

Лекція 3

Тема. Напрямки досліджень сучасної біохімії: методи до дослідження біополімерів, біомембран, мембранного транспорту.

План:

1. Дослідження біополімерів
2. Дослідження біомембран

Література:

1. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації. Теоретичні аспекти : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, Т. Б. Синельник, І. В. Компанець. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2016. – 639 с.
2. Біологічні мембрани та основи внутрішньоклітинної сигналізації: методи дослідження : навч. посіб. / Л. І. Остапченко, І. В. Компанець, Т. Б. Синельник. – К. : ВПЦ "Київський університет", 2017. – 447 с.
3. Гоженко А., Козирев А., Цебржинський О., Гоженко О., Жуков В. Основи молекулярної біології та персональна геноміка фізичних і психічних здібностей людини. Навчальний посібник. RSW. Одеса. Бидгощ. 2017 р. 340 с.
4. Дубінін С. І., Пілюгін В.О., Ваценко А.В., Улановська-Циба Н.А., Передерій Н.О. Сучасні проблеми молекулярної біології. Підручник для студентів ВНМЗ України III-IV рівнів акредитації. Полтава, 2016. 393 с.

1. Дослідження біополімерів

Існує взаємозв'язок між змінами в структурі ДНК і багатьма хворобами. Ідентифікація генів, порушення роботи яких призводить до розвитку спадкових захворювань, створила передумови для ретельного аналізу генетичних і біохімічних основ патогенезу цих захворювань і розробки найбільш ефективних методів лікування.

Досягнення:

1. Методами молекулярної медицини отримані вакцини для запобігання гепатитів, інсулін людини - для лікування цукрового діабету, фактор VIII - для відновлення нормального згортання крові і лікування гемофілії А, а також багато інших препаратів.
2. За допомогою **генної терапії** виявилось можливим вводити в організм хворого гени, що повноцінно працюють для відновлення метаболічних порушень, викликаних мутантними генами. На стадії клінічних випробувань знаходяться методи генокорекції таких спадкових хвороб, як сімейна гіперхолестеринемія, гемофілія В (зниження активності фактору IX) тощо.

Дослідження послідовності ДНК:

1. Для виявлення дефектів в структурі ДНК вона повинна бути виділена з відповідної біопроби (біологічна рідина, культура клітин) і «напрацьована» в кількостях, достатніх для дослідження.

1.1 Для фрагментування ДНК використовують рестриктази. Відомо більше 500 різних типів рестриктаз бактеріального походження, причому кожен з цих ферментів розпізнає свою специфічну послідовність. За допомогою набору рестриктаз можна розрізати молекулу ДНК на фрагменти потрібної довжини.

1.2 **Ідентифікацію** специфічних послідовностей у фрагментах ДНК проводять в гелі після розділення за допомогою електрофорезу шляхом гібридизації з міченими ДНК-зондами, які представляють собою фрагменти однострункової ДНК довжиною понад 100 нуклеотидних ланок із суворо визначеною первинною структурою.



Рисунок 8 - Ідентифікація специфічних послідовностей у фрагментах ДНК

Синтез ДНК-зондів здійснюється в автоматизованих машинах.

2. Для генотерапії необхідно виділення нормальних генів і введення їх в дефектні клітини таким чином, щоб вони експресувалися, дозволяючи відновити здоров'я пацієнта.

ДНК може бути **виділена** з будь-якого виду тканин і клітин, що містять ядра.

Етапи виділення ДНК:

- 1) швидкий лізис клітин,
- 2) видалення фрагментів клітинних органел і мембран за допомогою центрифугування,
- 3) ферментативне руйнування білків протеїназами
- 4) екстрагування ДНК з розчину за допомогою фенолу і хлороформу.
- 5) осадження ДНК, як правило, етанолом
- 6) видалення надосадової рідини
- 7) розчинення в буферному розчині
- 8) Оцінка якості екстрагованої ДНК проводять спектрально на підставі вимірювання оптичної щільності розчину ДНК в області білкового і нуклеїнового спектрів поглинання при довжині хвилі 280 і 260 нм відповідно.

