

Введение

Курс молекулярной биологии предоставляет студенту-медику глубокое понимание клеточных функций в молекулярных терминах. Эти знания необходимы для лучшего понимания таких традиционных дисциплин как гистология, анатомия, цитология, эмбриология, физиология, генетика, эволюция.

Курс молекулярной биологии представляет обобщенные знания и научные предположения относительно основных генетических процессов, осуществляемых на клеточном уровне. Изучаемый на протяжении курса материал (например, аномалии мембран и цитоскелета) является основой для понимания патологических процессов, происходящих в клетке (старение, смерть клетки, превращение нормальной клетки в раковую клетку). Основы молекулярной биологии необходимы при изучении всех медицинских дисциплин (генетика, биохимия, физиология, вирусология, микробиология, гистология, анатомия и др.).

В связи с изданием настоящей книги, имеем возможность поблагодарить всех, кто помог в создании и публикации этого курса.

В первую очередь благодарим доцента Н.И. Барбакаря, заведующего лабораторией "Молекулярной биологии" Института Генетики АН Молдовы, который вдохновил нас и руководил научной частью данного курса.

Выражаем признательность профессору П.К. Галецкому, проректору ГМФУ "Николае Тестемицану", который поддержал издание учебника.

Особенную благодарность выражаем рецензентам Курса: доценту Н.В. Ешану, декану Лечебного Факультета; профессору Л.Т. Лысому; Галине Лупашку, заведующей лабораторией иммуногенетики Института Генетики АН Молдовы.

Студент должен знать:

- ↙ Молекулярная биология - это дисциплина, изучающая молекулярную структуру и организацию живых клеток, а также взаимодействие клеток между собой (именно этот процесс обеспечивает синхронную и слаженную работу такого сложного организма как человек).
- ↙ Нормальная клетка воспринимает сложные биологические сигналы, приходящие из разных источников, и отвечает на них безошибочным изменением функций дифференцировки и пролиферации.
- ↙ Материальным веществом наследственности и изменчивости живых организмов является ДНК - главная обладательница генетической информации, которую она реализует в процессе биосинтеза белков. Благодаря точной репликации молекул ДНК эта информация передается потомству, обеспечивая, таким образом, непрерывность жизни.
- ↙ В отличие от прокариотических клеток, состоящих лишь из одного функционального пространства, ограниченного плазматической мембраной, эукариотические клетки состоят из многочисленных функционально различающихся компартментов, каждый из которых ограничен собственной мембраной. Эти компартменты, которые представляют собой ряд субклеточных структур, были названы клеточными органоидами (органеллами). Каждый органоид играет свою роль в росте и метаболизме клетки и содержит специфический набор ферментов и других специализированных молекул. Сообщение между компартментами осуществляется посредством сложной системы распределения, благодаря которой специфические продукты переносятся из одного компартмента в другой.

- ↪ Многоклеточные организмы зависят от свойств эукариотических клеток выражать наследственную информацию разнообразным способом (дифференциация клеток), обеспечивать соединения клеток (образуя систему межклеточных контактов). У человека имеется более 200 различных типов клеток. Все они образовались в результате дифференциации и выполняют собственные функции. Этот процесс является основой образования всех тканей. Рост и дифференциация клеток разворачиваются согласно точной генетической программе (гены активируются и инактивируются в зависимости от потребностей клеток).
- ↪ Митотическое деление является основным механизмом размножения клеток, обеспечивает рост многоклеточного организма и определяет его клеточную биомассу. У организмов с половым размножением существует особый тип деления - мейоз. Этот процесс начинается в диплоидной клетке, а завершается образованием гаплоидных клеток - гамет. При слиянии гамет образуется диплоидная зигота, которая и является первой клеткой организма. Пуск, разворачивание, ход и последовательность событий клеточного деления находится под контролем многих вне- и внутриклеточных факторов: образование и разрушение комплексов циклин - циклинзависимых протеинкиназ (cdk); белковых факторов роста; сигнальных белков клеточного роста; клеточной плотности; белков, участвующих в клеточной адгезии, белков, кодируемых антионкогенами (pRB, p53).
- ↪ В организме, клетки, исчерпавшие свои ресурсы и выполнившие свои функции, удаляются и замещаются молодыми клетками. Процесс удаления таких клеток является физиологическим процессом, называется апоптозом и обеспечивает клеточный гомеостаз органов. Апоптоз появляется в процессе нормального развития

