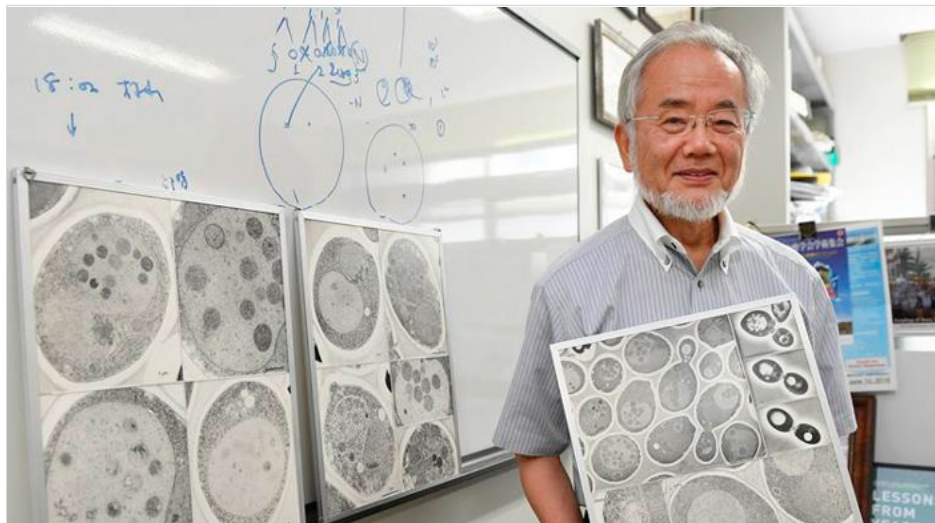


Нобелевская премия по физиологии и медицине — 2016

09.10.2016 • ЕЛЕНА НАЙМАРК • НОБЕЛЕВСКИЕ ПРЕМИИ, МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ • 16 КОММЕНТАРИЕВ

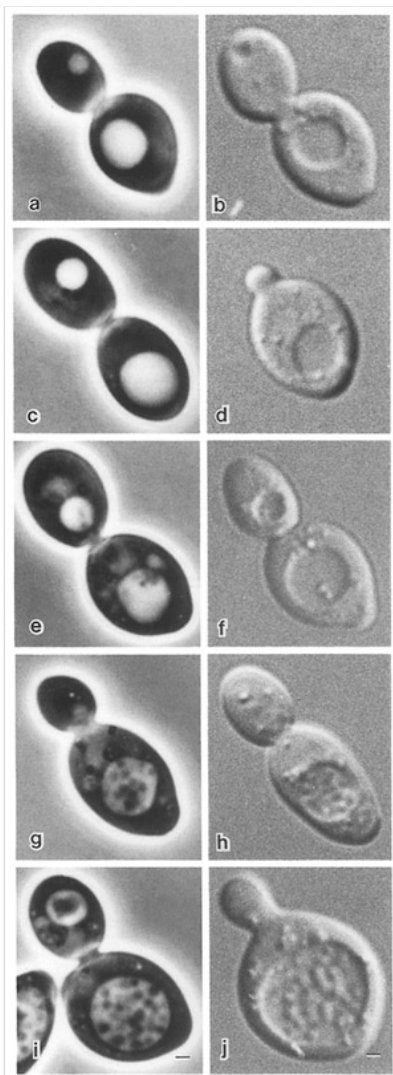


Ёсинори Осуми родился в Фукуоке, Япония, в 1945 году. Эта фотография сделана в июле 2016 года в его лаборатории в [Токийском технологическом институте](#). Фото с сайта [indianexpress.com](#)

В 2016 году Нобелевский комитет присудил премию по физиологии и медицине японскому ученому Ёсинори Осуми за открытие аутофагии и расшифровку ее молекулярного механизма. Аутофагия — процесс переработки отработавших органелл и белковых комплексов, он важен не только для экономного ведения клеточного хозяйства, но и для обновления клеточной структуры. Расшифровка биохимии этого процесса и его генетической основы предполагает возможность контроля и управления всем процессом и его отдельными стадиями. И это дает исследователям очевидные фундаментальные и прикладные перспективы.