Для **встановлення первинної структури ДНК** – секвенування ДНК – розроблені ефективні і економічні методи (хімічний та ферментативний методи).

Кількісне визначення вмісту біополимера в отриманій фракції, в виділеному або досліджуваному зразку: методи виміру оптичного поглинання (спектрофотометрія), радіоактивності (радіохімічні методи) або світіння зразків (люмінесцентні методи).

Метод ампліфікації – збільшення кількості молекул ДНК з певною послідовністю нуклеотидів за допомогою ДНК-полімерази.

Перенесення генів. Можливість вирізання з ДНК певних генів, отримання їх шляхом зворотної транскрипції матричних РНК та розробка методів штучного хімікоферментативного синтезу генів дозволили маніпулювати генами, в тому числі вставляти їх в плазмідні або вірусні, а потім вносити їх в мікроорганізми для подальшого розмноження.

Завдяки застосуванню прямої і зворотної транскрипції, багато методів розроблених для ДНК перенесені на РНК.

2. Дослідження біомембран

Біологічні мембрани є одними із найважливіших структурних утворень клітини.

До них належать:

- ✓ плазматична мембрана
- ✓ комплекс внутрішньоклітинних мембран ендоплазматичного ретикулума, апарату Гольджі, мембран ядер, мітохондрій, лізосом, пероксисом, піно- і фагосом.

Функції:

- механічна,
- бар'єрна,
- залучення в безліч фізіологічних і біохімічних процесів, притаманних відповідним органелам і клітині загалом.

Біологічні мембрани з різних клітин з різними функціями відрізнялися за своєю структурою та хімічним складом.

Основні компоненти біологічних мембран:

- ліпіди (фосфо-, гліколіпіди, холестерол); усі фосфоліпіди за наявності в їхній структурі спирту гліцеролу або сфінгозину поділяються на дві підгрупи – гліцерофосфоліпіди й сфінгофосфоліпіди
- білки,
- вуглеводи (останні у вільному вигляді не зустрічаються, а входять до складу гліколіпідів і глікопротеїнів, наприклад, рецептори є глікозилітованими білками).

В основі структури біологічних мембран лежить фосфоліпідний бішар товщиною близько 5 нм, непроникний для молекул води, побудований таким чином, що гідрофобні жирнокислотні хвости фосфоліпідних молекул розташовані всередині, а гідрофільні "голівки" – ззовні.

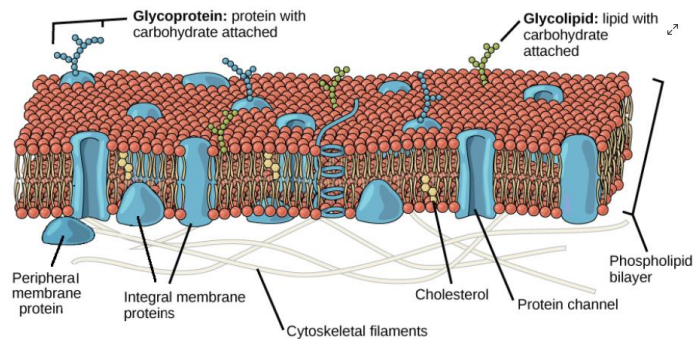


Рисунок 9 - Рідинно-мозаїчна структура плазматичної мембрани, запропонована Сенгером та Ніколсоном у 1972 р.

Білки мембран

Усі білки клітини умовно можна поділити на дві групи – мембранні та цитоплазматичні.

Класифікація мембранних білків за функціями дозволяє умовно розділити їх на:

- транспортні білки (АТФази, іонні канали, білкипереносники);
- білки-ферменти (інтегральні – АТФази; периферійні – ацетилхолінестераза, лужна і кисла фосфатази, РНКаза);
- сигнальні білки (білки-рецептори (як інтегральні, так і периферійні), G-білки);
- білки, залучені у розпізнавання іншими клітинами (низка глікопротеїнів слугують мішенями, які специфічно розпізнаються мембранними білками інших клітин);
- білки міжклітинних контактів (наприклад, білки, які беруть участь у створенні щільних та щілинних контактів)
- структурні білки (зокрема, мембранні білки, розташовані з цитозольного боку мембрани, можуть взаємодіяти із білками цитоскелета, тоді як білки, локалізовані на позаклітинному боці мембрани, можуть сполучатися з фібрилами позаклітинного матриксу).