эмбриона человека при обратном развитии временных органов, при удалении межпальцевых перепонки эмбриона человека, при клональной селекции клеток иммунной системы.

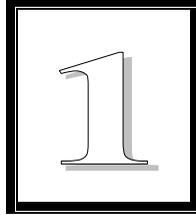
- ⇒ Проллиферативная способность нормальных клеток контролируется стимулирующими генами (протоонкогены) и подавляющими ее (антионкогены, супрессоры). Злокачественные опухоли возникают в результате нарушения равновесия между этими группами генов, что приводит к неконтролируемой пролиферации.
- ⇒ Бурное развитие молекулярной биологии стало возможным благодаря новым методам электронной микроскопии, использованию культур клеток, получению и использованию моноклональных антител, технологии рекомбинантных ДНК, возможности манипулировать генами, а также развитию кибернетики, что, в сочетании с быстрым развитием компьютерной техники, привело к увеличению аналитических мощностей и позволило унифицировать биологический эксперимент, молекулярный субстрат и терминологию.

Практическое значение знаний, полученных студентами при изучении курса МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

Знания молекулярной организации и функции нормальных клеток должны стать основой для понимания патологических феноменов на клеточном и молекулярном уровне. Студент (как будущий врач или исследователь) сможет понять и участвовать в создании новых лекарств со специфическим действием, в создании новых принципов и подходов к лечению, диагностике, профилактике различных заболеваний.

Открытие новых технологий прямого анализа гена - технологии рекомбинантных ДНК - является технологической революцией в биологии и медицине.

При любом заболевании проявление, течение и завершение всех патологических процессов происходят именно в клетке и зависят от ее специфической инфраструктуры. Следовательно, будущий медик должен знать молекулярную организацию нормальных клеток для успешной профессиональной деятельности в современных условиях.



БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Биологические системы представляют собой комплекс макромолекул (нуклеиновых кислот, белков, липидов, углеводов), которые взаимодействуют между собой, обеспечивая непрерывный поток информации, энергии и материи. Программа деятельности этих систем записана в ДНК. Реализация этой программы осуществляется через синтез и взаимодействия разных типов белков.

Организация биологических систем

Биологические системы характеризуют ряд особенностей:

- **самовоспроизведение** - способность создавать себе подобных, которое обеспечивается свойством молекул ДНК реплицироваться (1 молекула ДНК → 2 молекулы ДНК; 1 клетка → 2 клетки, и т.д.);
- **самоконсервирование** - свойство живых систем оставаться неизменными во времени (существование видов на протяжении времени). Основывается на свойстве нуклеиновых кислот (ДНК) реплицироваться, образуя новые молекулы с тем же содержанием и структурой и с

- последующим равномерным распределением генетического материала в процессе деления клеток;
- **саморегуляция** - способность биосистемы самостоятельно регулировать свою деятельность. Обеспечивается механизмом обратной связи (**feedback**), при котором конечный результат процесса регулирует процесс в целом. Например, количество тирозина в крови регулирует активность щитовидной железы. Подобным образом регулируется частота сердечных сокращений, артериальное давление, уровень метаболитов крови, глюкозы и др;
 - **метаболизм** - представляет собой обмен веществ организма. Метаболизм характеризуется **избирательностью** (отбор только необходимых факторов среды) и **специфичностью** (превращение поступающих в организм питательных веществ, сперва в более простые вещества, из которых затем синтезируются собственные макромолекулы).
 - **динамическое равновесие с окружающей средой** – свойство которое осуществляется благодаря постоянно-му потоку информации, вещества и энергии, все изменения среды приводят к соответствующим сдвигам в саморегулируемых внутренних системах для сохранения своего существования во времени и пространстве;
 - **целостность** – способность системы, состоящей из иерархических субсистем, функционировать как единое целое по отношению к среде (к примеру, организм состоит из подчиненных органов, которые, в свою очередь, состоят из тканей, образованных из клеток).

