

## Лекція 4

Тема: Напрямки досліджень сучасної біохімії: дослідження ПОЛ мембран та міжмолекулярних взаємодій.

План:

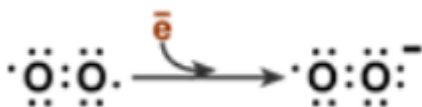
1. Методи дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів біологічних мембран
2. Дослідження міжмолекулярних взаємодій і сигнальної трансдукції.
  - 2.1 Взаємодії клітин
  - 2.2 Типи хімічної сигналізації
  - 2.3 Пов'язування сигнальної молекули з рецептором
  - 2.4 Поняття про рецептор
  - 2.5 Типи рецепторів клітин
  - 2.6 Механізми ліганд-рецепторного взаємодії
  - 2.7 Основні біохімічні методи, що використовуються для дослідження систем трансдукції (передачі) сигналу

### 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.

### 3 Методи дослідження процесів пероксидного окиснення ліпідів біологічних мембран

Пероксидне окиснення ліпідів (ПОЛ) мембран – окисна деградація ліпідів, ініційована вільними радикалами (наприклад, супероксид-аніоном кисню).



кисень

супероксид-аніон кисню

Під час реакцій біологічного окиснення у клітинах утворюються вільні радикали, які мають на зовнішній валентній орбіталі неспарений електрон.

**До активних форм кисню відносять:**

- $\text{H}-\ddot{\text{O}}\cdot$  або  $\text{OH}\cdot$  – гідроксильний радикал,
- $\text{O}_2^-$  – супероксидний аніон,

–  $H_2O_2$  – пероксид водню.

Вони мають високу хімічну активність і вступають у реакцію з ненасиченими жирними кислотами ліпідів мембран, порушуючи їхню структуру.

Пероксидне окиснення мембранних фосfolіпідів є одним із найпоширеніших механізмів деструкції мембранних структур.

Активні форми кисню та різні форми пероксидів утворюються у плазматичних і ядерних мембранах, пероксисомах та лізосомах, цитозолі.

Їхній вміст регулюється роботою ферментативних і неферментативних систем.

Ліпопероксиди необхідні для нормального функціонування клітинних мембран.

### Основні процеси ПОЛ:

- активація і деградація радикалів жирних кислот ліпідів,
- вбудовування у ліпіді попереднього активованого молекулярного кисню,
- реорганізація подвійних зв'язків у спряжених подвійних зв'язках.
- результатом цього є деструкція мембранних ліпідів і самих біомембран.

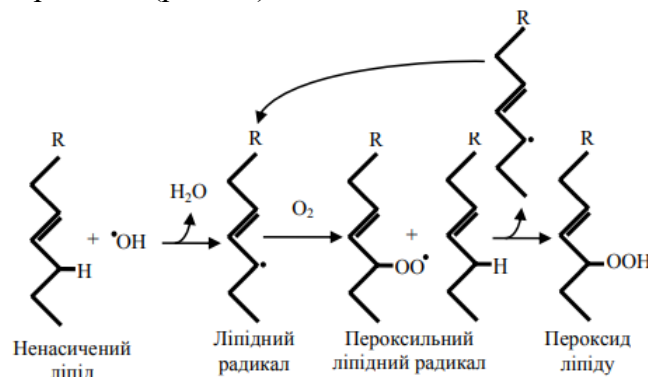
ПОЛ відбувається як у тварин, так і в рослин.

**Кінцеві продукти ПОЛ** - ліпідні гідропероксиди, тому цей процес і називається пероксидним окисненням ліпідів.

### Продукти ПОЛ:

- 1) малоновий діальдегід,
- 2) 4-гідроксиноненаль
- 3) коротколанцюгові леткі вуглеводні:
  - $R\cdot$  – вільний радикал жирної кислоти;
  - $R-O-O\cdot$  – пероксидіон жирної кислоти;
  - $R-O-OH$  – гідропероксид жирної кислоти;
  - $HC=O-CH_2-C=OH$  – малоновий діальдегід;
  - $R-CH=CH-CH_2-CH=CH_2$  – дієнові кон'югати.

Під час атаки поліненасиченої жирної кислоти у складі ліпиду молекулярним киснем утворюється пероксидний радикал (рис. 16).