За локалізацією у фосфоліпідному бішарі мембранних білків виділяють наступні підгрупи білкових молекул:

- інтегральні (помпи, канали);
- частково занурені ("заякорені");
- периферійні (розташовані із зовнішнього або цитоплазматичного боку мембрани);
- амфітропні білки, здатні існувати і у вільному, і в мембранозв'язаному стані. У латентному стані вони здебільшого сполучені з цитоскелетом; сигналом для їхнього вбудовування у мембрану стають посттрансляційні модифікації – найчастіше ацилювання (нековалентне приєднання жирних кислот або діацилгліцеролів) та ізопренілювання.

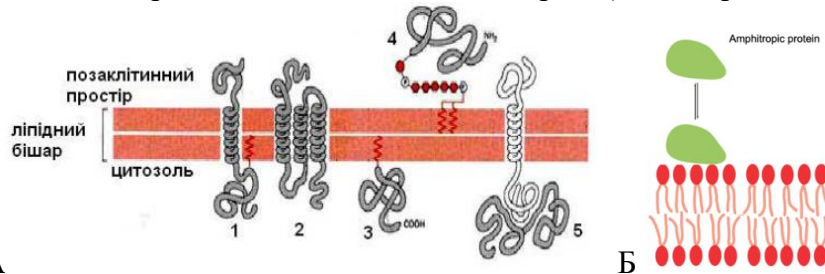


Рисунок 10 – А. Способи прикріплення білкових молекул до ліпідного бішару. 1- Інтегральний монотопний білок, α -спіральний домен якого пронизує мембрану; 2-інтегральний політопний білок, що пронизує мембрану кілька разів; 3- «заякорений» білок, приєднаний до мембрани через жирну кислоту; 4,5-периферійні білки, які не мають гідрофобних ділянок, а містять заряджені частини, що взаємодіють з фосфатними групами фосфоліпідів (4) або з іншими білками (5). Б. Амфітропний білок, що зв'язується з гідрофобними якірними структурами.

Вуглеводні компоненти мембран

Вуглеводні компоненти присутні виключно в зовнішньому моношарі біологічних мембран як складові глікопротеїнів, протеогліканів і гліколіпідів. У мембранах глікозилітованими є близько 10 % усіх білків і 5–26 % ліпідів.

У вільному стані вуглеводи в біомембранах відсутні.

Функції вуглеводних компонентів:

- ✓ контроль за міжклітинними взаємодіями,
- ✓ підтримання імунного статусу клітини
- ✓ забезпечення стабільності білкових молекул у мембрані.

Вуглеводні залишки, прикріплені до зовнішньоклітинного домену численних інтегральних білків мембран, разом із вуглеводами, прикріпленими до молекул фосфоліпідів, формують глікокалікс, функціями якого є клітинна адгезія та розпізнавання.

Ліпідні рафти

У 1997 р. німецький учений Кай Зимонс висунув «теорію ліпідних рафтів»:

Певні ділянки мембрани самоорганізовані в рафти – «плоти», що є щільнішими, ніж інші ділянки, і здатні вільно рухатися в оточуючих їх ліпідах. Залежно від подій, які відбуваються із клітиною, ці «плотики» можуть збиратися у великі платформи, і тоді молекули білків, які до цього містилися на різних "плотах", набувають здатності зустрічатися та взаємодіяти.

За своєю структурою ліпідний рафт є мікродоменом ліпідного бішару ПМ, що багатий на холестерол, сфінголіпіди і насичені фосфоліпіди (рис. 10).

