

Molecular Biology of the Cell

Bruce Alberts, Dennis Bray,
Julian Lewis, Martin Raff,
Keith Roberts, James D. Watson

Garland Publishing, Inc.
New York London

Б.Албертс
Д.Брей
Дж.Льюис
М.Рэфф
К.Робертс
Дж.Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

В ПЯТИ ТОМАХ

3

Перевод с английского
канд. биол. наук А. И. Грагера,
канд. биол. наук П. Л. Иванова
и Г. В. Крюковой

под редакцией чл.-корр. АН СССР
Г. П. Георгиева



Москва

«Мир»

1987

ББК 28.070
М75
УДК 576.3/.7

Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Робертс К.,
Уотсон Дж.

Молекулярная биология клетки: В 5-ти т. Т. 3. Пер. с
М75 англ.– М.: Мир, 1987. 296 с., ил.

Энциклопедическая полная монография, написанная учеными США и Англии, среди которых лауреат Нобелевской премии Дж. Уотсон, уже известный советским читателям по книге «Молекулярная биология гена» (М.: Мир, 1978). В третьем томе рассмотрены превращения энергии в митохондриях и хлоропластах, элементы цитоскелета, клеточное деление и взаимодействие клеток в организме.

Предназначена для биологов всех специальностей, преподавателей и студентов университетов, медицинских, педагогических и сельскохозяйственных институтов.

М $\frac{2001040000-028}{041(01)-87}$ подп. изд.

ББК 28.070

Редакция литературы по биологии

© 1983 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin
Raff, Keith Roberts and James D. Watson

© перевод на русский язык, «Мир», 1987



Молекулярная организация клеток

(продолжение)

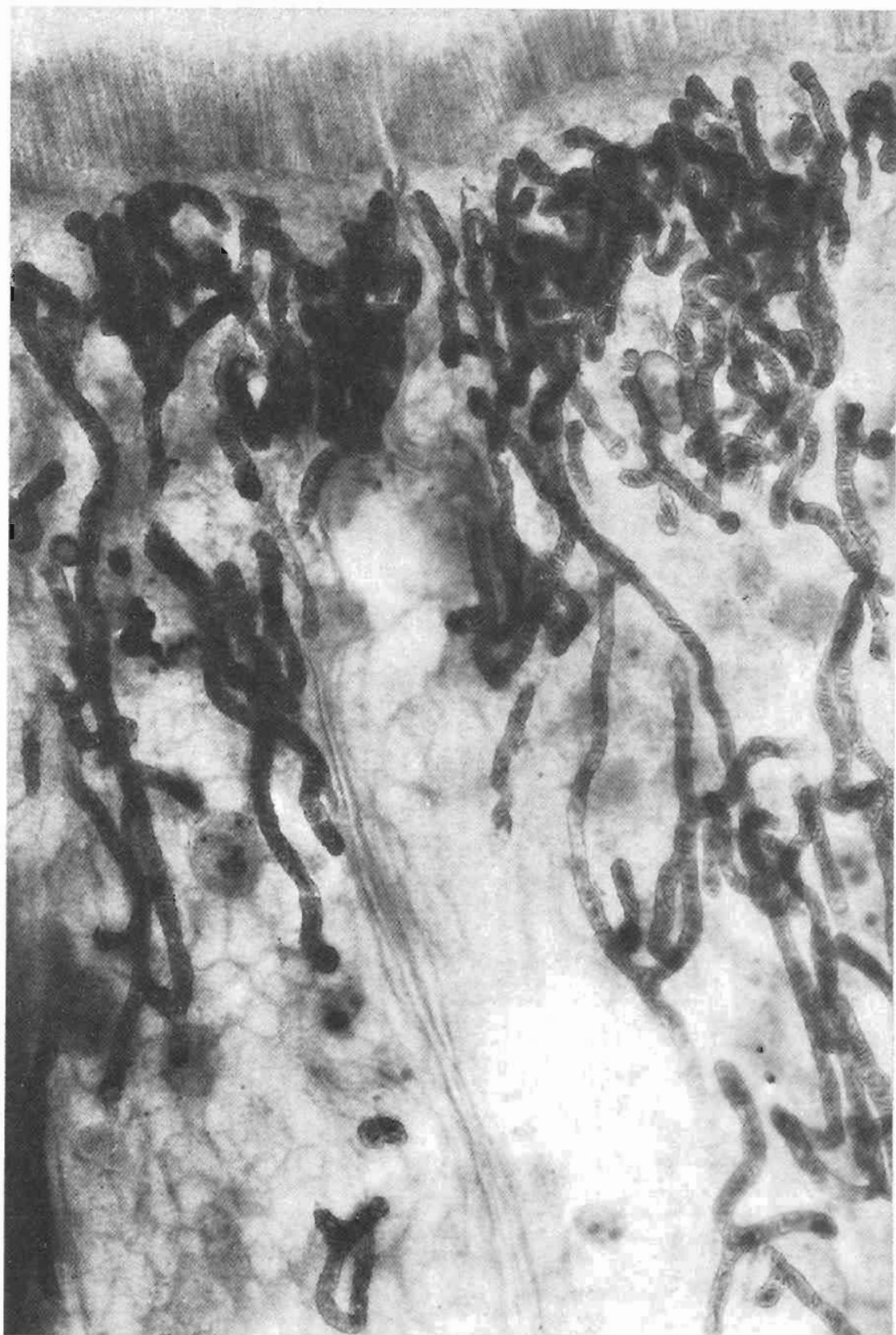
9 Преобразование энергии:
митохондрии и хлоропласты

10 Цитоскелет

11 Рост и деление клеток

12 Межклеточная адгезия
и внеклеточный матрикс

13 Межклеточная химическая
сигнализация



Змеевидные митохондрии в эпителиальной клетке улитки. Микрофотография, полученная с помощью высоковольтного электронного микроскопа. (С любезного разрешения Pierre Favard.)

Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты

В эукариотической клетке ДНК содержится не только в ядре: **митохондрии**, имеющиеся в клетках всех эукариот, и встречающиеся только у растений **пластиды** (из которых наибольший интерес представляют **хлоропласты**) обладают своей собственной ДНК, кодирующей ряд важных компонентов этих органелл. Митохондрии и хлоропласты очень многочисленны и, хотя они значительно меньше ядра, в сумме обычно занимают большой объем цитоплазмы. Оба типа органелл преобразуют энергию в форму, легко используемую клеткой; эта специфическая функция отражена и в их морфологических особенностях: внутренняя мембрана митохондрий и хлоропластов имеет очень большую площадь поверхности. Для функционирования «энергетических органелл» эта мембрана важна в двух отношениях. Во-первых, на ней протекают процессы переноса электронов, в результате которых энергия, освобождающаяся при окислении субстратов, преобразуется в биологически полезные формы, в частности в энергию АТФ. Во-вторых, эта мембрана образует в органелле большие внутренние «отсеки» (компарменты), где находятся специфические ферменты, катализирующие важные внутриклеточные реакции.

Без митохондрий животные клетки получали бы весь свой АТФ за счет анаэробного гликолиза. Но гликолиз, при котором глюкоза расщепляется до пирувата (разд. 2.3.2), высвобождает лишь небольшую часть той энергии, которую можно получить при полном окислении сахаров. В митохондриях сахара (и жирные кислоты) полностью окисляются молекулярным кислородом до CO_2 и H_2O ; высвобождаемая энергия используется настолько эффективно, что каждая молекула глюкозы дает 36 молекул АТФ, в то время как при гликолизе на одну молекулу глюкозы приходится только две молекулы АТФ.

Хлоропласты, так же как и митохондрии, очень эффективно синтезируют АТФ, но источник энергии у них совершенно иной. Вместо «сжигания» углеводов и жиров хлоропласты используют энергию солнечного света, и поэтому можно было бы ожидать фундаментальных различий в организации этих структур. На самом же деле в основе организации митохондрий и хлоропластов лежат одни и те же общие принципы, и АТФ в них синтезируется одним и тем же способом.