Він може взаємодіяти з іншою молекулою ліпиду та руйнувати її з утворенням нового ліпідного радикала. Одним із продуктів цієї реакції є гідропероксид ліпиду, порівняно стійка сполука.

Чим більше подвійних зв'язків міститься у жирній кислоті, тим більшою є їхня здатність вступати в реакції переокиснення.

Активація процесів ПОЛ може спричинити деструктивні зміни у клітинах - порушуються білок-ліпідні взаємодії в мембранах, утворюються міжмолекулярні зшивки, змінюється в'язкість ліпідної фракції.

### Контроль рівня ПОЛ у нормі:

У клітинах існує багато ферментів, що здійснюють реконструкцію пошкоджених або змінених під впливом АФК складових елементів мембрани. Це супероксиддисмутаза, каталаза, глутатіонпероксидаза та глутатіонредуктаза, усі вони є гемвмісними. Ці ферменти найактивніші в печінці, надниркових залозах і нирках, де вміст мітохондрій, цитохрому P450 і пероксисом особливо великий. А. наприклад, фосфоліпази видаляють із мембрани пошкоджені фосфоліпіди, що дозволяє зберегти її динамічну цілісність.

Антиоксидантні сполуки пригнічують вільнорадикальне окиснення. Це аскорбінова кислота (вітамін С), токоферол (вітамін Е),  $\beta$ -каротин (провітамін А), лікопін, убіхінон (коензим Q), поліфеноли (флавоноїди, таніни, антоціани).

### Методи дослідження процесів ПОЛ

Існує велика кількість методів дослідження процесів ПОЛ. Методи визначення його маркерів:

- ТБК-активних продуктів, основ Шиффа й дієнових кон'югатів,
- а також активності антиоксидантних ферментів (СОД, каталази)

Вони розроблені багато років тому, сьогодні вони вдосконалюються і широко використовуються.

Ранні методи дослідження процесів ПОЛ базувались на колориметричному визначенні продуктів реакції гідропероксидів або малонового діальдегіду з хімічними реагентами з утворенням хромофорів. Спочатку ці методи розроблялися для аналізу продуктів ПОЛ у їжі, потім вони були модифіковані для біологічних і біомедичних аналізів.

Найбільш інформативним, хоча й досить технічно складним методом є мас-спектрометрія, яку поєднують з газовою і рідинною хроматографією. Цей підхід дозволяє ідентифікувати компоненти зразка згідно з їхньою масою і картиною фрагментації, а також за часом утримання.

## 4 Дослідження міжмолекулярних взаємодій і сигнальної трансдукції.

### 2.1 Взаємодії клітин

Клітини багатоклітинного організму потребують обміну інформацією один з одним - для регуляції свого розвитку та організації у тканині, для контролю процесів росту та поділу та для координації функцій. Взаємодія тварин клітин здійснюється трьома способами:

- 1) клітини виділяють **хімічні** речовини, які є сигналами для інших клітин, розташованих на певній відстані;
- 2) вони несуть на своїй поверхні пов'язані з плазматичною мембраною сигнальні молекули, що впливають на інші клітини при безпосередньому фізичному контакті;
- 3) утворюють щільні контакти, що прямо з'єднують цитоплазму двох взаємодіючих клітин, що робить можливим обмін малими молекулами

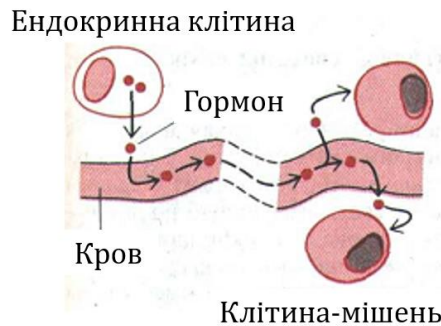


## 2.2 Типи хімічної сигналізації

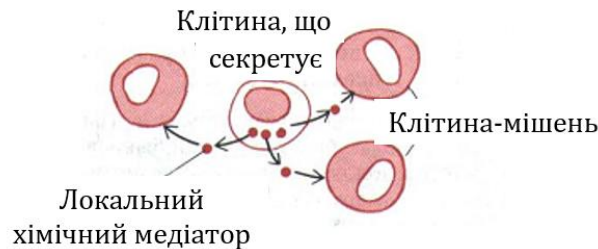
Існує три стратегії **хімічної** сигналізації: використання гормонів, локальних хімічних медіаторів та нейромедіаторів