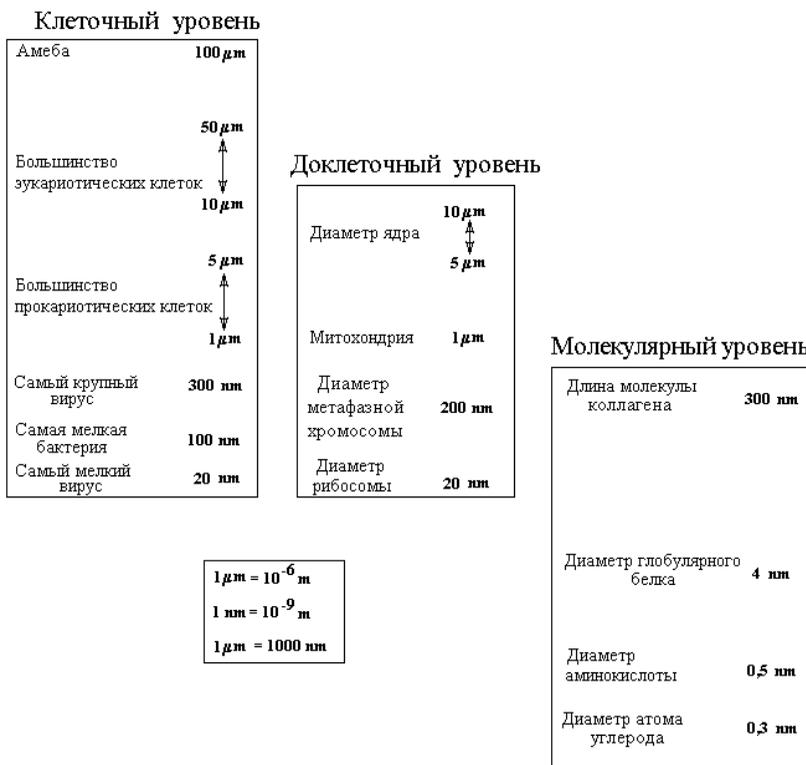
Уровни организации биосистем

Живая материя имеет несколько уровней организации, перечисленных ниже от микроуровней - к макроуровням:

Молекулярный – представленный молекулами, из которых состоят организмы. В составе живой материи присутствуют неорганические и органические вещества. Среди них важнейшую роль имеют биополимеры (нуклеиновые кислоты, белки, полисахариды), а также более простые соединения – моно-, ди- и олигосахариды и липиды.

Клеточный – представленный прокариотическими и эукариотическими клетками; которые ведут самостоятельный образ жизни или образуют многоклеточные организмы.

Масштабы биологических объектов



Тканевой – специализированные клетки с одинаковыми структурой и функциями образуют ткани. Путем запрограммированного объединения разных тканей образуются органы и системы органов, которые обеспечивают функцию многоклеточного организма.

Индивидуальный – представленный отдельными организмами – неклеточными (вирусы), одноклеточными (прокариоты и эукариоты) и многоклеточными.

Популяционный - представленный группами организмов одного вида, географически разделенных.

Биоценотический - сосуществование организмов разных видов на определенной территории.

Биосфера – совокупность всей живой материи планеты Земля.

