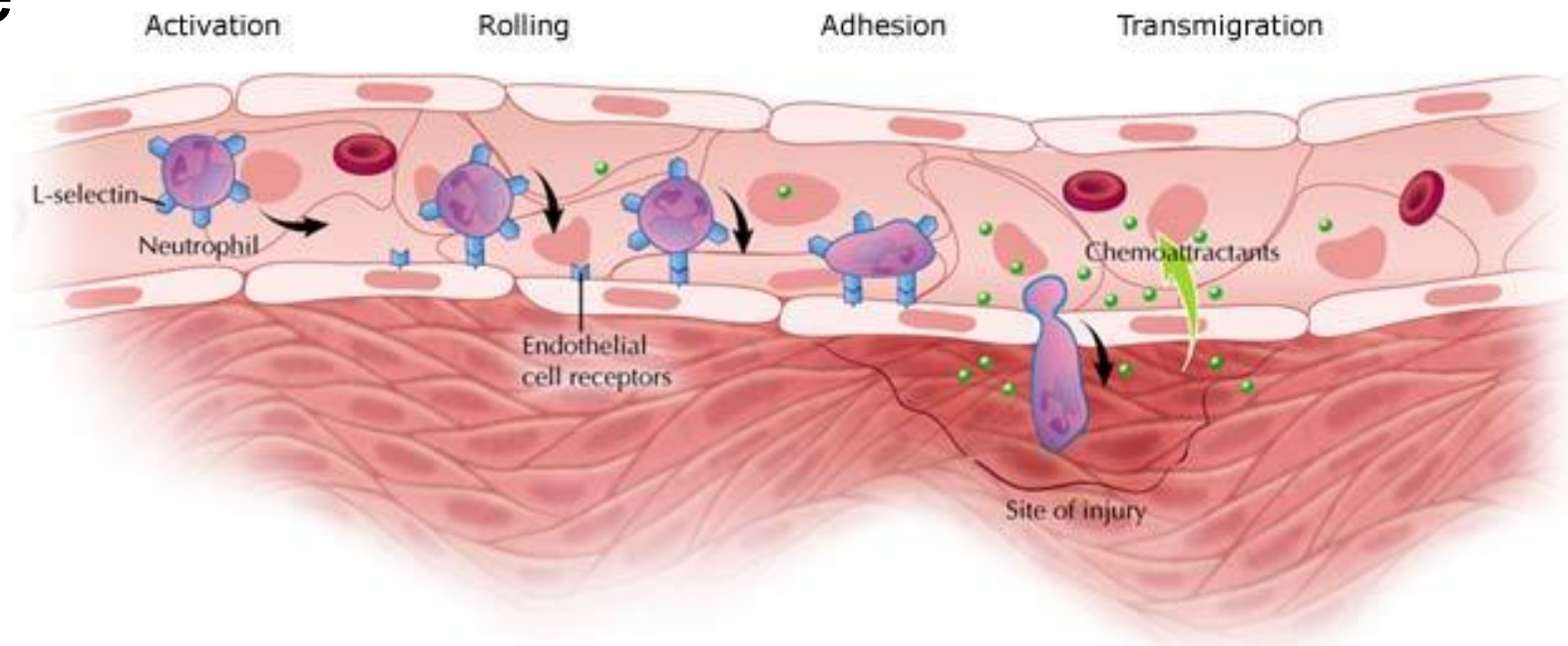


Хемотаксис

Выполнил: магистрант 1 курса
Кобякова М.И.

Хемотаксис (chemeia — химия и taxis — расположение) - направленное движение бактерий, клеток крови или других видов клеток по градиенту концентрации некоторых эндогенных и экзогенных веществ под действием химических реагентов



Хемотаксис бактерий

Основные понятия

- **Хемотаксис бактерий** – это двигательная реакция клеток в ответ на действие химических веществ.
- ДНК бактерии *E. coli* содержит 5 тыс. генов, из которых сто ответственны за подвижность и хемотаксис.
- За последние три десятилетия исследование хемотаксиса микроорганизмов вылилось в самостоятельную область биологии прокариот, добившуюся значительных успехов как в понимании биофизических и молекулярно-биохимических процессов, лежащих в основе бактериальной подвижности и хемотаксиса, так и в развитии специфических приемов и методов исследования.

АТТРАКТАНТЫ И РЕПЕЛЛЕНТЫ

Химические вещества, привлекающие микроорганизмы - **аттрактанты** (практически все сахара и аминокислоты), а отталкивающие – **репелленты** (жирные кислоты, спирты и другие потенциально вредоносные вещества).

- Чувствительность бактерии впечатляет — они легко детектируют изменение концентрации на 0,1 % при микромолярных концентрациях веществ, а диапазон детектируемых концентраций перекрывает пять порядков (исследования Берга и Брауна).

Аттрактанты и репелленты детектируются **за счет непосредственного взаимодействия со специфическими хеморецепторами**, а не за счет каких-либо внутриклеточных эффектов детектируемого вещества.

Аттрактантом для аэробных прокариот и репеллентом для анаэробных прокариот является молекулярный кислород. Аттрактанты часто представлены пищевыми субстратами, хотя не все вещества, необходимые для организма, выступают в качестве аттрактантов. Также не все ядовитые вещества служат репеллентами и не все репелленты вредны. Исследования Рочерта показали, что движение на аттрактанты можно избирательно подавлять, ингибируя реакцию на мясной экстракт повышением концентрации этилового спирта или хлороформа (Алдер)

Хемотаксис

Явление двигательной реакции микроорганизмов на химический раздражитель - **“хемотаксис”**.

В зависимости от фактора различают хемотаксис:



Фототаксис

(движение к свету или от него, свойствен прежде всего фототрофным бактериям);



Магнитотаксис

(у бактерий, обитающих в пресной и морской воде. Непрозрачные частицы определенной геометрической формы - магнитосомы, заполненные железом в форме магнетита (Fe_3O_4) и выполняющие функцию магнитной стрелки. На долю магнетита может приходиться до 4% сухого вещества бактерий);



Термотаксис



Вискозитаксис

(способность реагировать на изменение вязкости раствора и перемещаться в направлении ее увеличения или уменьшения).

Как движутся бактерии

“Жгутики” (“флагеллы”, “трипежи”) являются органами движения бактерий в жидкой среде.

Роль жгутиков как органов движения клетки - если у подвижных клеток механическим воздействием отделить жгутики от клеток, то последние теряют подвижность. если условия культивации остаются неизменными, а клетки не получили существенных повреждений, рост жгутиков возобновляется. Поступательное движение многожгутиковых бактерий восстанавливается только после того, как жгутики достигнут определенной, пороговой длины.

Число и характер расположения жгутиков на поверхности различных видов бактерий изменяются в широких пределах.

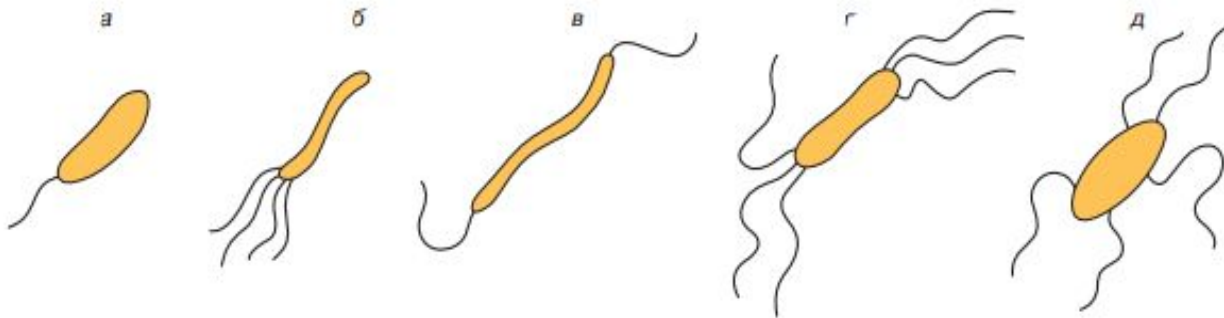


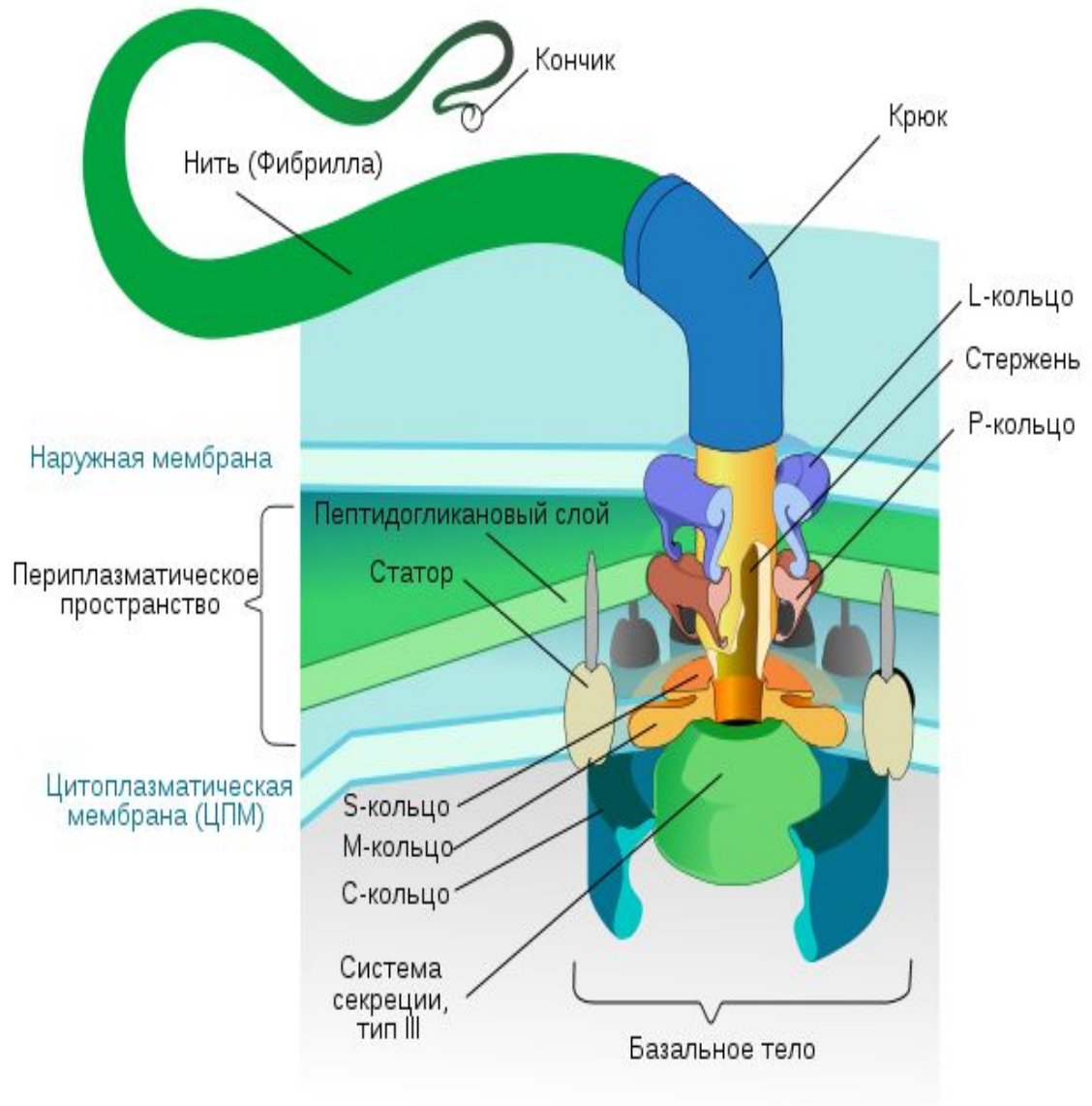
Рис. 1. Классификация бактерий по характеру расположения жгутиков на поверхности клетки: а – монополярные монотрихи, б – монополярные политрихи, в – биполярные монотрихи, г – биполярные политрихи, д – политрихи

Строение жгутика

• **Филамент (фибрилла, пропеллер)** — полая белковая нить толщиной 10—20 нм и длиной 3—15 мкм, состоящая из флагеллина, субъединицы которого уложены по спирали. Полость внутри используется при синтезе жгутика — он происходит в направлении от плазматической мембраны. По полости к собираемому в настоящий момент участку переносятся субъединицы флагеллина.