Наука несется вперед такими невероятными темпами, что неспециалист не успевает осознать важность открытия, а за него уже присуждается Нобелевская премия. В 80-х годах прошлого века в учебниках биологии в разделе о строении клетки можно было среди прочих органелл узнать о лизосомах — мембранных пузырьках, заполненных внутри ферментами. Эти ферменты нацелены на расщепление различных крупных биологических молекул на более мелкие блоки (нужно отметить, что тогда наша учительница по биологии еще не знала, зачем нужны лизосомы). Их открыл Кристиан де Дюв, за что в 1974 году ему была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине.

Кристиан де Дюв с коллегами отделял лизосомы и пероксисомы от других клеточных органелл с помощью нового тогда метода — центрифугирования, позволяющего рассортировать частицы по массе. Лизосомы теперь широко используются в медицине. Например, на их свойствах основана адресная доставка лекарств к поврежденным клеткам и тканям: молекулярный препарат помещают внутрь лизосомы за счет разницы в кислотности внутри и снаружи нее, а затем лизосома, снабженная специфическими метками, отправляется в пораженные ткани.



Накопление аутофагосом внутри вакуоли в дрожжевой клетке. В этом эксперименте использовалась культура дрожжей мутантной линии, в которой не экспрессировались протеиназы. Клетки фотографировались (разные техники фотографирования в двух колонках) в течение трех часов (верхний ряд — в самом начале опыта, второй ряд — через 15 минут, третий ряд — еще через 45 минут, следующие ряды — с промежутком в час). Фото из статьи K. Takeshige et al., 1992. [Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction](#)

Лизосомы по роду своей деятельности неразборчивы — они дробят на составные части любые молекулы и молекулярные комплексы. Более узкие «специалисты» — [протеасомы](#), которые нацелены только на расщепление белков (см.: [Белки попадают в протеасому через «преддверие» уже развернутыми](#), «Элементы», 05.11.2010). Их роль в клеточном хозяйстве трудно переоценить: они следят за отслужившими свой срок ферментами и уничтожают их по мере необходимости. Этот срок, как мы знаем, определен весьма точно — ровно столько времени, сколько клетка выполняет конкретную задачу. Если бы ферменты не уничтожались по ее выполнении, то идущий синтез трудно было бы остановить вовремя.

Протеасомы имеются во всех без исключения клетках, даже в тех, где нет лизосом. Роль протеасом и биохимический механизм их работы был исследован [Ароном Чехановером](#), [Аврамом Гершко](#) и [Ирвином Роузом](#) в конце 1970-х — начале 1980-х годов. Они открыли, что протеасомы узнают и уничтожают те белки, которые помечены белком [убиквитином](#). Реакция связывания с убиквитином идет с затратами [АТФ](#). В 2004 году эти трое ученых [получили](#) Нобелевскую премию по химии за исследования убиквитин-зависимой деградации белков. В 2010 году, просматривая школьную программу для одаренных английских детей, я усмотрела на картинке строения клетки ряд черных точек, которые были помечены как протеасомы. Однако школьная учительница в той школе не смогла объяснить ученикам, что это такое и для чего эти загадочные протеасомы нужны. С лизосомами на той картинке уже никаких вопросов не возникло.

Еще в начале исследования лизосом было замечено, что внутри некоторых из них заключены части клеточных органелл. Значит, в лизосомах разбираются на части не только крупные молекулы, но и части самой клетки. Процесс переваривания собственных клеточных структур получил название [аутофагия](#) — то есть «поедание самого себя». Как в лизосому, содержащую гидролазы, попадают части клеточных органелл? Этим вопросом еще в 80-е годы начал заниматься [Ёсинори Осуми](#), изучавший устройство и функции лизосом и аутофагосом в клетках млекопитающих. Он со своими коллегами показал, что в клетках в массе появляются аутофагосомы, если их выращивать на малопитательной среде. В связи с этим появилась гипотеза, что аутофагосомы формируются, когда необходим резервный источник питания — белки и жиры, входящие в состав лишних органелл. Как формируются эти аутофагосомы, нужны ли они в качестве источника дополнительного питания или для иных клеточных целей, как их находят лизосомы для переваривания? Все эти вопросы в начале 90-х годов не имели ответов.