Неклеточные формы жизни

Существуют такие биологические образования, которые не включаются в понятие живой системы и которым не присущи все фундаментальные свойства жизни – самовоспроизведение, саморегуляция, саморегенерация. К ним относятся вирусы и прионы, которым не свойственен собственный метаболизм, и они не способны делиться вне организма хозяина, на котором паразитируют. Они являются облигатными паразитами, которые вызывают различные заболевания у различных организмов. В то время как вирусы занимают промежуточное положение между живой и неживой природой, прионы являются лишь инфекционными агентами и не могут быть рассмотрены как живые организмы.

Вирусы

Вирусы состоят из белковой оболочки (*капсида*), внутри которой находится молекула ДНК или РНК, одноцепочечная или двухцепочечная (рис. 1.1). Иногда вирусы покрыты мембраной, которая происходит из мембраны разру-

шенной клетки-хозяина. Вирусный капсид может иметь разные формы: сферическую, палочковидную, многогранную и др. Их размеры варьируют от 20 до 250 nm. Вне клетки хозяина вирусы инертны: не делятся, ничего не используют и не выделяют в окружающую среду. Поэтому вирусы являются генетическими облигатными паразитами.

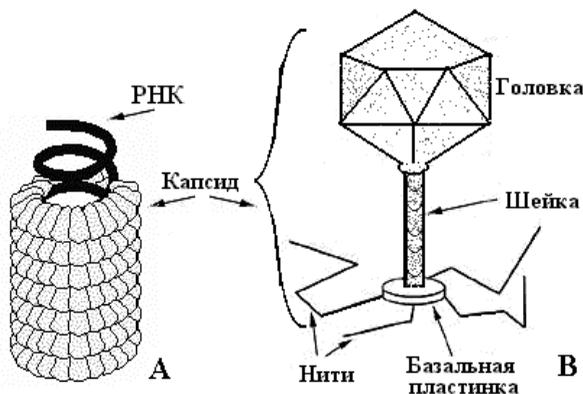


Рис. 1.1. Структура некоторых вирусов.
А – вирус табачной мозаики; В – бактериофаг λ

В момент контакта вирусной частицы с клеткой-хозяином генетический материал паразита внедряется в клетку. Используя ресурсы и ферментативный аппарат хозяина, вирусные частицы размножаются, за этим следует разрушение клетки. Такой способ размножения называется **литическим циклом**. Некоторые вирусы могут оставаться длительное время в латентном состоянии, внедряясь в ДНК хозяина, в так называемой стадии – **профага**. Под воздействием различных факторов среды происходит индукция или реактивация вируса. ДНК вируса отделяется от ДНК хозяина и переходит в цитоплазму. На этой стадии образуется **вегетативный вирус**. Вирусные частицы размножаются при помощи метаболической системы хозяина, после че-

го происходит разрушение клетки. Такой жизненный цикл называется **лизогенным циклом** (рис. 1.2).