• **Крюк** — более толстое, чем филамент (20—45 нм), белковое (не флагеллиновое) образование.

• **Базальное тело** - трансмембранный мотор.



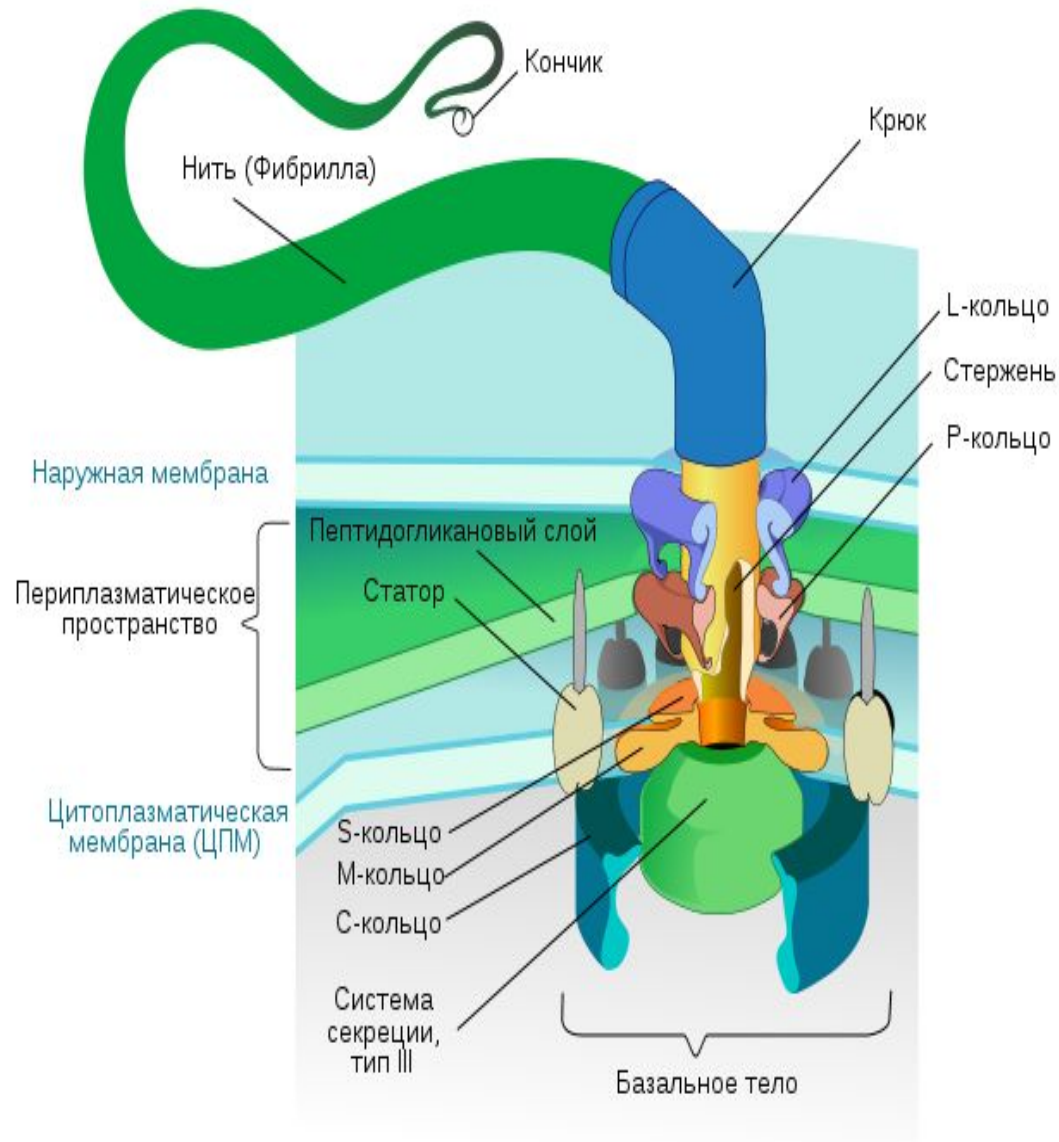
Базальное тело

Базальное тело - система колец, находящихся в плазматической мембране и клеточной стенке бактерий.

Два внутренних кольца — M и S-кольца (единое MS-кольцо) — являются **обязательными** элементами, M-кольцо находится в ЦПМ, а S — в периплазме грамотрицательных и пептидогликановом слое грамположительных бактерий.

Кольца — P и L — есть только у грамотрицательных бактерий, они расположены в **пептидогликановом слое и наружной мембране** соответственно, неподвижны и лишь направляют стержень ротора мотора.

Вокруг MS-кольца расположены **статоры** — белковые комплексы $\text{MotA}_4/\text{MotB}_4$, представляющие собой протонный канал (их может быть от 8 до 16)



Как движутся бактерии

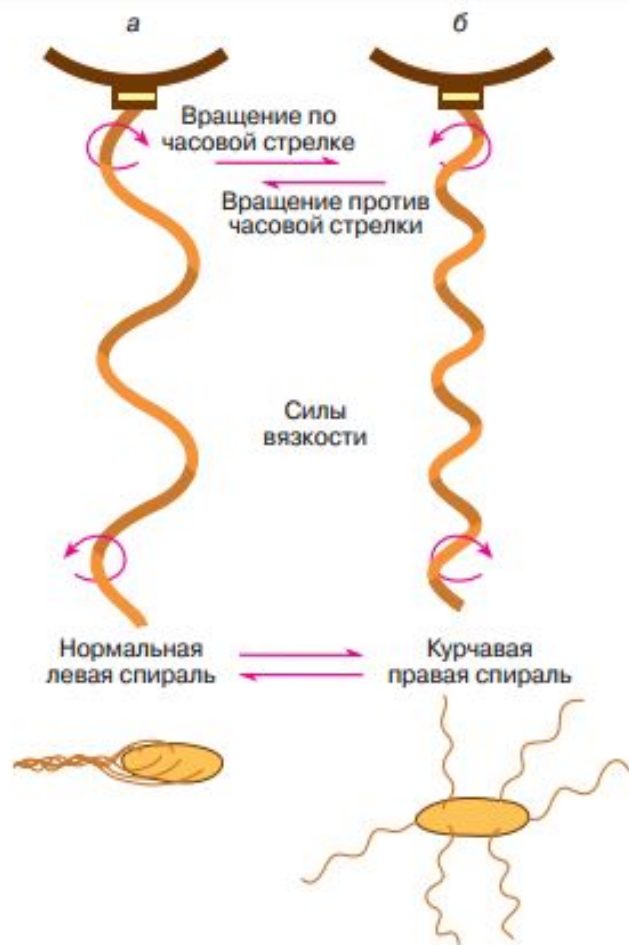


Рис. 3. Полный переход между нормальной лево-спиральной формой филамента, соответствующей фазе плавания клетки (а), и (б) курчавой правоспиральной формой, соответствующей кувирканию клетки, в вязкой среде при перемене направления вращения флагелл

Повышение концентрации аттрактантов приводит к росту вероятности вращения флагелл против часовой стрелки, а повышение концентрации репеллентов – к повышению вероятности противоположного направления вращения.

При вращении против часовой стрелки несколько флагелл, имеющих форму левосторонней спирали, могут образовать единый тяж **без** перекручиваний. При смене направления вращения такой тяж должен был бы перепутаться, однако фактически происходит перестройка флагелл.

При вращении по часовой стрелке флагеллы меняют свою форму: вместо левой спирали с крупным шагом возникает правая спираль с мелким шагом и тяж распадается, бактерия останавливается и начинает кувиркаться.

При последующей смене направления вращения флагелл вновь образуются левоспиральные структуры, они снова формируют тяж и бактерия начинает плыть в новом направлении. Таким образом было установлено, что **изменения химического состава среды, детектируемые специфическими белками-рецепторами, приводят к формированию внутриклеточных сигналов, управляющих режимом переключения направлений вращения флагелл.**

Модель работы флагеллярного мотора (Скулачев, Глаголев):

вращение жгутика объясняется электростатическим взаимодействием между подвижной роторной белковой структурой жгутика и неподвижно закрепленным в мембране статорным белковым комплексом – настоящее подобие современного электродвигателя.

Таким образом, приписываемое человеку изобретение колеса было осуществлено в природе задолго до появления человека =).

Белковый аппарат хемотаксиса бактерий

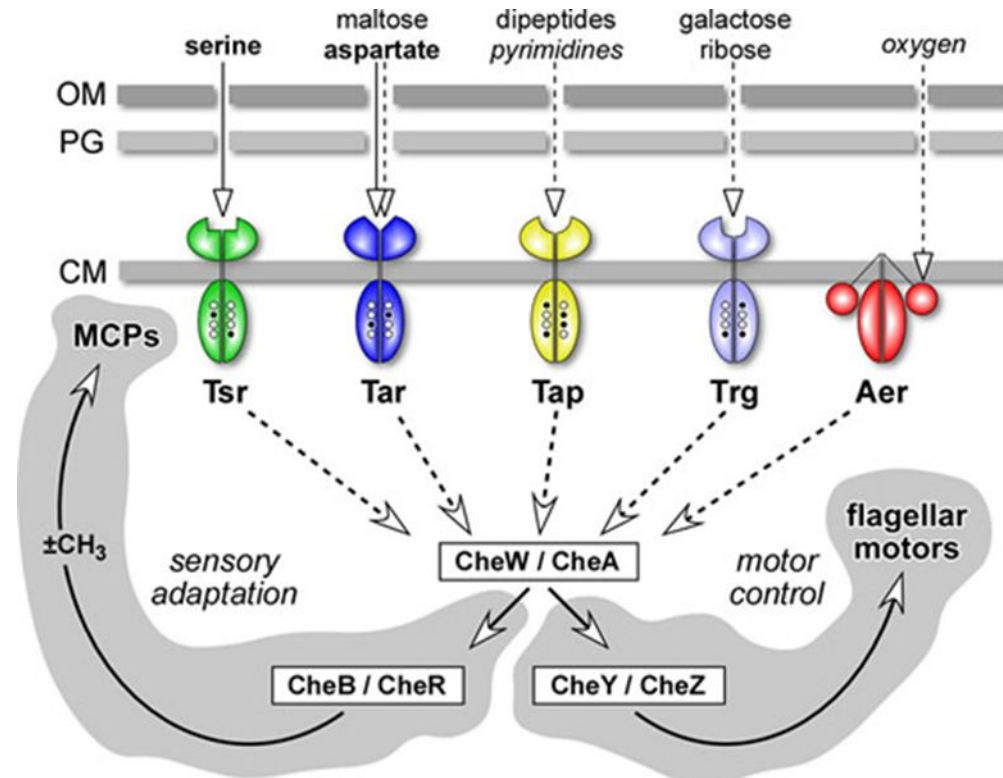
Три класса белков участвуют в хемотаксисе: трансмембранные рецепторы, цитоплазматические сигнальные белки и ферменты адаптивного метилирования.