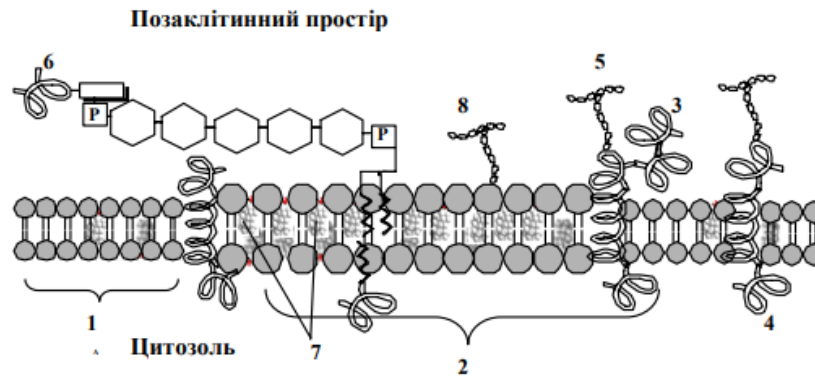


Рисунок 11. Структура ліпідного рафту: 1 – ліпід у рідкій невпорядкованій фазі, що оточує щільно упакований ліпідний рафт (2); 3 – трансмембранний білок, сполучений із ліпідним рафтом; 4 – інтегральний білок-глікопротеїн клітинної мембрани поза рафтом; 5 – олігосахаридні залишки на білку рафта (глікопротеїн); 6 – GPI-заякорений білок; 7 – холестерол; 8 – олігосахаридні залишки на ліпідах (гліколіпід)

Ліпідний рафт,:

- відносно нерозчинний в оточуючих його ліпідах;
- є достатньо гетерогенною і нестабільною структурою;
- розміри - 50–200 нм;
- вбудовування специфічних мембранних білків у ліпідний рафт спричиняє його стабілізації, а наступне зв'язування лігандів із рецепторами або глікосфінголіпідами, розташованими у таких рафтах, запускає передачу внутрішньоклітинного сигналу.

Різновидом ліпідних рафтів є **кавеоли** – спеціалізовані ліпідні угруповання, що мають вигляд 50–100 нм «впинань» ПМ.

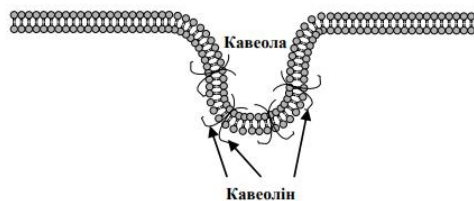


Рисунок 12 - Структура кавеоли

Містяться в гладком'язових, ендотеліальних, фібробластах, макрофагах і адипоцитах. Кавеоли можуть становити 30-70% мембран цих клітин. До складу кавеол входить ключовий білок - **кавеолін**, який виступає маркером цих структур, а також холестерин та сфінголіпіди, якорні глікопротеїни. Кавеоли беруть участь у передачі клітинних сигналів, ендоцитозі, онкогенезі, зараженні клітини поруч патогенних бактерій та вірусів.

Також вони містять рецептори-«уловлювачі» ЛПВЩ, ЛПНЩ, аніонних фосфоліпідів, апоптозних клітин, тригліцеридів, токоферолів, жирних кислот.

Значення ліпідних рафтів та кавеол:

- здійснення внутрішньоклітинної сигналізації,
- залучення в процеси секреції, у мембранний транспорт, трансцитоз через епітеліальні моношари,
- залучення у генерацію полярності клітин,
- залучення до рецептор-опосередкованого ендоцитозу харчових компонентів, гормонів, хемокінів, деяких вірусів, бактерій, паразитів і бактеріальних токсинів.

Останнє є особливо характерним для кавеол.

Кавеосоми, що утворюються під час ендоцитозу в ділянках кавеол, є більш стабільними, ніж ендосоми, і переносять "вантаж" до ЕПР і апарату Гольджі.

Тому поглинання в ділянках кавеол дозволяє патогенам уникнути перетравлення в лізосомах і деградації.

Потрапляння патогену в ділянку ліпідного рафта також може ініціювати запальну відповідь в організмі хазяїна.