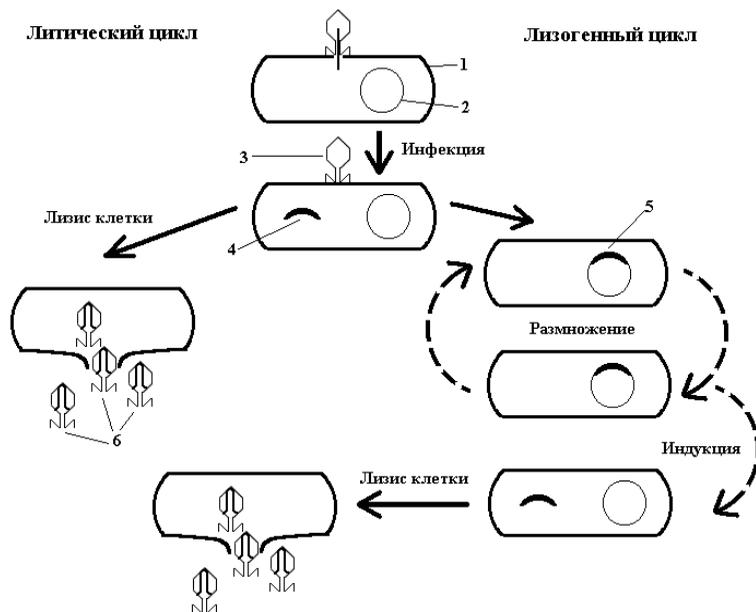


Рис. 1.2. Литический и лизогенный циклы развития бактериофага.
 1 - клетка-хозяин; 2 - ДНК хозяина; 3 - вирусная капсула; 4 - ДНК вируса; 5 - вирусная ДНК интегрированная в ДНК хозяина; 6 - новые вирусные частицы

Вирусы характеризуются высокой специфичностью по отношению к инфицированным клеткам, это относится как к виду организма, так и к тканевому типу клеток. Большинство вирусов паразитируют только на одном виде, некоторые могут паразитировать в клетках сразу нескольких родственных видов.

Таким образом, вирусы являются возбудителями болезней (грипп, герпес, СПИД, гепатит, полиомиелит). Вирусы также являются причиной возникновения некоторых форм рака, переносят гены от одного хозяина к другому

(между особями одного вида, а также особями разных видов).

Прионы

Это так называемые инфекционные агенты, вызывающие болезни у человека и животных, но не относящиеся ни к вирусам, ни к бактериям. Прионы представлены только белками, состоящими из $\cong 250$ аминокислот. В отличие от остальных клеточных белков, которым соответствует мРНК, прионы не синтезируются на базе мРНК, а являются продуктами неполного расщепления некоторых нормальных клеточных белков. Под воздействием прионовых белков некоторые клеточные белки изменяют свою конфигурацию и становятся неспособными к выполнению своих функций. Прионы вызывают нейродегенеративные и мышечные заболевания у человека и животных. Часто прионовые болезни являются спонгиозными энцефалопатиями, которые ведут к дегенерации мозга. Одна из самых распространенных болезней у крупнорогатого скота является *scrapie*. Среди болезней человека, вызванных прионами, наиболее известной является болезнь Куру, которая встречается среди аборигенов Новой Гвинеи, у которых распространен ритуальный каннибализм (благодаря которому передается инфекция). Некоторые прионовые болезни могут генетически наследоваться с частотой 1:1000000.

Клетка - элементарная, структурно- функциональная, генетическая единица жи- вого

Клетка представляет собой сложную систему, характеризующуюся:

- самовоспроизведением;

- саморегуляцией;
- самообновлением.

Каждая клетка отделена от окружающей среды *плазматической мембраной*, которая является липопротеидной структурой (рис. 1.3).