Рецепторы хемотаксиса

- Многие бактерии детектируют хемотаксические стимулы при помощи рецепторов - метилируемые белки хемотаксиса (methyl-accepting chemotaxis proteins, MCPs).

- Эти белки являются мембранными сенсорами, состоят приблизительно из 550 аминокислотных остатков и являются димерами.

- Хорошо изучены 4 MCP-белка из *E. coli*, реагирующие на серин (Tsr), мальтозу (Tar), рибозу, глюкозу и галактозу (Trg) и дипептиды (Tap).



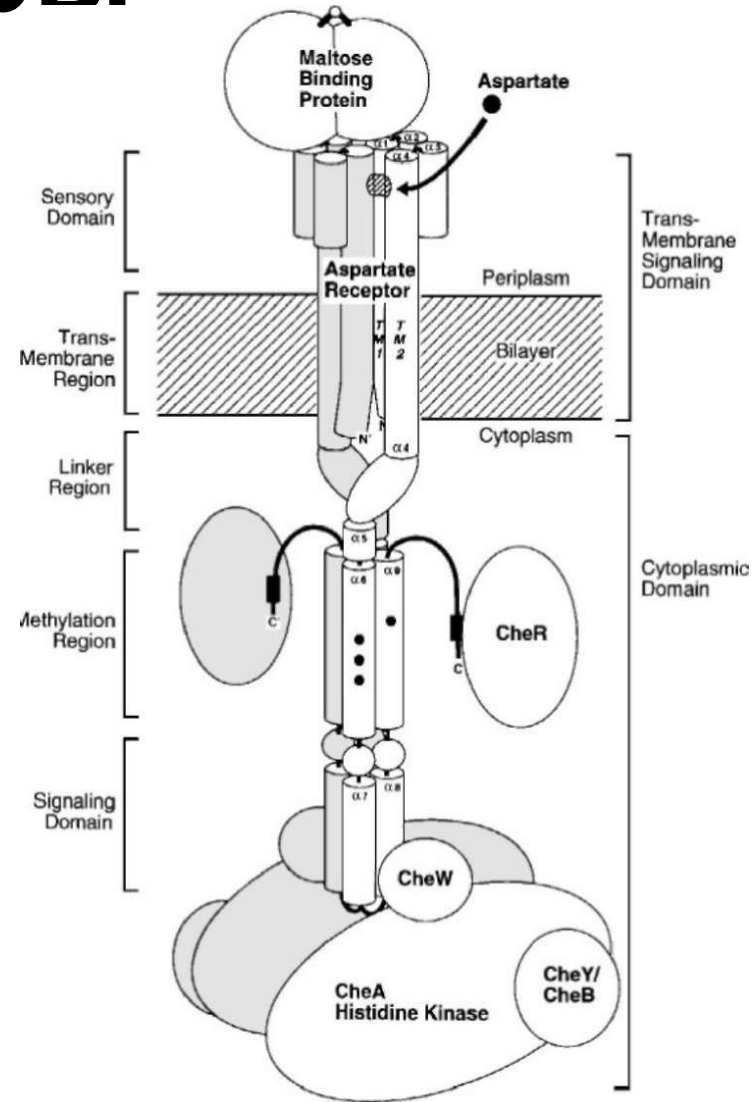
Трансмембранные рецепторы

Серин, аспарат и цитрат связываются **непосредственно** с рецепторами, тогда как сахара и дипептиды сначала связываются с соответствующими **периплазматическими** белками, а уже эти комплексы взаимодействуют с рецепторами.

MCP реагируют на изменения температуры и pH, а также являются рецепторами для различных репеллентов.

Классический рецептор хемотаксиса состоит из:

- аминоконцевой трансмембранной спирали,
- периплазматического собственно сенсорного домена, сложенного из четырех α -спиральных участков,
- второй трансмембранной спирали,
- большого цитоплазматического сигнального и адаптационного домена.



Цитоплазматические сигнальные белки

Взаимодействие между рецепторами и переключателем жгутика осуществляется четырьмя белками:

- CheA — гистидинкиназа
- CheY — PO, аспараткиназа
- CheW — «адаптор» между рецептором и CheA
- CheZ — белок, способствующий дефосфорилированию CheY-P

Пара белков CheA-CheY представляет собой двухкомпонентную регуляторную систему.

Гистидинкиназа CheA функционирует в виде димера, с которым связываются два мономера CheW, и уже этот комплекс вступает в ассоциацию с димерным рецептором. В составе такого комплекса автокиназная активность CheA резко возрастает, что усиливает перенос фосфата от CheA~P к CheY.

CheY~P связывается с FliM моторно-переключательного комплекса базального тела, что приводит к вращению жгутика по часовой стрелке.

CheZ предотвращает накопление CheY~P, стимулируя автофосфатазную активность CheY.

При отсутствии аттрактанта концентрация CheY-P поддерживается на уровне, способствующем вращению жгутика преимущественно *по часовой стрелке* и, следовательно, отсутствию упорядоченного движения бактерии.

Связывание аттрактанта с рецептором индуцирует конформационное изменение, которое передается через мембрану и подавляет автокиназную активность CheA. Концентрация CheY~P падает, и жгутики бактерии более продолжительное время вращаются против часовой стрелки. Поэтому клетки будут дольше двигаться прямолинейно, если они попадают в среду с более высокой концентрацией аттрактанта. Однако этот механизм не объясняет, как клетка может реагировать на постоянно возрастающую концентрацию аттрактанта. Этой цели служит сенсорная адаптация.

Метилазы хемотаксиса и сенсорная адаптация

Адаптация сенсорного аппарата достигается путём обратимого метилирования рецепторов, в котором участвуют два белка — **метилтрансфераза CheR** и **метилэстераза CheB**. Метилирование рецепторов оказывает действие, противоположное связыванию аттрактанта. Интересно, что метилирование стимулируется связыванием аттрактанта с рецептором и в конечном итоге нейтрализует эффект связывания аттрактанта.

С учетом метилирования принцип работы молекулярной машины хемотаксиса выглядит следующим образом.

- В отсутствие аттрактанта хеморецептор находится в активированном состоянии и его сигнальный домен стимулирует киназную активность CheA, что ведет к фосфорилированию CheY, а фосфо-CheY, взаимодействуя с переключателем мотора, вызывает вращение жгутика по часовой стрелке, что приводит к «кувырканию» бактерии на месте.

- Связывание аттрактанта инактивирует рецептор, и его сигнальный домен уже не может стимулировать киназную активность CheA, концентрация фосфо-CheY быстро падает (что стимулируется белком CheZ), направление вращения жгутика меняется, и бактерия движется прямолинейно.

- Прямолинейное движение, однако, может прекратиться по двум причинам. Если бактерия начала двигаться в неблагоприятном направлении, рецептор освобождается, начинается фосфорилирование CheY, и бактерия снова «кувыркается» на месте. Кроме того, когда киназа CheA «выключена», одновременно с дефосфорилированием CheY~P происходит дефосфорилирование CheB~P, хотя и с меньшей скоростью (поскольку CheB-P не является субстратом для CheZ), что приводит к повышению степени метилирования рецептора и восстановлению его сигнальной активности.

Поскольку и CheY, и CheB являются свободными цитоплазматическими белками, степень их фосфорилирования будет зависеть от **степени метилирования рецепторов и их загруженности лигандами**. Это делает возможным вместо ответа «все или ничего» плавно регулировать подвижность бактерий в широком диапазоне концентраций аттрактантов и репеллентов.

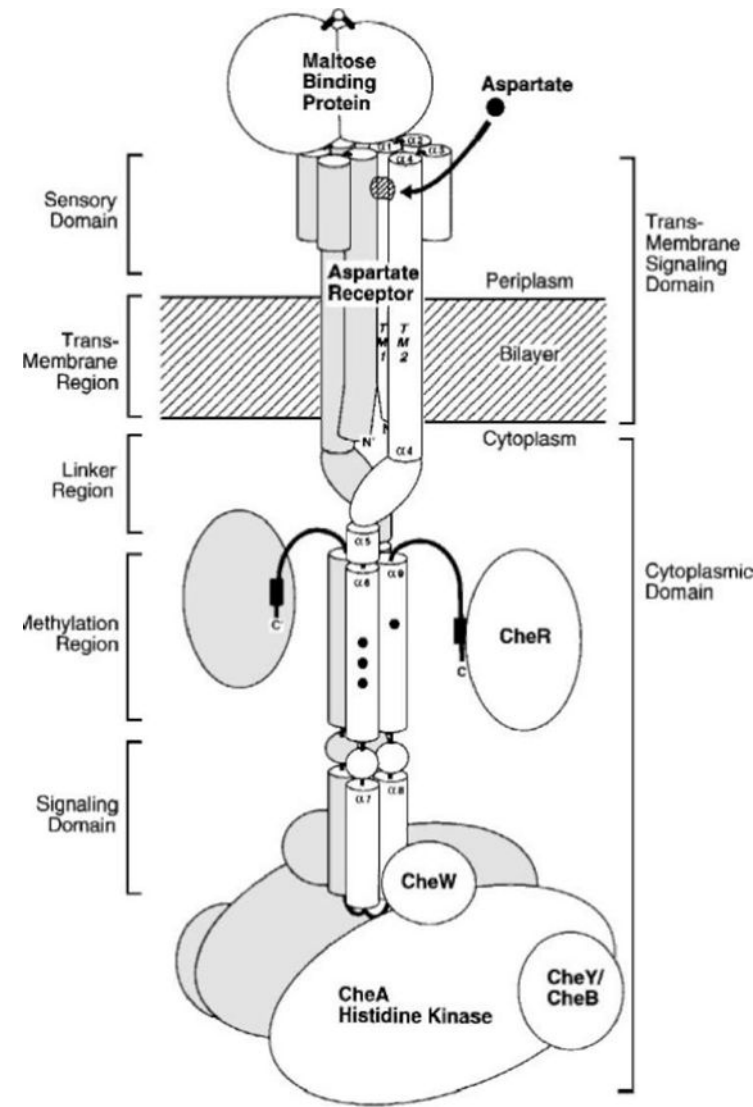
Трансляция внеклеточного стимула во внутриклеточный сигнал

Для объяснения механизма трансмембранной передачи сигнала молекулой хеморецептора было предложено две модели.

Первая модель (модель ножниц): контакт лиганда с дистальными концами связанных с мембраной спиралей хеморецептора может индуцировать значительное перемещение трансмембранных сегментов. В несвязанном с лигандом состоянии субъединицы рецептора предположительно взаимодействуют между собой только в области первого трансмембранного сегмента.

Связывание с лигандом вызывает сближение сенсорных и периплазматических субъединиц, что передается сигнальным субъединицам и обеспечивает их взаимодействие между собой, а в таком виде они уже не могут взаимодействовать с CheA и стимулировать его автокиназную активность. Метилирование создает стерические препятствия для взаимодействия сигнальных доменов между собой, что снова позволяет им стимулировать автокиназную активность CheA.