Взявшись за самостоятельные исследования, Осуми сфокусировал усилия на изучении аутофагосом дрожжей. Он рассудил, что аутофагия должна быть консервативным клеточным механизмом, следовательно, ее удобнее изучать на простых (относительно) и удобных лабораторных объектах.

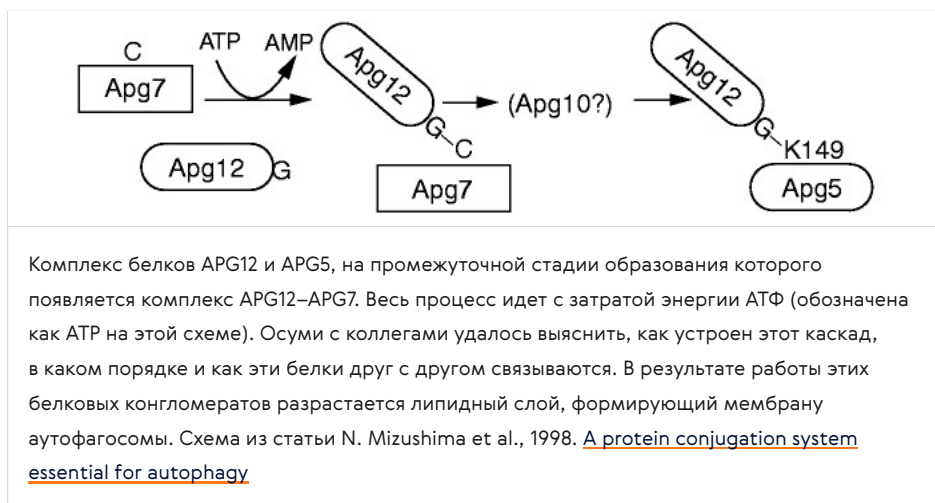
У дрожжей аутофагосомы находятся внутри вакуолей, а затем там распадаются. Их утилизацией занимаются различные ферменты-[протеиназы](#). Если в клетке протеиназы дефектные, то аутофагосомы накапливаются внутри вакуолей и не растворяются. Осуми воспользовался этим свойством для получения культуры дрожжей с повышенным числом аутофагосом. Он выращивал культуры дрожжей на бедных средах — в этом случае аутофагосомы появляются в изобилии, доставляя голодающей клетке пищевой резерв. Но в его культурах использовались мутантные клетки с неработающими протеиназами. Так что в результате клетки быстро накапливали в вакуолях массу аутофагосом.



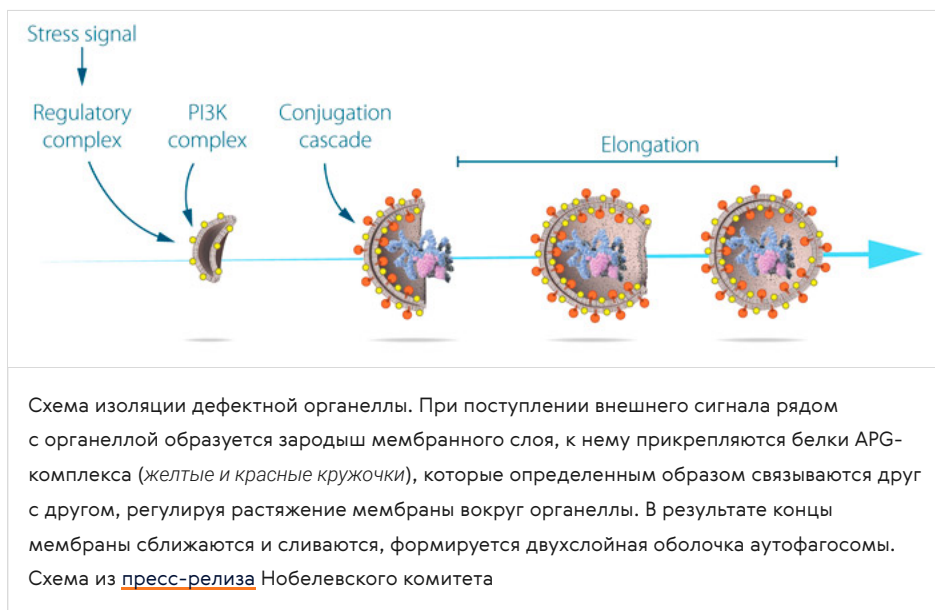
Аутофагосомы (AB) внутри вакуоли (V). Длина масштабного отрезка 1 мкм. Фото из статьи K. Takeshige et al., 1992. [Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction](#)