Хімічні сигнальні механізми розрізняються за відстанями, на яких вони діють:

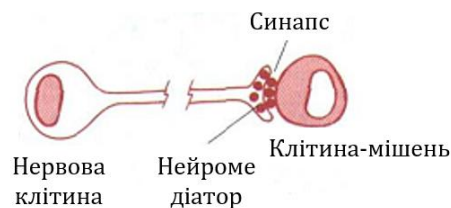
1) ендокрина сигналізація - спеціалізовані ендокринні клітини виділяють гормони, які разносяться кров'ю і впливають на клітини-мішені, що знаходяться іноді в різних частинах організму;



2) паракрина сигналізація - клітини виділяють локальні хімічні медіатори, які поглинаються, руйнуються або іммобілізуються так швидко, що встигають вплинути тільки на клітини найближчого оточення, можливо, в радіусі близько міліметра;



3) синаптична передача - використовується тільки в нервовій системі; клітини секретують нейромедіатори в спеціалізованих міжклітинних контактах - хімічних синапсах. Нейромедіатори дифундують через синаптичну щілину, зазвичай на відстань близько 50 нм, і впливають тільки на одну постсинаптичну клітину-мішень.



У кожному разі мішень реагує на певний позаклітинний сигнал за допомогою спеціальних білків - рецепторів, які пов'язують сигнальну молекулу і ініціюють відповідь. Відповіді реакції клітини можна розділити на швидкі та повільні:

1) **Швидкі** реакції протікають практично без затримок після сприйняття сигналу.  
Приклади:

А) швидких реакцій можуть бути зміни інтенсивності та напрямки трансмембранних іонних потоків і пов'язаних з цим процесів модуляції активності існуючих ферментів.  
Б) підвищення рівня глюкози у крові стимулює секрецію білкового гормону інсуліну ендокринними клітинами підшлункової залози. За лічені хвилини підвищення концентрації інсуліну змушує клітини печінки та м'язів посилено поглинати глюкозу, і її концентрація у крові падає.

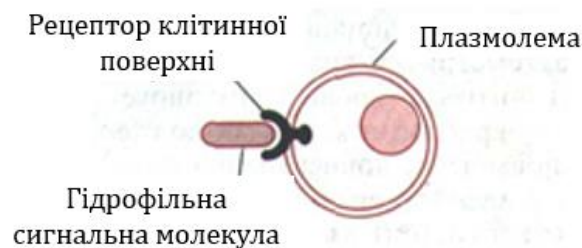
В) Нейромедіатори викликають ще більш швидкі реакції: у відповідь на звільнення ацетилхоліну з рухових нервових закінчень волокна скелетного м'яза скорочуються і знову розслабляються лише за кілька мілісекунд.

- 2) **Повільні** реакції пов'язані зі зміною експресії генів, тобто вони залучають процеси транскрипції та трансляції, тому проявляються з деякою затримкою, порівняно з швидкими реакціями.

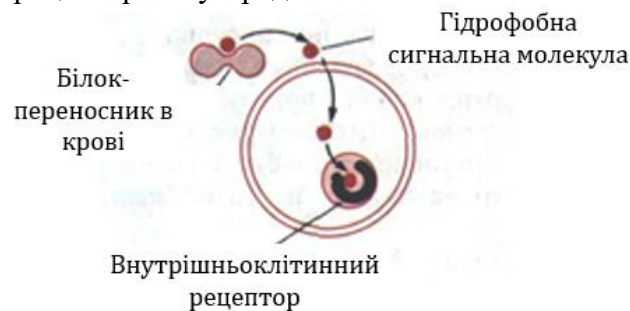
### 2.3 Пов'язування сигнальної молекули з рецептором

Всі відомі нейромедіатори, а також більшість гормонів та локальних хімічних медіаторів водорозчинні.

**Водорозчинні** молекули гідрофільні і не приходять через ліпідний бішар плазматичної мембрани, тому вони зв'язуються зі специфічними білковими рецепторами клітинної поверхні.