К этому поразительному заключению пришли в результате тщательных исследований, которые были проведены за последние двадцать лет и убедительно показали, что главный путь преобразования энергии в биологически полезные формы одинаков не только в митохондриях и хлоропластах, но также и в клетках бактерий. Энергия преобразуется с помощью процесса, получившего название **хемиосмоса**; в этом процессе используются электроны, богатые энергией, которые были либо возбуждены солнечным светом, либо заключены в питательных веществах. Такие электроны проходят через ряд соединений белковой природы, встроенных в мембрану, непроницаемую для ионов, и образующих так называемую **электронтранспортную цепь**. Продвигаясь по этой цепи, электроны последовательно переходят на все более низкие энергетические уровни. С помощью энергии, отдаваемой электронами, производится «перекачивание» протонов с внутренней стороны мембраны на внеш-



Рис. 9-1. Хемиосмос как универсальный механизм: энергия используется сначала для создания трансмембранного электрохимического протонного градиента. Этот градиент служит источником энергии для разнообразных процессов, происходящих в митохондриях, хлоропластах и бактериальных клетках.

нюю. В результате между двумя сторонами мембраны создается *электрохимический протонный градиент*, энергия которого может быть в свою очередь использована другими белками, встроенными в ту же мембрану (рис. 9-1). В митохондриях и хлоропластах она расходуется главным образом на синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата, но часть ее затрачивается также на транспорт специфических метаболитов в органеллу из окружающей цитоплазмы или в обратном направлении. У бактерий протонный градиент служит столь же важным непосредственным источником энергии, как и синтезируемый с его помощью АТФ. За счет энергии этого градиента не только осуществляются многие транспортные процессы, но и происходит передвижение всей клетки: обратный ток протонов вызывает быстрое вращение бактериальных жгутиков (разд. 13.5.5).

Полагают, что «энергетические» органеллы эукариот ведут свое происхождение от прокариотических клеток, которые были захвачены примитивными эукариотами путем эндоцитоза на ранних этапах эволюции и вступили с ними в симбиоз. Это позволяет объяснить, почему митохондрии и хлоропласты содержат свою собственную ДНК. Но за миллиард лет, прошедших с момента возникновения первых эукариотических клеток, эти органеллы утратили большую часть своего генома и стали тем самым зависимы от белков, которые кодируются ядерным геномом, синтезируются в цитоплазме и только потом переходят внутрь органелл. В то же время и клетка-«хозяин» зависит теперь от этих органелл — они дают ей молекулы АТФ, которые нужны для осуществления биосинтетических реакций, для транспорта ионов и растворенных веществ и для других непрерывно идущих процессов жизнедеятельности.

9.1. Митохондрии [1]

Митохондрии занимают значительную часть цитоплазмы и имеются почти во всех эукариотических клетках. Хотя митохондрии настолько велики, что их можно увидеть в обычный световой микроскоп, и впервые были обнаружены еще в прошлом веке, все же реальная возможность разобраться в их функции появилась только после 1948 г., когда была разработана методика выделения интактных митохондрий. Большинство биохимических исследований проводилось на препаратах очищенных митохондрий из печени, так как в печеночной клетке содержится от 100 до 200 этих органелл, и они занимают около пятой части всего объема цитоплазмы.

Митохондрии обычно изображают в виде жестких удлинённых цилиндров диаметром от 0,5 до 1 мкм. Однако цейтраферная микрокиносъемка живых клеток выявляет подвижность и пластичность этих органелл, опровергая статичный образ, созданный на основе электронных микрофотографий (рис. 9-2). Пути перемещения митохондрий в цитоплазме, по-видимому, связаны с микротрубочками цитоскелета: возможно, от этого зависит специфическая ориентация и распределение митохондрий в различных клетках. В некоторых клетках митохондрии образуют длинные подвижные цепочки (рис. 9-3), а в других они фиксированы вблизи мест особо высокого потребления АТФ. Например, в сердечной мышце митохондрии располагаются между миофибриллами, а в сперматозоидах плотно обвивают жгутик (рис. 9-4).

9.1.1. Митохондрия имеет наружную и внутреннюю мембраны и два внутренних компартмента [2]

Митохондрия окружена двумя высокоспециализированными мембранами, которые играют ключевую роль в ее активности. Каждый из двух липидных бислоев содержит специфический набор белков, и вместе они ограничивают два изолированных отдела — внутреннюю область, называемую *матриксом*, и узкое *межмембранное пространство*. Биохимический состав каждой из четырех частей митохондрии (обеих мембран, матрикса и межмембранного про-

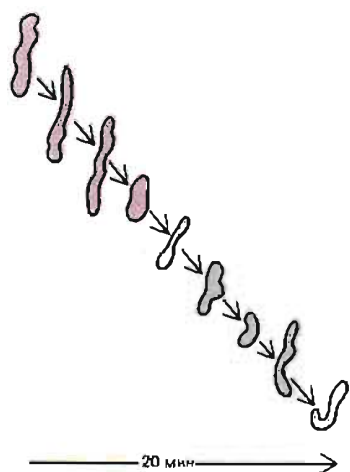


Рис. 9-2. Быстрое изменение формы митохондрий, наблюдаемое в живых клетках.

Рис. 9-3. А. Световая микрофотография цепочек вытянутых митохондрий в крупной живой клетке в культуре ткани млекопитающего. Клетки обработаны витальным флуоресцентным красителем (родаминном 123), специфически окрашивающим митохондрии. Б. Микротрубочки в той же клетке после другой флуоресцентной окраски. Обратите внимание на расположение митохондрий вдоль микротрубочек. Масштабный отрезок 25 мкм. (С любезного разрешения Lan Bo Chen.)

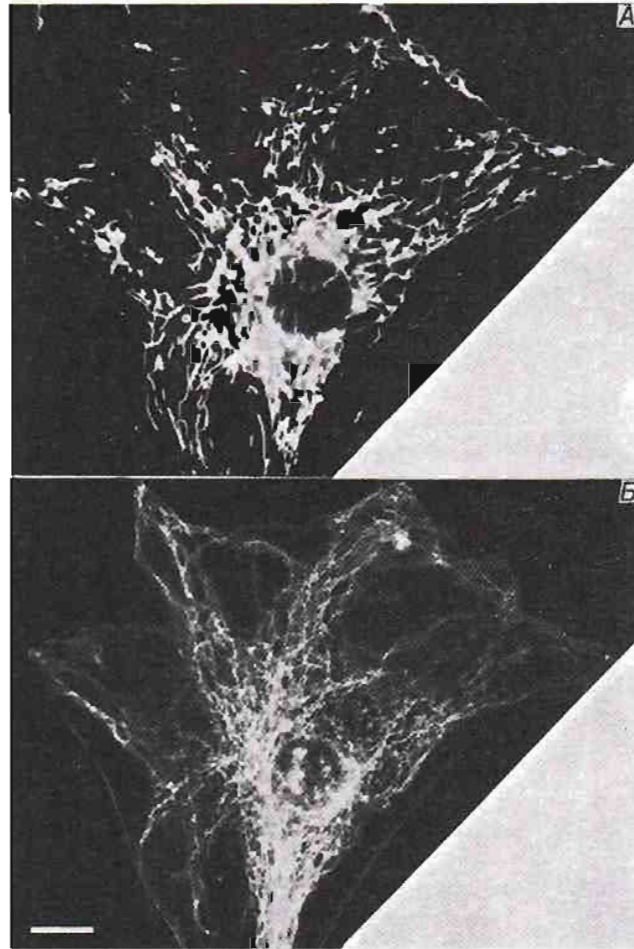
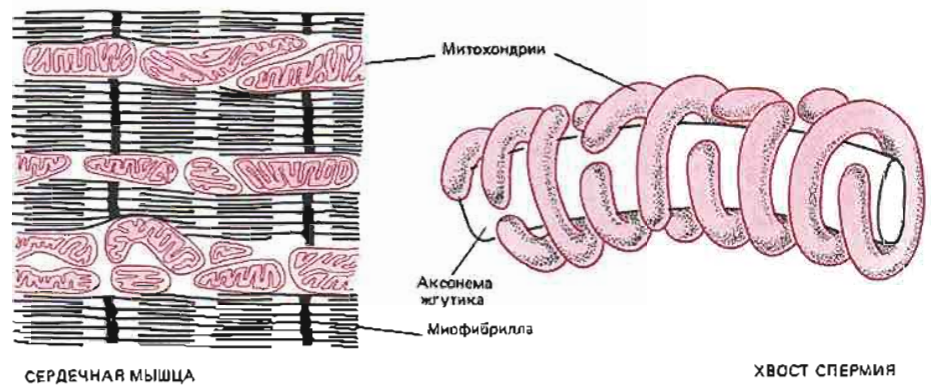


Рис. 9-4. Два примера специфической локализации митохондрий вблизи мест высокого потребления АТФ. Каким образом гидролиз АТФ приводит к сокращению мышцы (слева) и к движению эукариотического жгутика (справа), подробно объяснено в гл. 10. В ходе развития жгутика у сперматозоида микротрубочки на какое-то время обвивают аксоному жгутика и обеспечивают надлежащее расположение митохондрий в хвосте сперматозоида.



