 мкм.

Микротрубочки заканчиваются в наружном слое кинетохора.

Число микротрубочек связанных с кинетохором в метафазе и анафазе – от 1 до 20 и более, как правило – около 10.



# Движение хромосом в митозе

**Прометафаза ранняя – хромосомы поодиночке подтягиваются к полюсам за счет скольжения вдоль отдельных микротрубочек с помощью динеина.**

**Прометафаза поздняя – хромосомы отталкиваются от полюсов за счет роста плюс концов микротрубочек, прикрепившихся к плоскому кинетохору.**

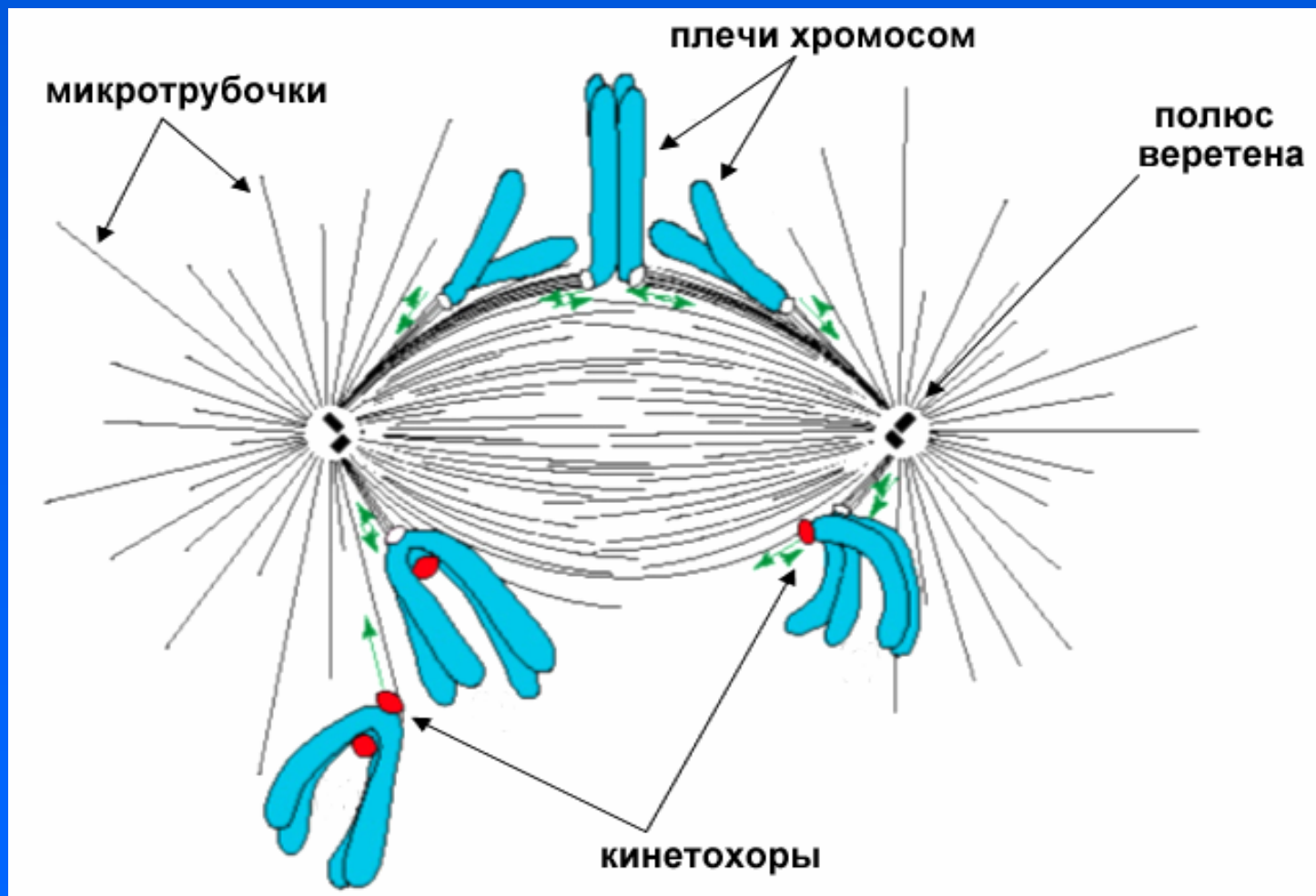
**Метафаза ранняя – колебание хромосом за счет роста и укорочения пучков микротрубочек, отходящих от противоположных полюсов.**

**Метафаза поздняя – начало растяжения хромосом.**

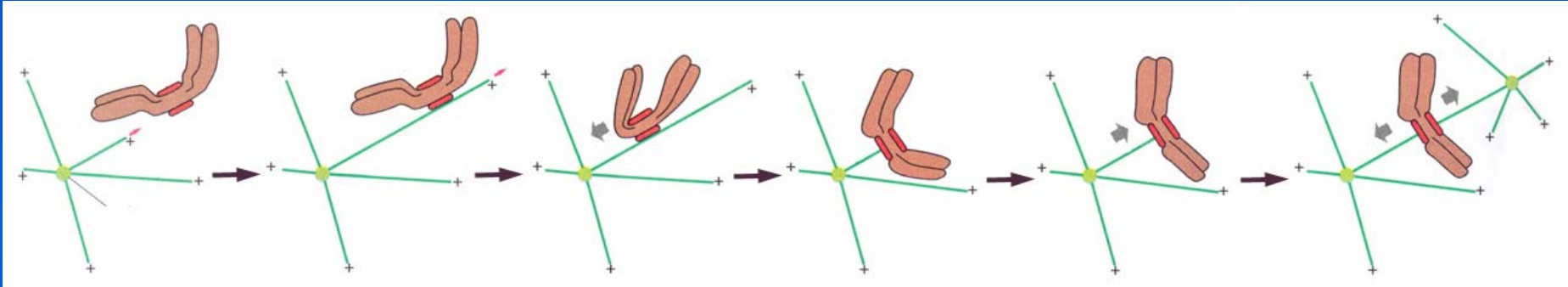
**Анафаза А – расхождение хромосом к полюсам за счет укорочения плюс концов прикрепленных к кинетохорам микротрубочек.**

**Анафаза Б – одновременное расхождение хромосом и полюсов за счет удлинения межполюсных микротрубочек.**

# Способы прикрепления хромосом к веретену



# Поведение хромосомы при формировании веретена

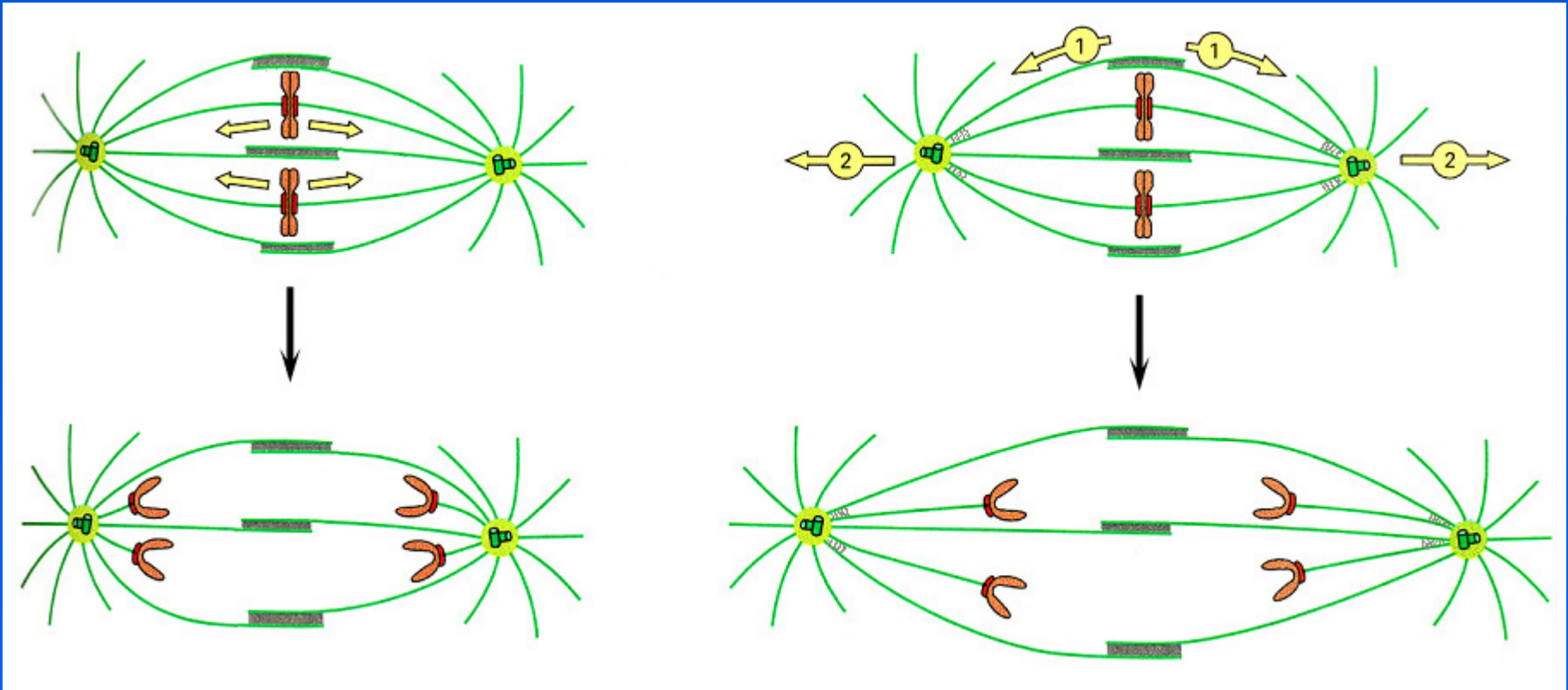


**1-3 - Одиночная МТ достигает кинетохора и обеспечивает быстрое подтягивание хромосомы к полюсу (динеин)**

**4-5 - Формируется пучок кинетохорных МТ, который отталкивает хромосому от полюса**

**6 - Устанавливается связь противоположных кинетохоров с противоположными полюсами**

# Анафаза



**Анафаза А – укорочение кинетохорных пучков МТ с плюс концов и растаскивание хромосом.**

**Анафаза Б – удлинение межполюсных пучков МТ и расхождение («расталкивание») полюсов. Предполагается, что хромосомные пучки МТ закреплены у минус концов и движутся вместе с межполюсными МТ.**

# Расхождение хромосом в анафазе

Движение кинетохоров всех хромосом начинается и заканчивается одновременно и происходит строго синхронно.

Скорость расхождения хромосом – 1 мкм/мин, и ее не удастся увеличить в эксперименте.

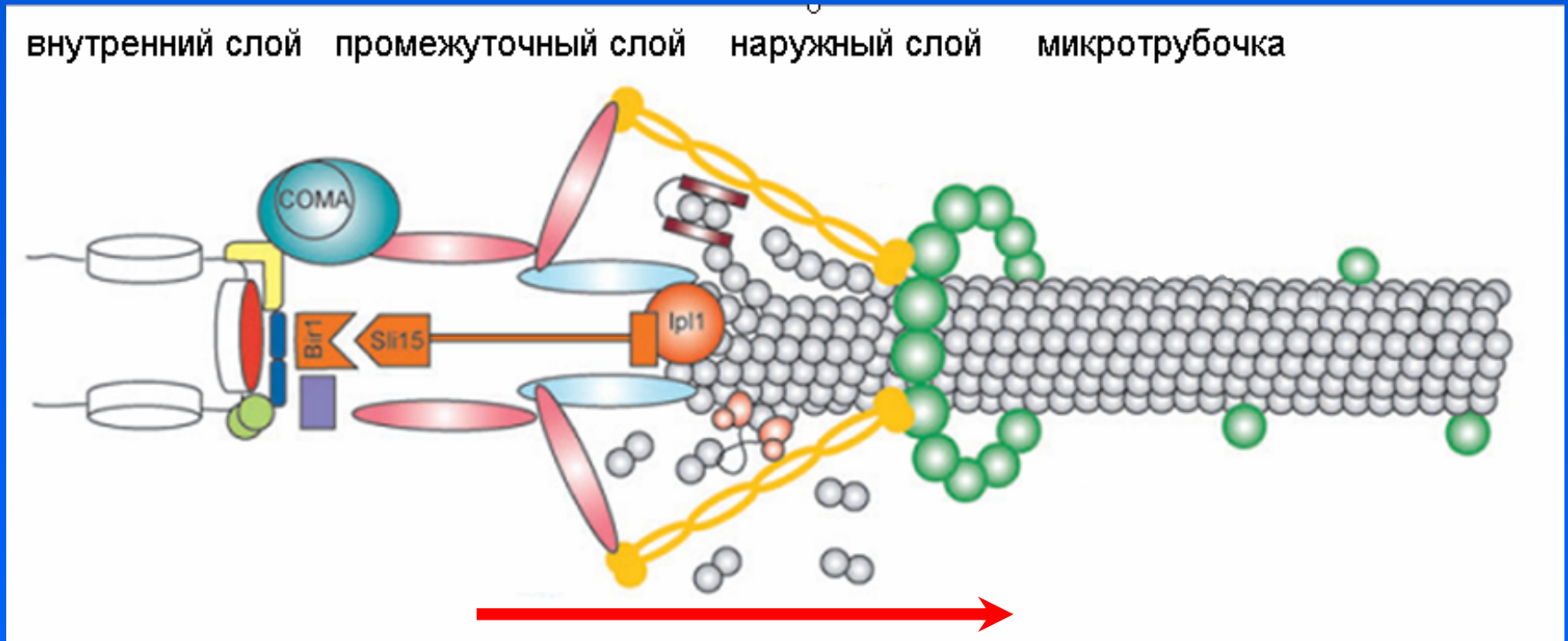
Усилие, приложенное к кинетохору в анафазе –  $10^{-5}$  дин (100 пН) на хромосому.

Анафаза обратимо блокируется при снижении уровня АТФ.

Загадка расхождения хромосом – нам не известны механизмы, обеспечивающие высокопроцессивное движение со скоростью 1 мкм/мин.



# Схема работы кинетохора в анафазе



направление движения

Адаптер скользит вдоль разбирающейся микротрубочки, и с помощью линкеров, связанных с центромерным хроматином, тянет за собой весь кинетохор.

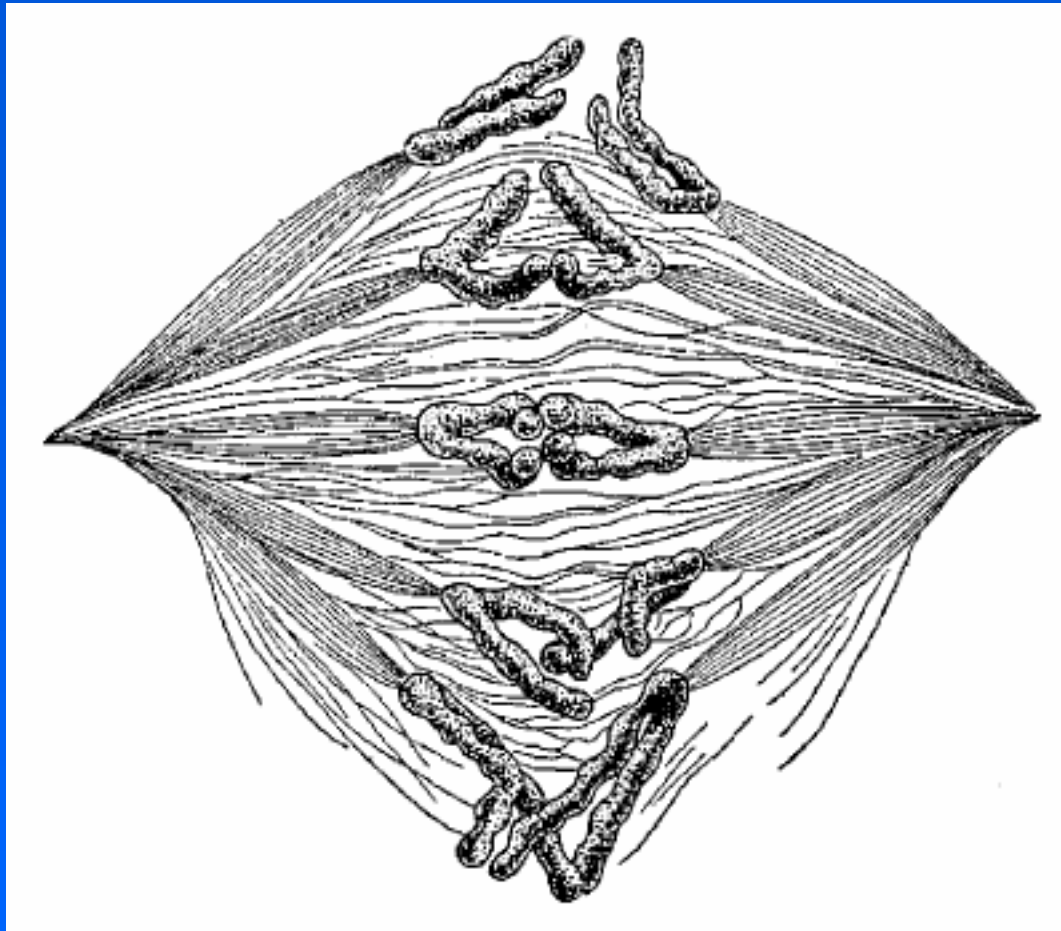
# Механизм расхождения хромосом в анафазе

Процесс расхождения хромосом тщательно регулируется клеткой – любое экспериментальное вмешательство его только подавляет.

Основная модель – скольжение адапторных комплексов кинетохора вдоль микротрубочки при ее деполимеризации.

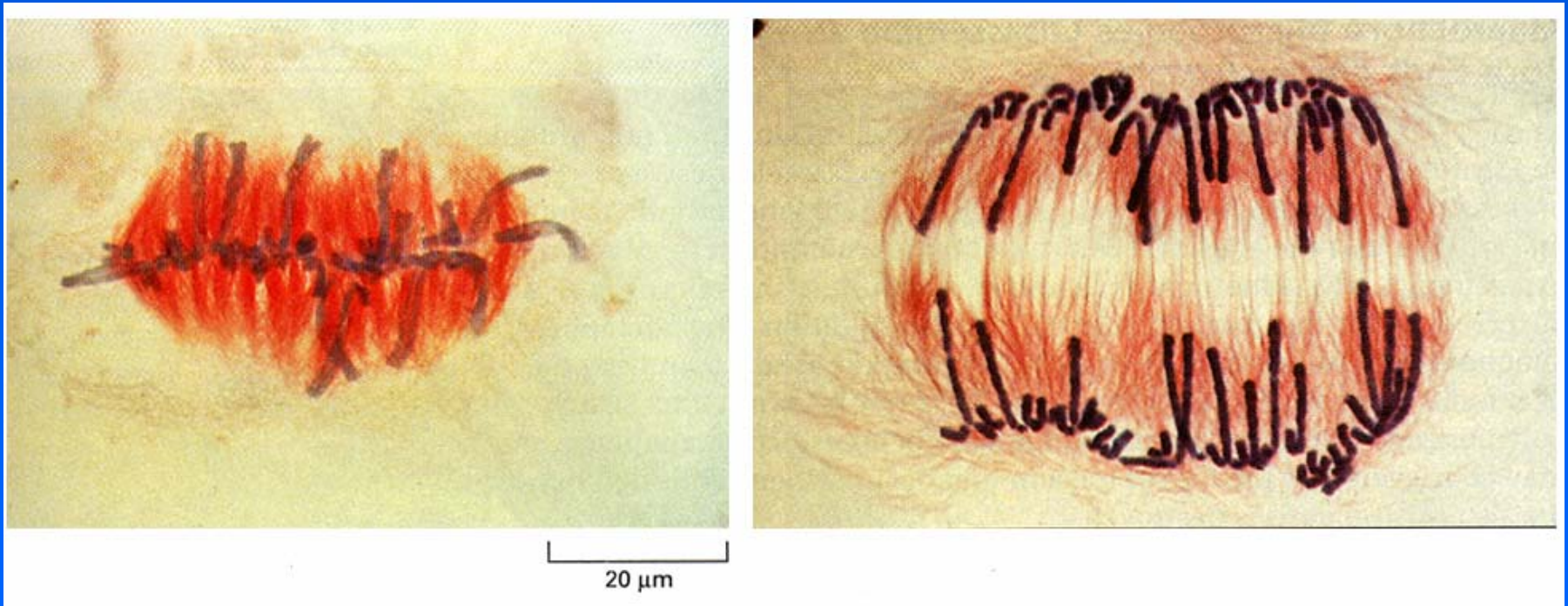
Источник энергии – энергия, запасенная в структуре полимеризованной микротрубочки при гидролизе ГТФ.