В патогенезі численних збудників, зокрема *Plasmodium spp.*, *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma spp.*, *Leishmania spp.*, відіграють роль не лише ліпідні рафти, локалізовані в ПМ клітини-хазяїна, але й **власні рафти у клітинних мембранах** цих збудників. **Вони:**

- регулюють адгезію ("заякорювання") клітин збудника до клітини-хазяїна,
- інвазію,
- везикулярний транспорт,
- рухливість,
- клітинну сигналізацію.

Для молекулярної медицини рафти стали ланкою, якої не вистачало для розуміння механізмів розвитку багатьох захворювань. Наприклад, виявилось, що віруси (у т. ч. й віруси СНІДу, кору, грипу, вірус мавп SV40) також вибирають своєю мішенню у клітинній мембрані саме ліпідні "плоти" і звідти розпочинають своє проникнення у клітину.

Методи дослідження мембран

1. Біохімічні методи дослідження біомембран дозволяють виділяти в максимально чистому вигляді окремі компоненти різних мембран, вивчати їх фізико-хімічні властивості, здатність утворювати надмолекулярні лабільні комплекси, визначати час "життя" окремих компонентів, вплив на метаболізм різних фізико-хімічних факторів внутрішнього та зовнішнього середовища: іонів, температури тощо.

2. Фізіологічними методами вивчають проникність мембран атомами, іонами, різними молекулами; процеси, що протікають у біомембранах при збудженні, гальмуванні, проведенні нервового імпульсу; надходженні, розподілу та виведенні іонів та молекул з клітин та тканин, вплив фізико-хімічних факторів на стан мембран та зміна фізіологічних функцій клітин.

3. Генетичні методи, засновані на використанні мутантів, дефектних за синтезом певних мембранних білків, дозволяють вирішувати питання ролі даних молекул білка в надмолекулярній організації, зміні функцій мембран, їх самоорганізації.

4. Імунологічні методи передбачають виділення певних мембран, використання їх як антигенів з метою подальшого застосування вироблених антигенів для ідентифікації специфічних ділянок мембран, розподілу антигенів на ділянках мембрани, що вивчаються, виділення комплексів антиген-антитіло з подальшим поділом на антиген і антитіло.

5. До біофізичних підходів для з'ясування структури та функцій біологічних мембран відносять низку методів, що дозволяють отримувати достовірні відомості про стан молекул, молекулярних комплексів, цілу мембрану та зміну їх фізико-хімічних параметрів залежно від функціонального стану мембран. До них відносять:

- метод електронної мікроскопії;
- метод електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) та використання спінових міток;
- метод ядерного магнітного резонансу (ЯМР);
- метод флуоресцентної спектроскопії (та використання флуоресцентних зондів);
- метод визначення дисперсії оптичного обертання та кругового дихроїзму;
- метод диференціальної скануючої калориметрії;
- метод рентгенівського розсіювання нейтронів;
- метод моделювання;

- метод штучних мембран;
- метод радіоактивних ізотопів;

Для проведення біохімічного аналізу структури та функцій необхідно отримати високоочищені зразки.

1) *Метод диференційного центрифугування.*

- гомогенізація клітин, яка дозволяє зруйнувати клітинну мембрану.
- для видалення непошкоджених клітин та їхніх великих уламків гомогенат центрифугують за низьких швидкостей.
- субклітинне фракціонування: оскільки органели клітини мають різні розміри й вагу, під час центрифугування вони осідають з різними швидкостями. Це дозволяє вибірково осаджувати структурні елементи клітин без порушення їхньої структури й без втрати біологічних властивостей.

За допомогою методу диференційного центрифугування у градієнті густини (наприклад, сахарози) можна отримати ядра, мітохондрії, мікросоми та плазматичні мембрани.