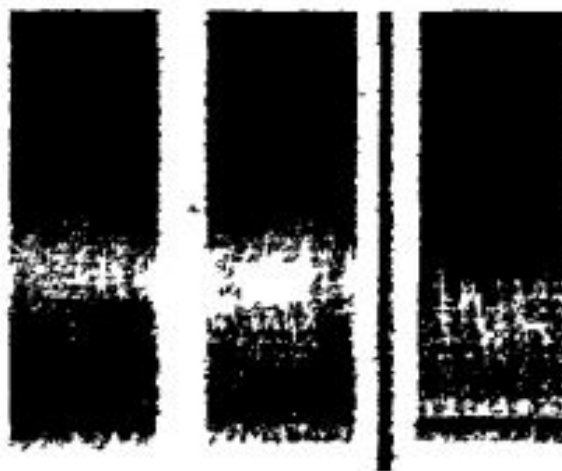
Вторая модель (модель пистона), основанная на скольжении трансмембранных сегментов (ТМС) друг относительно друга. В соответствии с этой моделью аминоконцевой ТМС закреплена в мембране жестко, тогда как второй более подвижен и, при связывании лиганда, скользит «вниз», то есть в сторону цитоплазмы, что и вызывает конформационное изменение цитоплазматического сигнального домена, инактивирующее его. Вариация на эту тему — участие двух амфипатических спиралей линкерного домена в изменении конформации.



Капиллярный



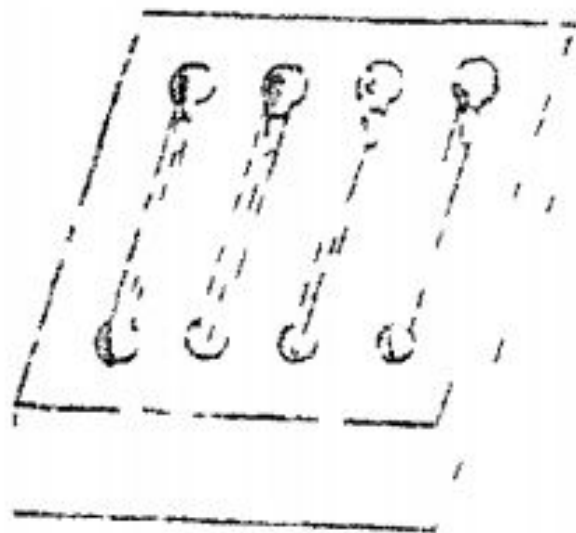
Денситометрический



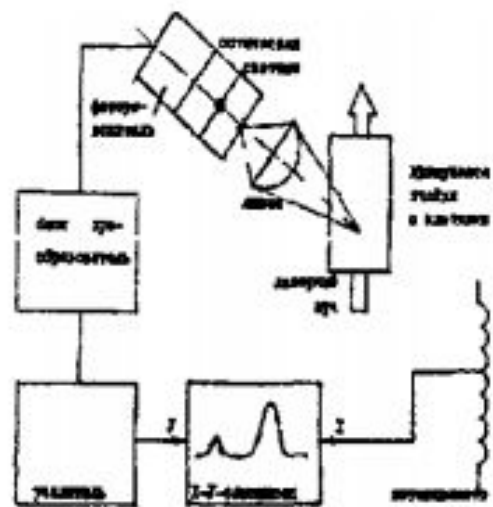
Проточный в камере



Комбинированный



Лазерное светорассеяние



Проточный в колонке с пористым материалом

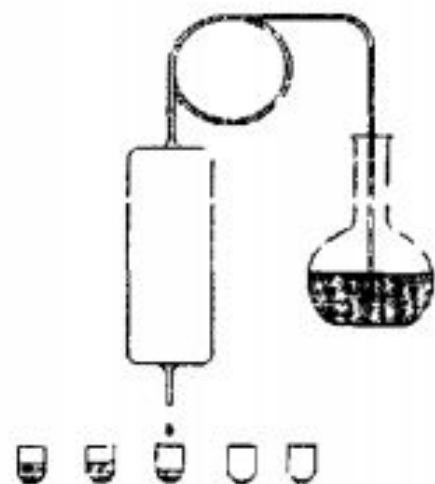


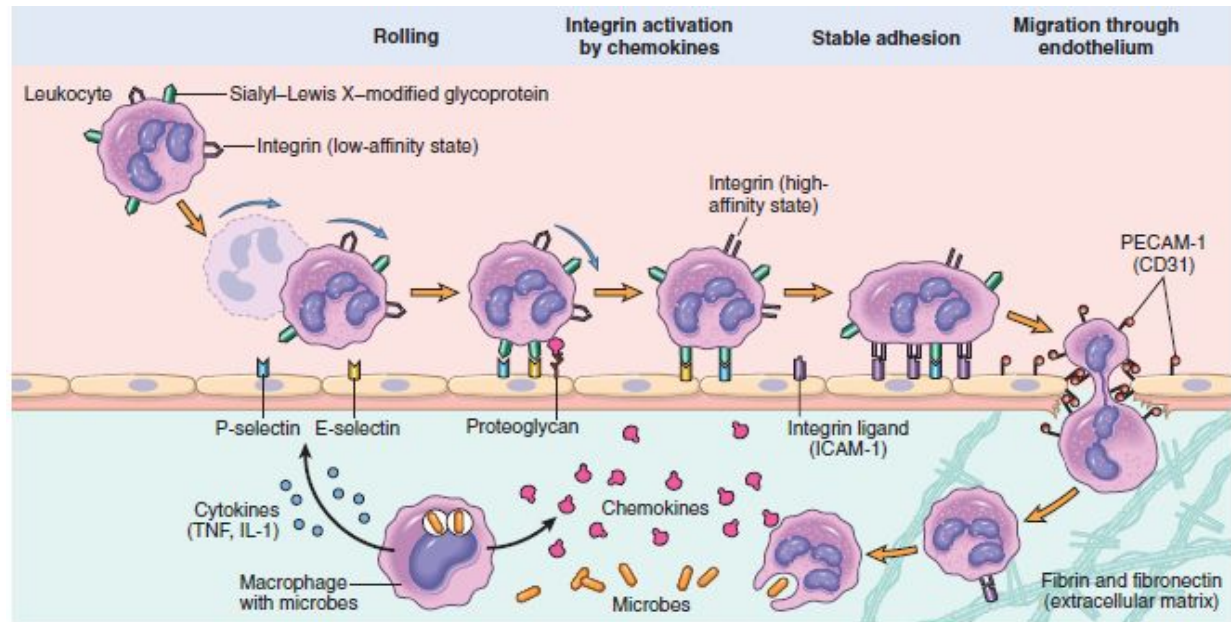
Рис. 1. Способы измерения хемотаксиса бактерий.

Хемотаксис эукариот

Хемотаксис – фундаментальное явление, имеющее много физиологических и патофизиологических приложений.

Хемотаксис проявляется:

1) в репродуктивной фазе, последующих этапах эмбрионального развития (закладку, ориентацию и формирование органов, мобилизацию и хоуминг стволовых и прогениторных клеток). 2) при иммунном ответе лимфоцитов и развитие воспалительных реакций, эндотелий-зависимого ангиогенеза, созревание и росте сосудов, для навигации и роста нервных окончаний. 3) участвует в воспалении, ранозаживлении и ремоделировании при регенерации и репарации тканей. 4) важное звено в патологии инфекционных и аллергических заболеваний, астмы и атеросклероза. 5) Ключевая роль в метастазировании опухолей.



Клетки мигрируют, используя *протрузии (псевдоподии)*, которые представляют собой выросты переднего края плазматической мембраны – того, что обращен в сторону движения. Псевдоподии различной формы и размеров скрепляют клетку с окружающим матриксом за счет *адгезивных контактов* или *заполняя собой лакуны в окружающем 3-мерном матриксе*.

В первом случае тело клетки после этого «протаскивается» вперед за счет тянущих усилий, прикладываемых к точкам прикрепления, а во втором случае тело перемещается за счет образования мембранных пузырей и «выдавливания» в них цитоплазмы, известное как *блеббовидное движение* (blebbing motility).

Ключевым событием для начала миграции является **поляризация** клетки, приводящая к изменению ее формы и морфологии, и определяющая ее дальнейшее поведение.

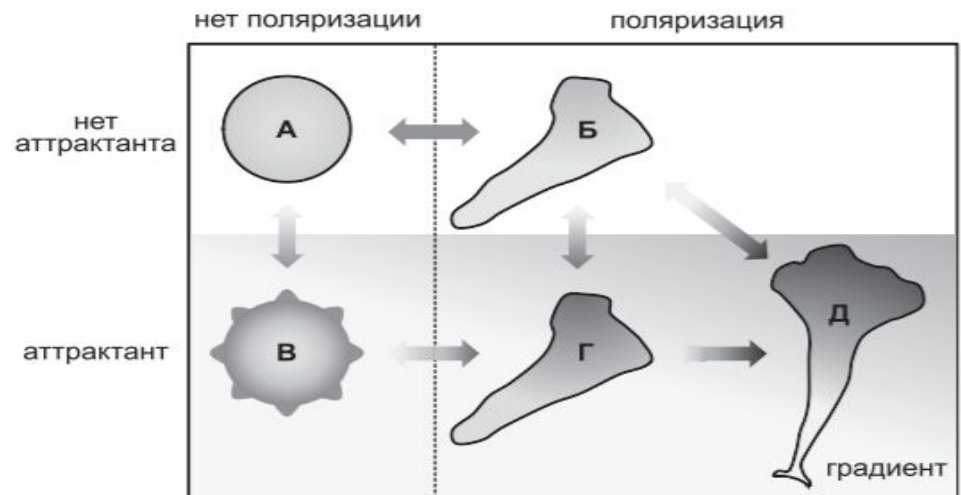


Рис. 1. Схема морфологических изменений клетки при поляризации и действии аттрактанта.

Последовательные изменения формы неполяризованной (А, В) и исходно поляризованной (Б, Г, Д) клетки представлены как обратимые переходы ее основных состояний в отсутствие (А, Б) или присутствии (В-Д) аттрактанта. Д – состояние в условиях градиента хемоаттрактанта, исходящего справа сверху, как показано полутонным затенением.

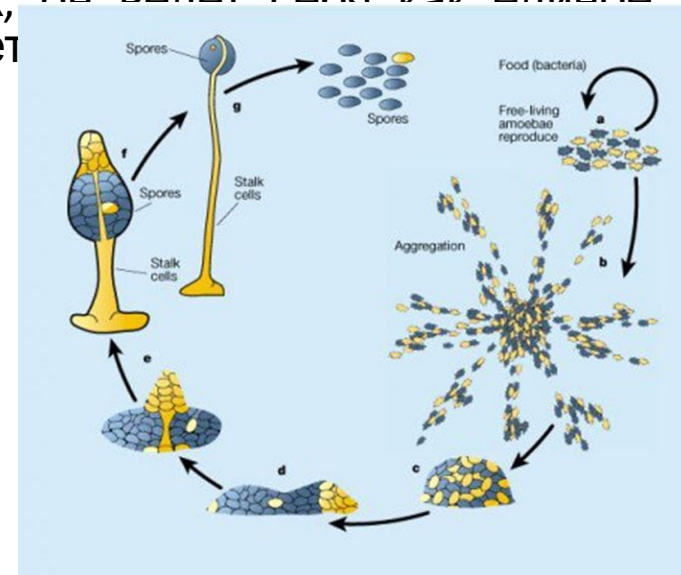
Объекты изучения

хемотаксиса

- **СЛИЗЕВИК *DICTIOSTELIUM***

В вегетативной фазе она существует в виде отдельных клеток, питается бактериями и дрожжами, которых узнает и настигает с помощью хемотаксиса. Отдельные клетки движутся со скоростью до 20 мкм/мин, и делятся каждые 4–12 часов. При истощении пищевых источников индивидуальные клетки запускают программу дифференцировки и вступают в репродуктивную фазу. Они синтезируют цАМФ и используют его как хемоаттрактант для передачи друг другу сигнала о необходимости собраться в одной точке и сформировать многоклеточник.