# Веретено деления



В основе формирования веретена деления лежат два процесса – стабилизация микротрубочек хромосомами и способность микротрубочек образовывать пучки.

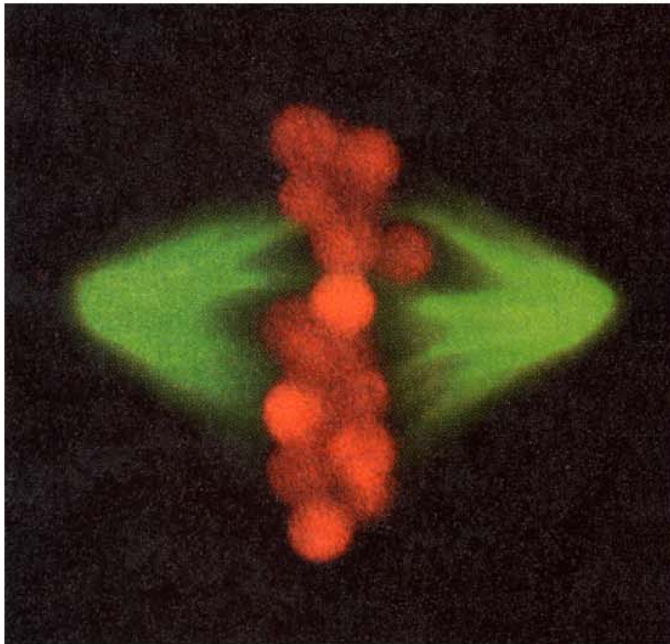
# Бесплюсной митоз в растительной клетке



Во многих клетках высших растений вместо веретена деления формируется множество пучков микротрубочек, отходящих от хромосом. При этом также происходят анафаза А и Б.



# Митоз без хромосом и полюсов

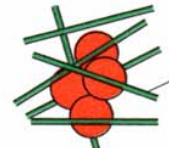


10  $\mu\text{m}$

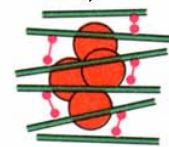
Экстракт яиц Хепорус  
и покрытые ДНК частицы



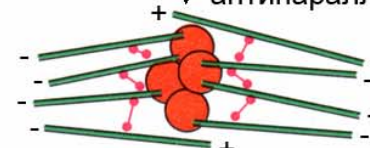
↓ микротрубочки растут вокруг частиц



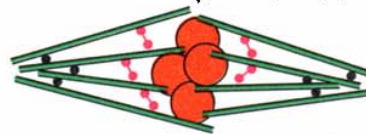
↓ плюс-концевые моторы укладывают и упорядочивают микротрубочки



↓ плюс-концевые моторы отталкивают минус-концы микротрубочек от частиц и раздвигают антипараллельные микротрубочки в стороны

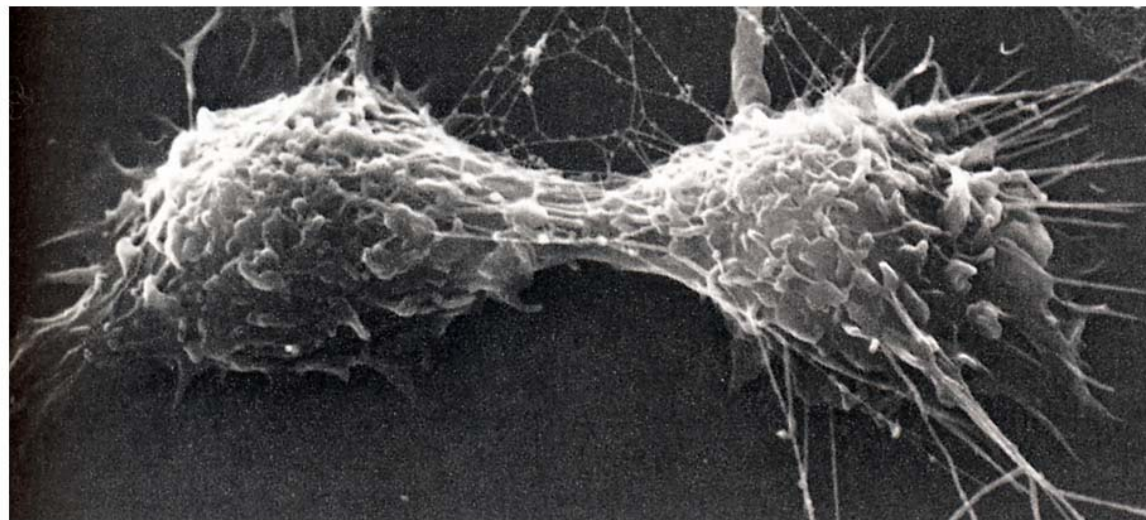


↓ динеин соединяет минус-концы микротрубочек в компактные полюса

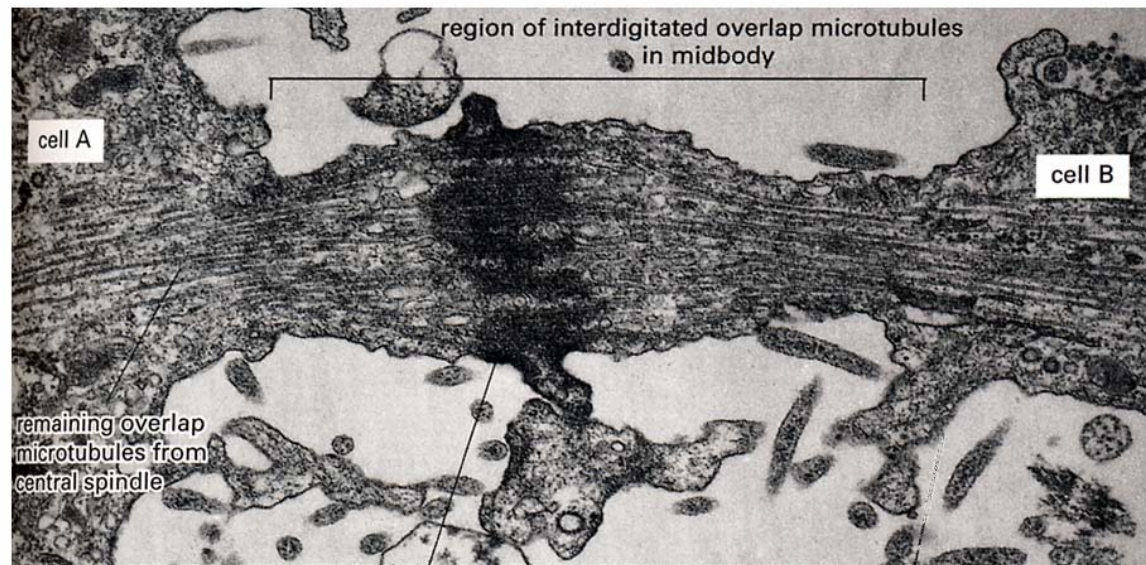




# Цитокинез у животных



10  $\mu\text{m}$



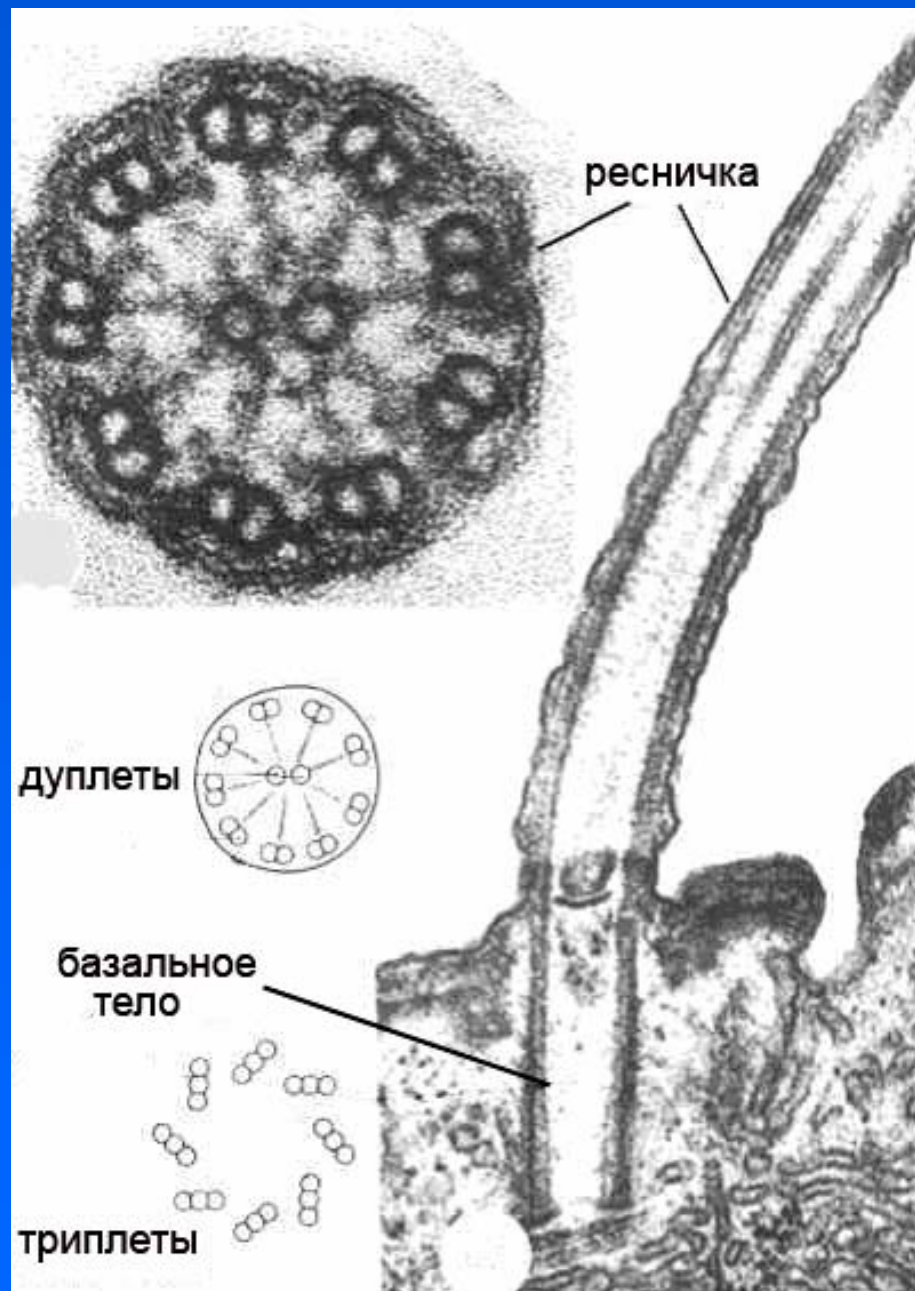
1  $\mu\text{m}$

# Лекция 11

**Реснички, жгутики и  
клеточная подвижность**

**Современная микроскопия**

# Ультраструктура реснички – продольный и поперечный срезы



# Компоненты реснички (жгутика)

Базальное тело – цилиндр, диаметром 0.2 мкм, аналог центриоли. От базального тела может отходить исчерченный корешок.

Шейка – перехват. Область контакта базального тела с мембраной.

Аксонема – система продольных микротрубочек (9+2; 9+0). Аксонема начинается от шейки и окружена плазматической мембраной.

# Реснички и жгутики

Строение базального тела и аксонемы консервативно – цилиндр, диаметром 0.2 мкм

Количество ресничек – одна на две центриоли (первичные реснички) или много с одним базальным телом в основании (ресничные клетки)

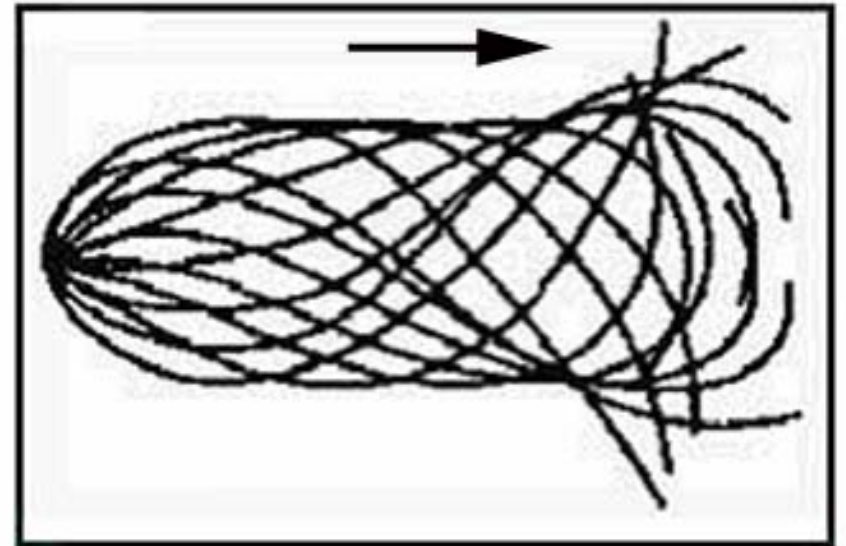
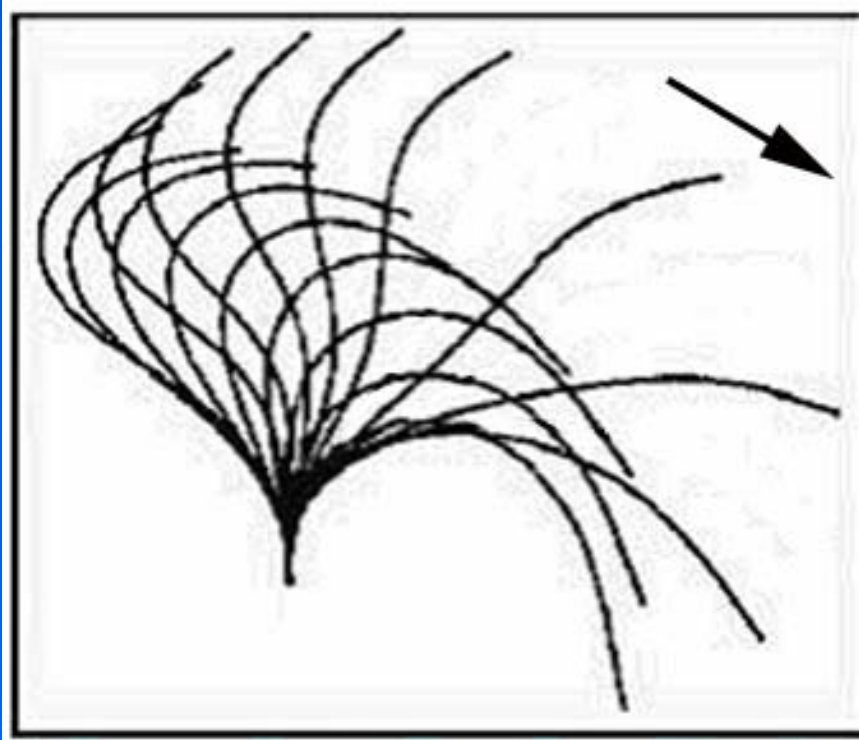
Ресничка и жгутик – разная кинематика движения (биение и псевдовращение).

Биение ресничек может быть скоординировано между многими клетками.

Механизм биения – скольжение дуплетов динеина (опыт Summers and Gibbons).



# Локомоторный цикл реснички и жгутика



Стрелки указывают направление тока жидкости

# Киноцилии и стереоцилии

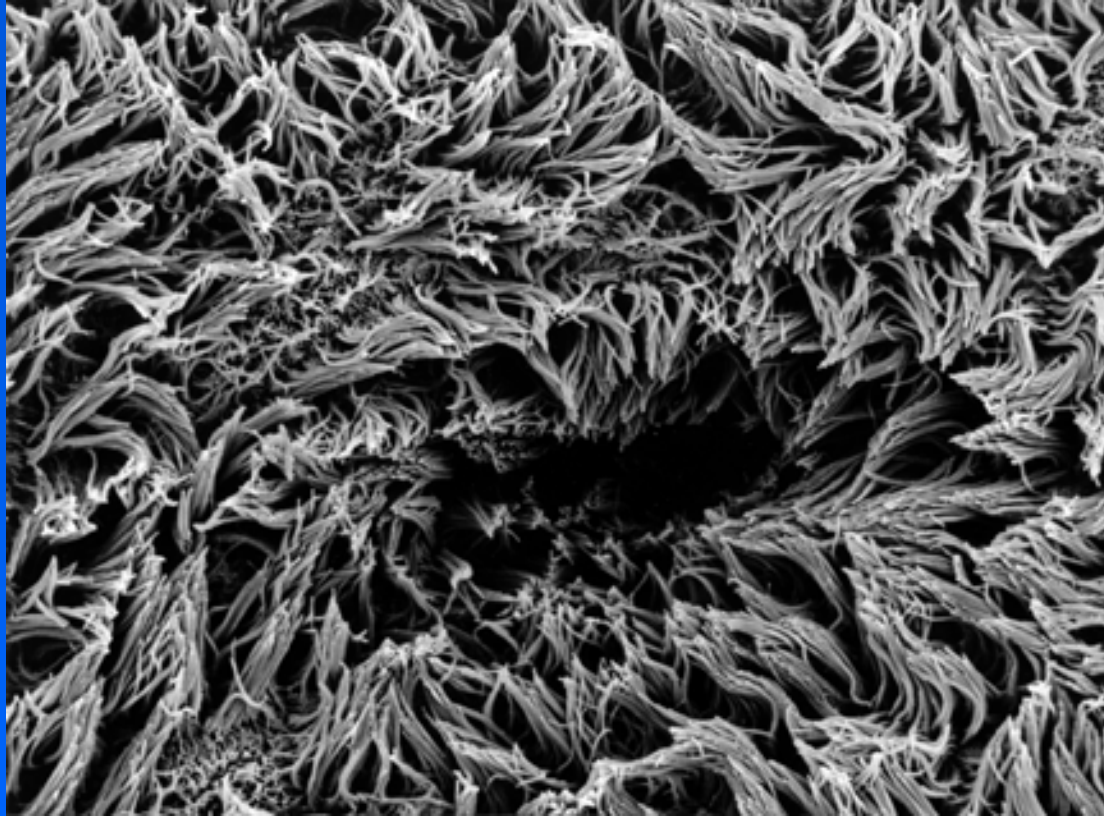
**Киноцилии – имеют центральную пару МТ, содержат специализированные динеины. Есть только в высокоспециализированных клетках.**

**Стереоцилии – динеина между дуплетами МТ нет, нет центральной пары МТ, не способны к активному изгибанию. Присутствуют во многих типах клеток.**

**Примеры стереоцилий – палочки и колбочки (сетчатка глаза), реснички в клетках внутреннего уха, первичные реснички в почечном эпителии, в фибробластах.**

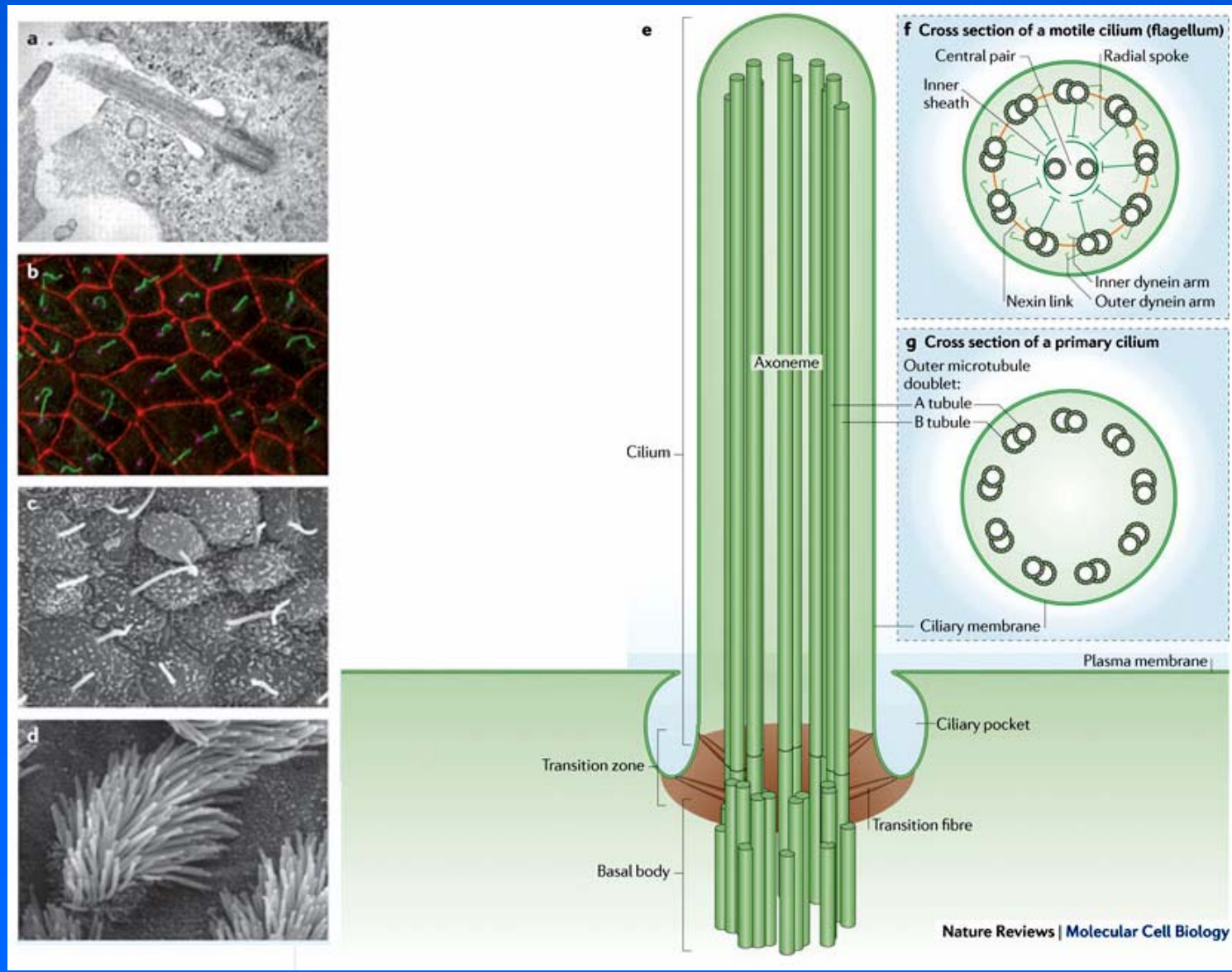
**Функции: киноцилии – моторные, стереоцилии – сенсорные.**

# Ресничный эпителий



**Многочисленные реснички одинаковой длины и диаметра бьются на поверхности эпителиальных клеток.**

# Киноцилии и стереоцилии



# Виды клеточной подвижности

Движение бактерий: с помощью вращающихся жгутиков; реактивное движение по субстрату (цианобактерии).