странства) можно определить, осторожно разрушив очищенные органеллы и разделив полученный материал на фракции (рис. 9-5); некоторые результаты приведены в подписи к рис. 9-6.

С помощью этого и других методов было показано, что **наружная мембрана** содержит много повторяющихся молекул транспортного белка, образующих широкие гидрофильные каналы в двойном липидном слое. Наружная мембрана, таким образом, напоминает сито, пропускающее все молекулы



Рис. 9-5. Методы разделения митохондрий на отдельные компоненты дают возможность изучать различные белки в каждом компартменте митохондрии.

Представленный здесь метод, позволяющий одновременно обрабатывать большое количество митохондрий, основан на том, что в среде с низкой ионной силой вода проникает в митохондрию и вызывает ее сильное набухание. При этом кристы внутренней мембраны расправляются, а наружная мембрана, не имеющая складок, разрывается, высвобождая структуру, состоящую только из внутренней мембраны и матрикса.

массой до 10 000 дальтон, в том числе и небольшие белки. Эти молекулы могут проникать в межмембранное пространство, но большая часть их не может пройти сквозь непроницаемую внутреннюю мембрану. Это означает, что если химический состав межмембранного пространства эквивалентен составу цитозоля хотя бы в отношении молекул малого размера, то состав матрикса гораздо более специфичен.

Основная рабочая часть митохондрии — это матрикс и окружающая его **внутренняя мембрана**. Среди специфических особенностей внутренней мембраны следует отметить необычно высокое содержание в ней *кардиолипина* — фосфолипида, составляющего более 10% всех ее липидов. Полагают, что именно этим обусловлена необычайно малая проницаемость внутренней мембраны для ионов. В состав этой мембраны входят также различные транспортные белки, избирательно пропускающие внутрь ряд небольших молекул, метаболизируемых ферментами, которые находятся в матриксе. В частности, матрикс содержит ферменты, превращающие пируват и жирные кислоты в ацетил-СоА и затем окисляющие последний в цикле лимонной кислоты. Главные конечные продукты этого окисления — двуокись углерода (CO_2), выходящая из клетки, и NADH, который служит основным источником электронов при переносе их по *дыхательной цепи* (так называют цепь переноса электронов в митохондриях). Ферменты этой цепи встроены во внутреннюю митохондриальную мембрану и важны для всего процесса *окислительного фосфорилирования*, происходящего в митохондриях и дающего большую часть АТФ в животных клетках.

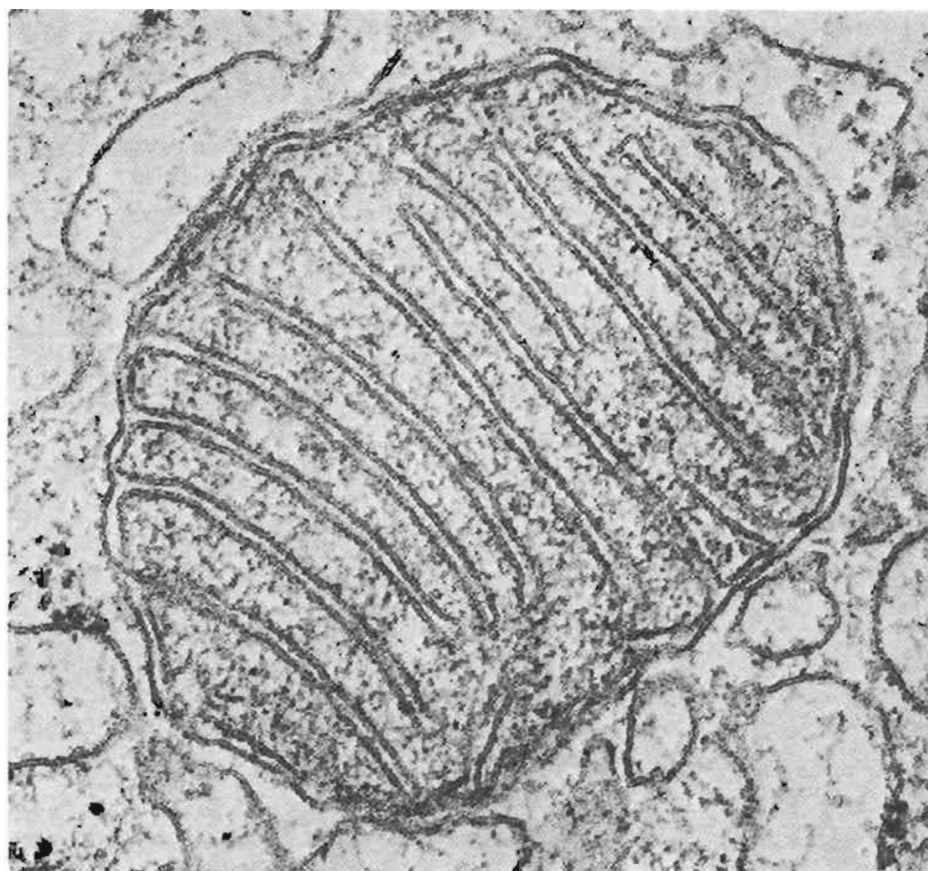
9.1.2. Кристы — складки, образованные внутренней мембраной [3]

Внутренняя мембрана обычно образует многочисленные складки, выступающие в область матрикса, которые называют *кристами*. Благодаря этим складкам общая поверхность внутренней мембраны в митохондриях печени почти в пять раз превышает общую поверхность наружной мембраны и составляет около трети поверхности всех мембран клетки (см. табл. 7-2). В митохондриях сердечной мышцы крист втрое больше, чем в митохондриях печени; вероятно, это связано с большей потребностью сердечной ткани в АТФ. Морфология крист в митохондриях разных клеток может быть весьма различной (рис. 9-7); значение этих различий неизвестно. Кроме того, митохондрии часто содержат специальные ферменты, позволяющие им наилучшим образом обслуживать именно те клетки, в которых они находятся. В этой главе мы не будем останавливаться на подобных различиях, а рассмотрим только те ферменты и другие особенности, которые характерны для всех митондрий. Прежде чем перейти к деталям процессов переноса электронов, определяющих специфические черты этих органелл, рассмотрим кратко основные метаболические пути, приводящие к образованию субстратов для ферментов дыхательной цепи.

9.1.3. Окислительный процесс в митохондриях начинается при образовании в матриксе достаточного количества ацетил-СоА из пирувата и жирных кислот [4]

Как уже отмечалось, «топливом» для окислительного метаболизма митондрий служат главным образом жирные кислоты и пируват, образующийся в результате гликолиза в цитозоле. Эти вещества избирательно транспортируются из цитозоля в митохондриальный матрикс, где распадаются до двухуглеродных ацетильных групп, присоединенных к СоА (рис. 9-8). В составе молекулы ацетил-СоА каждая ацетильная группа поступает затем в цикл лимонной кислоты для дальнейшего расщепления. Процесс заканчивается прохождением по дыхательной цепи богатых энергией электронов, извлеченных из ацетильной группы.

Рис. 9-6. Общее строение митохондрии. В митохондриях печени 67% всего белка находится в матриксе, 21% – в наружной мембране, 6% – во внутренней мембране и 6% – в межмембранном пространстве. Каждый из этих четырех компартментов в соответствии со своей функцией содержит определенный набор ферментов. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)



100 нм

Матрикс. Матрикс содержит высококонцентрированную смесь из сотен различных ферментов, в том числе ферменты, необходимые для окисления пирувата и жирных кислот, и ферменты цикла лимонной кислоты. Кроме того, там находятся несколько идентичных копий митохондриальной ДНК, специфические митохондриальные рибосомы, тРНК и различные ферменты, участвующие в экспрессии митохондриального генома.