Аутофагосомы, как следовало из его наблюдений, окружены однослойными мембранами, внутри которых может находиться самые разнообразные содержимое: рибосомы, митохондрии, гранулы липидов и гликогена. Добавляя или убирая ингибиторы протеаз в культуры немутантных клеток, можно добиться увеличения или уменьшения числа аутофагосом. Так что в этих экспериментах было продемонстрировано, что эти клеточные тельца перевариваются с помощью ферментов-протеиназ.

Очень быстро, всего за год, используя метод случайного мутирования, Осуми выявил 13–15 генов (APG1–15) и соответствующих белковых продуктов, участвующих в образовании аутофагосом (M. Tsukada, Y. Ohsumi, 1993. [Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*](#)). Среди колоний клеток с дефектной протеиназной активностью он под микроскопом отбирал такие, в которых не было аутофагосом. Затем, культивируя их по отдельности, выяснял, какие гены у них испорчены. Еще пять лет понадобилось его группе, чтобы расшифровать в первом приближении молекулярный механизм работы этих генов.



Удалось выяснить, как устроен этот каскад, в каком порядке и как эти белки друг с другом связываются, чтобы в результате получилась аутофагосома. К 2000 году прояснилась картина формирования мембраны вокруг испорченных органелл, подлежащих переработке. Одинарная липидная мембрана начинает растягиваться вокруг этих органелл, постепенно окружая их, пока концы мембраны не приблизятся друг к другу и не сольются, образовав двойную мембрану аутофагосомы. Затем этот пузырек транспортируется к лизосоме и сливается с ней.



В процессе образования мембраны участвуют APG-белки, аналоги которых Ёсинори Осуми с коллегами обнаружили и у млекопитающих.

В иммунной системе человека найден аналог химического синапса

03.08.2017 • АЛЁНА СУХОПУТОВА • ИММУНОЛОГИЯ, ЭВОЛЮЦИЯ • 4 КОММЕНТАРИЯ

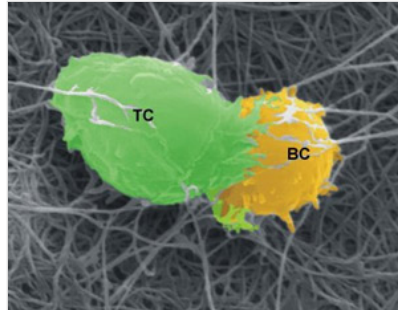


Рис. 1. Взаимодействие Т-клетки (зеленая) и В-клетки (желтая) *in vitro* на подложке из коллагеновых волокон. Изображение получено сканирующим электронным микроскопом. С сайта fias.uni-frankfurt.de

Ученые пролили свет на то, как происходит взаимодействие Т- и В-лимфоцитов при формировании иммунного ответа. Оказалось, что лимфоциты человека для общения между собой используют гранулы с нейромедиатором дофамином, а способ передачи сигнала аналогичен тому, что имеется в нервной системе. Поразительно, что у мышей нет подобного механизма общения лимфоцитов. Хотя у мышей, как и у людей, во время взаимодействия Т- и В-лимфоцитов формируется положительная обратная связь, усиливающая взаимодействие клеток. Но у людей, судя по всему, это происходит эффективнее.

Как нервная, так и иммунная системы помогают нашему организму реагировать на внешнее окружение. Общепринято мнение, что эти две системы, хоть и дополняют друг друга, работают относительно независимо и разными путями. Но в последние годы появились подтверждения того, что эти системы взаимодействуют более глубоко. К примеру, была выявлена передача сигналов от нервной системы к иммунным клеткам с помощью синапсов (см. статьи А. Р. Kohm, V. M. Sanders, 2000. [Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system](#) и М. L. Dustin, D. R. Colman, 2002. [Neural and immunological synaptic relations](#)). А на днях в журнале *Nature* вышла статья большого международного коллектива ученых, в которой показано, что в рамках взаимодействия Т- и В-клеток иммунной системы устанавливаются межклеточные контакты, подобные тем, что мы привыкли встречать именно в нервной системе.