## Эукариоты:

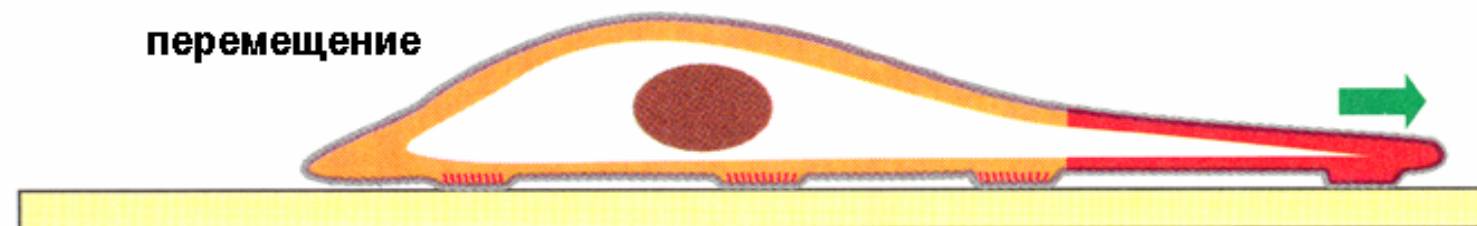
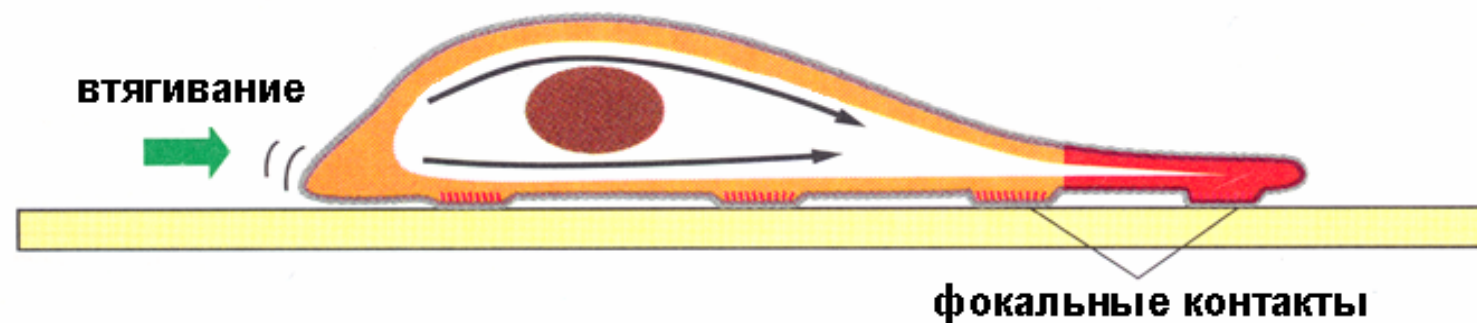
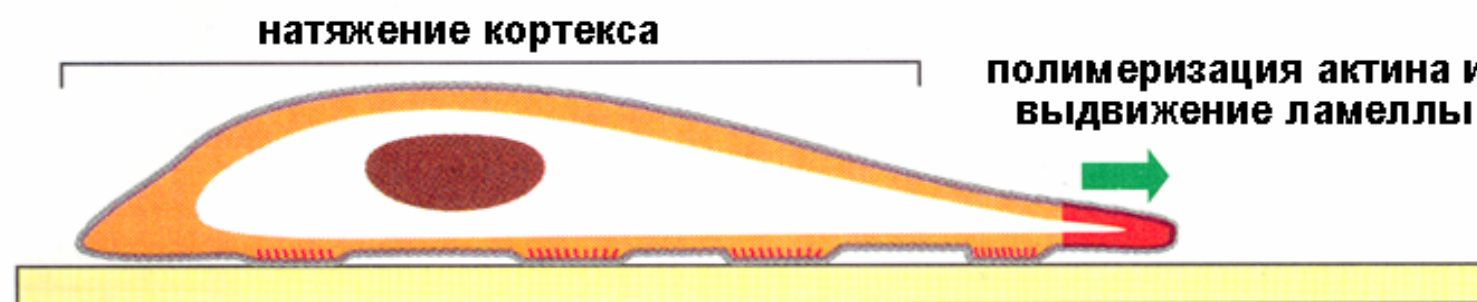
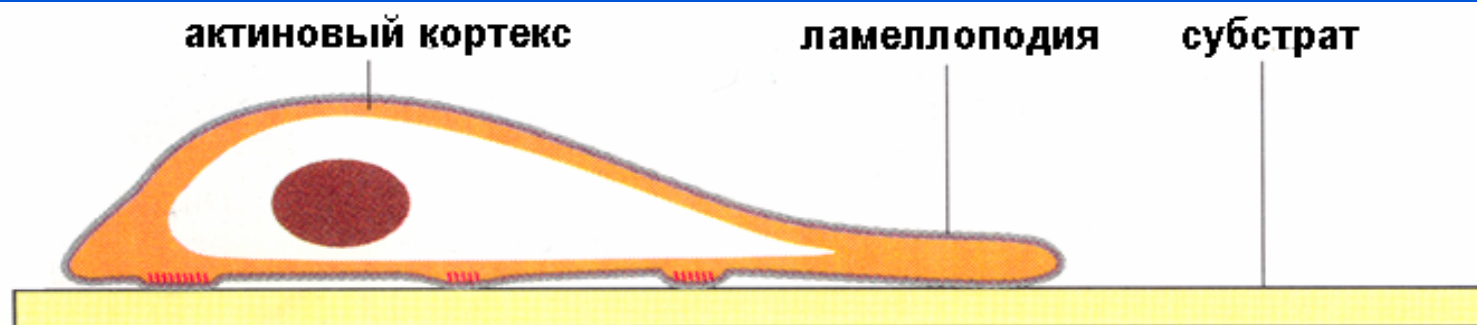
Амебоидное движение – скольжение по субстрату с образованием псевдоподий.

Мезенхимное движение и движение клеточных пластов – движение распластанных клеток с образованием и закреплением ламеллиподий.

Мышечное сокращение – подтягивание клетки с помощью специализированных актомиозиновых комплексов.

Движение с помощью ресничек и жгутиков – плавание в толще воды.





# Локомоция клеток на субстрате

Актиновые филаменты быстро полимеризуются на переднем краю (филоподии, ламеллоподии) и край клетки прикрепляется к поверхности.

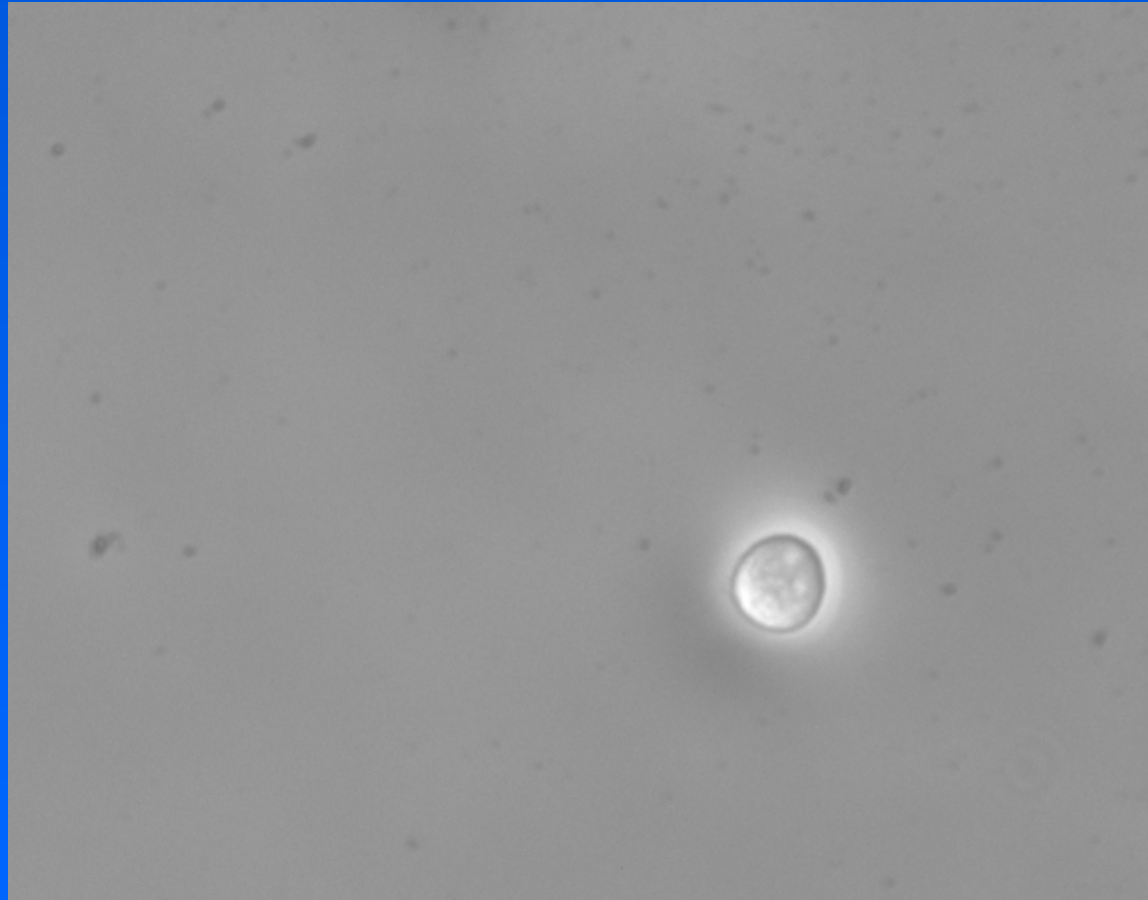
В ламелле постоянно идет ретроградный ток цитоплазмы, поэтому неприкрепившиеся области втягиваются в тело клетки.

Ламелла прикрепляется к субстрату с помощью фокальных контактов. В малоподвижных клетках фокальные контакты через систему стресс-фибрилл развивают значительное тянущее усилие и растягивают клетку или стягивают субстрат.

Расширение ламеллы ограничивается стабильными краями клетки. Механизм стабилизации клеточного края неизвестен.

Перемещение клетки происходит вследствие дисбаланса сил прикрепления на переднем и заднем краях. Два вида перемещений: быстрое («скольжение») слабо прикрепленных клеток и медленное («блуждание») хорошо прикрепленных клеток.

# Амебоидное движение фибробластов



# Случайное и направленное движение клеток

**Блуждание** – прямолинейные отрезки не превосходят 1-2 диаметров клетки. Пример – выползание фибробластов в рану.

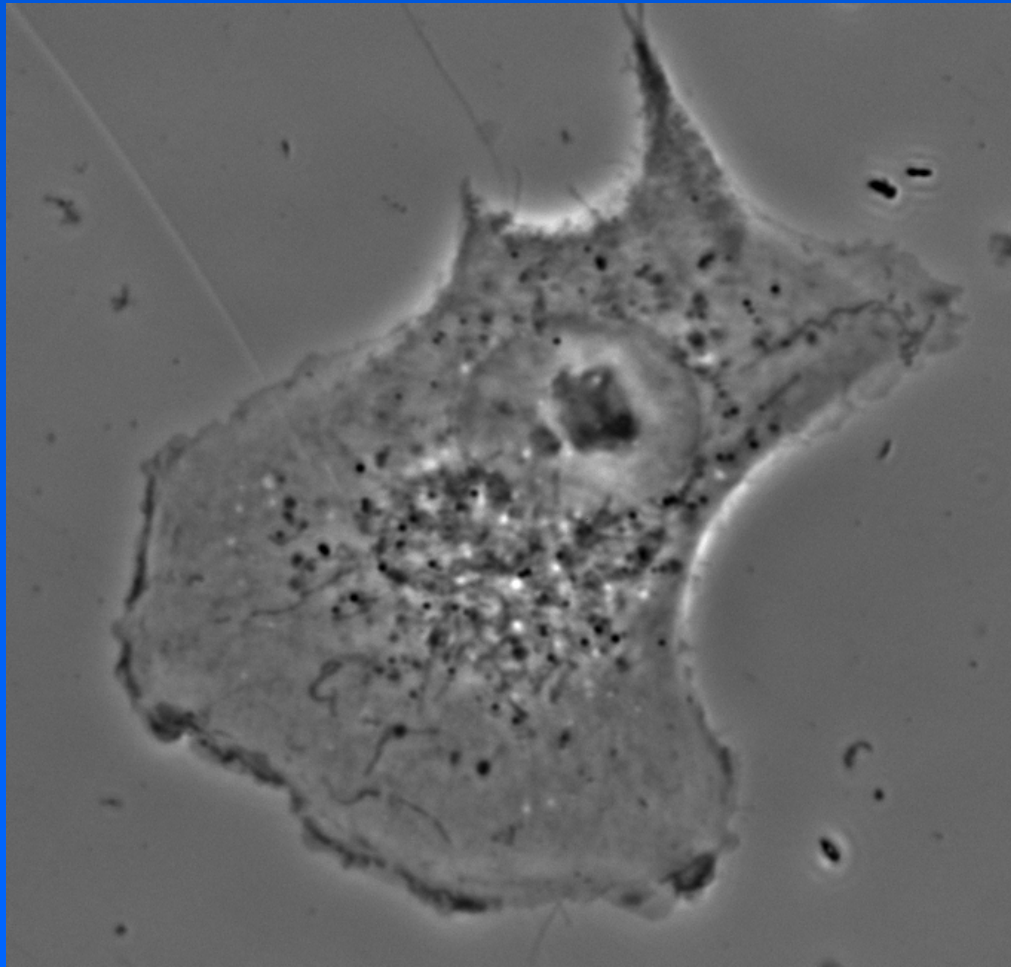
**Направленное движение** – стабильная поляризация клетки, отклонения от прямолинейного движения невелики.

**Хемотаксис** – направленное движение в градиенте концентрации вещества (аттрактанта или репеллента). Клетки приобретают стабильный ведущий край.