Внутренняя мембрана. Эта мембрана образует многочисленные складки, увеличивающие общую поверхность мембраны. В ней содержатся белки трех главных типов: 1) белки, катализирующие окислительные реакции в дыхательной цепи; 2) ферментный комплекс, называемый АТР-синтетазой, который синтезирует в матриксе АТР; 3) специфические транспортные белки, регулирующие перенос метаболитов в матрикс и из него. Так как электрохимический градиент, энергию которого использует АТР-синтетаза, создается на этой мембране при участии дыхательной цепи, важно, чтобы мембрана была непроницаема для большей части малых ионов.

Наружная мембрана. Так как наружная мембрана содержит белок, образующий широкие каналы, она проницаема для всех молекул массой до 100 000 дальтон. Кроме того, в состав этой мембраны входят ферменты, превращающие липиды в реакционноспособные интермедиаты, которые затем участвуют в метаболических процессах, протекающих в матриксе.

Межмембранное пространство. Здесь находится несколько ферментов, которые используют выходящий из матрикса АТР для фосфорилирования других нуклеотидов.

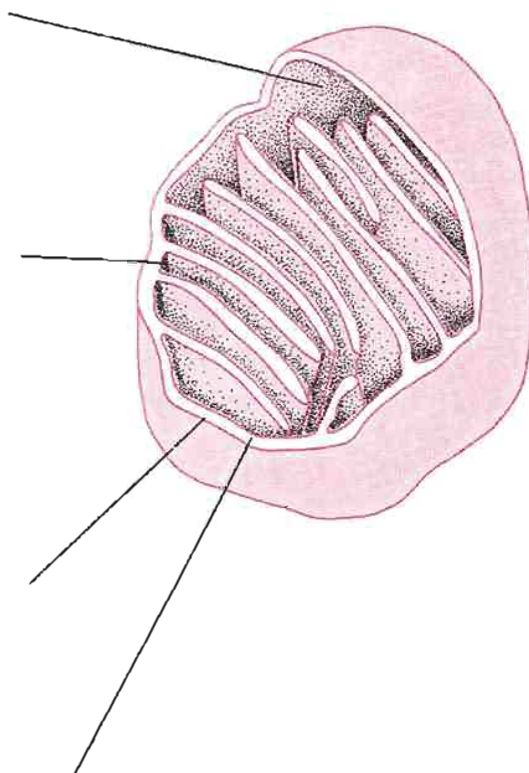




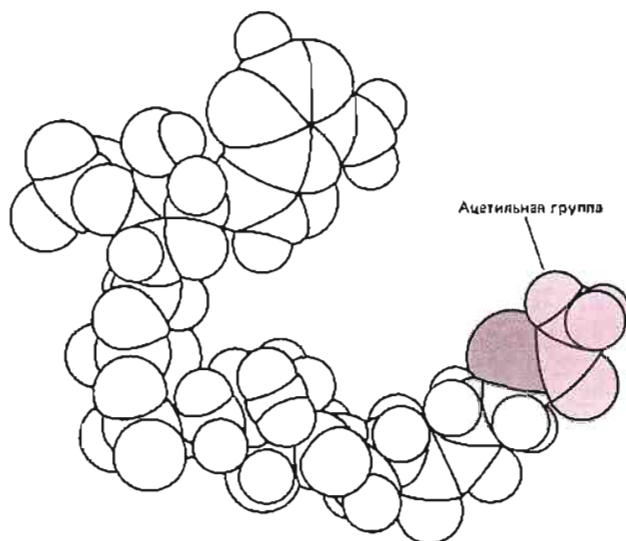
Рис. 9-7. Некоторые морфологические различия в строении крист митохондрий, выделенных из различных тканей крысы. Значение этих различий для функционирования митохондрий неизвестно.

Для того чтобы обеспечить постоянное снабжение окислительного метаболизма «топливом», клетка запасает его в определенных формах, а именно в виде жиров, служащих источником жирных кислот, и гликогена — источника глюкозы, которая потом расщепляется до пирувата. В количественном отношении жиры гораздо более важны, хотя бы потому, что при их окислении освобождается в шесть с лишним раз больше энергии, чем при окислении равного количества гликогена в его гидратированной форме. Запасов гликогена в организме среднего взрослого человека достаточно на один день нормальной активности, тогда как запаса жиров хватит на месяц. Если бы главным резервуаром топлива в нашем организме служил гликоген, а не жиры, вес тела увеличился бы в среднем на 25 кг.

Основная часть жировых запасов находится у нас в жировой ткани, откуда по мере надобности жиры транспортируются с током крови к остальным клеткам. Потребность в жирах возрастает после периода голодания; даже после ночного сна происходит мобилизация жира, так что в утренние часы большая часть ацетил-СоА, поступающего в цикл лимонной кислоты, извлекается из жирных кислот, а не из глюкозы. Однако после еды основным источником ацетил-СоА для цикла лимонной кислоты становится глюкоза, полученная с пищей. Избыток этой глюкозы идет на восполнение истощенных запасов гликогена или на синтез жиров. (Следует отметить, что хотя сахара в животных клетках легко переводятся в жиры, последние не могут превращаться в сахара.)

Молекула жира состоит из трех остатков жирных кислот, присоединенных эфирными связями к молекуле глицерола. Такие *триацилглицеролы* (*триглицериды*) неполярны и практически нерастворимы в воде — в цитозоле они образуют жировые капельки. В *адипоцитах* — клетках жировой ткани — одна большая капля жира занимает почти весь клеточный объем. В сердечной мышце и других тканях, использующих энергию окисления жирных кислот, тоже имеются жировые капельки, но гораздо меньшего размера. Часто такие капельки тесно связаны с митохондриями (рис. 9-9). Во всех клетках в наружной и внутренней митохондриальных мембранах имеются ферменты, которые переносят извлекаемые из жиров жирные кислоты в матрикс митохондрий. Здесь молекула жирной кислоты постепенно подвергается полному расщеплению в цикле реакций, за один оборот которого она укорачивается на два углеродных атома с образованием одной молекулы ацетил-СоА (рис. 9-10). Затем происходит дальнейшее окисление ацетил-СоА в цикле лимонной кислоты.

Рис. 9-8. Пространственная модель молекулы ацетил-СоА. Ацетильная группа составляет лишь малую часть молекулы этого кофермента. S — атом серы (см. также рис. 2-9).



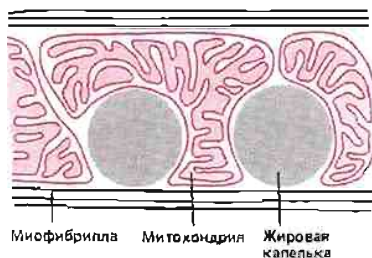


Рис. 9-9. В клетках сердечной мышцы жировые капельки окружены митохондриями, в которых происходит окисление жирных кислот, извлекаемых из триглицеридов.

Глюкоза – шестиуглеродный сахар – сначала расщепляется в цитозоле на две трехуглеродные молекулы пирувата, еще сохраняющие большую часть энергии, которая может быть извлечена при полном окислении глюкозы. Эта энергия высвобождается в результате реакций, начинающихся после поступления пирувата в митохондрию. Здесь молекула пирувата связывается большим ферментным комплексом, по величине крупнее рибосомы, – *пируватдегидрогеназой* (разд. 2.5.5). Этот мультиферментный комплекс, содержащий множественные копии трех различных каталитических белков, пяти коферментов и двух регуляторных ферментов, быстро превращает пируват в ацетил-CoA (рис. 9-11). Этот ацетил-CoA, так же как и ацетил-CoA, получающийся при окислении жирных кислот, поступает в цикл лимонной кислоты.