Но для начала давайте вспомним общие принципы работы иммунной системы. Иммуитет делится на [врожденный](#) и [приобретенный](#). Врожденный иммунитет включается в первые же минуты после появления патогена: постоянно присутствующие в крови и других тканях белки [системы комплемента](#) и иммунные клетки атакуют «всё, что не своё», а точнее, реагируют на целые классы типичных для патогенов веществ, не встречающихся в норме в организме хозяина, — [антигены](#).

Приобретенный иммунитет активируется гораздо дольше — ему требуется около 1–2 недель, но и защищает он нас эффективнее. Его основная особенность заключается в специфичности атаки, а его компоненты имеют сложную схему запоминания и опознания преступника, массово атакуя его по наводке. Благодаря «памяти», приобретенный иммунитет обеспечивает эффективную быструю нейтрализацию патогена при повторном его попадании в организм.

Приобретенный иммунитет, в свою очередь, делится на [клеточный](#) и [гуморальный](#). Клеточный иммунитет работает в основном путем [фагоцитоза](#), то есть поедания узанных патогенов защитными клетками и выделения [цитокинов](#). Гуморальный же, о котором пойдет речь далее, функционирует с помощью [антител](#) и системы комплемента (её относят как к врожденному, так и к приобретенному иммунитету). Начинается все с того, что клетки врожденного иммунитета поедают патоген и затем выставляют на своей поверхности небольшие фрагменты этого патогена. Когда лимфоциты иммунной системы, [Т-хелперы](#) и [В-](#)

лимфоциты, встречаются с ними, они по этим фрагментам знакомятся с особенностями попавшего в организм патогена (с его антигенами). Затем лимфоциты размножаются и мигрируют в так называемые зародышевые центры, места активного деления и созревания В-клеток в лимфатических узлах, glandax и селезенке. Там «знакомые» с одним и тем же антигеном лимфоциты разных типов (Т и В) взаимодействуют друг с другом (рис. 1). Это межклеточное взаимодействие приводит к созреванию В-лимфоцитов, их трансформации в плазмоциты. Плазмоциты затем массово образуют антитела, специфичные по отношению к встреченным чужеродным клеткам. Эти антитела находят патоген и связываются с ним, не давая размножаться и активируя присутствующие в крови белки системы комплемента, которые и уничтожают патоген или совместно с антителами делают его более уязвимым перед элементами врожденного иммунитета – макрофагами. Подробнее о ролях и взаимоотношениях Т- и В-клеток, как их еще называют, см., например, статью Иммунная система.

Клетки нервной системы, нейроны, контактируют друг с другом или с клетками других типов посредством синапсов (они бывают химическими и электрическими), в которых происходит передача сигнала между клетками. В химическом синапсе у передающей сигнал клетки в месте контакта в специальных секреторных гранулах имеется вещество, нейромедиатор, которое в нужный момент выделяется в щель между контактирующими клетками и достигает поверхности принимающей клетки. У последней на поверхности есть рецепторы к данному нейромедиатору, которые связываются с ним и передают сигнал дальше внутрь клетки. Данный тип передачи сигнала всегда односторонний и в качестве передающей сигнал клетки, считалось, может выступать только нейрон. Подробнее о строении синапсов и о различиях между химическими и электрическим синапсами см. новость Электрические синапсы рыб оказались несимметричными, «Элементы», 29.06.2017 и статью Распространение нервных импульсов.

Исследователи обнаружили в glandax, лимфатических узлах и селезенке человека белок хромогранин В (CgB), характерный для секреторных гранул нейронов. При этом они выяснили, что в органах иммунной системы мышей, в селезенке и агрегированных лимфоидных узелках (Peyer's patches), такого белка нет, притом, что в нервной системе мышей он встречается так же часто, как и в нервной системе человека.