Образовавшийся клеточный агрегат может ползти как миниатюрный садовый слизняк. Именно из-за такого сходства он получил название слизевика. Хотя слизевик является скоплением одиночных клеток, он ведет себя как единое существо и направленно движется по градиенту свет



• ЛЕЙКОЦИТЫ

Хемотаксис полностью определяет функции лейкоцитов в иммунной системе млекопитающих. Нейтрофилы наиболее подробно изучены в этом отношении.

Они – одни из **наиболее быстрых и чувствительных** клеток млекопитающих, мигрирующих со скоростями 10–20 мкм/мин, определяющие до 1 % разницы концентраций хемоаттрактанта на дистанции длины клетки около 10 мкм. Используют GPCR как хемотактические рецепторы.

Хемотаксис полностью **зависит от** внешних воздействий. Чем круче градиент, тем более эффективна ориентация клеток в пространстве и их направленное движение.

Лейкоциты способны одновременно распознавать **несколько градиентов** различных хемоаттрактантов. Они избирательно направляются в различные участки инфекций и воспаления в организме под действием сложной гаммы более чем 50 хемокинов, обычно формирующих перекрывающиеся градиенты. Для того, чтобы успешно достичь цели, эти клетки преимущественно реагируют на так называемые «целевые факторы» и, в меньшей степени, на «промежуточные хемоаттрактанты».

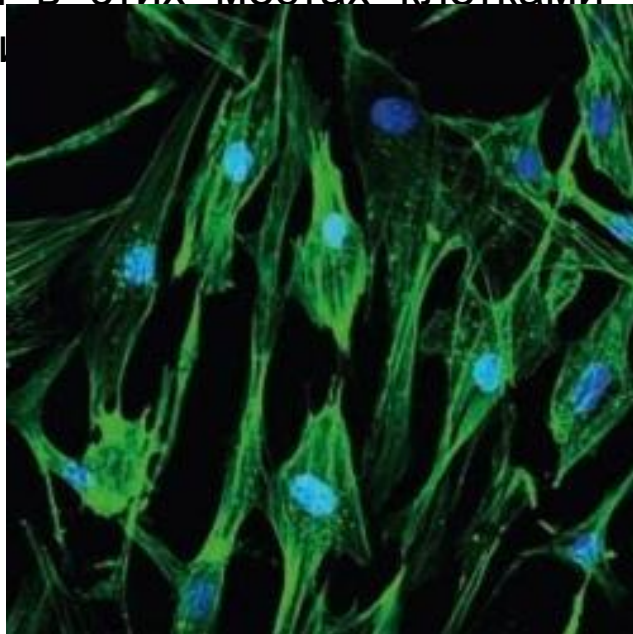


• **ФИБРОБЛАСТЫ**

Фибробласты **сильнее адгезируют**, используя многочисленные интегрины, и поэтому передвигаются значительно **медленнее**, со скоростями порядка 0,25–1 мкм/мин.

Они используют широкие ламеллиподии, заполненные поляризованной дендритной сетью актина, а также систему микротрубочек. Движение включает взаимодействие с внеклеточным матриксом и его деградацию под действием секретируемых металлопротеиназ.

Миграция фибробластов является важным этапом в процессе **ранозаживления и репарации** тканей. Она контролируется факторами роста и их рецепторами (RPTK) на поверхности клеток. **Основным хемоаттрактантом**, который привлекает фибробласты в рану из прилежащей ткани является **PDGF**, который секретируется в этих местах клетками «первой помощи» — тромбоцитами, нейтрофилами



ОБЩИЕ МЕХАНИЗМЫ ДВИЖЕНИЯ

Клетки умеют **переключать способ движения в зависимости от окружения и структуры матрикса**, но при этом используют общие принципы и стратегии движения.

Поляризованные клетки последовательно чередуют циклы перемещения, в каждом из которых выделяют четыре основных стадии.

- **Первая стадия** заключается в выдвигении передней части мембраны, именуемой **протрузией** или **псевдоподией**. В большинстве случаев **рост протрузий** обеспечивается локальной полимеризацией актина и связан с формированием ламеллиподий, филоподий и прочих мембранных выростов.

Ламеллиподии-плоские листовые структуры, заполненные ветвящейся сетью актиновых филаментов, **филоподии** – это малые пальцеобразные или нитевидные выросты, содержащие плотные пучки параллельно упакованных актиновых филаментов.



Рис. 2. Двигательный цикл клетки.
Схематично показана исходно неполярная клетка (сверху)

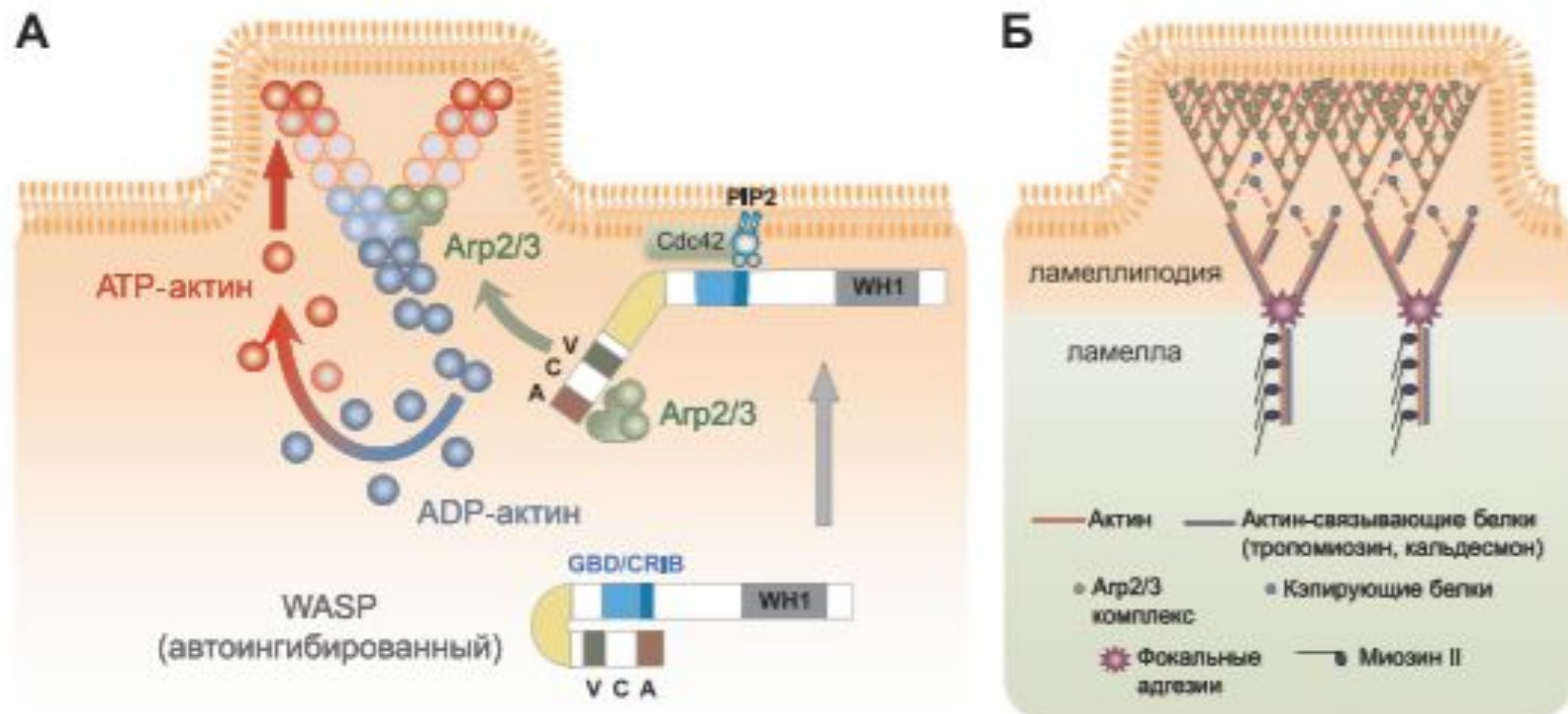


Рис. 3. Полимеризация актина на лидирующем крае.

А – Полимеризация и ветвление актиновых филаментов. Представлена схема тредмиллинга актиновых филаментов, их ветвления под действием комплекса Arp2/3, и последовательной активации Arp2/3 с участием Cdc42 и PIP2, на примере WASP ([63, 77], с изменениями).

Б – Организация актина в ламеллиподии и ламелле. Схема изменений структуры и состава актиновой сети по мере удаления от лидирующей мембраны в ламеллиподии и переходе в ламеллу; фокальные адгезии маркируют границу между этими компартментами клетки (с упрощениями из [62]).

- На второй стадии мембранные протрузии прикрепляются к субстрату за счет **адгезивных структур**, которые соединяют цитоскелет с внеклеточным матриксом и обеспечивают последующее передвижение тела клетки.

Эти структуры очень динамичны. Они служат каркасом для сборки актиновых стресс-фибрилл и реагируют на механическую нагрузку.