9.1.4. Окисление ацетильной группы в цикле лимонной кислоты ведет к образованию молекул NADH и FADH₂ для дыхательной цепи [5]

Еще в прошлом веке биологи заметили, что в анаэробных условиях клетка образует молочную кислоту (или этанол), а в присутствии кислорода – CO₂ и H₂O. Пытаясь выяснить пути аэробного метаболизма, исследователи в конце концов сосредоточили внимание на окислении пирувата, что привело к открытию в 1937 г. **цикла лимонной кислоты**, известного также как **цикл трикарбоновых кислот** или **цикл Кребса**. Сейчас известно, что в большинстве клеток в цикле лимонной кислоты происходят примерно две трети всех реакций окисления углеродных соединений. Основные конечные продукты этого цикла – CO₂, NADH и FADH₂. NADH и FADH₂ передают свои электроны

Рис. 9-10. Цикл окисления жирных кислот, катализируемый ферментами митохондриального матрикса. За каждый оборот цикла молекула жирной кислоты укорачивается на два углеродных атома и образуются одна молекула ацетил-CoA и по одной молекуле NADH и FADH₂.

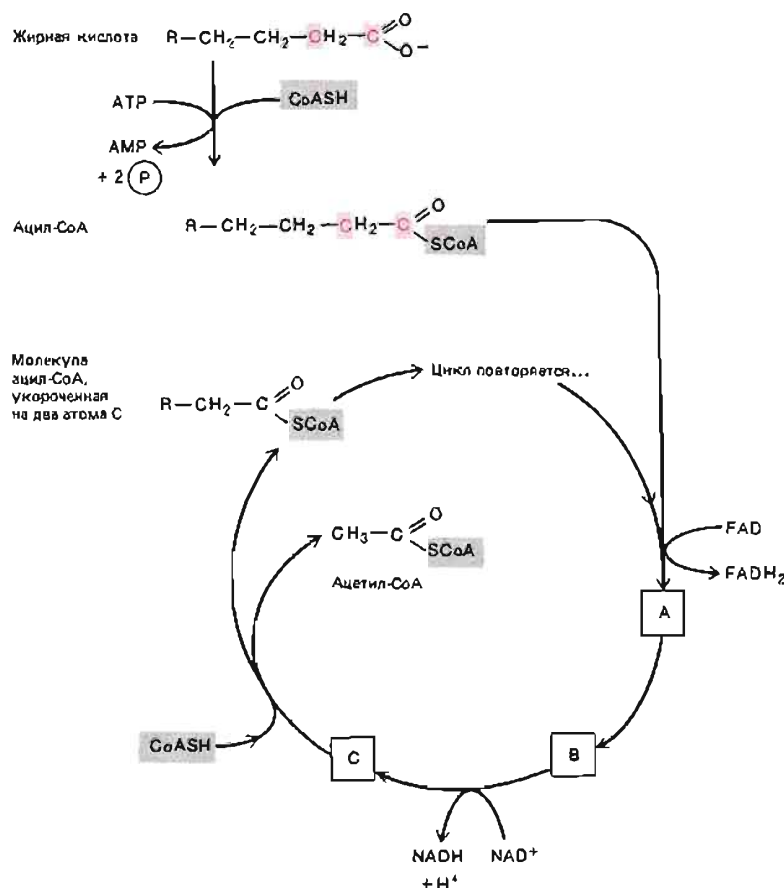
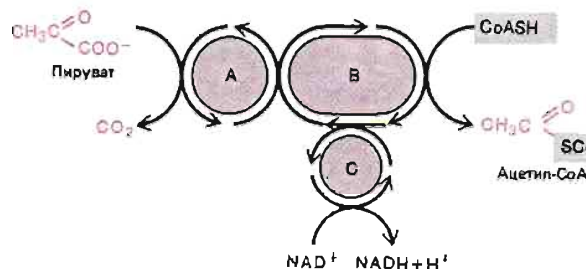


Рис. 9-11. Схема сопряженных реакций, превращающих пируват в ацетил-СоА в матриксе митохондрий. Стрелки большого ферментного комплекса, катализирующего эти реакции, показано на рис. 2-40.



в дыхательную цепь, в конце которой эти электроны используются для восстановления молекулярного кислорода до H_2O .

Цикл лимонной кислоты начинается с взаимодействия между ацетил-СоА и четырехуглеродным соединением оксалоацетатом, в результате чего образуется шестиуглеродная лимонная кислота, которая и дала название всему циклу. Затем в ходе семи последовательных ферментативных реакций два углеродных атома удаляются в виде CO_2 , а оксалоацетат регенерируется. Каждый оборот цикла дает две молекулы CO_2 , образующиеся из двух углеродных атомов, поступивших в предыдущие обороты цикла (рис. 9-12). Пре-

Рис. 9-12. Цикл лимонной кислоты. Промежуточные продукты представлены в виде свободных жирных кислот, хотя в действительности они ионизированы. Каждая из указанных реакций катализируется особым ферментом; все эти ферменты находятся в матриксе митохондрий. Два атома углерода, приносимые с ацетил-СоА, превращаются в CO_2 в последующих оборотах цикла.

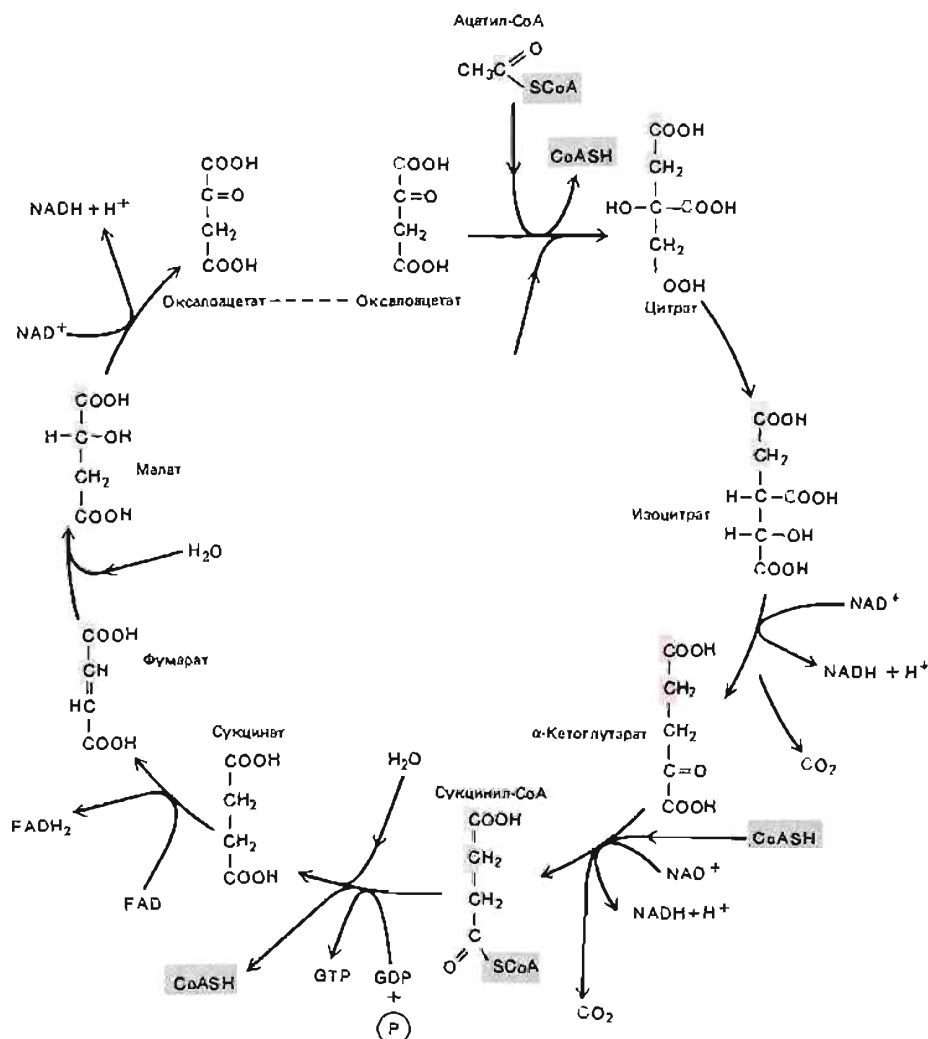
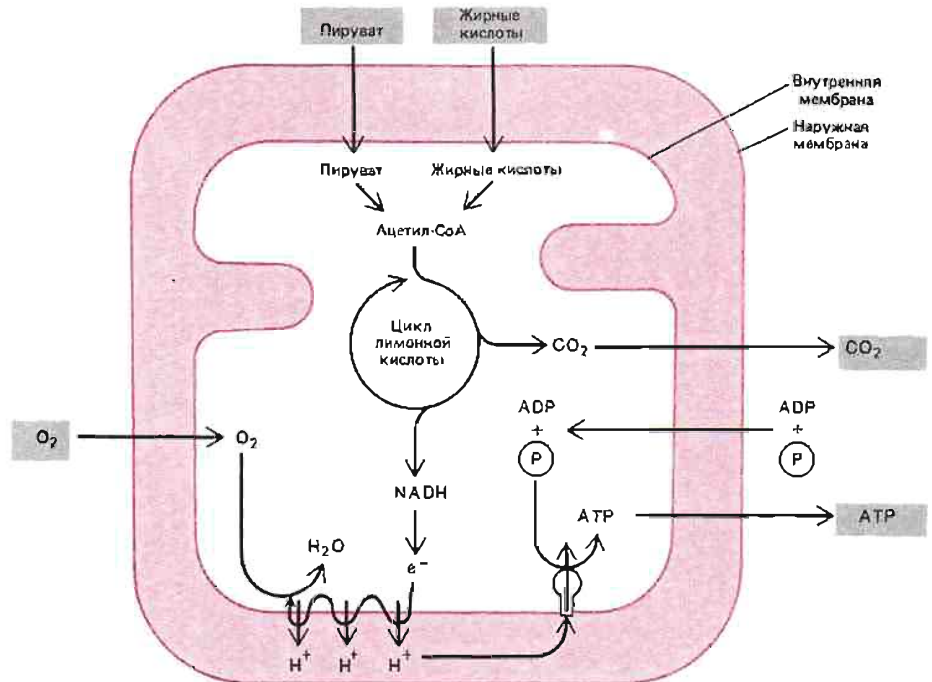