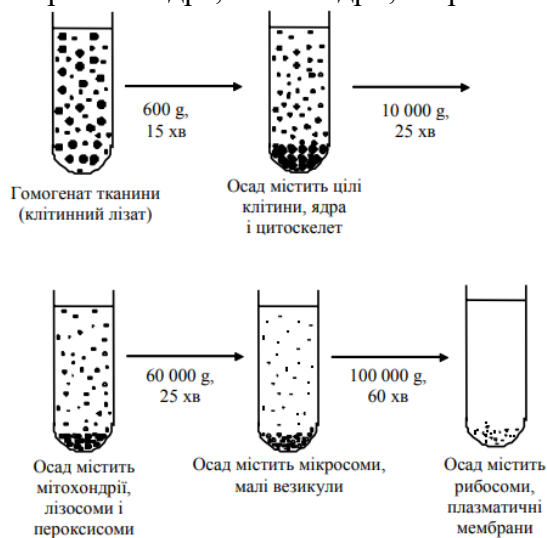


Рисунок 13 - Методика диференційного ультрацентрифугування

2) **тест на присутність у препараті мембранних органел**

При виділенні будь яких мембранних органел необхідно проводити тест на присутність у препараті інших органел. Оцінюють за активністю ферментів, які містяться виключно в мембрані даної органели.

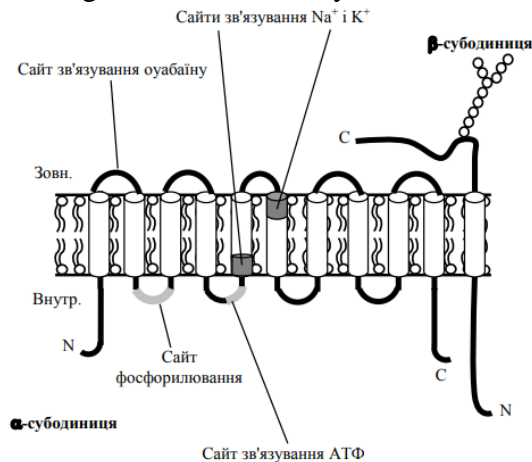
Кожна біомембрана, залежно від свого функціонального призначення, має характерний набір ферментів, які називаються **векторними**, або **маркерними**. Такі мембранозв'язані ферменти специфічні для даного виду мембран, вони стабільні й мають високу активність, яку можна легко виміряти. Переважно вони є інтегральними білками, міцно зв'язаними з мембраною.

До маркерних ферментів належать:

- аденілатциклаза, 5'-нуклеотидаза, Na^+ , K^+ -АТФаза та Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаза (маркери плазматичних мембран),
- Ca^{2+} -АТФаза (маркер саркоплазматичного ретикулума),
- H^+ -АТФаза, цитохромоксидаза, сукцинатдегідрогеназа, НАДН-дегідрогеназа (внутрішній маркер мітохондріальної мембрани),
- кисла фосфатаза (маркер лізосом).

Присутність небажаної ферментативної активності у препараті свідчить про забруднення отриманої фракції органел. Чим більша активність маркерного ферменту у виділеній мембранній фракції порівняно з такою у вихідному гомогенаті тканини, тим вищий ступінь збагачення мембранного препарату порівняно з цим гомогенатом, і тим більш очищеним є отриманий препарат.

За допомогою визначення активності маркерних ферментів було охарактеризовано основні мембранні клітинні органели. Щоб контроль чистоти мембранного препарату був ефективним, проводять визначення активності не менше трьох маркерних ферментів, властивих даній мембрані. Наприклад, для плазматичної мембрани реєструють активність Na^+ , K^+ - і Ca^{2+} , Mg^{2+} -АТФаз та 5'-нуклеотидази.



Убаїн, також відомий як g-строфантин, є токсичною речовиною рослинного походження, яка традиційно використовувалася як отрута для стріл у східній Африці як для полювання, так і для війни. Убаїн є серцевим глікозидом і в менших дозах може використовуватися в медицині для лікування гіпотензії та деяких аритмій. Інгібує Na^+ , K^+ -АТФазу

Рисунок 14 - Модель структури Na^+ , K^+ -АТФаз з урахуванням мембранної топології

Функцією Na^+ , K^+ -АТФаз є генерація трансмембранного електричного градієнта і підтримка потенціалу спокою, що є важливим для функціонування електророзбудливих тканин, зокрема скелетних м'язів та мозку. Утворений градієнт концентрації іонів Na^+ забезпечує перебіг багатьох транспортних процесів за механізмом ко-транспорту, зокрема Na^+ /глюкозний ко-транспортер, Na^+ / Ca^{2+} обмінник. Також він необхідний для транспорту амінокислот і вітамінів у клітини. Градієнт іонів Na^+ , утворений Na^+ , K^+ -АТФазою, забезпечує також реадсорбцію цих іонів і води у клубочковій зоні нефронів та адсорбцію рідини із легень і кишечника. Na^+ , K^+ -АТФаза також бере участь у клітинній осморегуляції.