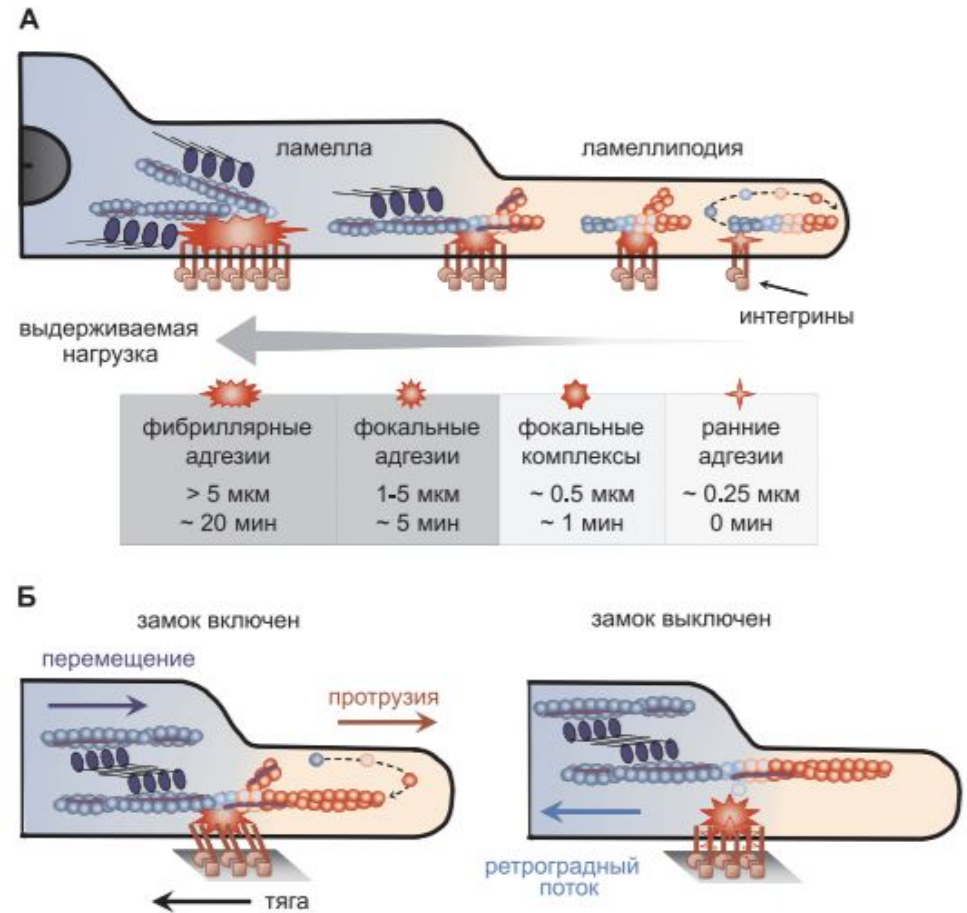


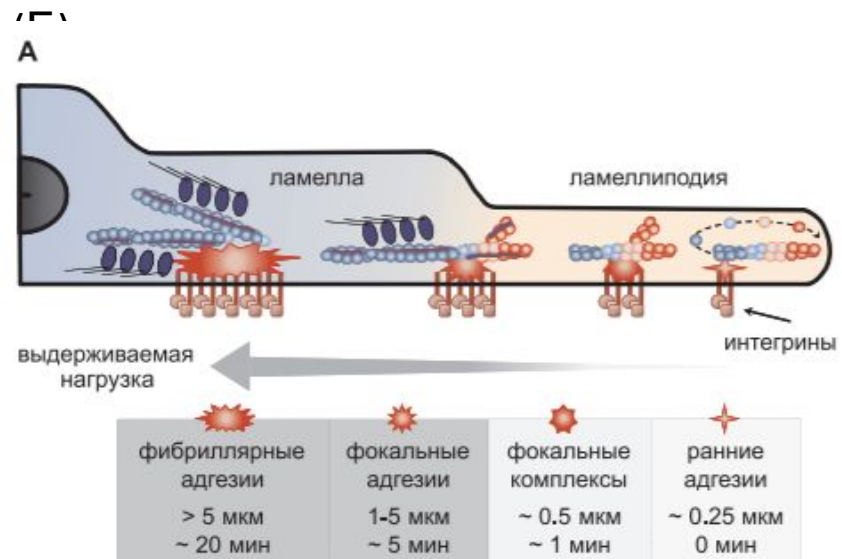
Рис. 4. Динамика клеточных адгезий при движении клетки.

А – Основные фазы созревания адгезивных контактов

Сверху схематически проведен срез через ламеллиподию, ламеллу и переднюю часть тела клетки и дано относительное расположение в них субстратных адгезий разной степени зрелости (красные многолучевые фигуры) и связанных с ними филаментов актина и миозина II. Полутоновая стрелка ниже характеризует относительную способность этих контактов выдерживать механическую нагрузку, а принятая номенклатура субстратных адгезий с указанием расстояний от края клетки и времени их жизни приведена в таблице снизу.

Показано, что слабые адгезивные контакты в ламеллиподии обеспечивают закрепление актиновых филаментов, которые претерпевают тредмиллинг и удлинение, тогда как фокальные адгезии на границе с ламеллой являются точкой включения миозиновых олигомеров, которые обеспечивают работу молекулярного замка, показанную на панели 'Г'

Мощные фибриллярные адгезии объединяют несколько филаментов актина, в том числе со смешанной полярностью, и входят в состав сократительного домена тела клетки.



Б –Предполагаемая схема работы молекулярного замка

Когда замок включен (слева), актиновые филаменты иммобилизованы на интегриновых комплексах за счет многочисленных вспомогательных белков-компонентов адгезивных контактов. Прикладываемые к актину силы, создаваемые миозиновыми моторами, преобразуются в тягу (traction), приложенную к внеклеточному матриксу, а двунаправленная структура миозиновых олигомеров позволяет одновременно перемещать вперед внутренние филаменты актина и ламеллу. Присоединение мономеров актина к концам иммобилизованных филаментов обеспечивает проталкивание вперед края лидирующей мембраны по механизму Броуновского храповика. Когда замок выключен (справа), продвижение лидирующей мембраны останавливается и миозин обеспечивает ретроградное движение актиновых филаментов, которые внешне выглядят неподвижными из-за тредмиллинга актина.

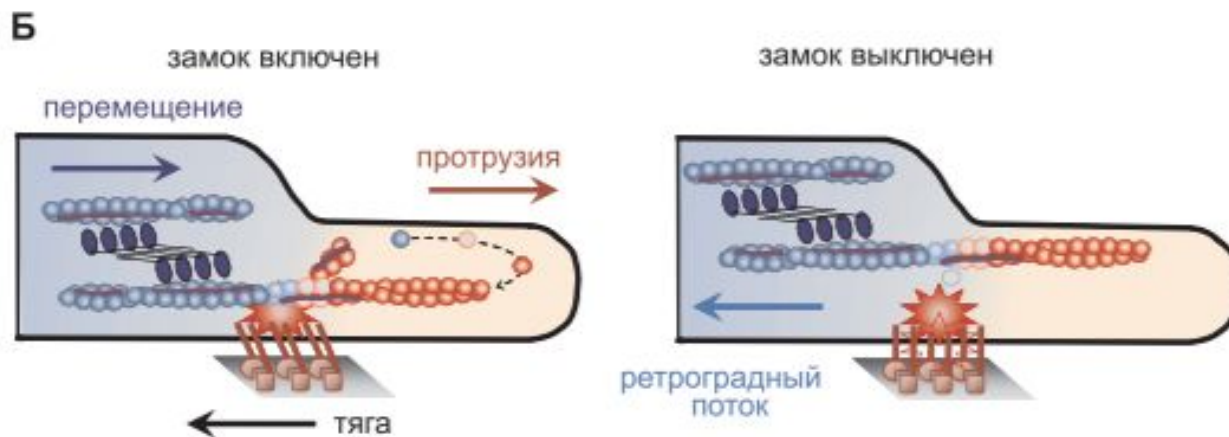


Рис. 4. Динамика клеточных адгезий при движении клетки.

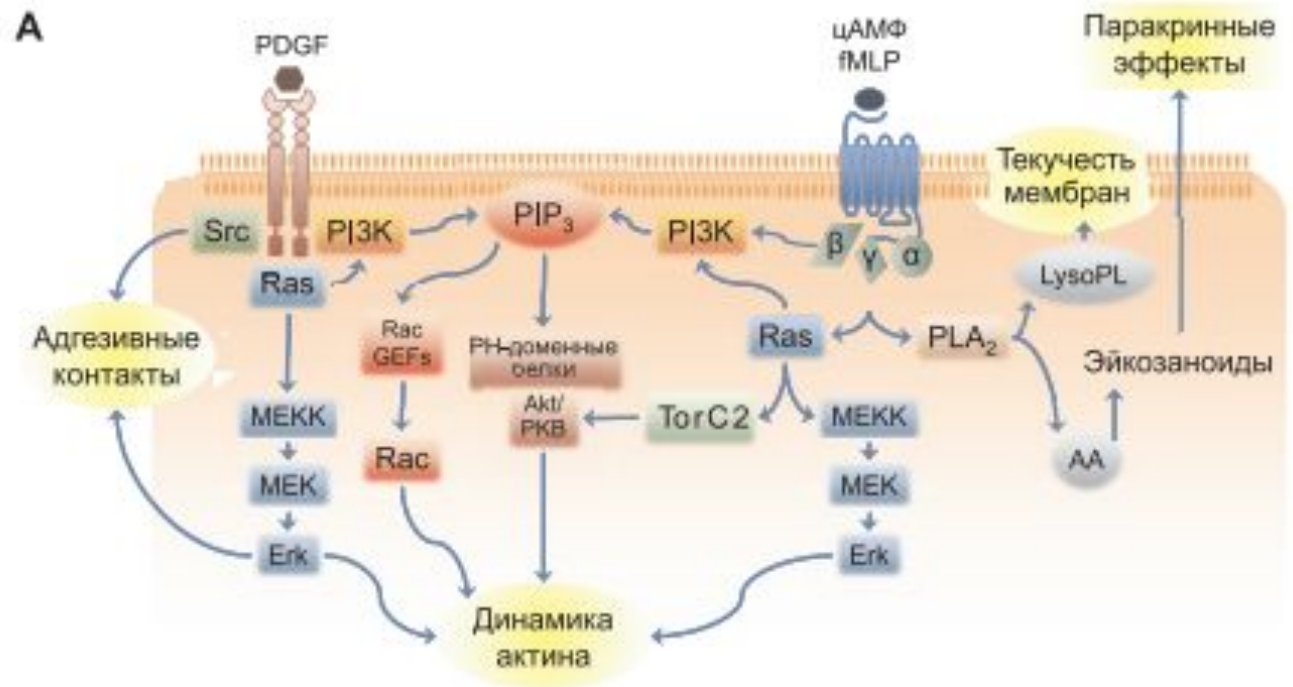
- **На третьем этапе** клетка реально перемещает тело вперед. Это требует сократительных усилий, обеспечиваемых **миозином II** типа, включенным в состав пучков актиновых филаментов.
- **Заключительный этап** состоит из **открепления и подтягивания задней части клетки – двух пространственно и функционально различных событий**. Скорость движения клетки зависит не только от протрузионной активности, но также от силы адгезии и сократимости.

Экспериментальные и теоретические исследования показали, что **максимальная скорость** достигается при **средних тянущих усилиях и силе адгезии**. Быстро мигрирующие амебы и лейкоциты слабо адгезируют и имеют среднюю тянущую силу, в то время как сильно адгезирующие фибробласты генерируют значительные усилия и движутся медленно. Сам факт наличия оптимума скорости следует из того, что протрузионная, адгезивная и сократительная активности клетки зависят друг от друга и четко сбалансированы.