**Примеры хемотаксиса:** движение нейтрофилов в рану, сползание миксамеб в плодовое тело.

**Хемотаксис у бактерий** – вероятностный процесс изменения направления движения.

# Движение в фибробласте



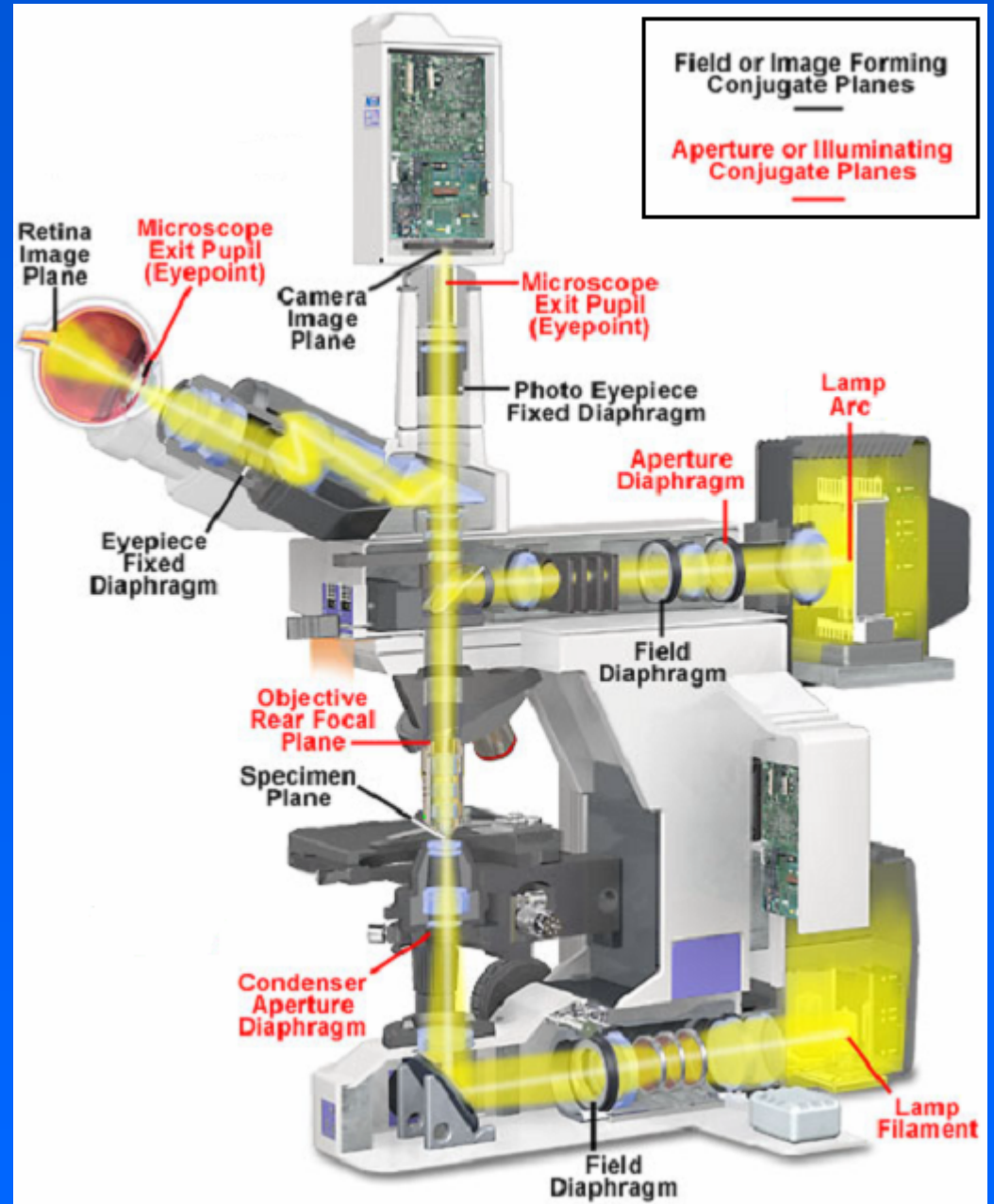


# Современная микроскопия

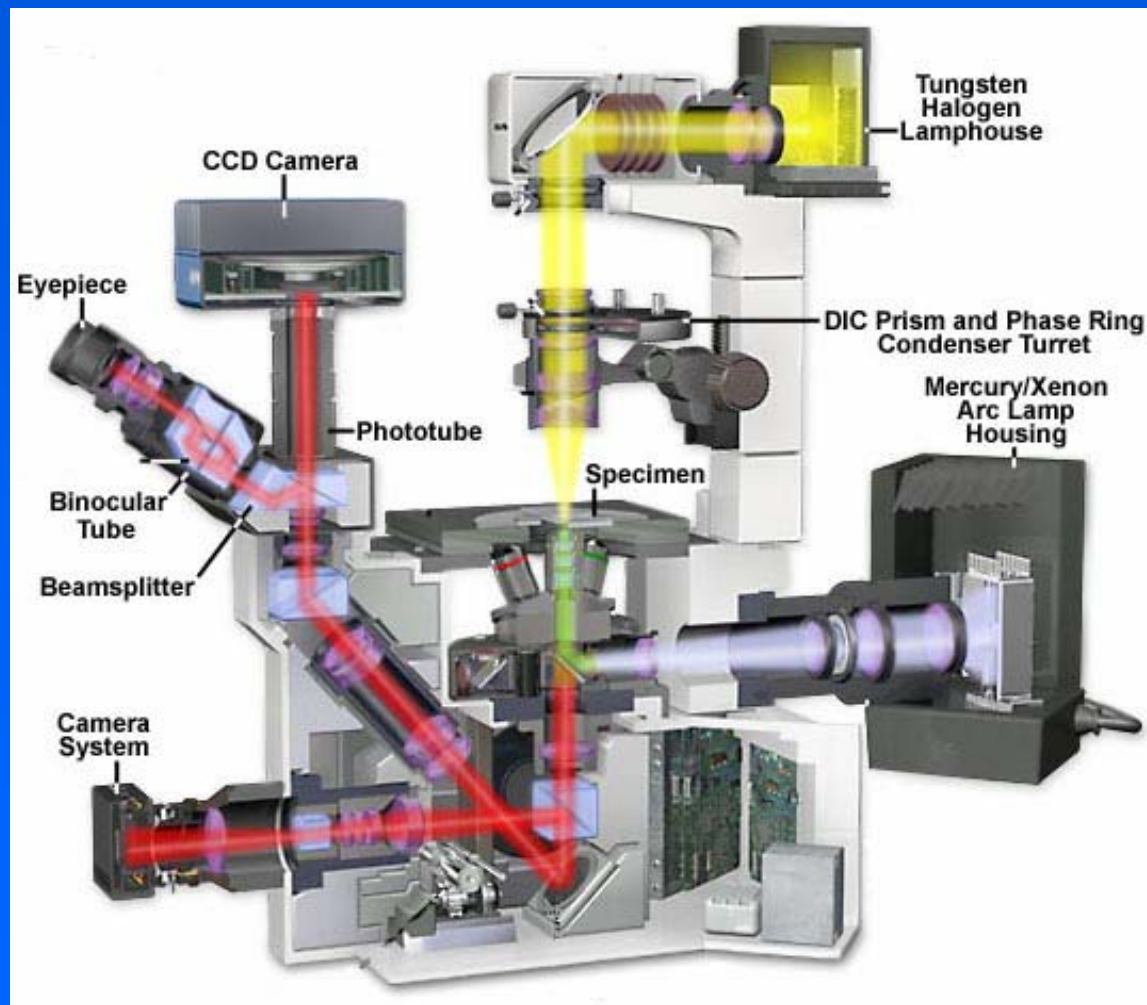
# Современный исследовательский микроскоп

1. **Флюоресцентный осветитель: металл-галидная лампа (со световодом) или блок из твердотельных лазеров.**
2. **Механические затворы и АОПФ (АОТФ) – акусто-оптические перестраиваемые фильтры.**
3. **Наружные порты для присоединения камер и насадок.**
4. **Пьезо-управляемый столик.**

# Общий вид флуоресцентного микроскопа



# Общий вид инвертированного флуоресцентного микроскопа



# Охлаждаемая ПЗС камера

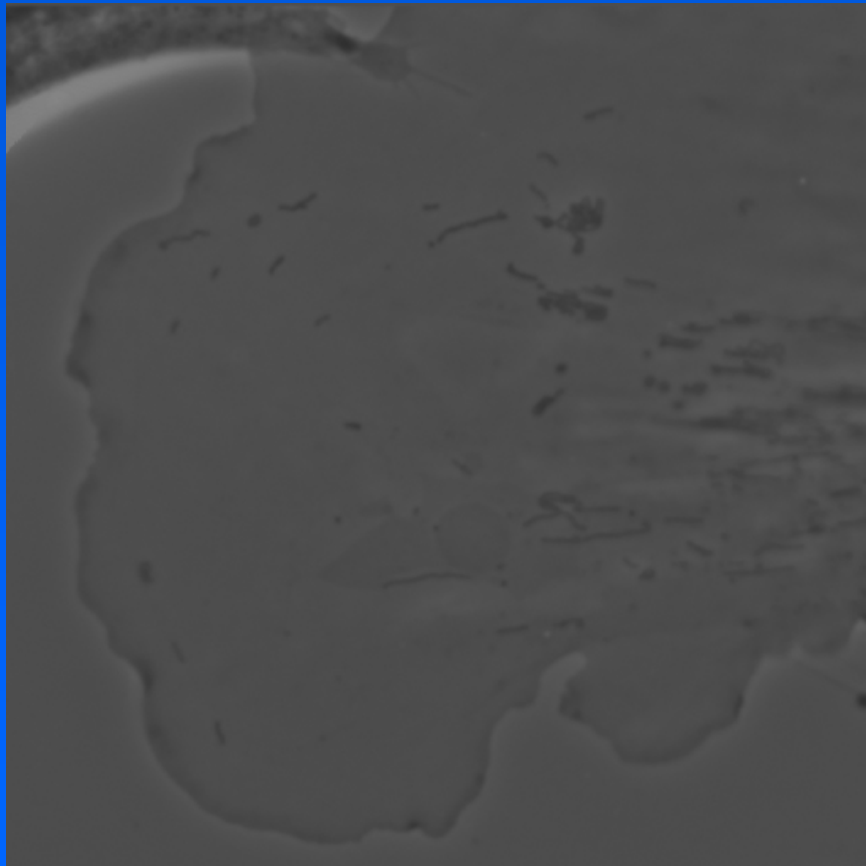


В основе формирования изображения лежит накопление фотоэлектронов на мишени. Камеры обеспечивают квантовый выход (к.п.д.) свыше 90% в области 500-800 нм и обладают линейностью в широком диапазоне освещенностей.

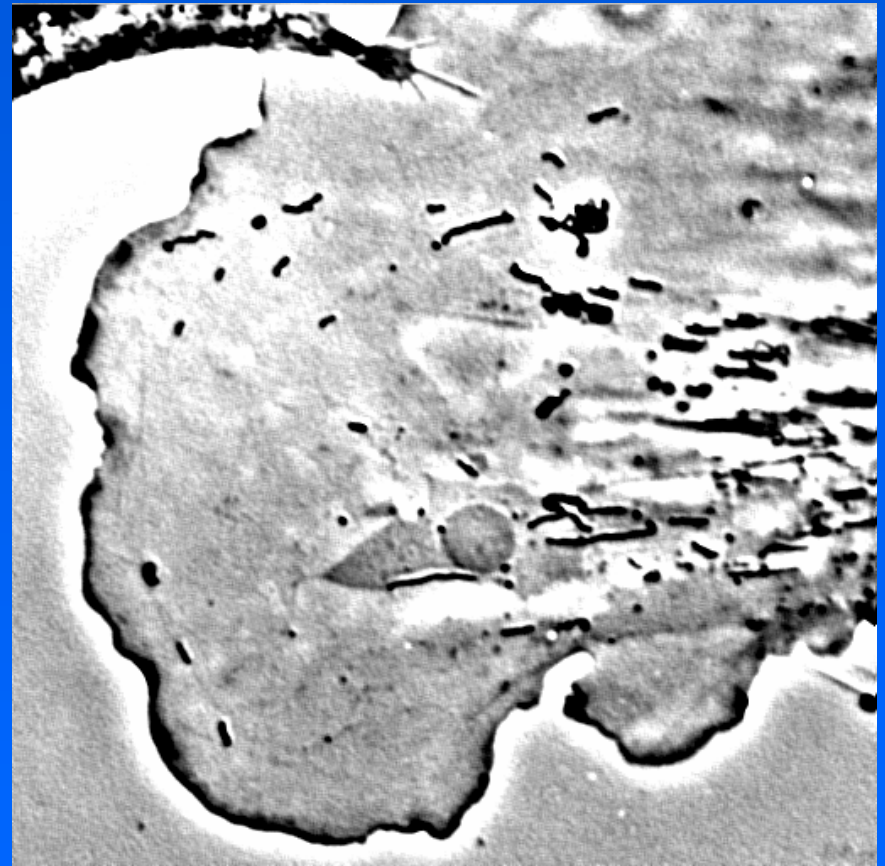
Диапазон оцифровки сигнала – 14-16 бит. Размер матрицы – от 512x512 до 2048x2048 пикселей. Тактовая частота – 5-20 МГц.



# Усиление фазового контраста

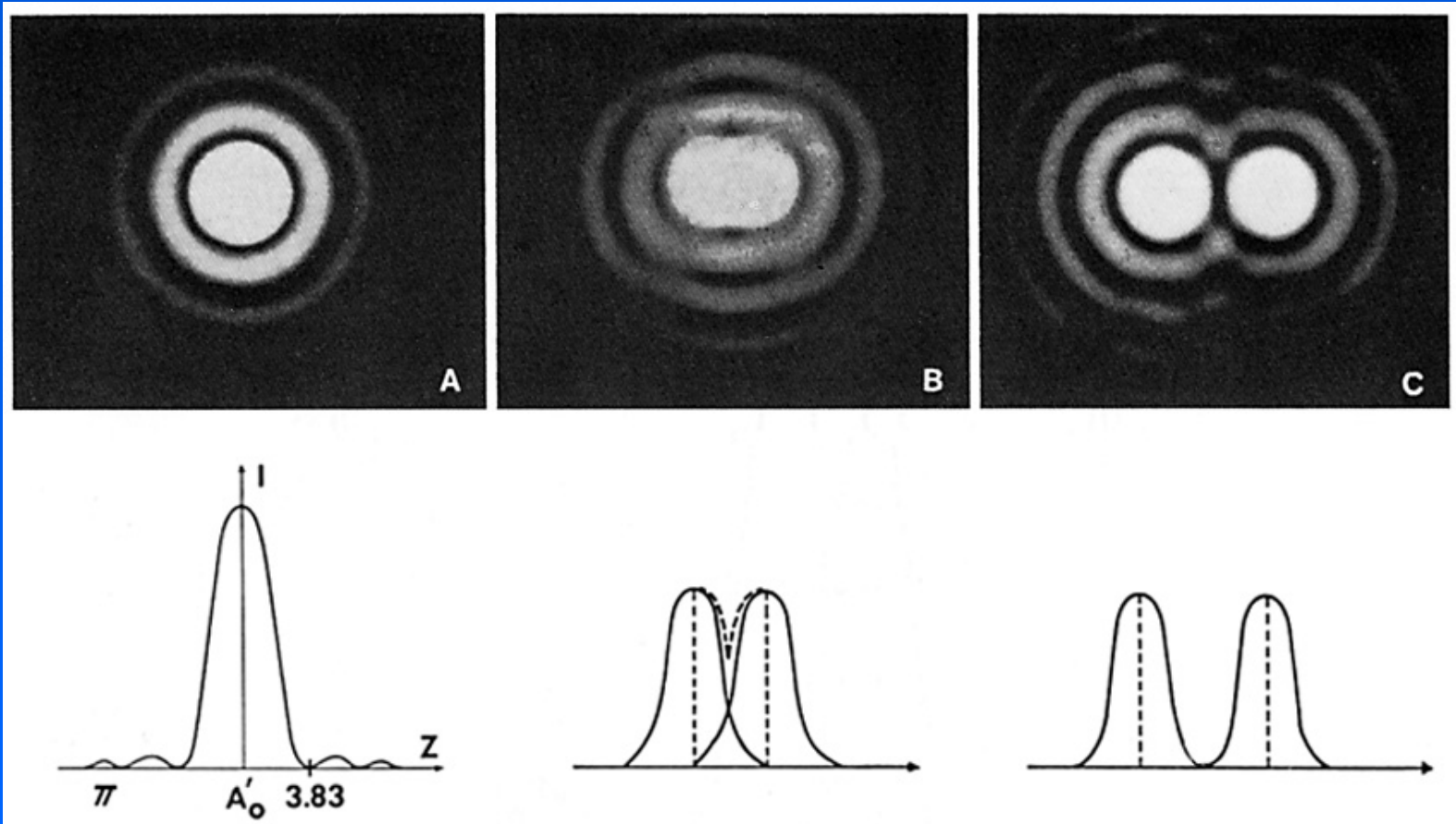


**Исходный**



**Усиление в 50 раз**

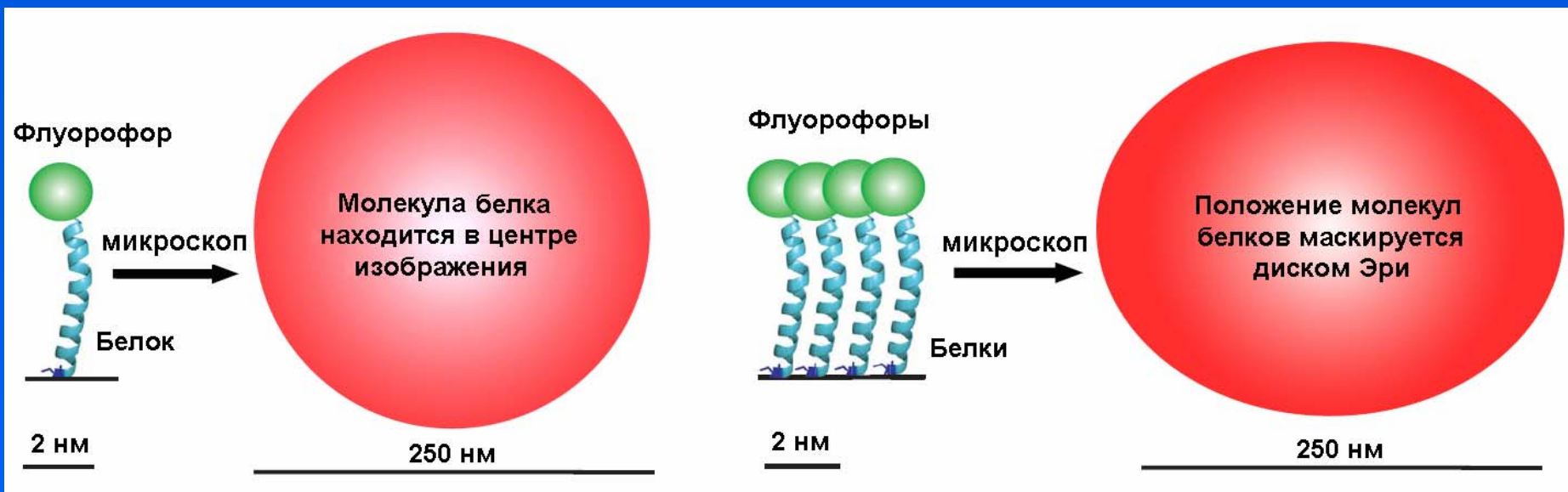
# Дифракционный предел в микроскопии



Сигнал от точечного источника превращается в диск Эри.

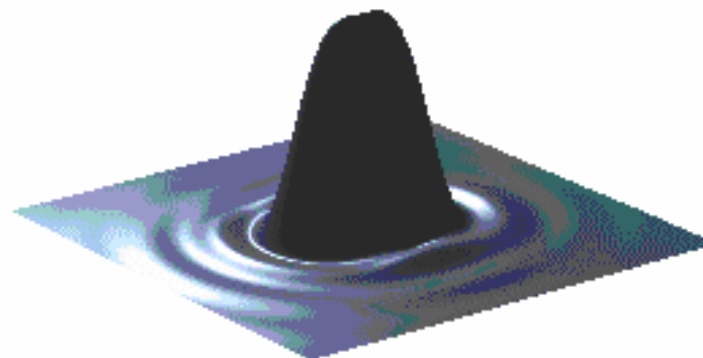
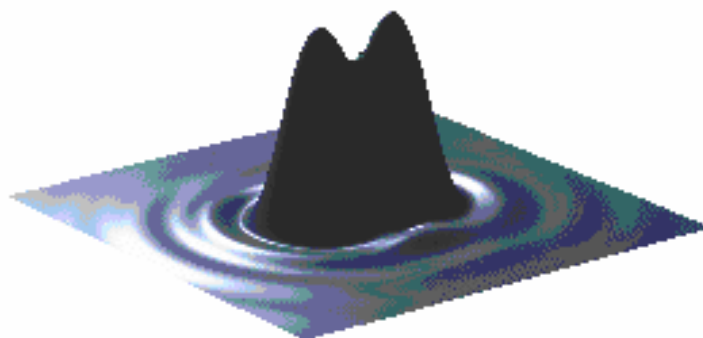
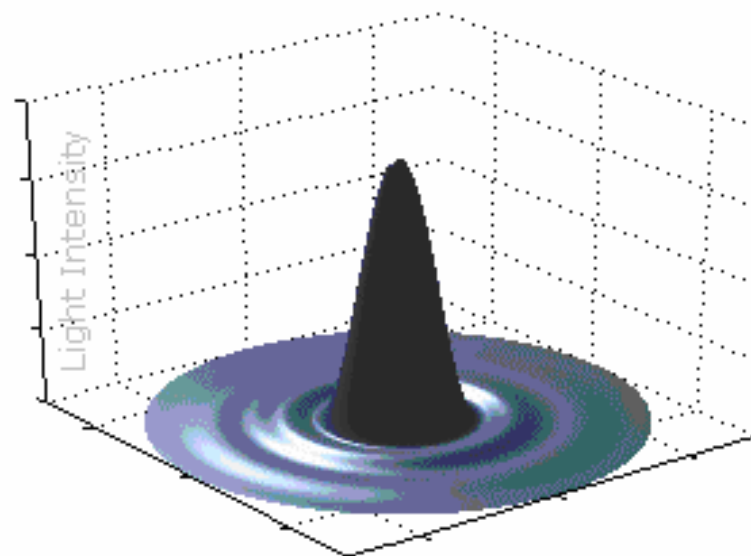
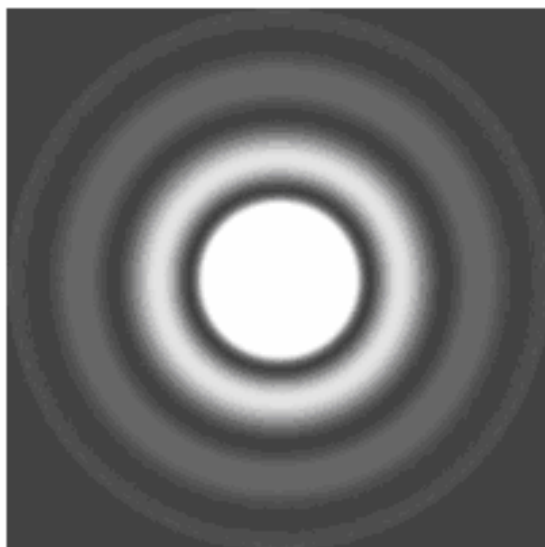
Разрешение традиционного микроскопа ограничивается критерием Рэля (Спарроу), то есть радиусом диска Эри.