Рис. 9-13. Потоки важнейших метаболитов, поступающих в митохондрию и выходящих из нее. В дополнение к показанному на схеме в цепь переноса электронов поступают еще электроны от NADH, образующегося при гликолизе в цитозоле. Этот перенос осуществляется косвенным путем при помощи одной из нескольких «челночных» систем, которые транспортируют восстановленное соединение в матрикс, окисляют его с образованием NADH (или FADH_2) и затем переносят из митохондрии в цитозоль, где восстанавливают до первоначального состояния с помощью цитоплазматического NADH. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для NADH.



вращения ацетата можно представить следующей суммарной реакцией:
 CH_3COOH (в виде ацетил-CoA) + $2\text{H}_2\text{O}$ + 3NAD^+ + $\text{FAD} \rightarrow 2\text{CO}_2$ + 3NADH_2 + FADH_2 .

Кроме того, в результате этой реакции синтезируется одна молекула ATP (через GTP как промежуточный продукт) путем фосфорилирования, подобно тому как это происходит при гликолизе (разд. 2.3.2). Но основной вклад цикла лимонной кислоты в метаболизм — это извлечение высокоэнергетических электронов из молекулы ацетил-CoA, происходящее при превращении двух углеродов этой молекулы в CO_2 . Эти электроны оказываются в NADH и FADH_2 и передаются затем в дыхательную цепь внутренней митохондриальной мембраны (рис. 9-13).

9.1.5. На внутренней митохондриальной мембране энергия окислительных реакций преобразуется при участии хемиосмотического механизма в энергию ATP [6]

Хотя цикл лимонной кислоты составляет часть аэробного метаболизма, ни в одной из реакций этого цикла, приводящих к образованию NADH и FADH_2 , молекулярный кислород не принимает прямого участия. Он выходит на сцену только в завершающей серии катаболических реакций, протекающих на внутренней митохондриальной мембране. В ходе этих реакций электроны, перевесенные при окислении субстратов на NAD^+ и FAD, связываются молекулярным кислородом, а высвобождаемая при этом энергия используется для синтеза ATP из ADP и P_i ; этот процесс, взятый в целом, называют **окислительным фосфорилированием** (рис. 9-14).

Как уже упоминалось, синтез ATP в реакциях окислительного фосфорилирования, протекающих в дыхательной цепи, зависит от хемиосмотического процесса. Схема этого процесса, впервые предложенная в 1961 г., позволила разрешить проблему, давно уже стоявшую перед биологией клетки. Однако идея была так нова, что только спустя несколько лет она получила всеобщее признание в результате накопления экспериментальных данных. Раньше ду-

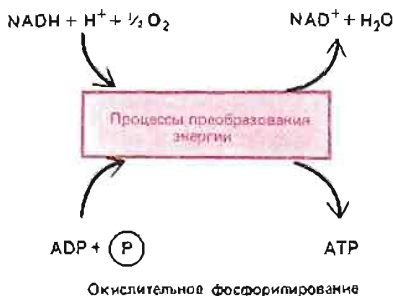


Рис. 9-14. Суммарный итог превращения энергии, происходящего в митохондрии. Процесс, в котором часть энергии окисления NADH преобразуется в энергию фосфатных связей ATP, называют окислительным фосфорилированием.

Таблица 9-1. Хемиосмотическая гипотеза

Хемиосмотическая гипотеза, предложенная в начале 60-х годов, включала четыре независимых постулата, касающиеся функции митохондрий:

1. Одновременно с прохождением электронов по митохондриальной дыхательной цепи, находящейся на внутренней мембране, происходит «откачивание» протонов из матрикса
2. Митохондриальная АТФ-синтетаза тоже перемещает протоны через внутреннюю мембрану. Поскольку этот процесс обратим, фермент может не только использовать энергию гидролиза АТФ для переноса H^+ через мембрану; при наличии достаточно большого протонного градиента протоны начинают «течь» через АТФ-синтразу в обратном направлении, что сопровождается синтезом АТФ
3. Внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для анионов и катионов, в том числе для OH^- и H^+
4. Внутренняя митохондриальная мембрана содержит ряд белков-переносчиков, осуществляющих транспорт необходимых метаболитов

матри, что синтез АТФ в дыхательной цепи основан на том же известном еще с 1937 г. механизме, что и синтез АТФ при гликолизе: предполагалось, что энергия окисления используется для образования высокоэнергетической связи между фосфатной группой и каким-то промежуточным соединением и что синтез АТФ из ADP и P_i осуществляется за счет энергии, выделяемой при разрушении этой связи. Но все попытки обнаружить такие промежуточные соединения были тщетны; это и не удивительно, так как мы теперь знаем, что таких соединений просто нет.