Стероїдні та тиреоїдні гормони розчиняються в ліпідах і, відокремившись від білка-носія, можуть легко проникати через плазматичну мембрану клітини-мішені. Ці гормони зв'язуються з білковими рецепторами усередині клітини.



Ці два види сигнальних молекул мають різну тривалість життя в кровотоку або тканинній рідині:

- ✓ **водорозчинні молекули**, перейшовши в кров, зазвичай видаляються та/або руйнуються за час, що вимірюється хвилинами,
- ✓ **локальні хімічні медіатори та нейромедіатори** після виходу в міжклітинний простір інактивуються ще швидше - приблизно секунд або навіть мілісекунд,
- ✓ **стероїдні гормони** циркулюють у крові годинами,
- ✓ **тиреоїдні** можуть зберігатися кілька днів.

Тому водорозчинні сигнальні молекули зазвичай викликають короточасні реакції, а водонерозчинні - триваліша відповідь.

## 2.4 Поняття про рецептор

**Клітинний рецептор** - молекула (зазвичай білок) на поверхні клітини, клітинних органел або розчинена в цитоплазмі, що специфічно реагує зміною своєї просторової конфігурації на приєднання до неї молекули певної хімічної речовини, що передає зовнішній регуляторний сигнал і, у свою чергу, передає цей сигнал всередину клітини клітинної органели, нерідко з допомогою про вторинних посередників чи трансмембранних іонних струмів.

Речовина, що специфічно поєднується з рецептором, називається **лігандом** цього рецептора. Це може бути:

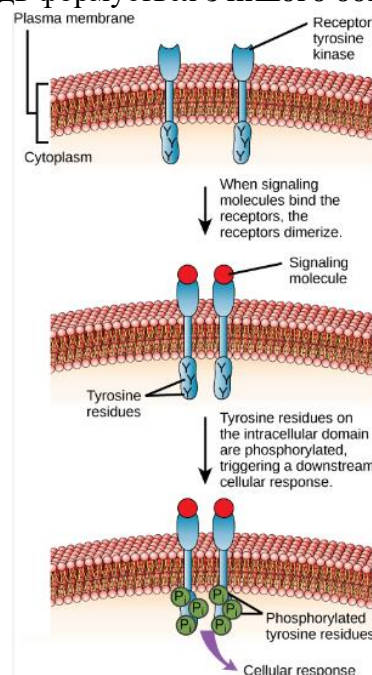
- ✓ гормон
- ✓ нейромедіатор
- ✓ їх штучні замінники, що застосовуються як лікарські засоби та отрути.
- ✓ речовини, що впливають на рецептори нюху або смаку.
- ✓ зорові рецептори, що реагують на світло,
- ✓ рецептори в органах слуху.

Клітинні рецептори можна розділити на два основні класи - *мембранні рецептори* та *внутрішньоклітинні рецептори*.

### А) Мембранні рецептори

Більшість мембранних рецепторів – трансмембранні білки. Їх пов'язані з вуглеводними ланцюгами, тобто є глікопротеїдами.

Трансмембранні рецептори — мембранні білки, які розміщуються і працюють не лише у зовнішній клітинній мембрані, а й у мембранах компартментів та органел клітини. Зв'язування з сигнальною молекулою (гормоном чи медіатором) відбувається з **одного боку** від мембрани, а клітинна відповідь формується з **іншого боку від мембрани**.



Багато трансмембранних рецепторів складаються з двох або декількох субодиниць, які діють у сукупності і можуть дисоціювати при зв'язуванні з лігандом або змінювати свою конформацію і переходити на наступну стадію циклу активації. Найчастіше вони класифікуються з урахуванням їхньої молекулярної структури. Поліпептидні ланцюги найпростіших із цих рецепторів перетинають ліпідний бислой лише один раз, тим часом як багато - сім разів.