# Микроскопия одиночных молекул



**Диск Эри маскирует близко расположенные молекулы флуорофоров, превращая их в равномерно светящееся пятно. Отдельные флуоресцирующие молекулы можно идентифицировать по характерному свечению – оно постоянно, затем внезапно полностью гаснет.**

# Диск Эри и проблема разрешения

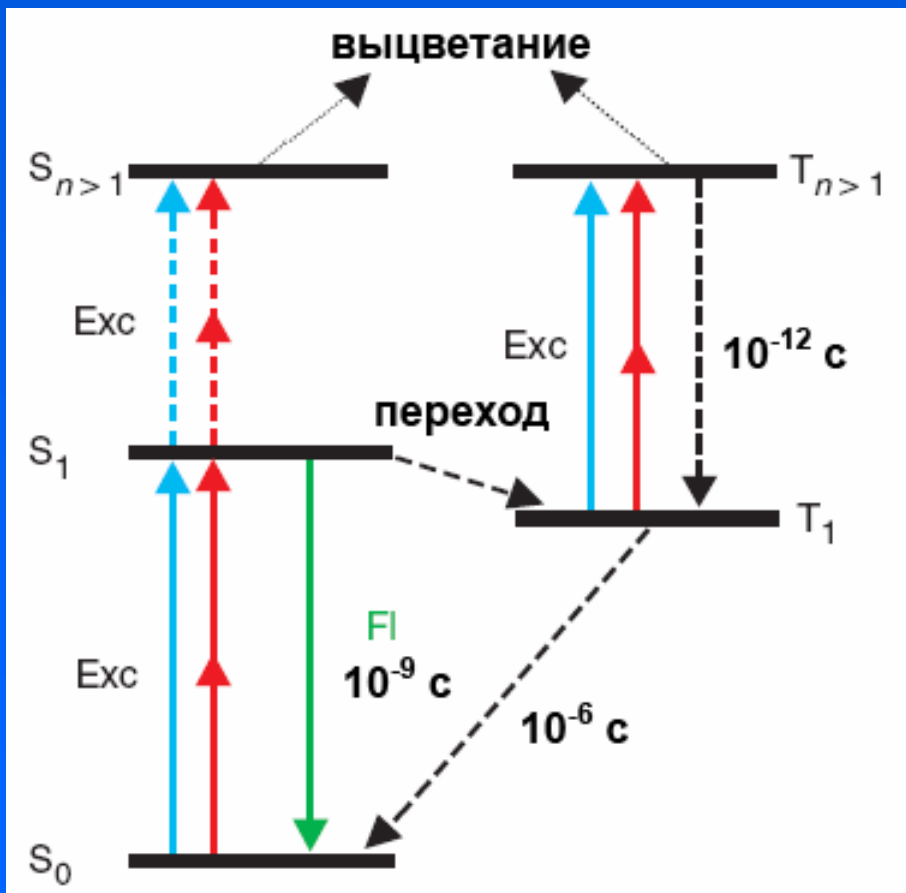


# Преодоление дифракционного предела в микроскопии

1. Детекция сигнала от отдельных флюоресцирующих молекул – равномерная флюоресценция, которая внезапно полностью гаснет.
2. Установка камеры на малый эквивалентный размер пиксела – он составляет 60 нм или меньше или сканирование с малым шагом (10-20 нм).
3. Восстановление центров дисков Эри (центроидов) на множестве кадров (~1000) или подавление флюоресцентного сигнала по периферии диска Эри в процессе сканирования.
4. Суперразрешение определяется в первую очередь количеством фотонов от каждой молекулы флюорохрома.



# Увеличение стабильности за счет импульсного облучения



**S** – возбужденное состояние

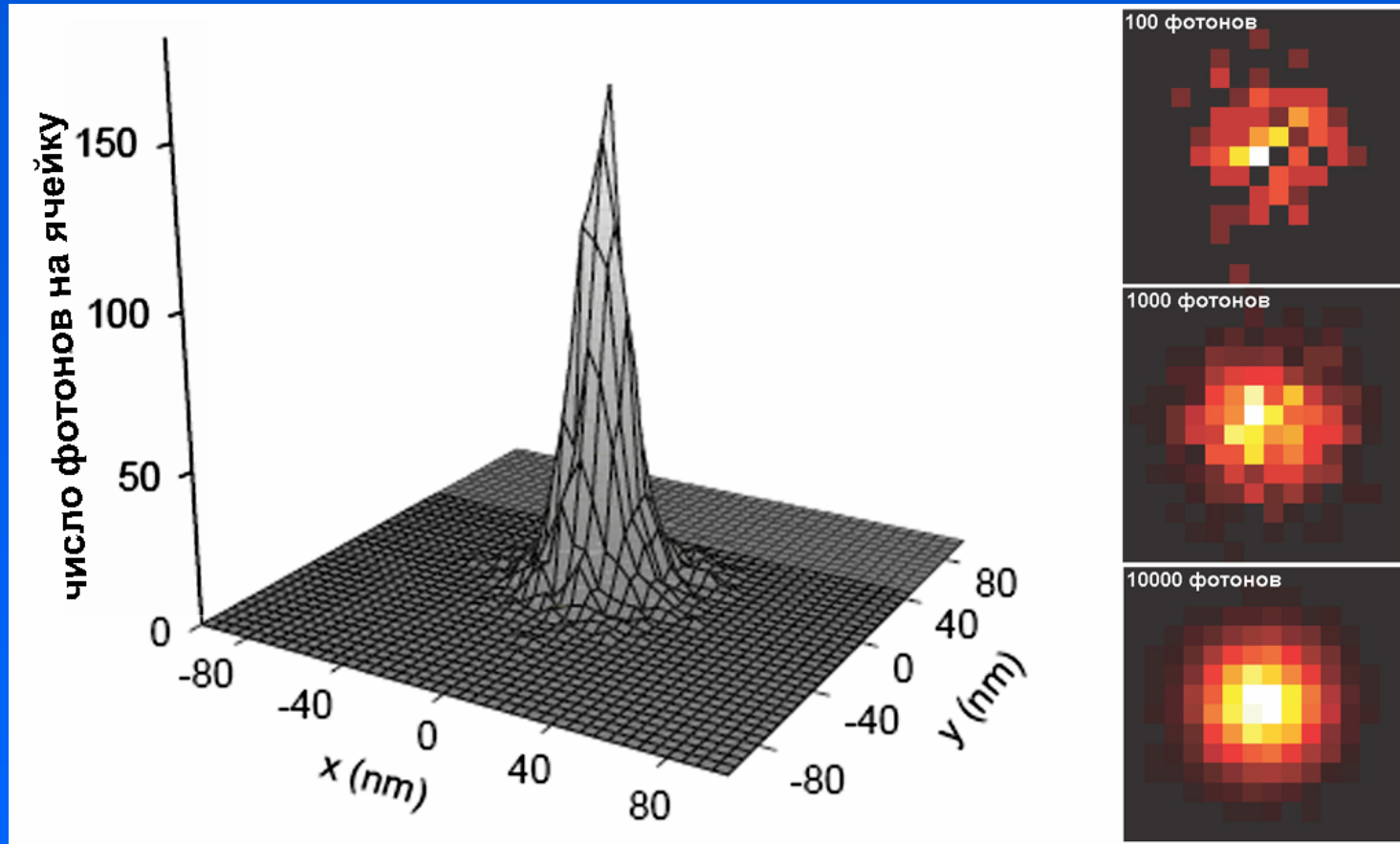
**T** – триплетное состояние

Возбуждение –  $10^{-15}$  c;

флюоресценция –  $10^{-9}$  c;

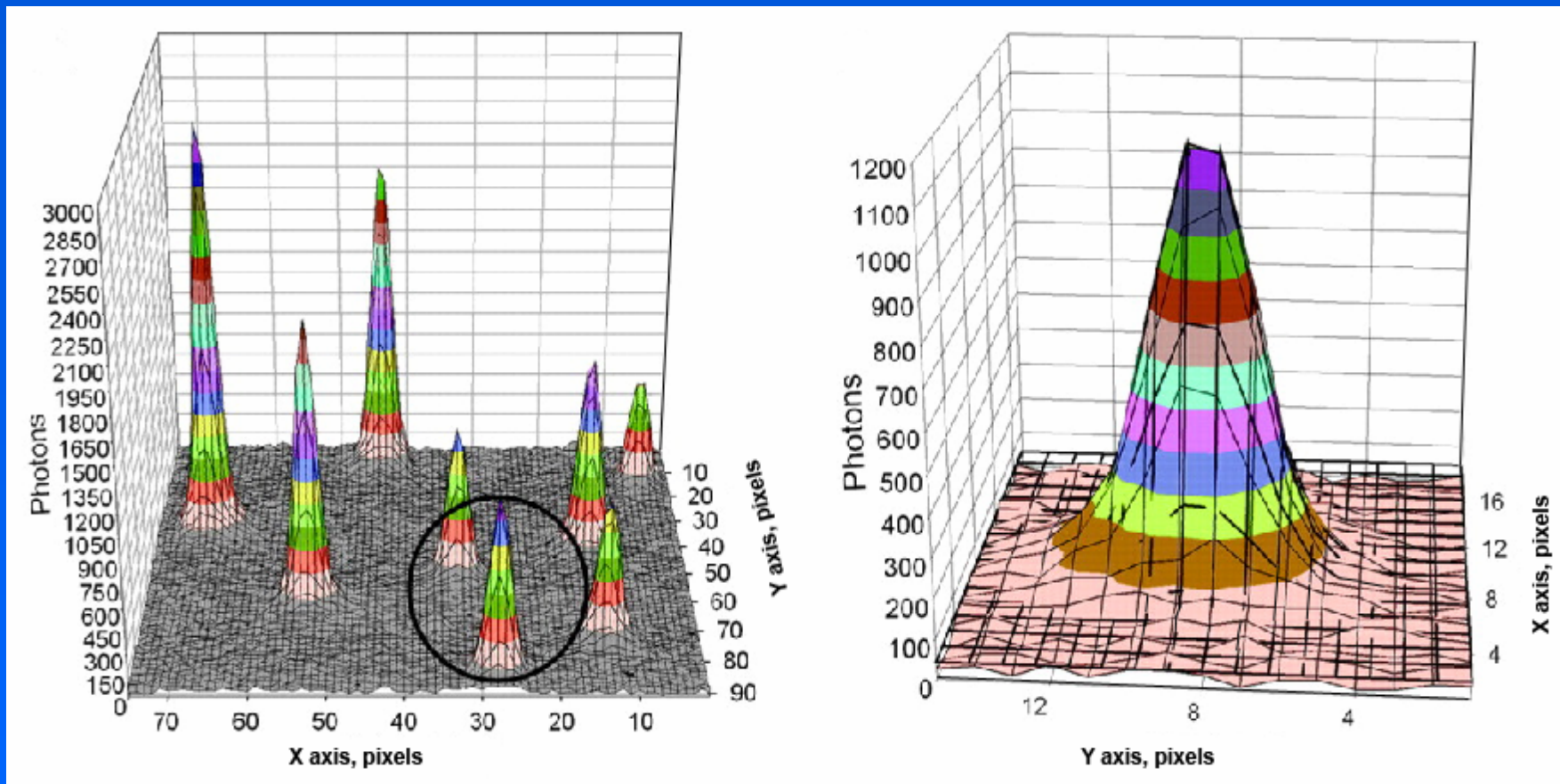
релаксация триплета –  $10^{-6}$  c

# Локализация точечного источника света в микроскопии



Точность восстановления центроида определяется количеством детектированных фотонов. Погрешность локализации молекулы уменьшается в ростом времени накопления сигнала.

# Восстановление PSF

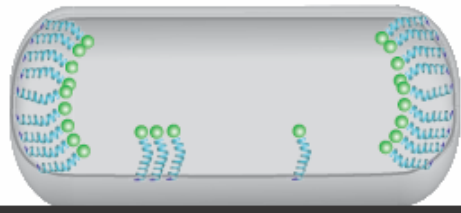


**Пример восстановления сигнала от одиночных молекул Су-3. Время накопления – 0,5 с; среднее число фотонов – около 30000.**

# Локализация отдельных молекул

Стандартное флуоресцентное изображение

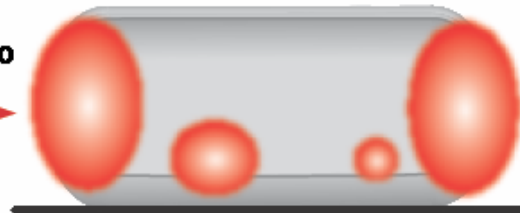
реальная структура



все молекулы  
наблюдаются одновременно

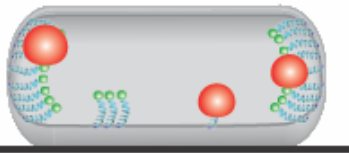


микроскопическая картина



Наблюдение отдельных молекул

1



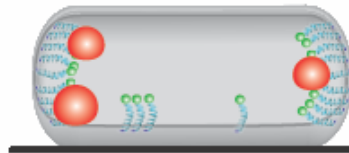
+

2



+

3



суммация

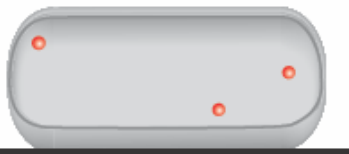


обычная картина



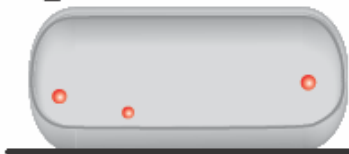
Локализация отдельных молекул

1



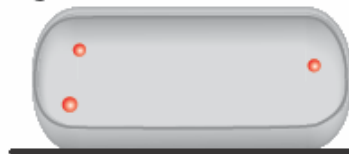
+

2



+

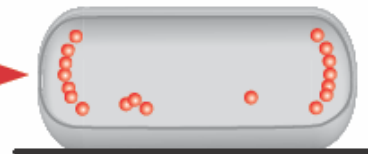
3



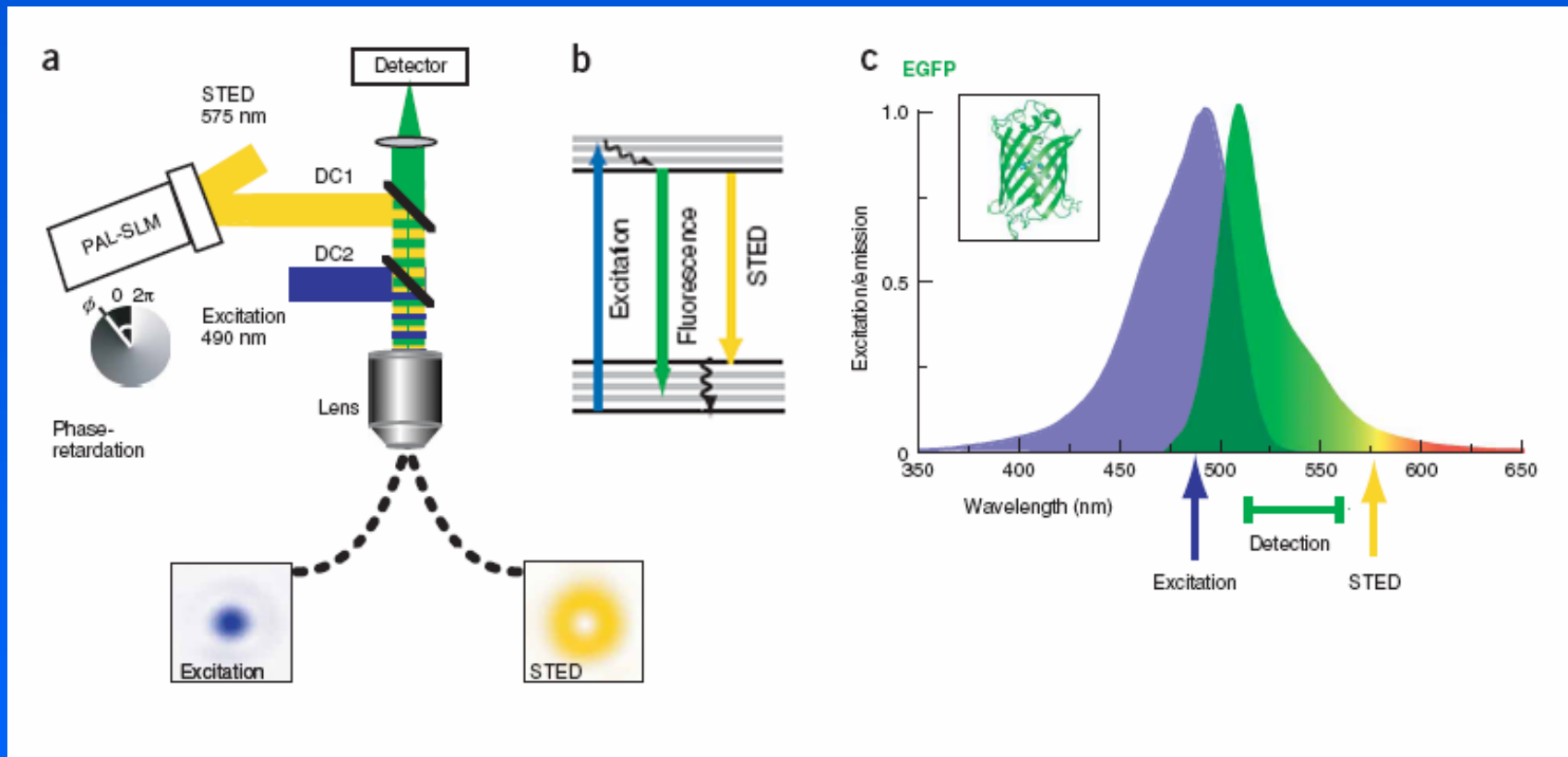
суммация



восстановленное  
изображение



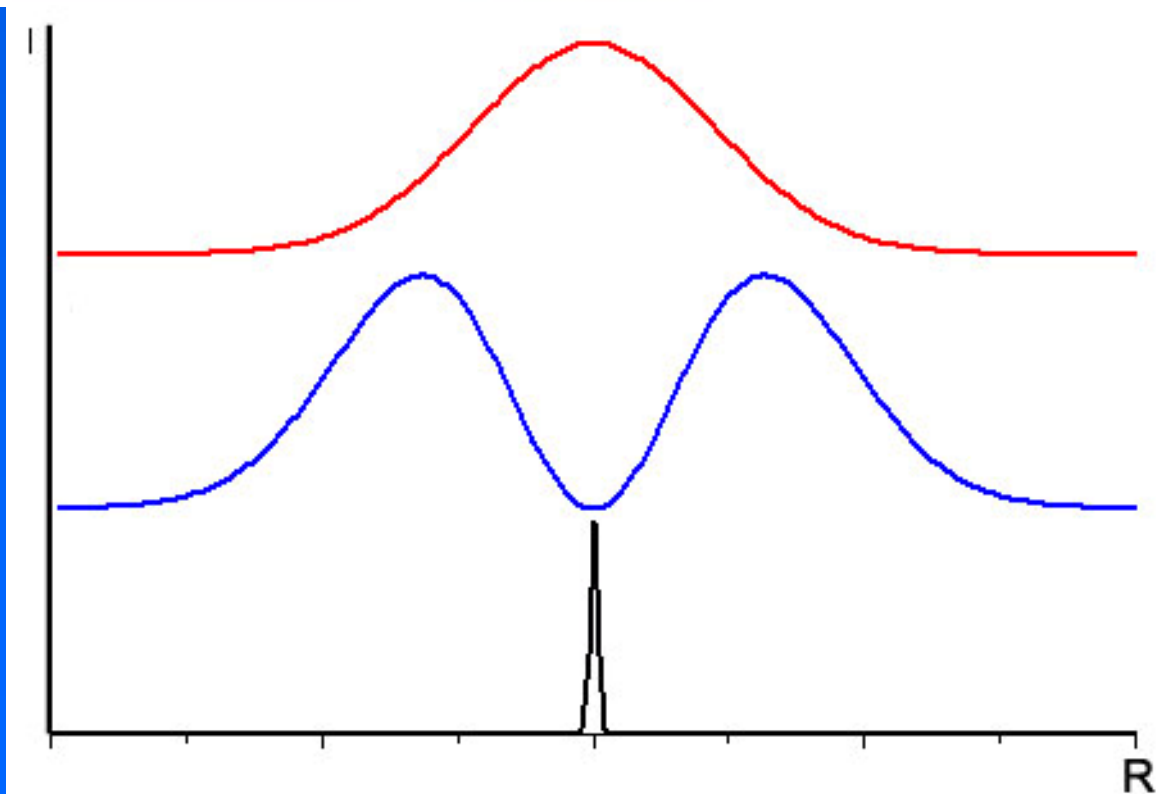
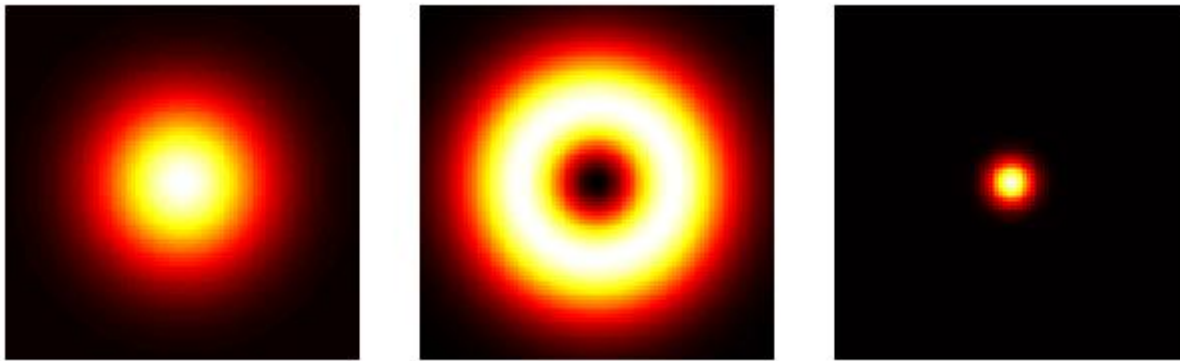
# STED микроскопия