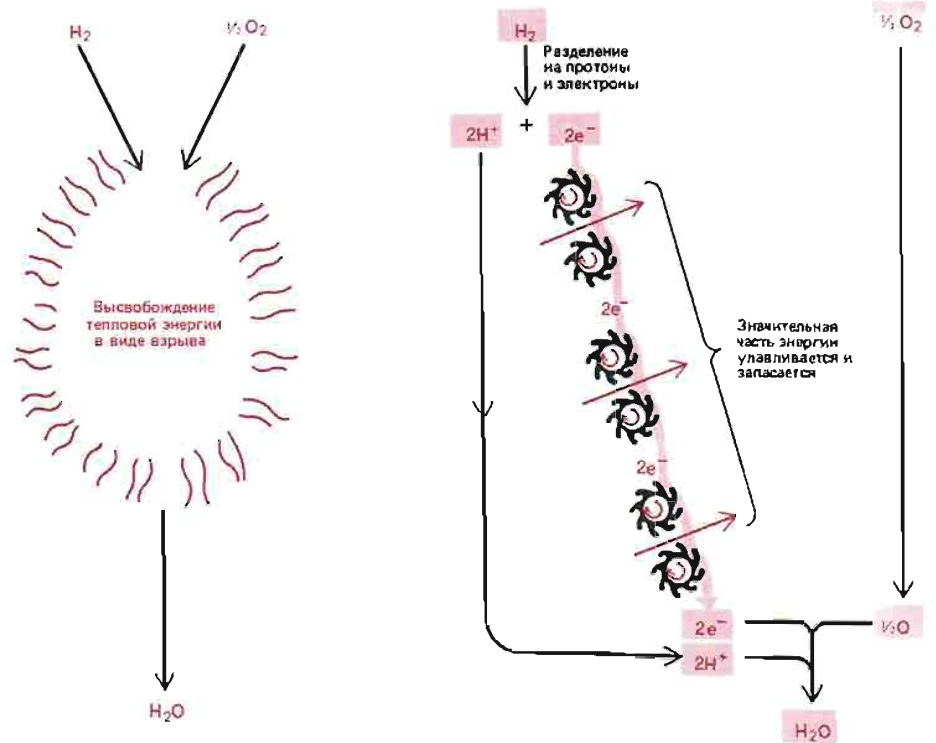
Согласно *хемиосмотической гипотезе*, вместо богатых энергией промежуточных продуктов существует прямая связь между процессами химическими («хеми...») и транспортными (осмотическими, от греческого «osmosis» – толчок, давление), отсюда «хемиосмос» (табл. 9-1). При прохождении высокоэнергетических электронов, доставляемых NADH и $FADH_2$, по электрон-транспортной цепи внутренней митохондриальной мембраны (дыхательная цепь) высвобождается энергия, которая используется для перемещения протонов из матрикса в межмембранное пространство. В результате между двумя сторонами внутренней мембраны создается *электрохимический протонный градиент*. Энергия обратного тока протонов «вниз» по этому градиенту используется связанным с мембраной ферментом – АТФ-синтетазой, катализирующей образование АТФ из ADP и P_i и завершающей таким образом процесс окислительного фосфорилирования.

В молекулах NADH и $FADH_2$ электроны находятся в высокоэнергетическом состоянии, заключая в себе энергию клеточных реакций окисления, которая высвобождается только при переносе этих электронов на молекулярный кислород. Таким образом, использование NADH и $FADH_2$ в качестве переносчиков электронов на ранних окислительных этапах позволяет сохранить почти всю энергию от «сжигания» углеводов, жиров и аминокислот до заключительных этапов. На этих последних этапах переносчики электронов во внутренней мембране направляют высвобождаемую энергию в конечном счете на осуществление реакций $ADP + P_i \rightarrow ATP$. Итак, внутренняя мембрана митохондрий играет роль *энергообразующей машины*, превращающей энергию окисления NADH в энергию фосфатных связей (в виде АТФ) (рис. 9-14). Сейчас мы кратко рассмотрим эту серию реакций (детали будут обсуждаться позже, в разд. 9.2).

9.1.6. Дыхательная цепь переносит электроны с NADH на кислород [7]

В дыхательной цепи на внутренней мембране митохондрий используются те же общие механизмы, которые лежат в основе извлечения энергии при других катаболических процессах. Реакция $H_2 + \frac{1}{2}O_2 \rightarrow H_2O$ разбита на много не-

Рис. 9-15. При сгорании водорода большая часть энергии рассеивается в виде тепла (слева). В живой клетке она запасается в форме, удобной для использования, с помощью цепи переноса электронов, находящейся во внутренней митохондриальной мембране (справа); часть энергии окисления и здесь высвобождается в виде тепла.

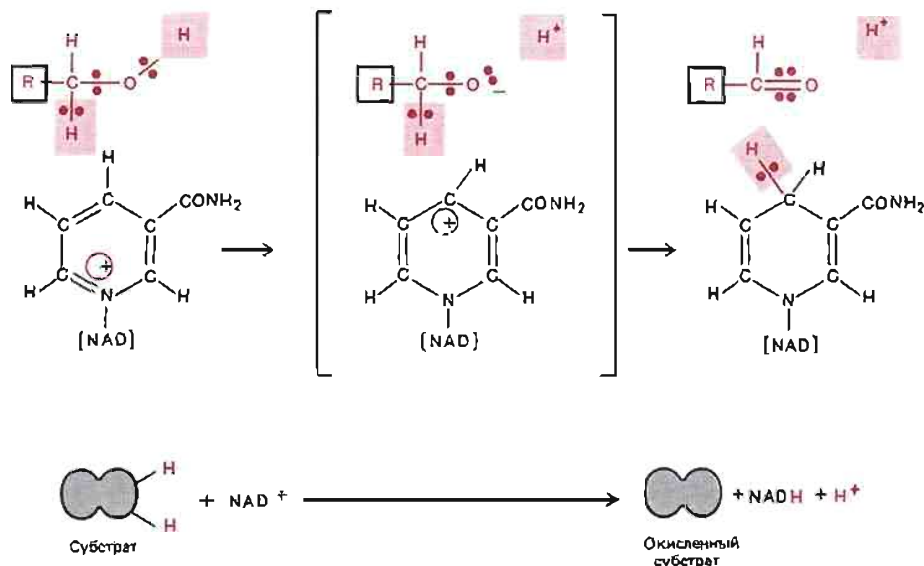


больших «ступенек», так, чтобы энергия в основном перешла в связанную форму, а не рассеялась в виде тепла. Как и в случае гликолиза и цикла лимонной кислоты, это связано с использованием непрямого пути. Но здесь есть существенное отличие: окислению подвергается водород, а не углеводы, и не прямой путь включает прежде всего расщепление водородных атомов на электроны и протоны. Электроны передаются в дыхательную цепь, а протоны поступают в окружающую водную среду и возвращаются только после того, как электроны достигнут конца дыхательной цепи, для нейтрализации отрицательного заряда, возникающего при переходе электронов на молекулу кислорода (рис. 9-15).

Мы проследим процесс окисления начиная с образования $NADH$, так как в большинстве случаев электроны переносятся в составе $NADH$, а не $FADH_2$. Атом водорода (будем обозначать его $H^{\cdot-}$) состоит из одного электрона (e^-) и одного протона (H^+). Одна молекула $NADH$ переносит не просто водородный атом, а гидрид-ион (атом водорода плюс добавочный электрон, $H^{\cdot-}$). Однако из-за того, что в окружающем водном растворе содержится достаточное количество протонов, это, по существу, равнозначно переносу двух атомов водорода в виде водородной молекулы ($H^{\cdot-} + H^+ \rightarrow H_2$). Соответственно в реакциях, в которых образуется $NADH$, от молекулы субстрата одновременно отнимаются два атома водорода, которые дают один гидрид-ион и один протон, как показано на рис. 9-16.

Транспорт электрона по дыхательной цепи начинается с отнятия гидрид-иона ($H^{\cdot-}$) от $NADH$; при этом регенерируется NAD^+ , а гидрид-ион превращается в протон и два электрона ($H^{\cdot-} \rightarrow H^+ + 2e^-$). Эти электроны переходят на первый из многочисленных переносчиков электронов, встроенных во внутреннюю митохондриальную мембрану. На этом этапе электроны обладают очень большой энергией, запас которой постепенно уменьшается по мере прохождения электрона через цепь из более чем 15 различных молекул-переносчиков в дыхательной цепи. Чаще всего электроны переходят от одного атома металла к другому. Каждый из этих металлов прочно связан различным образом с белковой молекулой, которая влияет на его сродство

Рис. 9-16. Предполагаемый механизм биологического окисления спирта в альдегид. От молекулы спирта отщепляются два атома водорода; при этом гидрид-ион переносится на NADH, а протон поступает в водную среду. Показанные стадии процесса протекают на поверхности фермента алкогольдегидрогеназы и катализируются его специфическими группами. (По P.F. Cook, N.J. Oppenheimer, W.W. Cleland, *Biochemistry*, 1981, 20, 1817–1825; видоизменено.)



к электрону. Однако самый простой из всех переносчиков электронов — **убихинон**, или **кофермент Q**, — представляет собой небольшую гидрофобную молекулу. Убихинон способен принять или отдать как один, так и два электрона одновременно; при этом он захватывает из среды по одному протону на каждый принятый электрон (рис. 9-17).