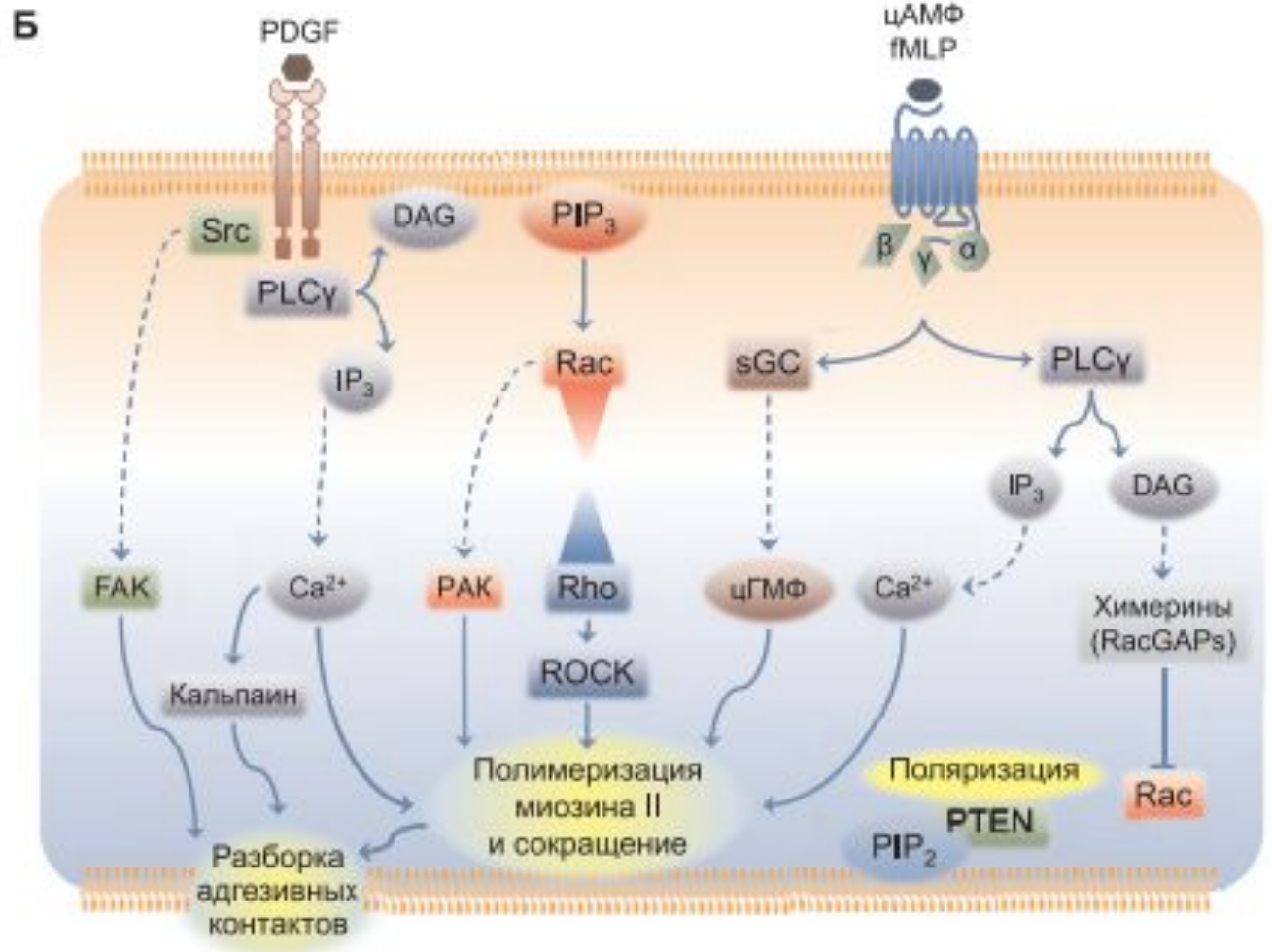
ХЕМОТАКТИЧЕСКАЯ СИГНАЛИЗАЦИЯ

1. Поверхностные рецепторы регистрируют внешний сигнал и передают его внутрь клетки.
2. Внешний градиент переводится во внутренний градиент сигнальных молекул клетки. Усиление происходит на пост-рецепторном уровне.
3. В клетке есть несколько сигнальных каскадов, ведущих к хемотаксису. Одного доминирующего каскада нет, все они в разной степени дублируют и влияют друг на друга.
4. Целью передачи сигнала является поляризация сигнальных молекул и цитоскелета.
5. Должны существовать механизмы усиления внутренних градиентов, контроля длительности активации сигнальных каскадов и адаптации клеточных реакций к пространственным и временным изменениям внешнего градиента.

- Передача сигнала от хемотактических рецепторов до белков, обеспечивающих двигательные реакции, организована очень сходно во многих клетках и включает общие компоненты. Рецепторы передают информацию о внешних сигналах через мембрану к белкам **Ras** и **PI3K** – двум основным маршрутизаторам передачи хемотактического сигнала внутри клетки.
- В амeboидных клетках сигнал далее разделяется на 3 каскада, включающих PIP3, TorC2 и/или sGC. **PIP3** является **главным** усилителем и «дирижером» двигательного аппарата псевдоподий, а также определяет высокую чувствительности



- Другие направления, пока менее охарактеризованы, включают MAP-киназы, фосфолипазу A2 (PLA2) (рис. 5A) и фосфолипазу C γ . Они могут быть специфичны для определенных типов клеток и включаться рецепторами,



Рецепторы для хемокинов и хемоаттрактантов

По своей структуре и функциональным свойствам эти рецепторы традиционно делятся на две основные группы:



серпентиновые рецепторы (GPCR)

сопряжены с тримерными G-белками

(лейкоциты млекопитающих и гематопозэтические клетки)



с одним транс- мембранным доменом (RPTK)

димеризуются при активации либо обладают собственной тирозинкиназной активностью

(фибробласты, МСК, краевых клетки яичника дрозифилы, гладко- мышечные, эпителиальные и трансформированные клетки)

Клетки одного типа предпочитают использовать определенный тип рецепторов для хемотаксиса и связанной с ним механизм передачи сигнала. **Общей чертой хемотактических рецепторов** является использование малых G-белков суперсемейства Ras и PI3K для повышения уровня PIP3 на лидирующей мембране

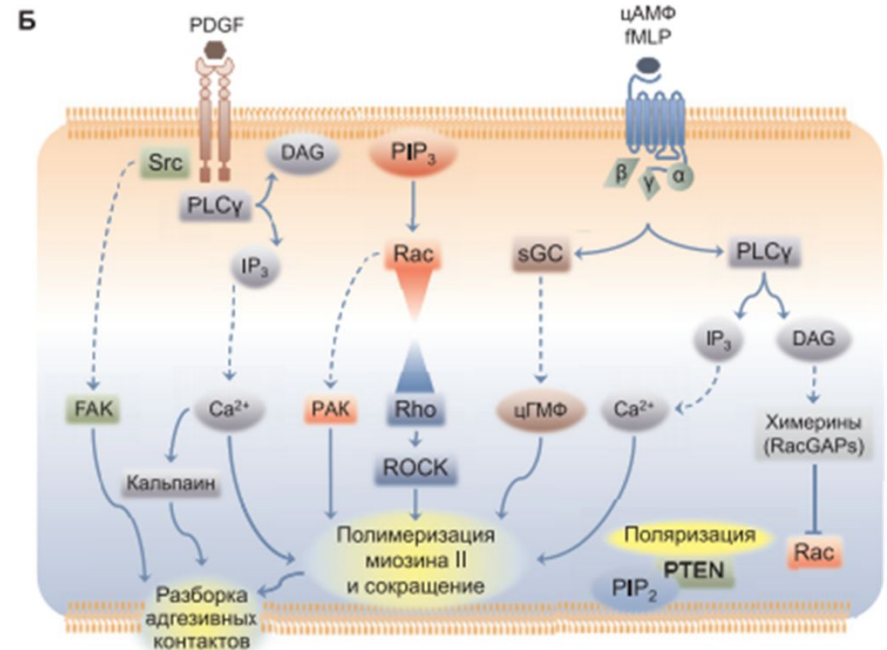
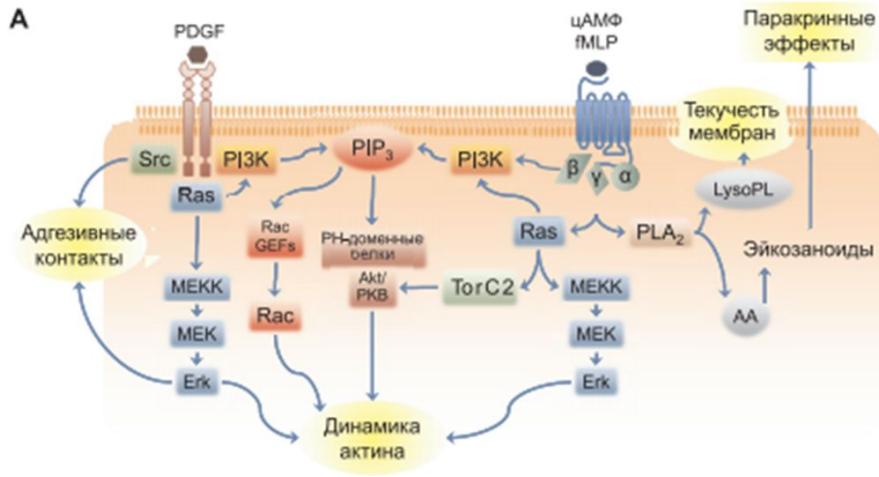
Хемотаксические рецепторы обеспечивают поляризацию клетки, и исходящие от рецептора **каскады** можно разделить на две группы:



активируют события на переднем крае клеток, стимулируют динамику актина и формирование адгезий



активируют миозин II, сборку сократительных стресс-фибрилл и ослабление адгезий на заднем крае



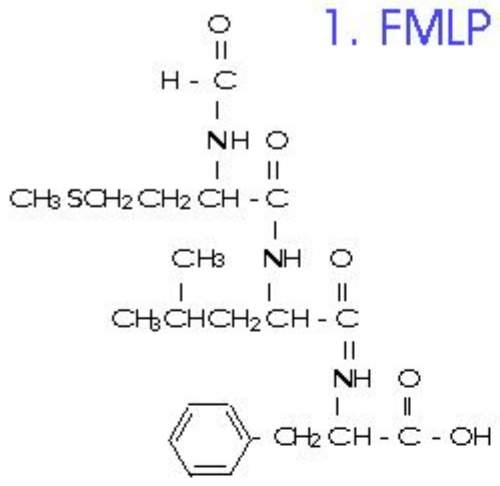
Хемоаттрактант (стимулирующий агент)

Можно выделить пять групп "классических" хемоаттрактантов, действующих на лейкоциты через рецепторы, сопряженные с G-белками (серпентиновые), или рецепторы с семью трансмембранными спиралями:

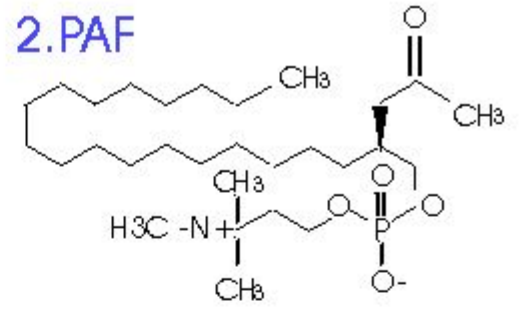
- 1) ***N-формилированные пептиды***, например fMLP производные бактериальных белков;
- 2) ***фактор активации тромбоцитов PAF***, который производится активированными тромбоцитами, нейтрофилами и другими клетками;
- 3) ***лейкотриен В4***, образующийся в результате метаболизма арахидоновой кислоты различными миелоидными клетками;
- 4) ***анафилотоксин С5а***, продукт гидролиза фактора компонента С5 ;
- 5) ***хемокины***;

Хемоаттрактанты также усиливают экспрессию на мембране фагоцитов молекул межклеточной адгезии => ***хемотаксис и адгезия взаимосвязанные процессы, протекающие одновременно.***

1. Химическая структура fMLP. Обратите внимание на N-формилную группу на N-конце пептида (сверху), характерную для бактериальных, но не эукариотических белков.

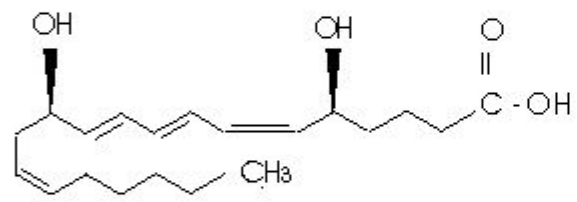


2. Химическая структура фактора активации тромбоцитов (PAF, platelet activating factor).