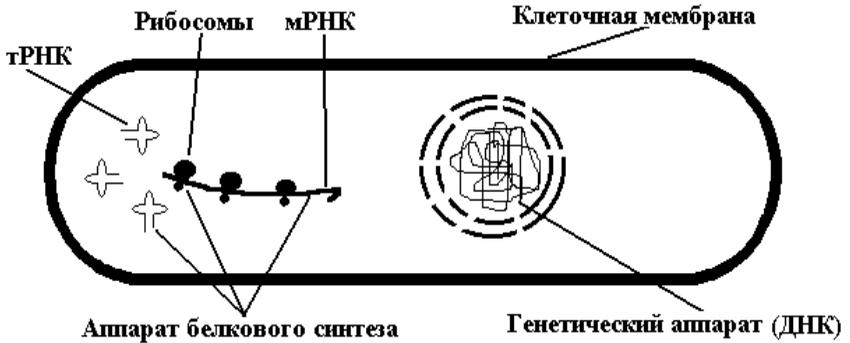


Рис. 1.3. Главные компоненты клеток

Плазмалемма определяет индивидуальность клеток, обеспечивает обмен веществ, регулируя химический состав клетки. Все клетки содержат *генетическую информацию в виде молекул ДНК*. В молекуле ДНК закодирована информация об организации и функционировании каждой клетки. Благодаря самовоспроизведению молекул ДНК, вновь образованные клетки содержат одинаковый генетический материал. Клетки многоклеточных организмов содержат одинаковые молекулы ДНК. Молекулы ДНК у прокариот располагаются в цитоплазме, а у эукариот отделены от цитоплазмы двумя мембранами ядра. Все клетки содержат *цитоплазму*, в которой происходят все химические реакции обмена веществ. В цитоплазме располагается *аппарат синтеза белков* - обязательный компонент всех клеток. Синтез белков осуществляется на основе мРНК с участием рибосом и тРНК.

Прокариотические клетки

К прокариотам относят бактерии, микоплазмы и цианобактерии (синезеленые водоросли). Все прокариоты являются одноклеточными организмами или колониальными формами, могут быть аэробами или анаэробами, размером от 1 до 10 μm . У прокариот отсутствует ядро, а генетический материал представлен кольцевой молекулой ДНК - **нуклеоидом**, который локализуется в цитоплазме (рис. 1.4).

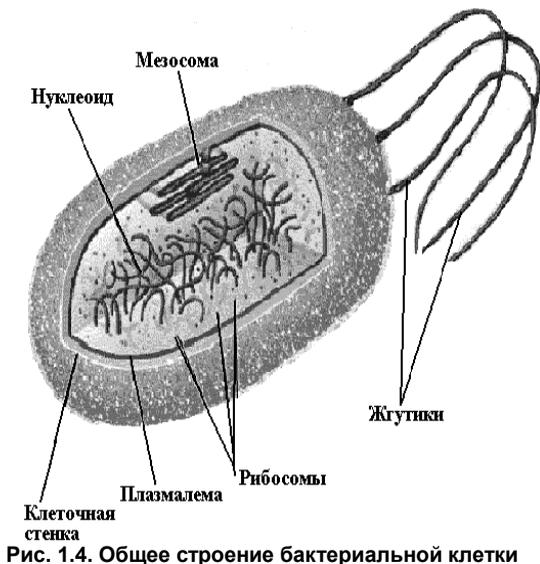


Рис. 1.4. Общее строение бактериальной клетки

Другой особенностью прокариот является то, что они имеют лишь один компартмент, они лишены внутриклеточных мембран и мембранных органоидов. Все ферментативные системы локализуются в цитоплазме, на плазмалемме или на мезосоме. Синтез белков происходит на рибосомах 70S (30S + 50S). Размножение осуществляется прямым делением. Некоторые бактерии вызывают инфекционные болезни (туберкулез, холера, бактериальная пневмония, скарлатина, сифилис, менингит, дифтерия). Другие (*Escherichia coli*) используются в новых биотехнологиях для

производства биологически активных веществ, лекарств, клонирования генов и др.

Эукариотические клетки

Эукариоты это ядродержащие клетки, размерами 10-1000µm, которые образуют одноклеточные, колониальные и многоклеточные организмы. В **ядре** находится большая часть ДНК клетки и там же синтезируется большая часть РНК клетки. **Цитоплазма** состоит из **цитозоля** и **органонидов** (ЭПС, аппарат Гольджи, митохондрии, лизосомы, пероксисомы), находящихся в суспензии (рис. 1.5).