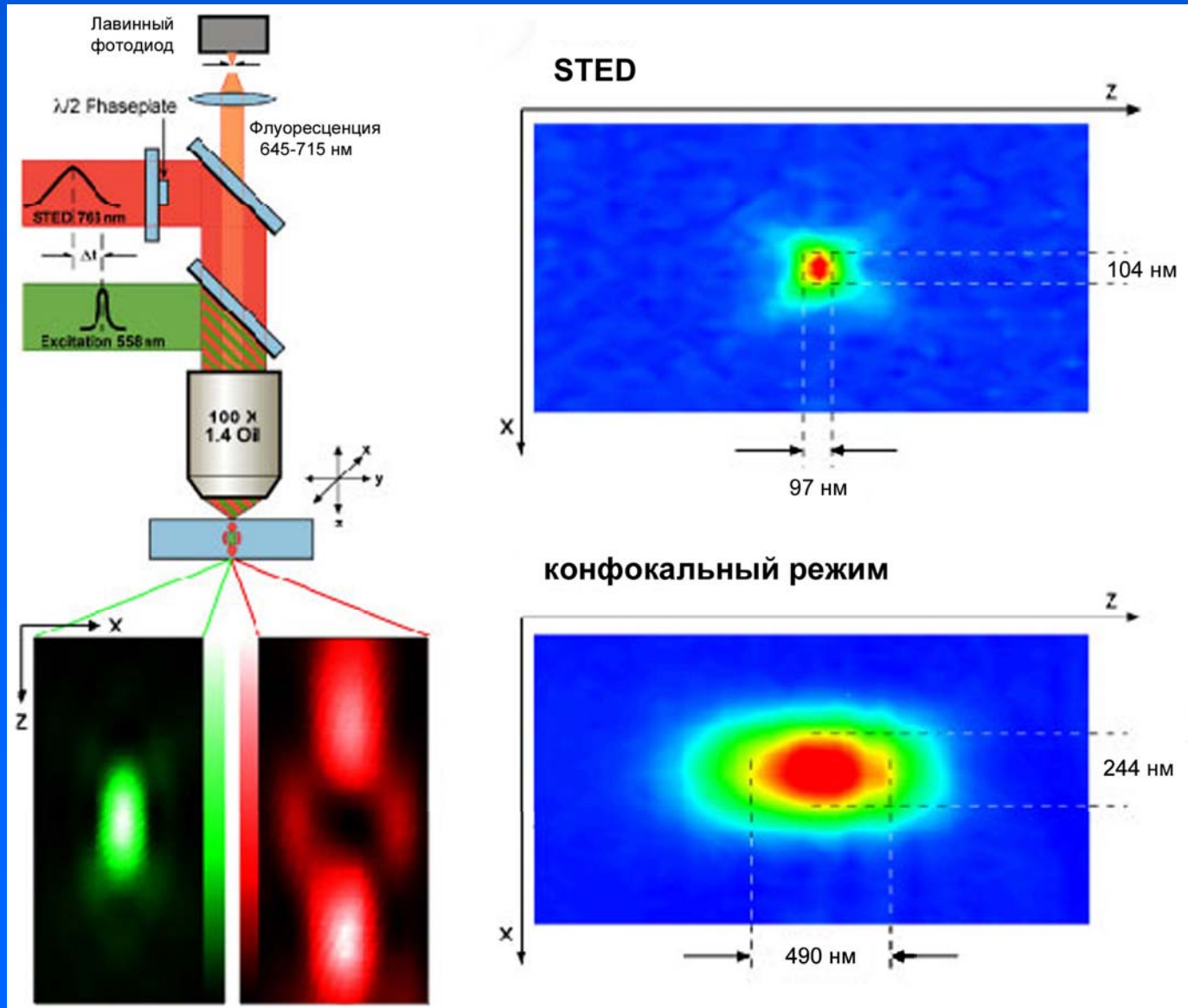
Флюоресценция на периферии диска Эри подавляется гасящим импульсом тороидальной формы. Микроскопия осуществляется в сканирующем режиме с малым шагом. (Hell S. W.)



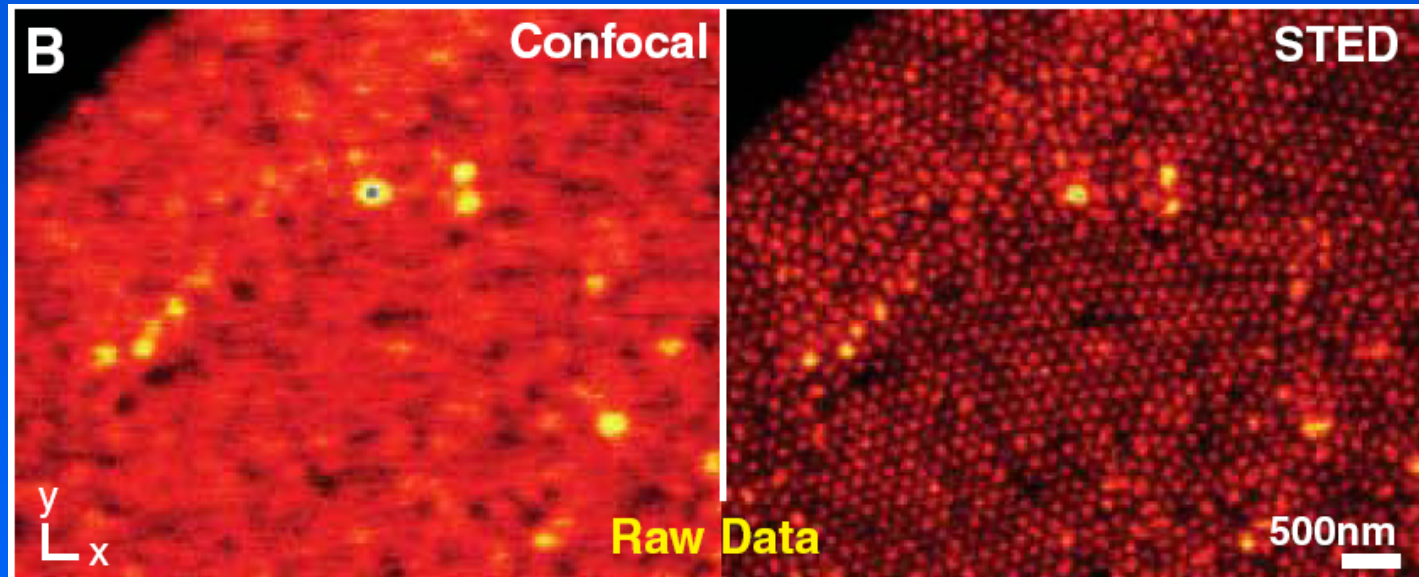
# STED микроскопия



# STED микроскопия – вид перетяжки



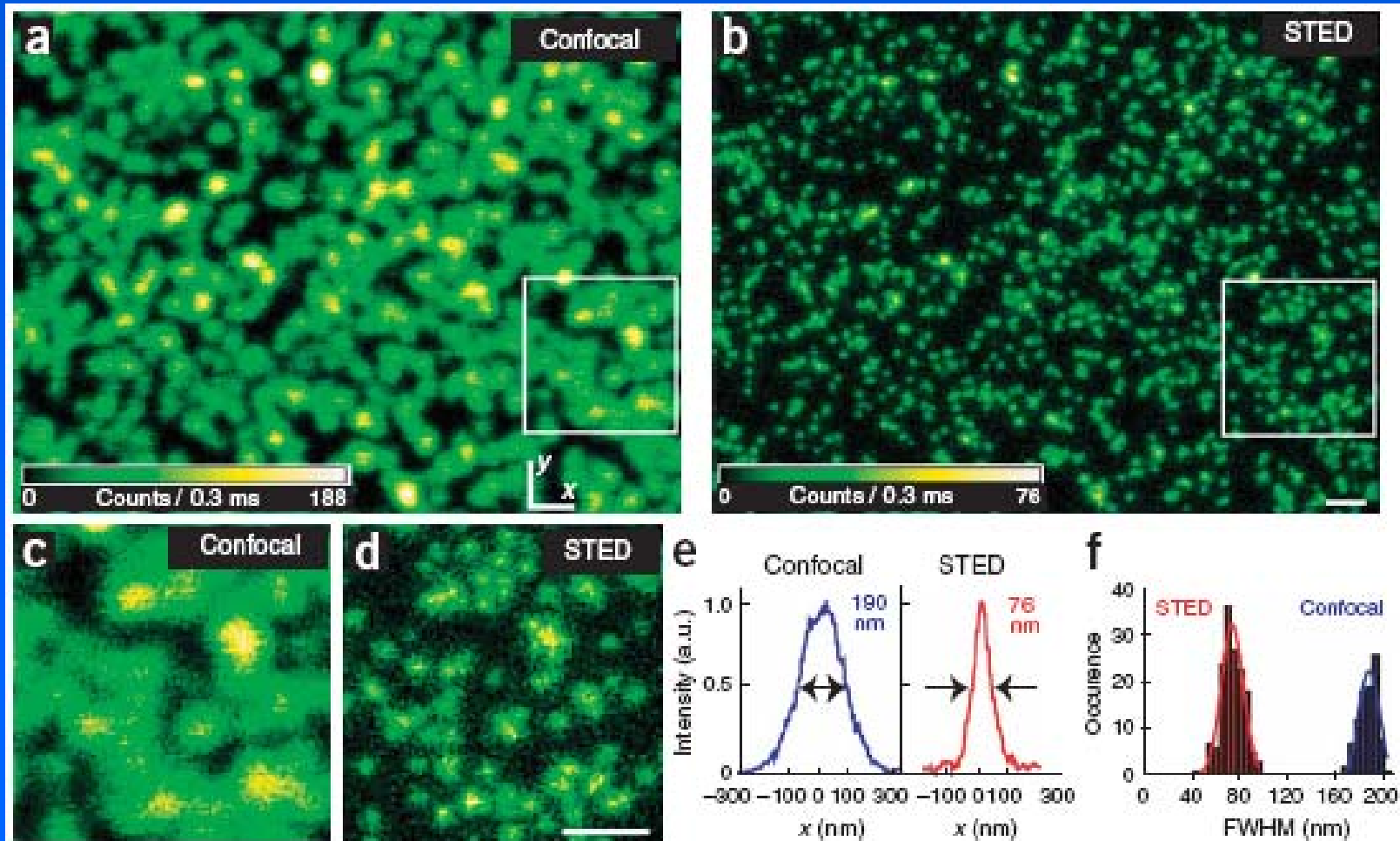
# Разрешающая способность в режиме STED



$$\Delta r \approx \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \sqrt{1 + I_{\max} / I_s}}$$

$I_{\max}$  – мощность гасящего импульса;  
 $I_s$  – мощность возбуждающего импульса

# Меченные GFP вирусные частицы (диаметр – 40 нм)



# STORM микроскопия

Два лазера (зеленый/красный) и сближенные красители (Cy-3/Cy-5) – длительность флюоресценции регулируется переключением молекулы Cy-5.

Запись изображения идет со скоростью около 20 кадров в секунду (время накопления сигнала – около 40 мс, число квантов – от 600 до 3000).

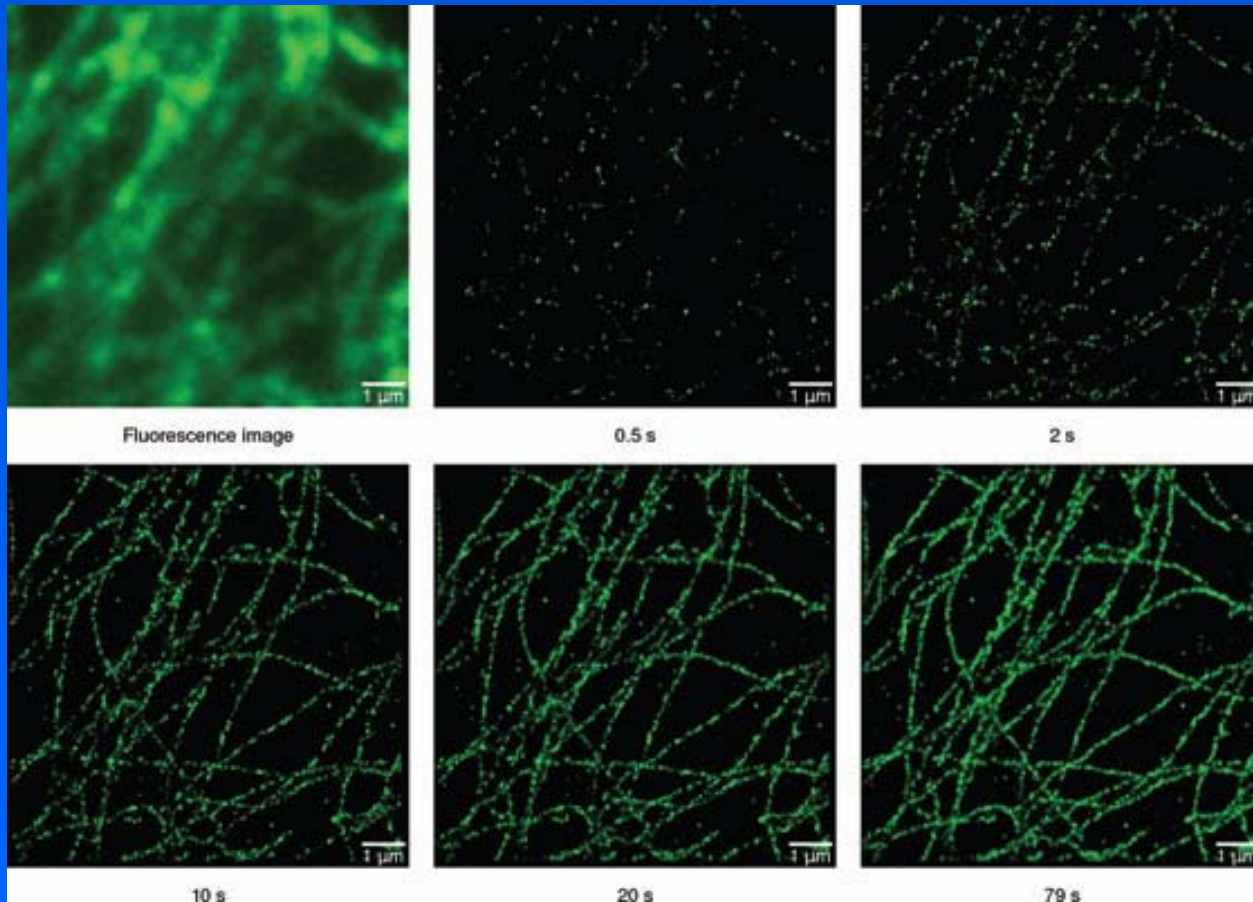
Восстановление центроидов при случайном возбуждении отдельных молекул флюорохрома. Достигнутая точность – около 25 нм.

Синтез полного изображения проводится по рассчитанным центроидам (порядка 1000 кадров).

Общее время получения одного кадра – около 2 минут.

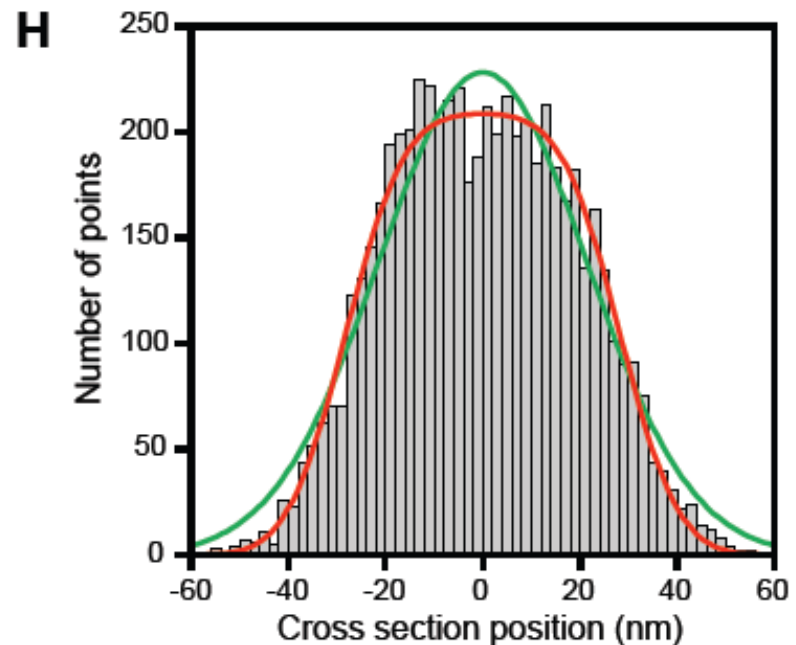
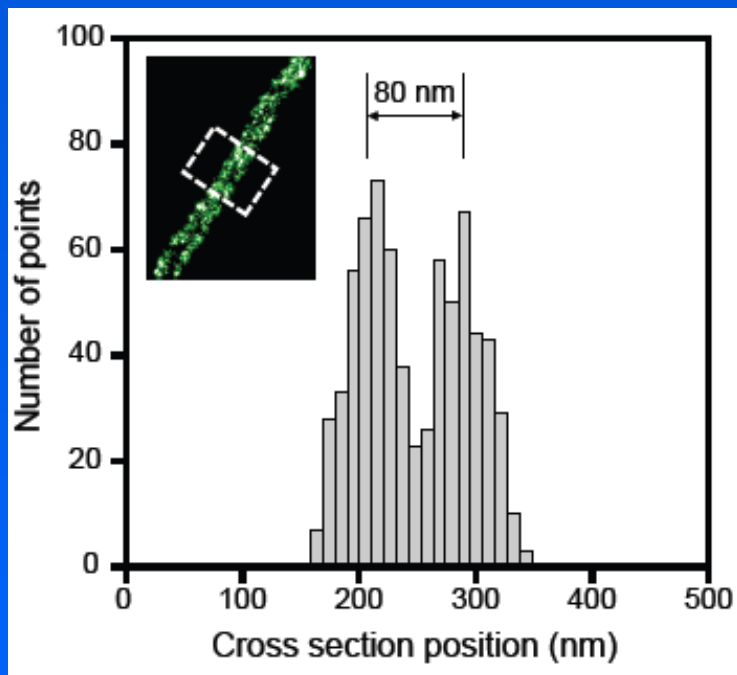


# STORM микроскопия – реконструкция во времени



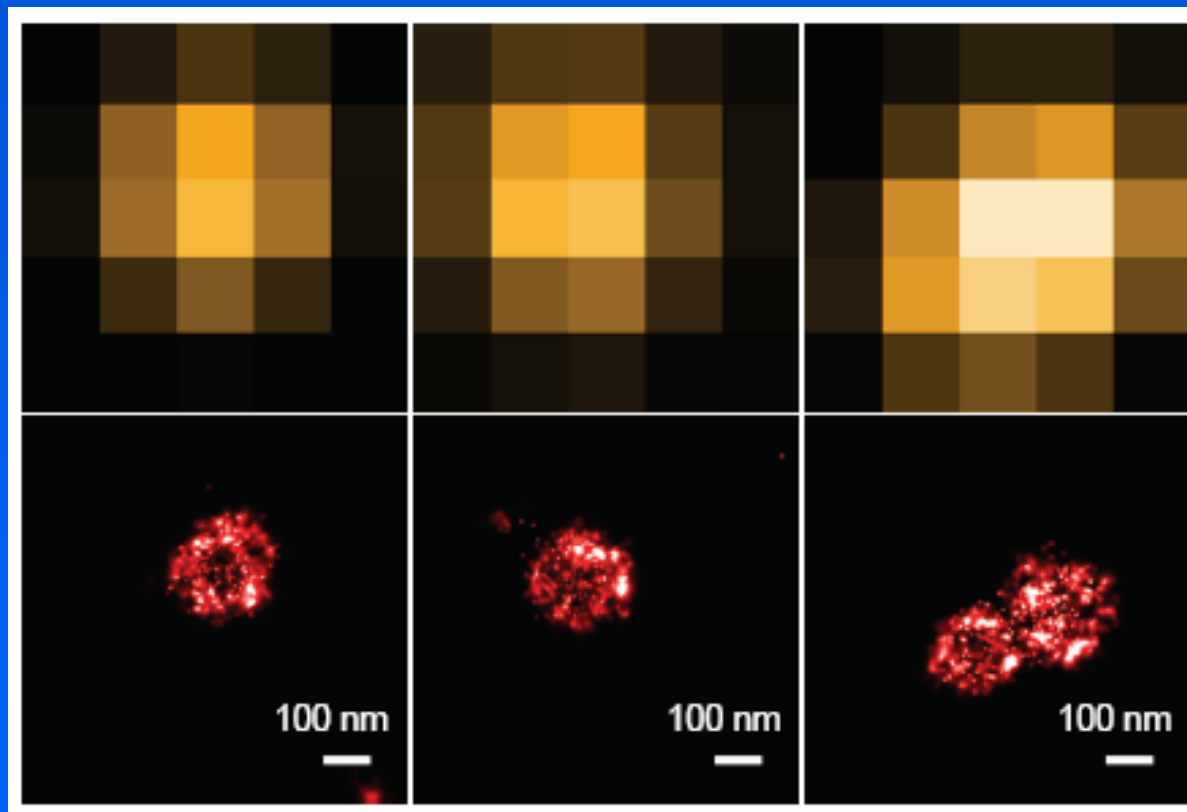
Многokратное сканирование образца позволяет постепенно восстановить изображение микротрубочек в фиксированной клетке. Краситель – Alexa-647. Формат кадра – 64x64 пиксела. Частота сканирования – 1 кГц; восстановлено точек излучения (молекул) – около 730 тыс.