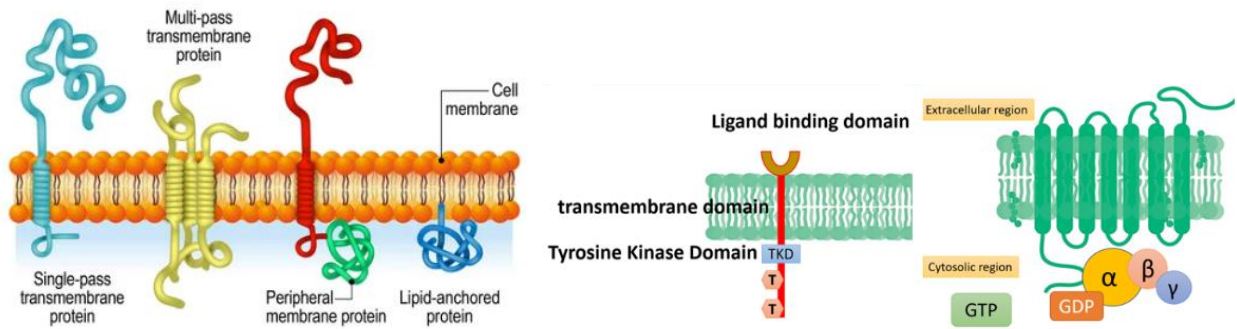
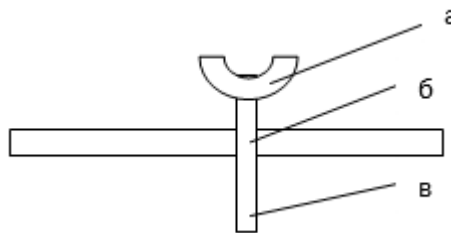


Рисунок – види рецепторів

### Будова рецептора



#### *А) Позаклітинний домен*

Позаклітинний домен - це ділянка рецептора, що знаходиться поза клітиною або органоїдом. Якщо поліпептидний ланцюг рецептора перетинає клітину кілька разів, зовнішній домен може складатися з декількох петель. Основна функція рецептора у тому, щоб упізнавати сигнальну молекулу.

#### *Б) Трансmemбранний домен*

Деякі рецептори є також білковими каналами. Трансmemбранний домен переважно складається з трансmemбранних  $\alpha$ -спіралей. Він закріплює рецептор у мембрані. Після активації позаклітинного домену (зв'язування з гормоном) канал може пропускати іони. В інших рецепторів після зв'язування гормону трансmemбранний домен змінює свою конформацію, що має внутрішньоклітинний вплив.

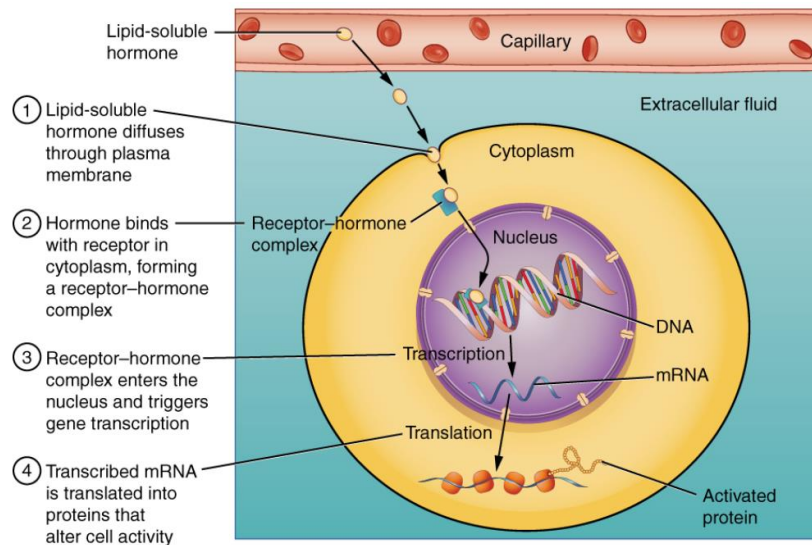
#### *В) Внутрішньоклітинний домен*

Внутрішньоклітинний або цитоплазматичний домен взаємодіє з внутрішньою частиною клітини або органоїду, ретранслюючи отриманий сигнал. Існують два принципово різні шляхи такої взаємодії:

- Внутрішньоклітинний домен зв'язується з ефекторними сигнальними білками, які передають сигнал по сигнальному ланцюгу до місця його призначення.
- Якщо рецептор пов'язаний з ферментом або сам має ферментативну активність, внутрішньоклітинний домен активує фермент (або здійснює ферментативну реакцію).