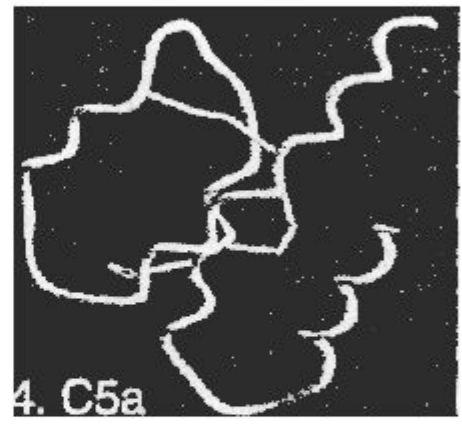


3. Химическая структура лейкотриена B4.

3. LTB4

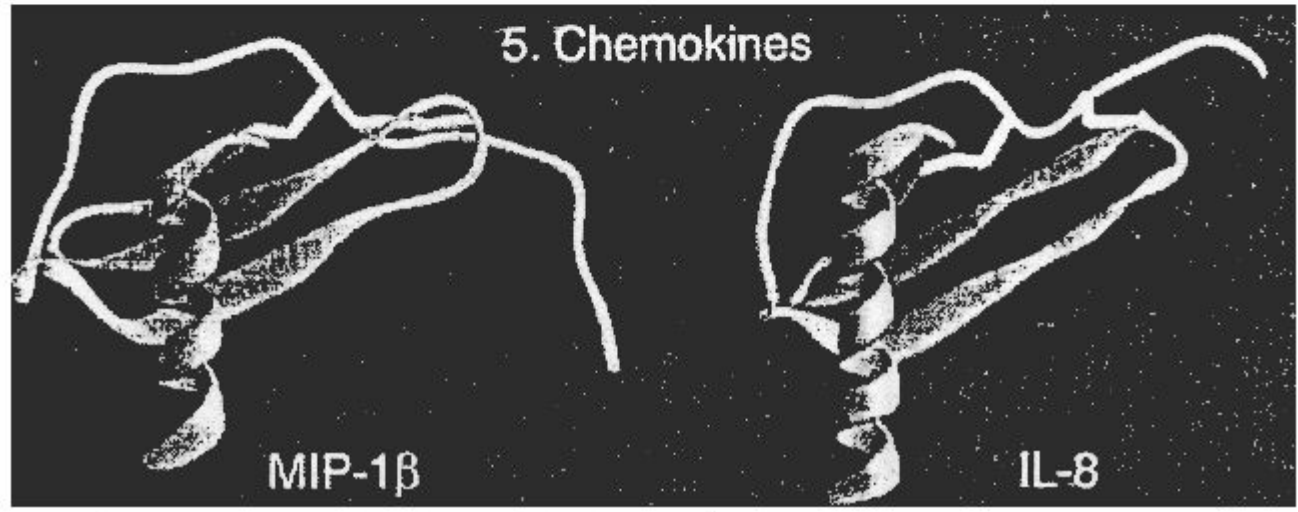


4. Структура анафилотоксина C5a в растворе.



5. Структуры хемокинов в растворе: CC-хемокин MIP-1β (воспалительный белок макрофагов ip) и CXC-хемокин IL-8 (интерлейкин-8).

5. Chemokines



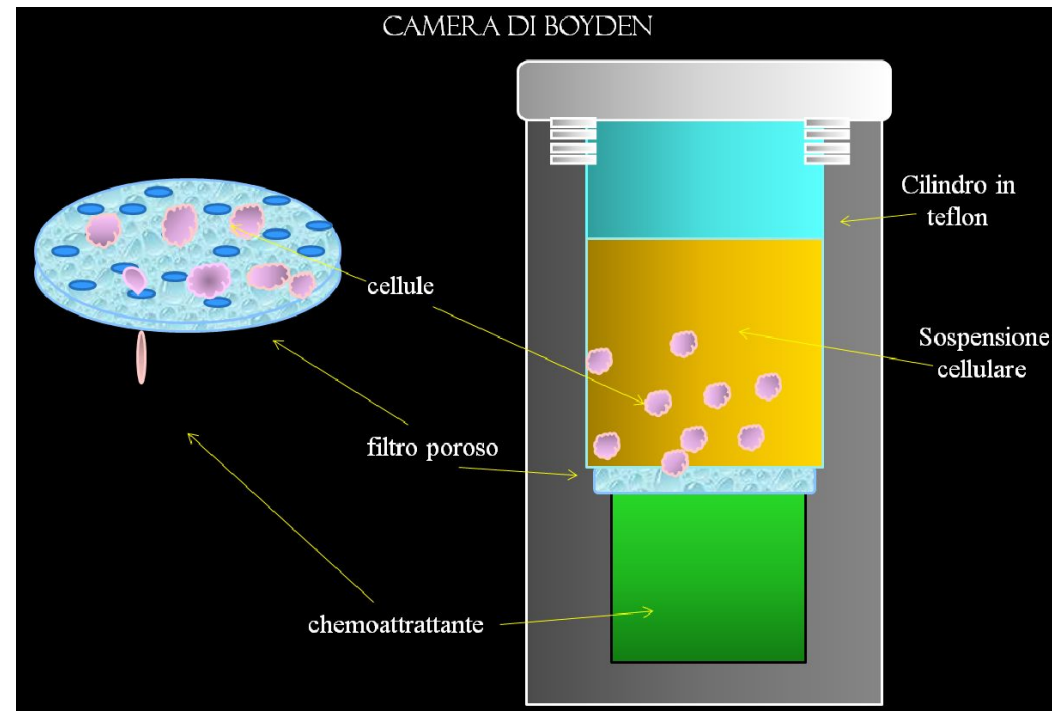
Методы изучения

1. Хемотаксис нейтрофилов исследуют с помощью **камеры Бойдена**.

Эта камера состоит из двух отделений, между которыми находится фильтр. В одно отделение камеры помещают суспензию нейтрофилов, в другое - хемотаксический фактор, например С5а. После инкубации нейтрофилов в камере Бойдена определяют, какое их количество мигрировало на противоположную сторону фильтра.

В частности, при изучении хемотаксиса полинуклеарных лейкоцитов используют мембрану, у которой диаметр пор 2.5-3 0 мкм, а моноцитов — 5-8 мкм.

Оптимальные условия для миграции лейкоцитов создаются в термостате при 37°C. С этой целью камеру помещают в термостат на 30-60 мин, где вследствие стимулирующего действия хемоаттрактанта клетки (лейкоциты) мигрируют через поры на нижнюю сторону мембраны.



2. Метод кожного окна (in vivo)

С помощью скальпеля удаляют поверхностный слой с эпидермиса площадью 4 мм (при этом должно появиться небольшое количество крови). На поврежденный участок помещают покровное стекло. В течение суток каждые 0,5-2 ч покровное стекло меняют. Затем стекла окрашивают и исследуют под микроскопом находящиеся на них лейкоциты. В норме в течение первых 2 ч наблюдается приток нейтрофилов к месту повреждения. В течение последующих 12 ч нейтрофилы замещаются моноцитами.



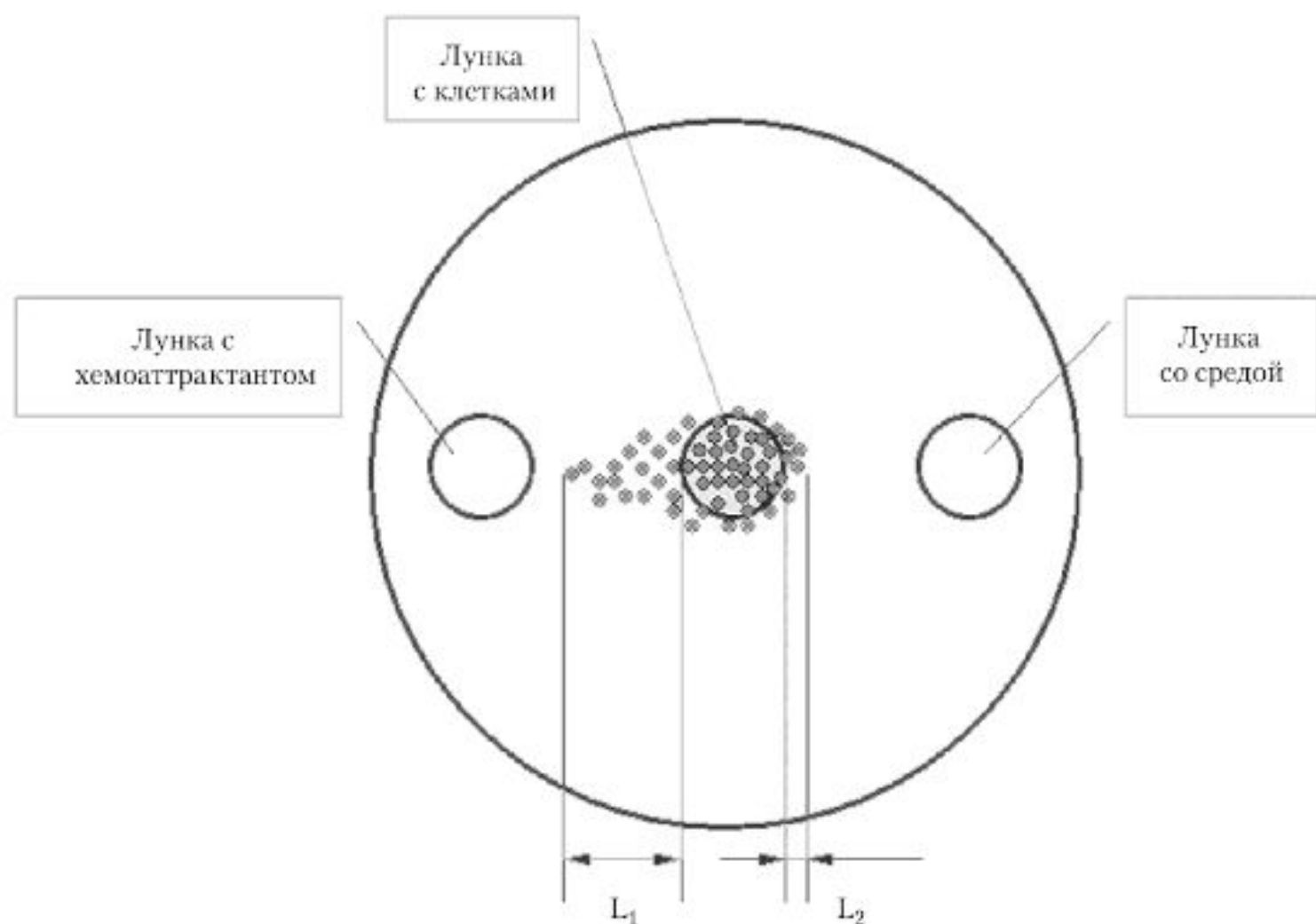


Рис. 2.2. Принцип исследования хемотаксиса методом миграции под агарозой. В агарозном геле вырезают три лунки, куда добавляют хемоаттрактанты и клетки, как указано на рисунке. Клетки, мигрирующие в сторону лунки с хемоаттрактантом, образуют характерный «клин». Интенсивность хемотаксиса оценивают по разности путей, пройденных лидирующими клетками в сторону лунки с хемоаттрактантом и в сторону лунки без хемоаттрактанта ($L_1 - L_2$)

термины

- **G-белки**— это семейство белков, относящихся к ГТФамам и функционирующих в качестве вторичных посредников во внутриклеточных сигнальных каскадах.
- **Тирозинкиназа** — фермент подкласса протеинкиназ, группы киназ (фосфотрансфераз). Тирозинкиназы катализируют перенос фосфатного остатка от АТФ на тирозиновый остаток специфических клеточных белков-мишеней. Тирозинкиназы — одно из важнейших звеньев в системе передачи сигналов в клетке.