У человека, как оказалось, транскрипция генов, кодирующих CgB в иммунной системе, приурочена к фолликулярным Т-хелперам. Фолликулярные Т-хелперы (T_{fh}) представляют собой субпопуляцию Т-хелперов, которая помогает В-лимфоцитам производить антитела в ответ на появление в организме антигенов. На снимках с электронного микроскопа видно, что в клетках этого типа есть пузырьки с плотной сердцевиной, они же и содержат CgB (рис. 2). Совместив методы газовой хроматографии и масс-спектрометрии и подтвердив результаты с помощью иммуноцитохимии, исследователи выяснили, что в этих гранулах находится нейромедиатор дофамин.

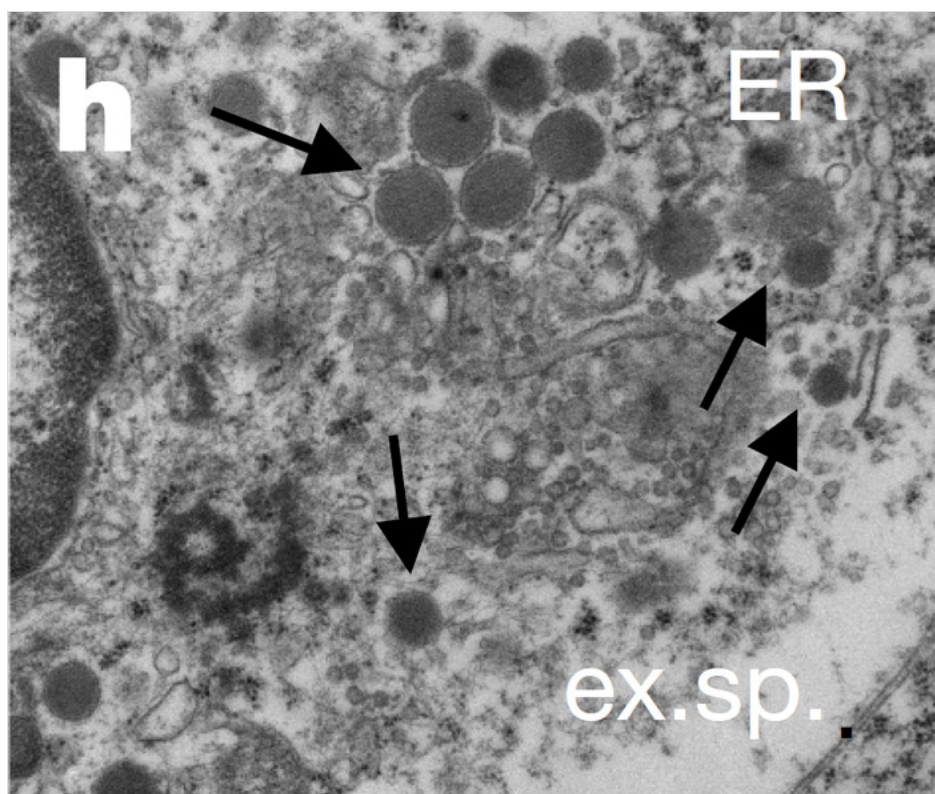


Рис. 2. Секреторные гранулы фолликулярных Т-хелперов (указаны стрелками) в зародышевом центре. ER — эндоплазматический ретикулум, ex.sp. — внеклеточное пространство. Изображение из обсуждаемой статьи в Nature

То есть по строению и основным признакам можно сказать, что в клетках иммунной системы человека (фолликулярных Т-хелперах) имеются секреторные гранулы, свойственные, как считалось ранее, именно нервной системе.

