Содержание

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ...8

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Глава 1. Феномен программируемой клеточной смерти...11

Характерные признаки апоптоза...11

Функции апоптоза у многоклеточных...13

Компоненты каскада самоубийства...14

Роль митохондрий в апоптозе многоклеточных...16

Терминология типов клеточной смерти...18

Апоптотические домены и механизмы апоптоза в разных систематических группах...19

Глава 2. Запрограммированная гибель одноклеточных

организмов...22

Инфузории...23

Паразитиеские кинетопластиды...24

Слизевики...25

Одноклеточные автотрофы...26

Архемонады...26

Дрожжи...27

Глава 3. Молекулярные механизмы программируемой клеточной

смерти дрожжей...34

Дрожжевая метакасп аза...34

Протеаза Omi...35

AIF...36

Роль митохондрий в программируемой клеточной смерти

дрожжей...37

Неспецифическая митохондриальная пора дрожжей...41

Глава 4. Феромонный каскад дрожжей...42

Биология дрожжей...42

Клеточный ответ на половой феромон...44

Гибель клеток S. cerevisiae, вызванная а-фактором...47

Глава 5. Кальций в дрожжах...48

Методы измерения внутриклеточного кальция в S. cerevisiae...48

Поддержание кальциевого гомеостаза в S. cerevisiae...50

Амиодарон...52

Глава 6. Особенности митохондрий пекарских дрожжей...53

Глава 7. Активные формы кислорода...56

Особенности образования и детоксикации АФКу дрожжей S.cerevisiae...58

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 1. Культивирование дрожжей...63

Генотипы использованных штаммов дрожжей...63

Приготовление среды для культивации...63

Условия культивации...64

Глава 2. Тесты на выживание дрожжей...66

Индукция ПКС...66

Оценка выживаемости по количеству КОЕ...66

Микроскопические методы...67

Глава 3. Синхронизация культуры дрожжей...68

Глава 4. Методы флуоресцентной микроскопии...68

Окрашивание клеток на АФК...68

Окрашивание клеток на митохондрии...69

Окрашивание клеток на Са2+...70

Окрашивание клеток на ДНК\*...70

Определение репликативного возраста клеток...70

Глава 5. Выделение митохондрий из Saccharomyces cerevisiae и

измерение скорости поглощения кислорода...71

Глава 6. Молекулярно биологические методы...72

Выделение плазмидной ДНК из E.coli

на колонках Qiagen miniprep kit...72

Выделение геномной ДНК дрожжей...73

Расщепление и лидирование ДНК дрожжей...73

Аналитический электрофорез ДНК в агарозных гелях...74

Трансформация клеток E.coli методом электропорации...74

Интегративная трансформация дрожжей...74

Получение мутантных линий с полностью

инактивированным геном...75

Глава 7. Список использованных реактивов...77

РЕЗУЛЬТАТЫ

Глава 1. Исследование модели программируемой клеточной смерти

дрожжей штамма W303-1B, вызванной избытком

феромона...79

Глава 2. Исследование ПКС, индуцированный высокой концентрацией

феромона на линии клеток W303-1B cmd1-6...82

Глава 3. Влияние ингибиторов и антиоксидантов на ПКС клеток W303-

1Bcmd1-6...88

Глава 4. Скрининг генов, участвующих в регуляции программы самоубийства Saccharomyces cerevisiae, вызванного избытком

фермона...90

Описание скрининга...90

Результаты скрининга...95

Анализ мутантов на предмет устойчивости к ПКС, вызванной

избытком феромона...96

Глава 5 Индукция программируемой клеточной смерти на

промежуточных этапах...104

Индукция ПКС пекарских дрожжей

перекисью водорода и менадионом...104

Искусственное повышение концентрации цитоплазматического

кальция...105

А23187...106

Амиодарон...107

Глава 6. Характерные признаки апоптоза, наблюдаемые в клетках обработанных амиодароном...113

4

Глава 7. Гиперполяризация митохондрий, вызванная

амиодароном...114

Изменения дыхания дрожжевых клеток, вызванные амиодароном...115

Глава 8. Образование АФК клетками, вызванное амиодароном...121

Глава 9. Фрагментация митохондрий...126

Глава 10. Исследование функции гена YSP1...128

ОБСУЖДЕНИЕ...130

ВЫВОДЫ...138

Список работ, опубликованных по теме диссертации...139

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ...140