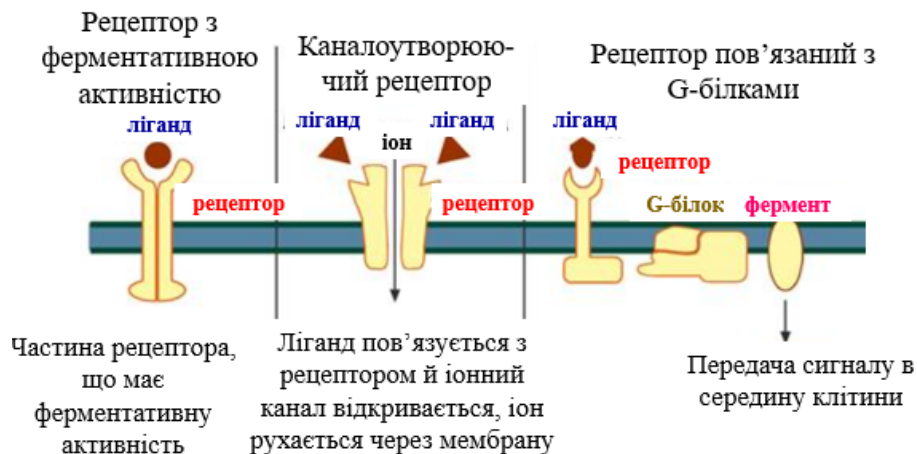
### **Б) Внутрішньоклітинні рецептори**

Внутрішньоклітинні рецептори - як правило, фактори транскрипції (наприклад, рецептори глюкокортикоїдів) або білки, що взаємодіють з факторами транскрипції. Більшість внутрішньоклітинних рецепторів зв'язуються з лігандами в цитоплазмі, переходять в активний стан, транспортуються разом з лігандом в ядро клітини, там зв'язуються з ДНК і індукують або пригнічують експресію деякого гена або групи генів.



## 2.5 Типи рецепторів клітин

Відомі щонайменше три класи білкових рецепторів клітинної поверхні: утворюють канал, пов'язані з G-білками та каталітичні.



А) **Каталітичні рецептори** під час активації лігандом починають працювати як **ферменти**. Більшість відомих каталітичних рецепторів - трансмембранні білки з цитоплазматичним доменом, що має **тирозин-специфічну протеїнкіназну активність**. Вони одноразово пронизують мембрани і їхній каталітичний домен знаходиться з внутрішньої сторони мембрани. При зв'язуванні ліганду вони активуються та переносять фосфатні групи від АТР на ОН-групу **тирозинового залишку** у певних білках клітини-мішені. Це рецептори інсуліну, багато ростових факторів. Білок-рецептор з тирокіназною активністю фосфорилує і сам себе, коли активований, що підвищує його активність.

Б) **Каналоутворюючі рецептори** - це регульовані медіаторами іонні канали, що беруть участь головним чином швидкої синаптичної передачі сигналів між електрично збудливими клітинами. Для управління такого роду каналами використовується невелика кількість нейромедіаторів, які на короткий час відкривають або закривають канал, що утворюється рецепторами, змінюючи таким чином іонну проникність плазматичної мембрани, а тим самим і збудливість постсинаптичної клітини. Найбільш добре вивченим рецептором-іонним каналом є ацетилхоліновий



## В) Рецептори, пов'язані з білком G.

Більшість рецепторів відносяться до сімейства серпентинових (змієподібних) рецепторів, що семиразово перетинають мембрану. Ці рецептори виконують різноманітні біологічні сигнальні функції. До них відносяться рецептори смакових клітин. Сотні різних різновидів рецепторів, що знаходяться на клітинах нюхових цибулин нашого носа, передають інформацію щодо присутності лігандів-ароматів. Ці рецептори мають дуже давнє походження. Їх використовують, наприклад, клітини дріжджів, які виділяють необхідні для парування поліпептидні фактори і розпізнають їх за допомогою таких поверхневих рецепторів.



У передачі сигналу з рецептора беруть участь білки, що мають назву **G білки**.