# Восстановление PSF



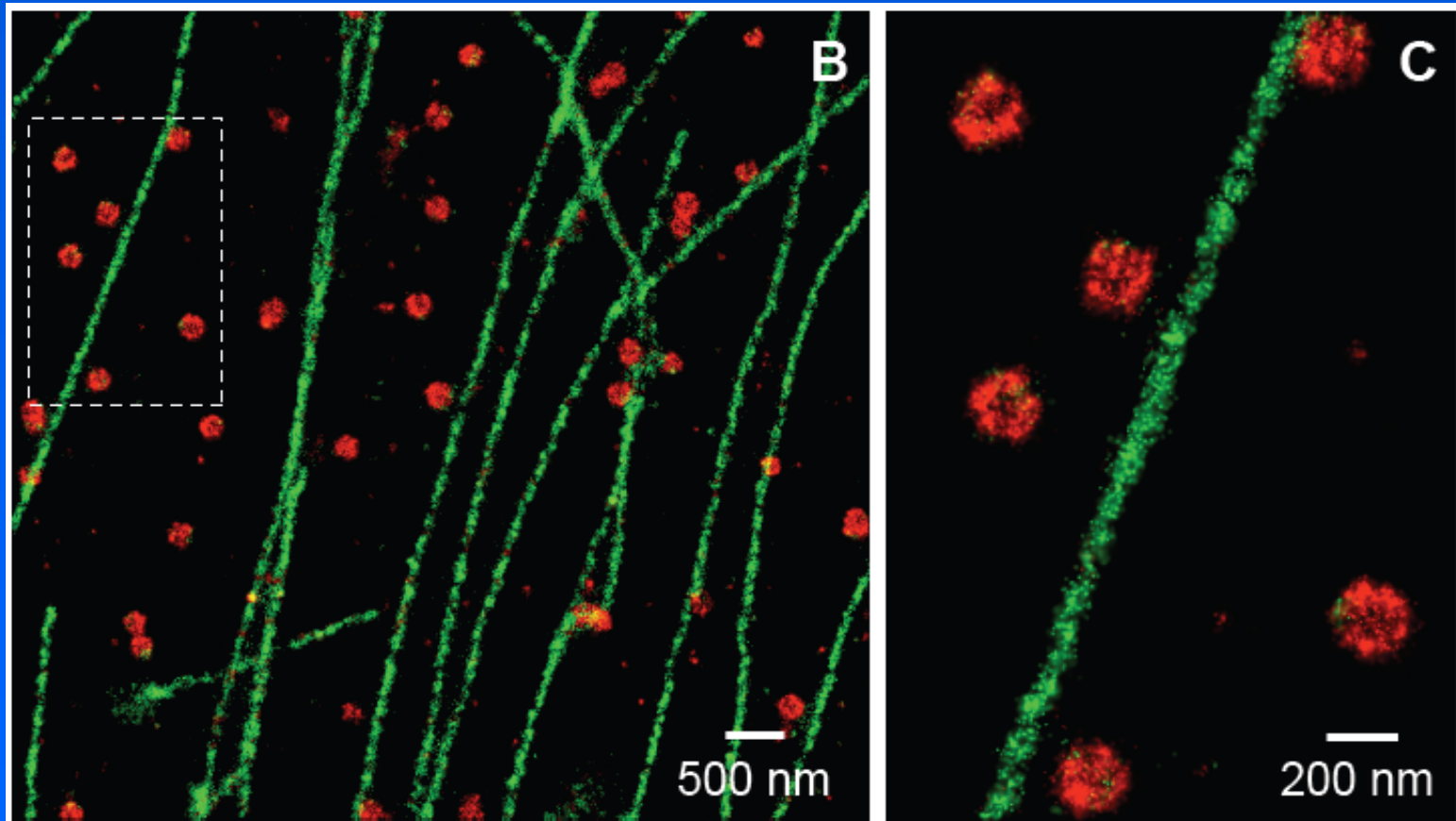
С помощью STORM (слева) и при  
обычной микроскопии (справа)

# STORM микроскопия



**Клатриновые пузырьки при обычной микроскопии (вверху) и после восстановления изображения (внизу)**

# STORM микроскопия, 2 цвета



Клатриновые пузырьки и микротрубочки

# **PALM микроскопия**

**PALM – photoactivated localization microscopy.**

**Изображение складывается из нескольких тысяч последовательных кадров, в каждом из которых возбуждается (активируется) не более 1% флюоресцирующих молекул. Для каждой из молекул компьютером восстанавливается положение ее центроида.**

**Наиболее эффективное применение метода – использование фотоактивируемых флуоресцентных белков.**



# PALM и обычная микроскопия

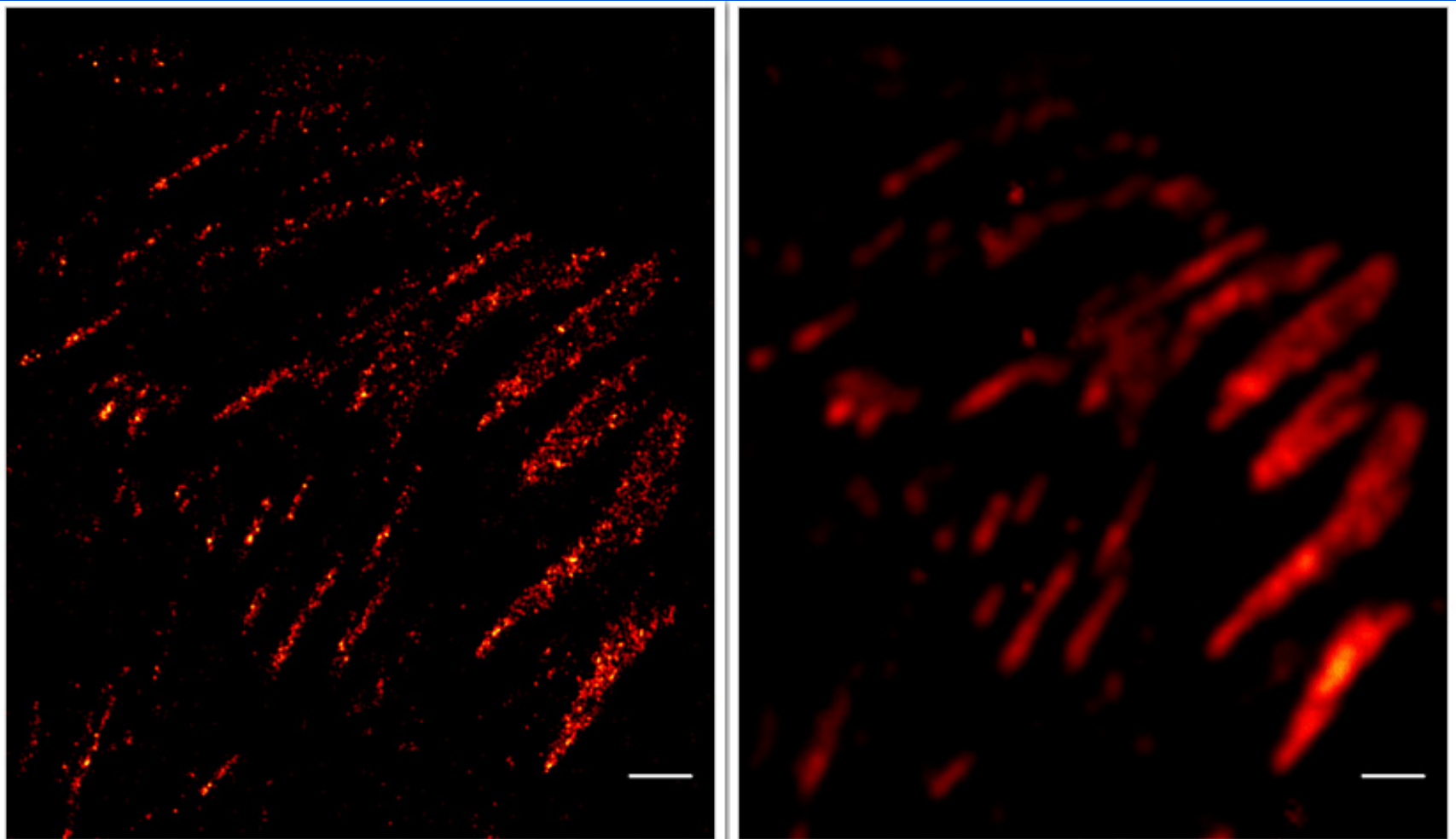


Image of focal adhesions in cultured cells Red: tdEos-Paxillin fusion protein scale bar: 1  $\mu\text{m}$ , construct courtesy of Dr. Shroff

**Фокальные контакты в фибробластах**

# TIRF

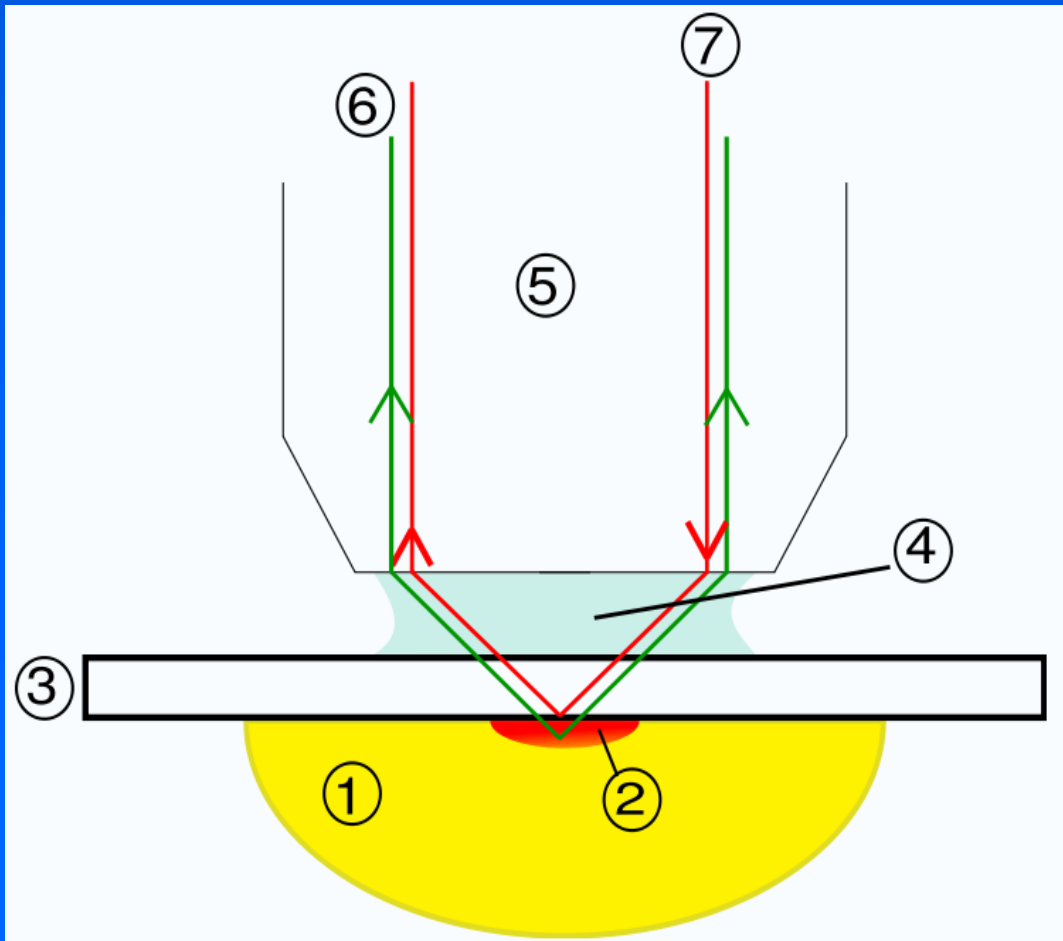
При полном внутреннем отражении в среде, куда не проходит луч света, возникает затухающая волна (evanescent wave).

Возбуждение флюоресценции происходит на глубину около 100 нм.

Световая энергия не проникает внутрь клетки – поэтому возможно использование мощного лазера.

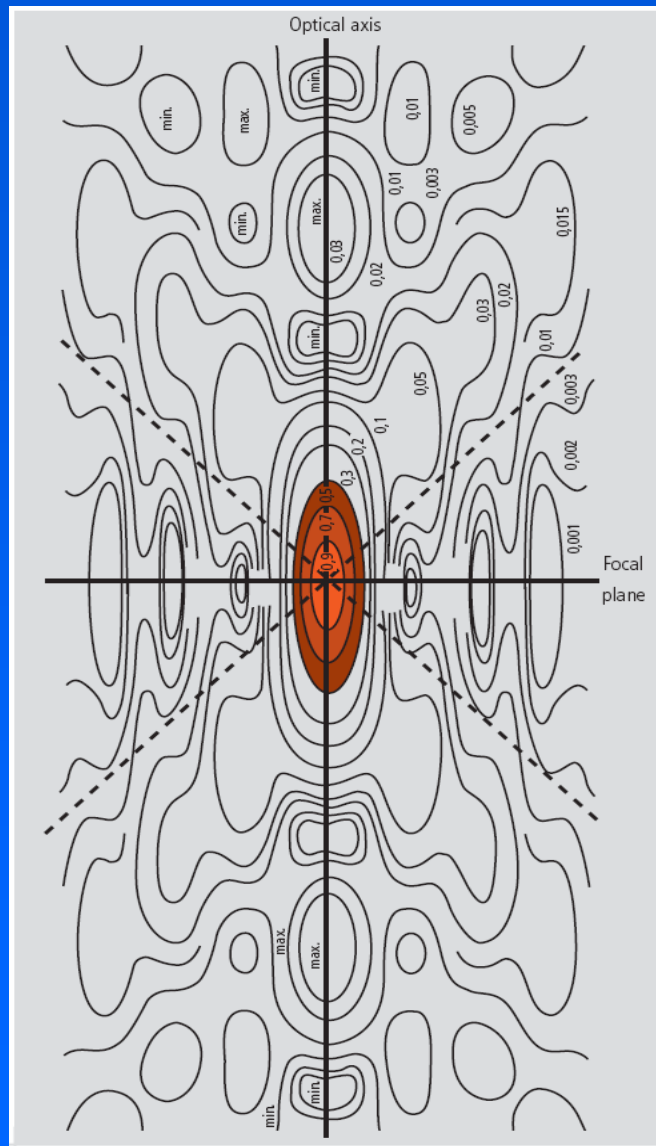
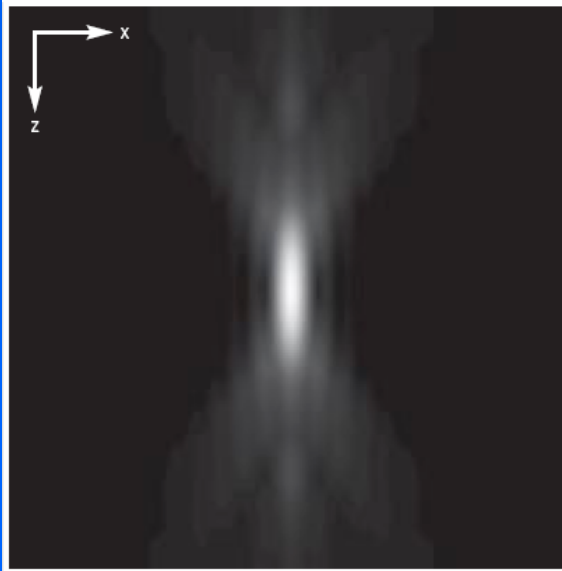
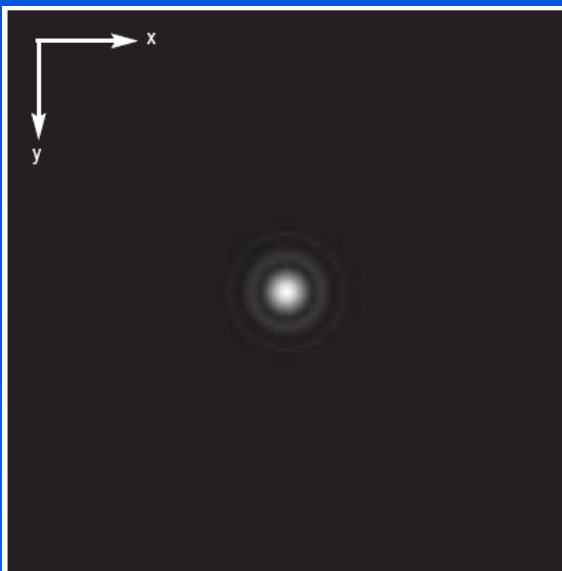
Эффективность возбуждения определяется разностью между показателем преломления среды ( $n \sim 1,34$ ) и апертурой объектива ( $NA > 1,40$ ).

# Флюоресценция в условиях полного внутреннего отражения (TIRF)



- 1 – объект (в водной среде)
- 2 – затухающая волна
- 3 – покровное стекло
- 4 – иммерсионное масло
- 5 – объектив с  $NA > 1.4$
- 6 – свет флюоресценции
- 7 – возбуждающий свет

# Интенсивность света в перетяжке



# Микроманипуляции и оптический захват (optical trap)

Мощный лазер ( $>100$  мВт) фокусируется объективом микроскопа в диск Эри (перетяжку).

Выжигание – микродиссекция.

Инфракрасный лазер – оптическая ловушка. Сила пропорциональна разнице коэффициентов преломления и объему частицы ( $d < 0,25$  мкм).