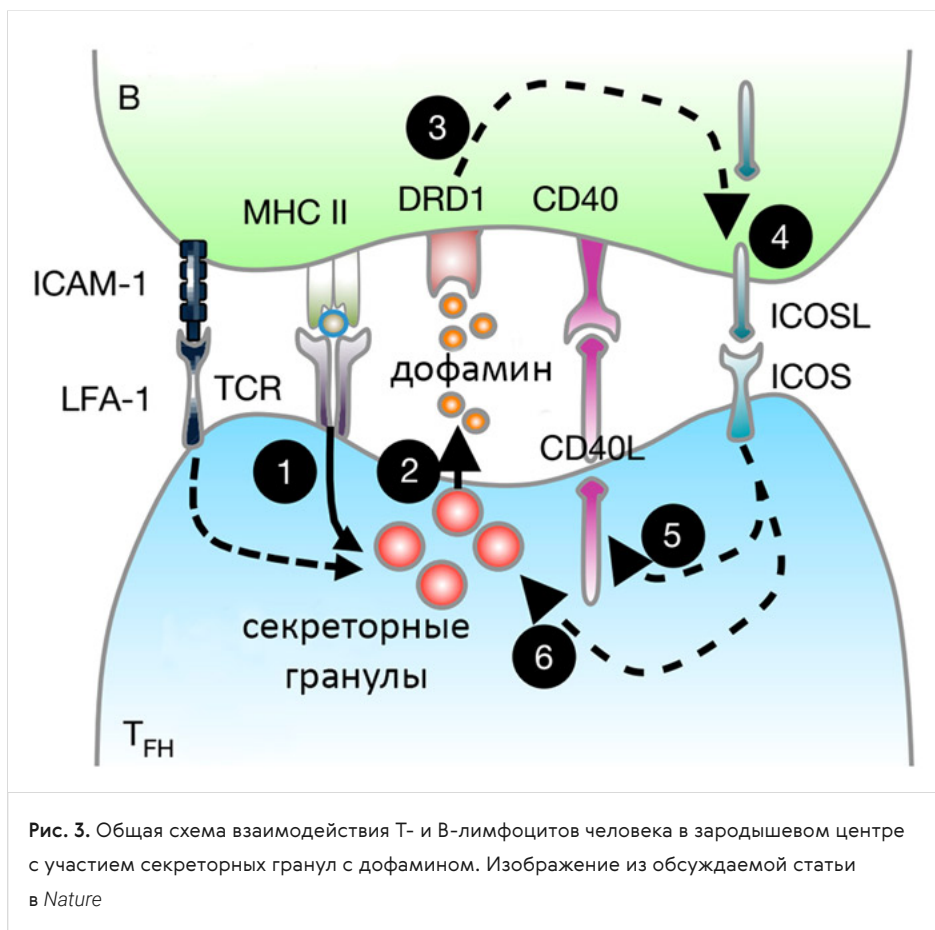
Как дофамин, так и хромогранин В можно обнаружить вовсе не во всех фолликулярных Т-хелперах, а только примерно в 5% клеток данного типа. Обработка изолированных клеток форсколином, интенсифицирующим синтез дофамина, привела к росту процента Т_{FH}, содержащих дофамин и СgВ. В других Т-клетках человека до обработки их форсколином и после неё дофамин не обнаруживается, а в Т_{FH} мышей детектируется минимальное количество дофамина после обработки.

Исследователи перемешали культуры изолированных из человеческого тела Т_{FH} и В-клеток, а затем снова их разделили. В результате получасового свидания количество дофамина в Т-клетках вполовину снизилось, а в В-клетках наоборот повысилось. При заблаговременном добавлении в среду ингибиторов специфического взаимодействия мембранных белков Т- и В-клеток (LFA1/ICAM1) количество дофамина в каждом типе клеток оставалось неизменным. Таким образом, от Т_{FH} дофамин передается к В-клеткам и для этой передачи необходим межклеточный контакт по типу лиганд-рецептор. Такой тип контакта очень распространен и заключается в том, что на поверхностях контактирующих клеток имеются подходящие друг к другу, как ключ к замку, белки. У одной — ключ, так называемый лиганд (ICAM1 В-клетки), у другой — замок, рецептор (LFA1 Т-клетки). Когда клетки с соответствующими друг другу мембранными белками оказываются достаточно близко, лиганд связывается с рецептором и тем самым изменяет его. Измененный рецептор запускает далее некие, зависящие от типа клетки и рецептора, процессы внутри своей клетки, в данном случае напрямую или косвенно вызывает передачу дофамина. В качестве лиганда могут выступать и свободные, не прикрепленные к какой-либо клетке молекулы, так, например, происходит при контакте нейромедиатора с его рецептором в синаптической щели.