У неактивному стані G-білки зазвичай знаходяться поблизу рецептора. Фактично вони є комплексом, сформованим з 3-х різних субодиниць -  $\alpha$ ,  $\beta$  і  $\gamma$ . До активації всі три субодиниці пов'язані разом. Коли рецептор активується приєднанням ліганду, на субодиниці  $\alpha$  відбувається обмін GDP на GTP (звідки і термін G білок). Два стани G-білка (on або off) визначаються гуаніновим нуклеотидом, який він зараз пов'язує. **Неактивний G-білок зв'язує GDP, активний зв'язує GTP**. Будучи в активному стані, білок G передає сигнали далі в клітину. Однак G білок залишається в активному стані лише протягом короткого періоду часу (секунди або менше), після чого він дефосфорілюється його власною GTP-азою.

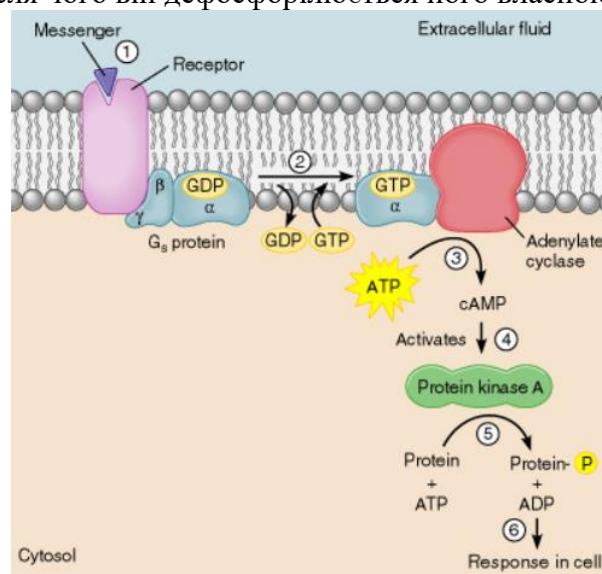
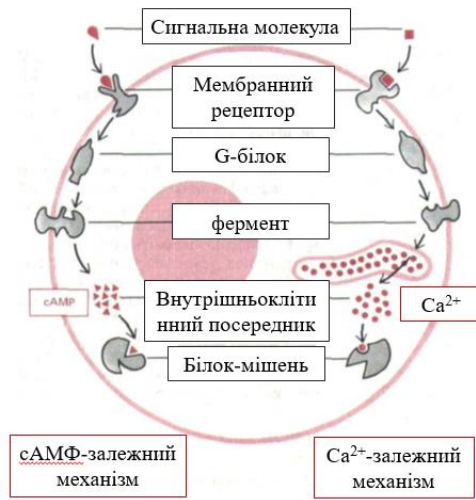


Рисунок - модель сполучення активації рецептора з активацією аденілатциклази за допомогою G-білка.

## 2.6 Механізми ліганд-рецепторного взаємодії

**Мембранна рецепція.** Речовини, нерозчинні в ліпідному бішарі клітинних мембран, не здатні проникнути в клітину самостійно, тому змушені «користуватися» системою вторинних посередників. Ці речовини зв'язуються із рецепторами на мембрані. Такі рецептори мають екстраклітинний ліганд-зв'язуючий N-кінцевий домен, з'єднаний трансмембранним доменом зі

спеціалізованим С-кінцевим доменом-ферментом у цитоплазмі. Останній стає активним щоразу, коли екстраклітинний домен рецептора пов'язує ліганд. Взаємодія молекули ліганду з мембранним рецептором ініціює («запускає») каскад ферментативних реакцій, сутність яких коротко зводиться до наступного:

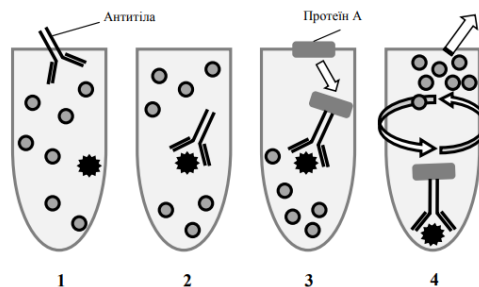


## 2.7 Методи дослідження

### А) Основні біохімічні методи, що використовуються для дослідження систем трансдукції (передачі) сигналу

#### 1) Імунопреципітація білків із клітинних екстрактів

Преципітація (осадження, наприклад, дією трихлороцтової кислоти) білків супроводжується утворенням білкових агрегатів, які випадають в осад із розчину і можуть бути зруйновані центрифугуванням. Коли для осадження білків із екстрактів використовуються антитіла, метод називається **імунопреципітацією**. Перевагами імунопреципітації є простота і швидкість виконання. Він придатний для осадження як малих, так і великих білків. Також він дозволяє проводити подальше визначення як сильних, так і слабких фізичних взаємодій між білками.



*Схема процесу імунопреципітації: 1 – додають антитіла, специфічні до шуканого білка, 2 – антитіла зв'язуються з білком, 3 – додають протеїн А чи G для переведення комплексу антитіло-білок у нерозчинний стан, 4 – центрифугують пробірки, що містять комплекс антитіло-білок, видаляють супернатант і відмивають*

Розроблено велику кількість протоколів імунопреципітації. Усі вони включають наступні етапи: 1) лізис клітин і приготування клітинних екстрактів; 2) упізнання і зв'язування антитіл з білком; 3) преципітація комплексів антиген-антитіло; 4) відмивання імунопреципітату для видалення неспецифічних білків.

Ізольовані імунопреципітати можуть бути використані для визначення активності ферменту після того, як білок буде відокремлено від антитіл за допомогою, наприклад, гелелектрофорезу. Після цього білки виявляють різними методами: за радіоактивністю (мітять їх радіоактивними мітками до того, як проводять лізис клітин), імуноблотингом (поєднання електрофорезу та ІФА) або ІФА.

## 2) Імуноферментний аналіз

Це метод лабораторної діагностики, заснований на реакції «антиген-антитіло», який дозволяє виявляти продукти білкової природи. Можна сказати, що виявлення присутності ліганду в рідкому зразку проводиться за допомогою антитіл, спрямованих проти білка, який потрібно виміряти

## 3) Радіоімунний аналіз

Високочутливий метод визначення концентрації антигенів *in vitro*, що базується на їхньому конкурентному зв'язуванні з антитілами. При цьому використовують радіоактивно мічені антитіла або антигени. Детекцію сигналу проводять за радіоактивністю на лічильниках – радіоспектрометрах. Інтенсивність випромінювання прямо пропорційна кількості молекул антигену, що зв'язалися з антитілами

### **Б) Вивчення цАМФ-залежної сигнальної системи**

Широко використовуються:

- ✓ радіоактивні методи, які базуються на конкурентному зв'язуванні міченого і неміченого цАМФ,
- ✓ методи радіоімунного аналізу
- ✓ нерадіоактивні методи, наприклад ІФА, у яких вміст цАМФ визначають за допомогою специфічних антитіл, а детекцію сигналу здійснюють колориметрично чи флуориметрично.
- ✓ вміст цАМФ визначають біоломінесцентними методами з використанням ферменту люциферази.
- ✓ метод флуоресцентного перенесення енергії, що дозволяє відстежувати зміни внутрішньоклітинного рівня цАМФ у відповідь на зміну активності рецепторів, пов'язаних із G-білками. Цей процес може використовуватися для переносу енергії між двома флуоресцентними барвниками, для яких можна як збуджувати донор, так і реєструвати перехід акцептора у збуджений стан оптичними методами. В результаті метод дозволяє реєструвати відстань між молекулами барвників або їх взаємну орієнтацію, і в результаті використовувати ці барвники як мітки для дослідження інших молекул.

### **В) Визначення активності аденілатциклази**

Аденілатциклази є родиною мембранозв'язаних ферментів, які каталізують перетворення АТФ на цАМФ – загальнопоширений вторинний посередник, який активує цАМФ-залежну протеїнкіназу. Методи визначення активності аденілатциклази базуються на вимірюванні вмісту цАМФ і дозволяють оцінювати швидкість перетворення АТФ на цАМФ. Поряд із радіоізотопними методами широко використовують імуноферментні, флуоресцентні та люмінесцентні методи.

Також подібними методами визначають й інші внутрішньоклітинні посередники.