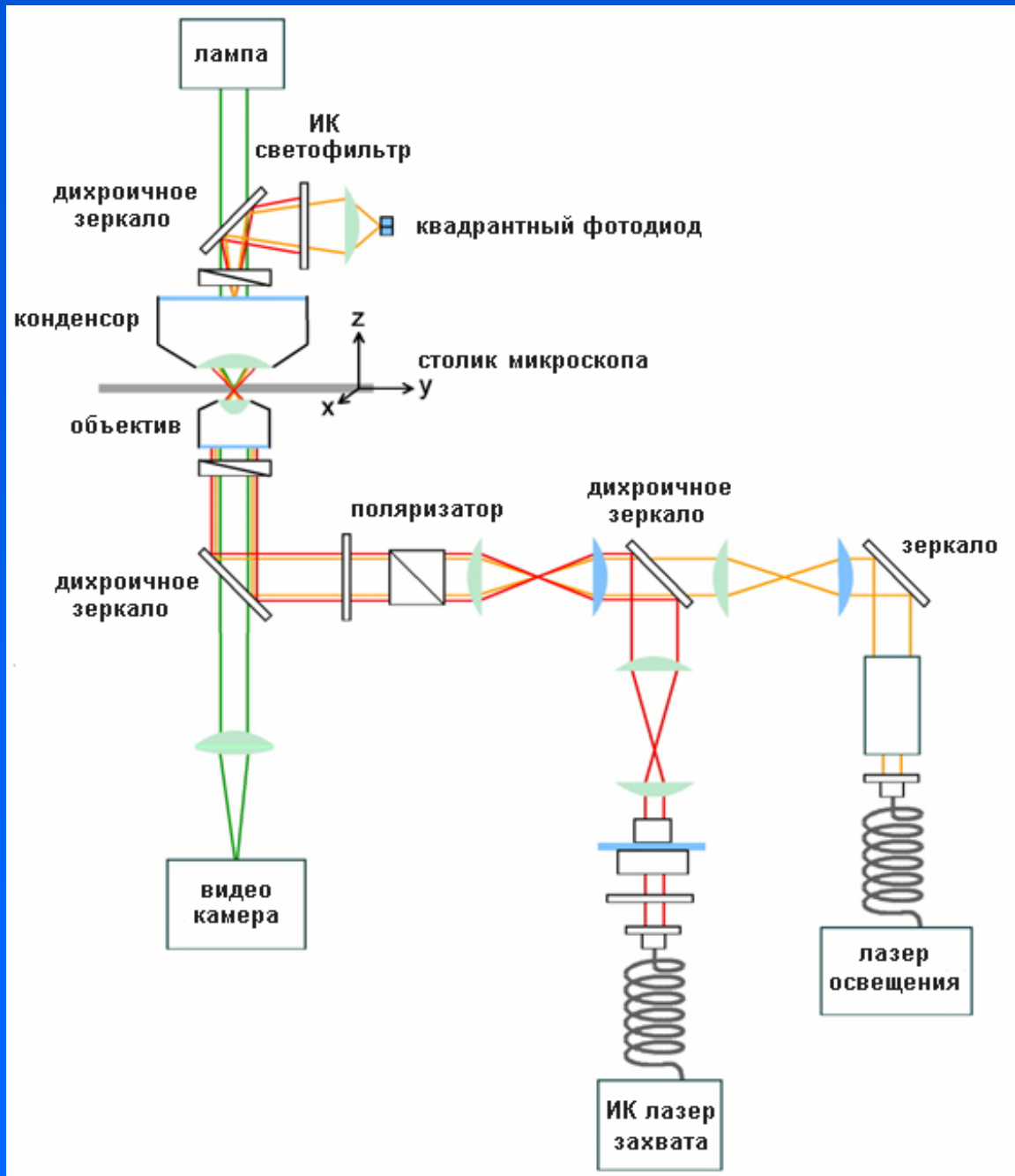
Управление ловушкой – медленное перемещение столика или быстрое перемещение луча (частота более 1 мГц).

Измерения силы производится по смещению или ускользанию из ловушки.

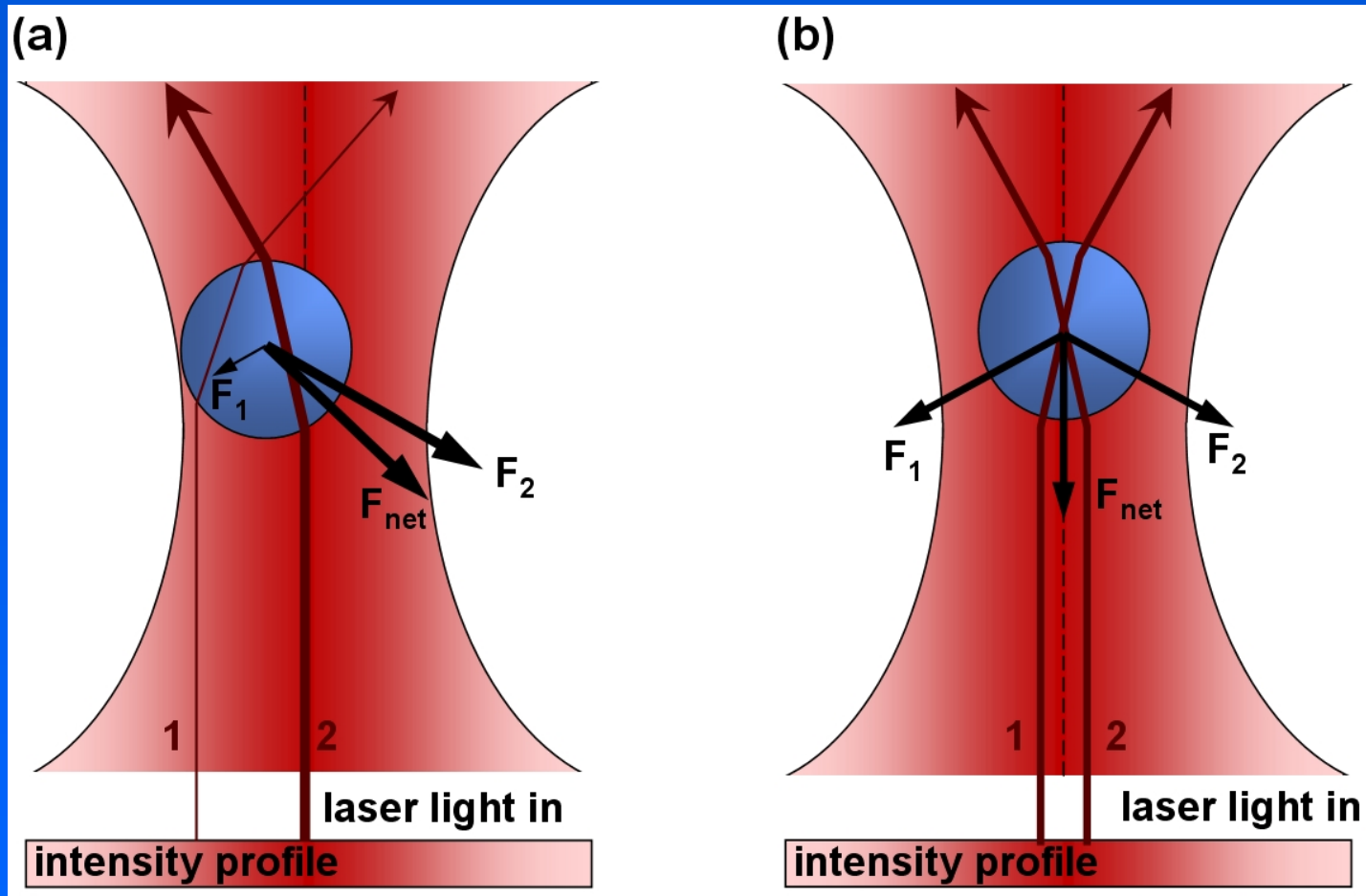
Точность определения положения – восстановление центроида ( $<1$  нм).



# Микроскоп для работы с оптическим захватом (optical trap / tweezers)

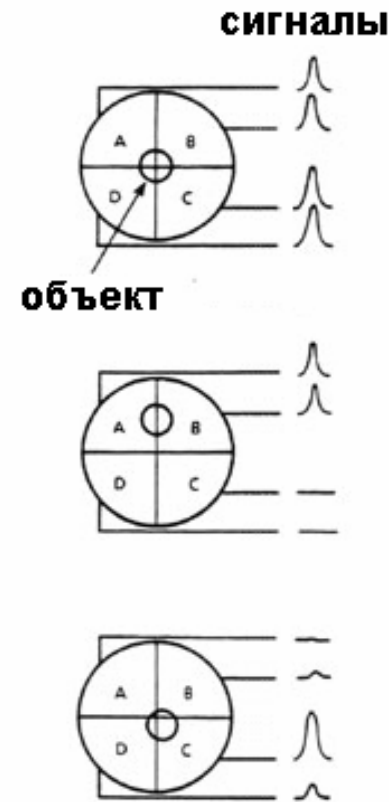
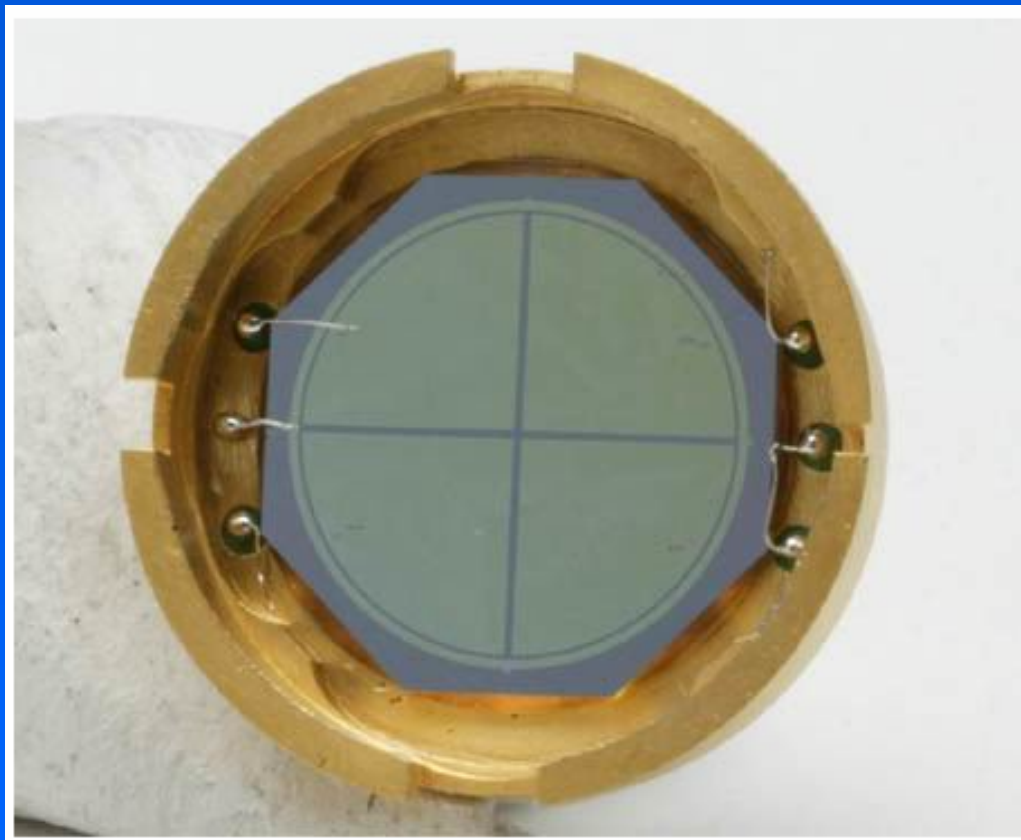


# Оптический захват



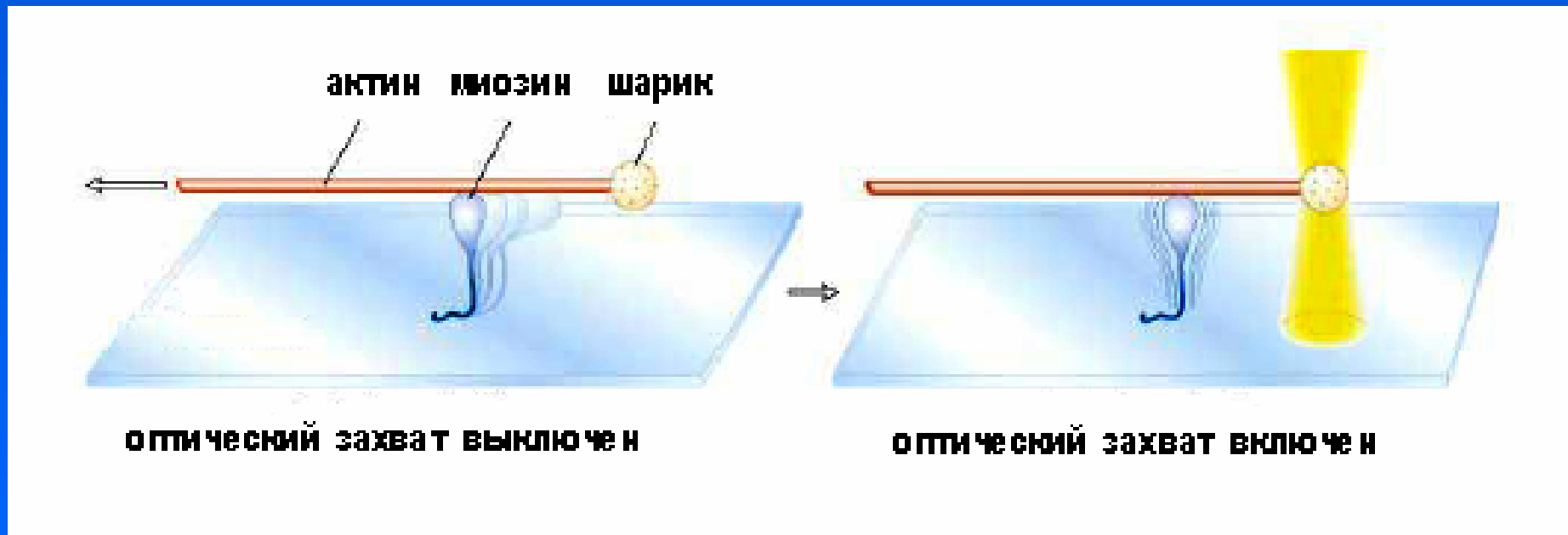
На смещенную от оси пучка частицу действует сила, направленная к оси пучка. Измеряется величина смещения или внешняя сила, выводящая частицу из пучка (escaping force).

# Квадрантный детектор



Детектор, состоящий из четырех высокочувствительных фотодиодов или ФЭУ, позволяет определять исчезающе малые смещения одиночных объектов (с точностью до 0,1 нм). Точность определения зависит от числа фотонов.

# Анализ моторных белков методом оптического захвата

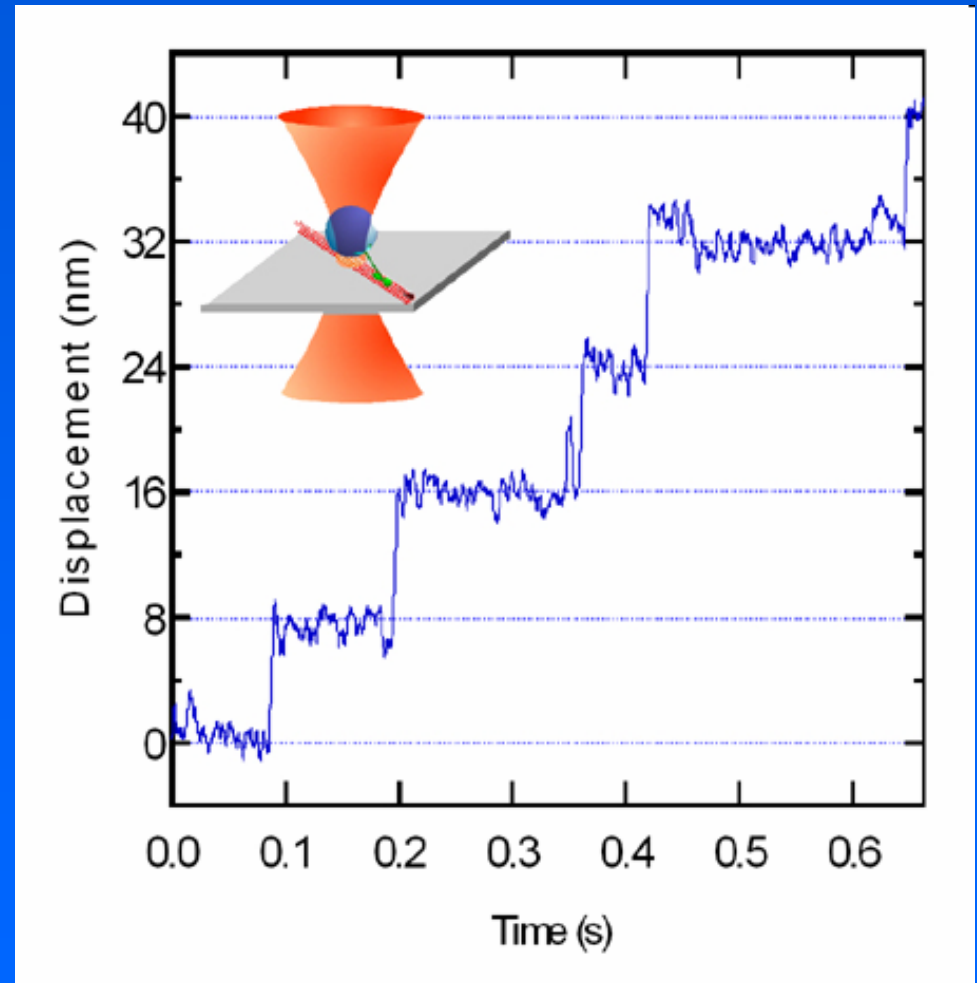


Два вида измерений: усилие (мощность лазера), удерживающее шарик, или смещение шарика при данной мощности.

# Измерение шагов кинезина

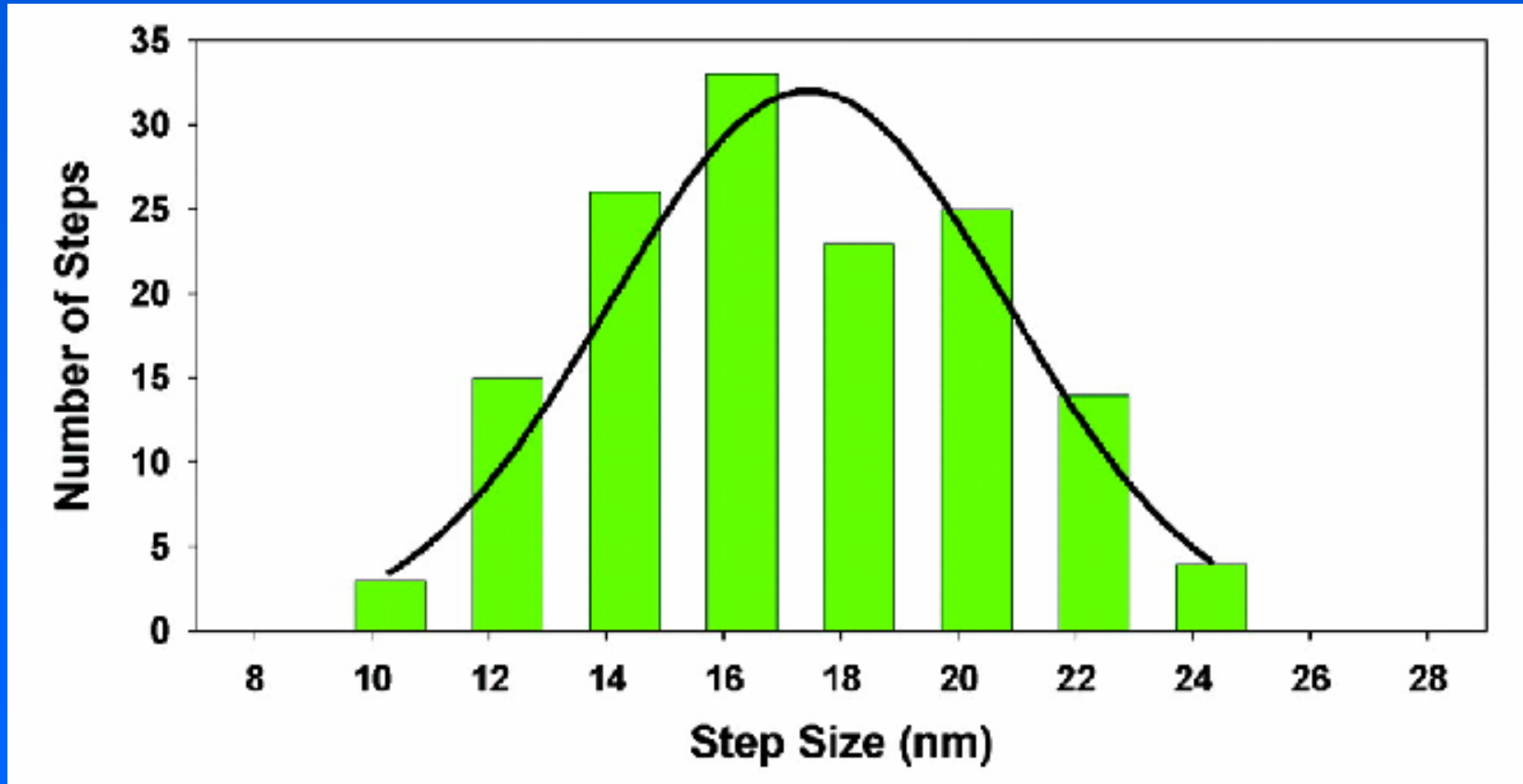
Смещение частицы во времени определяется с помощью квадрантного фотодиода.

Точность регистрации положения шарика может достигать 0,1-0,3 нм.





# Размер шага кинезина (Gaussian fit)



Величина шага –  $17.3 \pm 3.3$  нм