На поверхности человеческих В-клеток зародышевых центров и В-клеток памяти, необходимых для формирования долговременного иммунитета, исследователи нашли большое количество рецепторов дофамина. При обработке зародышевых центров дофамином ускорилась трансформация В-клеток в плазмочиты, активную форму, образующую антитела, но скорость деления и выживаемость В-клеток не изменились. В ответ на дофамин в В-клетках значительно повысилось количество поверхностного ICOSL — белка, связывающегося с рецептором Т-клетки при взаимодействии Т- и В-клеток. Ингибитор дофаминовых рецепторов блокировал этот эффект, а ингибитор белкового синтеза — нет. Общее количество ICOSL клетки не изменилось, кроме того, не было обнаружено изменений в транскрипции гена этого белка. Получается, что дофамин, связавшийся с дофаминовым рецептором В-клетки, стимулировал не синтез ICOSL, а его транспортировку к поверхности.

У мышей подобного эффекта от дофамина не было обнаружено. Известно, что у них увеличение количества поверхностного ICOSL связывают с контактом CD40L (мембранного белка Т_{FH}) с CD40 (мембранным белком В-клетки). Исследователи проверили действие растворенного CD40L на В-клетки мышей и человека и обнаружили, что он эффективен только для клеток мышей, но не для человеческих лимфоцитов. Связь CD40L/CD40, в отличие от связывания дофамина с его рецепторами, у человека не увеличивает в В-клетках количество поверхностного ICOSL.

Связывание ICOSL В-клеток с соответствующим ему ICOS Т_{FH}-клеток у мышей приводит к увеличению активного CD40L Т-клеток. У человека, кроме того, повышается количество секреторных гранул с дофамином. Также под действием ICOSL/ICOS-связывания и у человека, и у мыши увеличивается площадь возможного LFA1/ICAM1-взаимодействия. Таким образом, в целом усиливается взаимодействие Т- и В-клеток, однако время этого взаимодействия не меняется.



Поразителен тот факт, что система усиления взаимодействия двух клеток хоть и одинакова принципиально, но различается в деталях у человека и мыши, очень близких организмов с точки зрения эволюции иммунной системы. У мыши ICOSL/ICOS-связывание приводит к усилению связи CD40L/CD40, которая в свою очередь усиливает ICOSL/ICOS. У человека же в этой схеме появляется новый участник, который практически полностью забирает на себя функцию CD40L/CD40-взаимодействия. Это дофамин в секреторных гранулах фолликулярных Т-хелперов, который передается в ответ на ICOSL/ICOS-взаимодействие на рецепторы В-клетки и усиливает ICOSL/ICOS-взаимодействие. В обоих случаях формируется положительная обратная связь, но у человека её образует система, полностью сходная с передачей сигнала на нервных синапсах. Впервые было показано, что подобный тип связи существует между клетками иммунной системы.

Дофамин — очень коротко живущая молекула с периодом полураспада всего 1–2 минуты. Это может способствовать специфичности и точности сигнала, подаваемого с её участием, и гарантии того, что сигнал будет передан именно целевой клетке. Компьютерное моделирование показывает, что такая замена в схеме взаимодействия клеток могла ускорить созревание В-лимфоцитов, а значит, и в некоторой степени увеличить скорость и эффективность иммунного ответа по сравнению с мышами. Данное открытие не только поспособствует новому витку в фармакологии, но и стимулирует изучение эволюции столь сложного и полезного приобретения, как наш иммунитет.

Источник: Ilenia Papa, David Saliba, Maurilio Ponzoni, Sonia Bustamante, Pablo F. Canete, Paula Gonzalez-Figueroa, Hayley A. McNamara, Salvatore Valvo, Michele Grimbaldston, Rebecca A. Sweet, Harpreet Vohra, Ian A. Cockburn, Michael Meyer-Hermann, Michael L. Dustin, Claudio Doglioni & Carola G. Vinuesa. TFH-derived dopamine accelerates productive synapses in germinal centres // *Nature*. 2017. V. 547. P. 318–323. DOI: 10.1038/nature23013.

Алёна Сухопутова