Оскільки Na^+ , K^+ -АТФаза інгібується серцевим глікозидом оуабайном (строфантином G), то, застосовуючи його, можна визначити активність цього ферменту. Вимірюють АТФазну активність у середовищі без інгібітора та віднімають від неї значення активності за його присутності. АТФазна активність виражається як кількість неорганічного фосфору, відщепленого від АТФ за одиницю часу. Для фіксації гідролізу АТФ під дією Na^+ , K^+ -АТФаз застосовують спектрофотометричний метод, який базується на вимірюванні кількості неорганічного фосфату – продукту реакції гідролізу АТФ. Його кількість визначають за методом Фіске – Суббароу

Активність маркерних ферментів вимірюють якнайшвидше після виділення мембранної фракції, при цьому препарат не заморожують і зберігають за температури 4 °С.

3) Тонкошарова хроматографія

Методи розділення й аналізу ліпідів:

- фракціонування за розчинністю в різних розчинниках,
- колонкова хроматографія на силікагелі й оксиді алюмінію,
- тонкошарова хроматографія,

– рідинна хроматографія

Оскільки фракцію ліпідів зазвичай отримують у невеликій кількості, найбільш адекватним методом їхнього аналізу є тонкошарова хроматографія – швидкий і зручний для виконання, причому він дозволяє провести як кількісний, так і якісний аналіз ліпідів різних класів: багатьох фосфоліпідів, сфінголіпідів (гангліозидів, цереброзидів, сульфатидів) тощо.

Найчастіше для екстракції використовують суміші розчинників, які містять хлороформ і метанол. Вибір методу екстракції залежить від того, якою є мембрана: у вигляді осаду чи у вигляді концентрованої суспензії або розведеного завису.

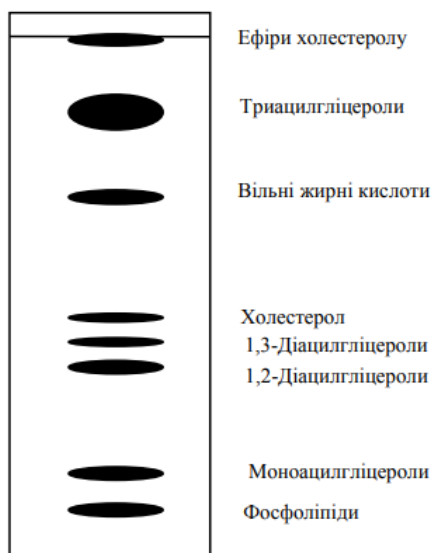


Рисунок 15 - Схематичне зображення розділення ліпідів методом тонкошарової хроматографії на силікагелі G (розчинник – гексан:діетиловий ефір мурашиної кислоти)

Розділення проводять у хроматографічних камерах, стінки яких слід вистилати фільтрувальним папером для прискорення насичення їх парами розчинника. Папір має бути добре просоченим парами розчинника.

Для ідентифікації ліпідів використовують стандартні зразки ліпідів (чисті зразки всіх досліджуваних ліпідів), які наносять на пластинки одночасно з досліджуваними екстрактами.

Плями ліпідів на хроматографічних пластинках виявляють різними методами: у парах йоду, амоній молібденовокислим та сульфатною кислотою (фосфоліпіди), нінгідрином в ацетоні (фосфоліпіди з аміногрупами: фосфатидилетаноламін, фосфатидилсерин), α -нафтолом у суміші метанол:вода (гліколіпіди: цереброзиди, сульфатиди, гангліозиди). Спектри ліпідів можна проаналізувати на денситометрі.