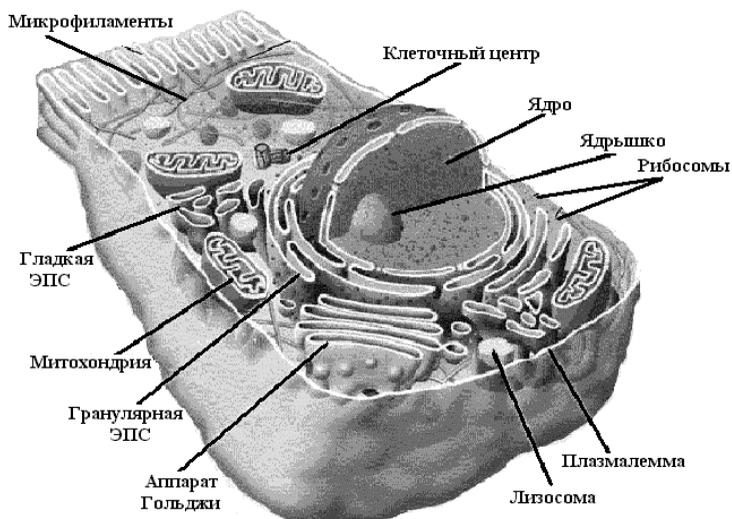


Рис. 1.5. Схема эукариотической клетки

Мембраны, органониды или внутриклеточные частицы имеют специальные функции, определяемые содержащимися в них белками. Размножаются эукариоты митозом и мейозом. Чаще являются аэробами. Растительные клетки могут быть автотрофными или миксотрофными, а животные клетки чаще гетеротрофные.

Клетки многоклеточных организмов, объединяясь, образуют ткани, из которых состоят органы. Органы с разными функциями объединены в системы органов, из которых формируется целостный организм.

Методы, используемые в исследовании клеток

При исследовании мелких объектов широко используются методы микроскопии и биохимические анализы.

Световая микроскопия. Осуществляется при помощи светового микроскопа. Могут изучаться одноклеточные организмы, культивируемые клетки, тонкие срезы тканей. Чаще изучаются фиксированные, окрашенные клетки, реже - живые (разрешающая способность 200-350 нм).

Микроскопия с использованием ультрафиолетовых (UV) лучей, на световых микроскопах со специальными линзами (разрешающая способность 130-140 нм).

Микроскопия в темном поле зрения с использованием видимых лучей света, но при боковом освещении объекта. Лучи света не могут пройти через объект и отражаются. Изучаются живые клетки, их подвижность (разрешающая способность 0,2 мкм).

Фазово-контрастная микроскопия, основана на разной рефракции молекул и структур клетки, изучаются живые клетки без фиксации и предварительной окраски.

Микроскопия в поляризованном свете, изучаются образования, которые вызывают поляризацию световых лучей (веретено деления, мышцы).

Люминесцентная микроскопия основана на способности некоторых клеток и специальных веществ (люминофоров) излучать свет в темноте.

Электронная микроскопия, вместо пучка света используется пучок электронов, а вместо зеркал - электромагниты. Разрешающая способность - 1 Å.

Электронная микроскопия со сканированием. Возможно объемное изучение структуры клетки. Электроны, отражаясь, при обратном движении, создают изображение на экране. Сочетается с криоскопией - быстрым замораживанием объекта исследования и образованием сколов с последующим их изучением.

Фракционирование компонентов клетки. Исследуемые клетки разрушаются путем механической или ультразвуковой гомогенизации. Фракции органоидов могут разделяться либо центрифугированием при различных скоростях, либо при центрифугировании в градиенте плотности.

Биохимические анализы. Клетки, ткани или жидкости организма могут быть изучены при помощи биохимических методов с целью определения химических компонентов (белки, жиры, углеводы)

Молекулярно-генетические анализы. Осуществляются анализы молекул нуклеиновых кислот в отношении количества копий генов в геноме, уровня транскрипции, первичной структуры, выявления мутаций. Молекулярно-биологические методы основаны на принципах манипуляции рекомбинантной ДНК.

Контроль знаний:

1. **Дайте определения:** биологическая система, клетка, вирус, эукариоты, прокариоты, прион, самовоспроизведение.
2. Что изучает молекулярная биология?
3. Каковы основные свойства биологических систем?
4. Каковы уровни организации живой материи?
5. Каковы методы изучения биологических систем?
6. Какими свойствами обладает эукариотическая клетка?