Наиболее изученный белок дыхательной цепи — **цитохром c**. Его трехмерная структура была определена методом рентгеноструктурного анализа (рис. 9-18). В дыхательной цепи имеется пять разных **цитохромов**, образующих группу окрашенных белков, содержащих молекулу гема. Когда цитохром принимает электрон, атом железа в геме изменяет свою валентность (Fe^{III} → Fe^{II}) (рис. 9-19). Помимо цитохромов в дыхательную цепь входят шесть различных **железосерных комплексов**; в переносе электронов участвуют также два атома меди и два флавина, тесно связанные с белками дыхательной цепи. Группы соседних переносчиков образуют крупные **ферментные комплексы дыхательной цепи**, которые будут описаны позднее (разд. 9.2.5). Каждая последующая группа переносчиков имеет большее сродство к электронам, чем предыдущая. В результате электроны, передаваемые в дыхательную цепь молекулой NADH, постепенно спускаются на все более низкие энергетические уровни, переходя от одного белка-переносчика к другому, пока не дойдут до конечного акцептора — молекулярного кислорода, который обладает наибольшим сродством к электронам.

Рис. 9-17. Убихинон (кофермент Q) — важный переносчик электронов в дыхательной цепи. На каждый принятый электрон убихинон захватывает из окружающей водной среды по одному протону; при этом он способен переносить как один, так и два электрона. Когда убихинон отдает свои электроны следующему переносчику, протоны высвобождаются. В клетках млекопитающих гидрофобный хвост, удерживающий молекулу убихинона в толще мембраны, обычно состоит из десяти изопреновых единиц. У растений аналогичным переносчиком электронов служит пластохинон, который почти не отличается от убихинона.

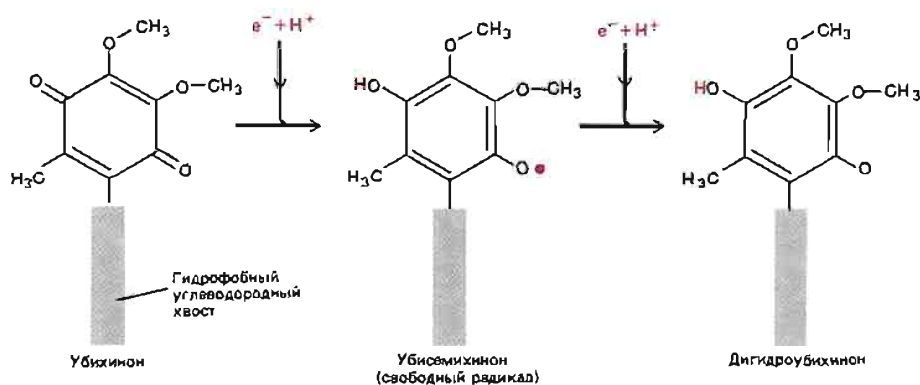


Рис. 9-18. Пространственная модель цитохрома *c* – переносчика электронов в дыхательной цепи. Это небольшой белок, содержащий немногим более 100 аминокислотных остатков и довольно свободно перемещающийся в мембране (см. рис. 9-31). Атом железа (выделен темной окраской) в составе ковалентно связанного с белком гема (показан розовым цветом) может переносить только один электрон.

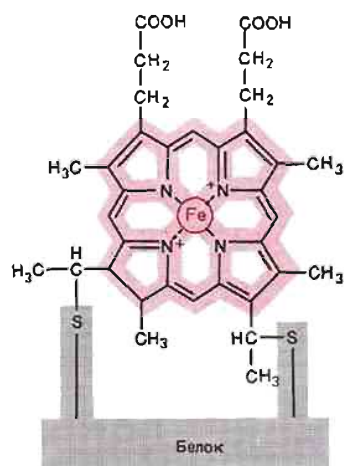
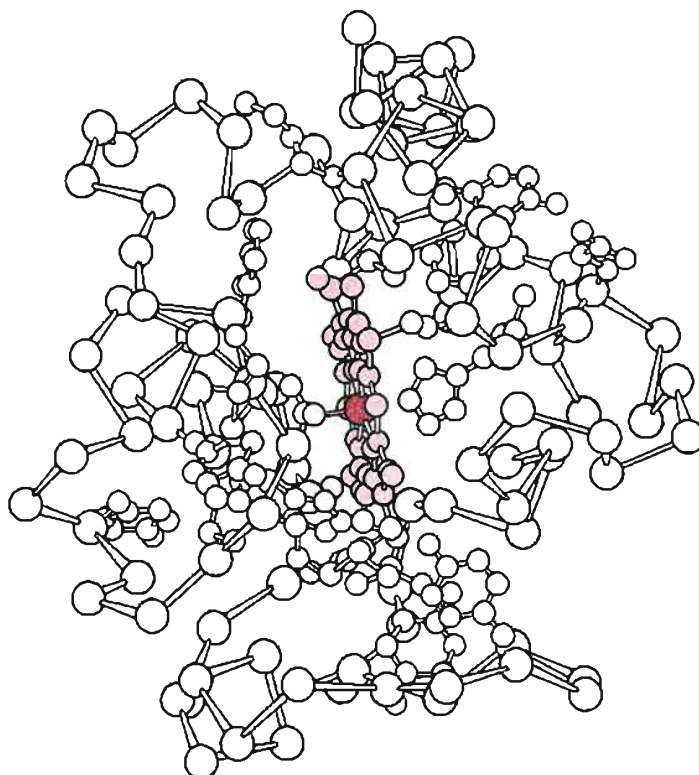


Рис. 9-19. Структура гема, ковалентно связанного с цитохромом *c*. Гемы разных цитохромов несколько различаются по строению и по-разному связываются белками, поэтому разные цитохромы имеют различное сродство к электронам.

Цитохромы, железосерные комплексы и атомы меди способны за один раз перенести только один электрон. Между тем молекула NADH отдает два электрона, а молекула O_2 , для того чтобы образовалась вода, должна принять четыре. Для согласования этих расхождений в числе электронов в электронтранспортной цепи есть несколько электрон-собирающих и электрон-распределяющих участков.

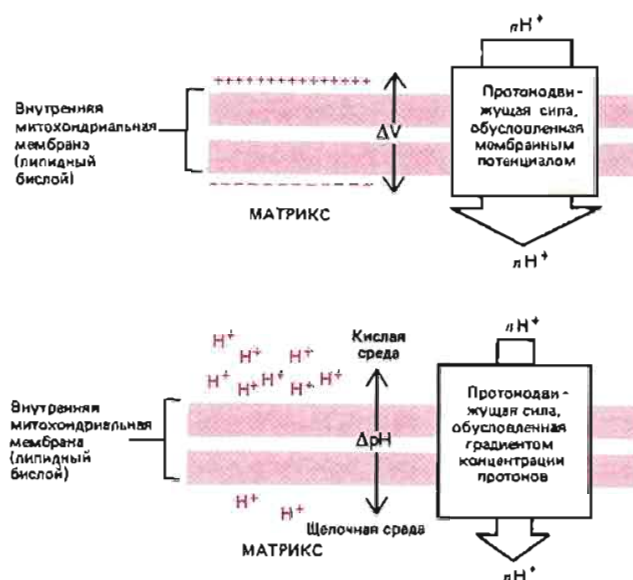
9.1.7. Энергия, высвобождаемая в процессе переноса электронов по дыхательной цепи, запасается в форме электрохимического протонного градиента на внутренней мембране митохондрий [8]

Как уже говорилось, большая часть энергии, высвобождаемой при транспорте электронов, используется компонентами дыхательной цепи для создания потока протонов (H^+) в направлении из матрикса в межмембранное пространство и далее за пределы митохондрии. Это приводит к двум следствиям:

1. Поток протонов создает между двумя сторонами внутренней мембраны градиент рН, причем концентрация ионов H^+ в матриксе становится значительно ниже, чем в остальной клетке, где значение рН обычно близко к 7 (напомним, что малые по размерам молекулы свободно проходят через наружную мембрану митохондрии, и поэтому рН в межмембранном пространстве будет таким же, как в цитозоле).
2. Поток протонов создает на мембране разность электрических потенциалов (мембранный потенциал): внутренняя сторона мембраны заряжается отрицательно, а наружная – положительно (как результат выхода наружу положительно заряженных ионов).

Градиент рН (ΔpH) заставляет ионы H^+ переходить обратно в матрикс и «вытягивает» из него ионы OH^- . Под действием мембранного потенциала ($\Delta\psi$) любой положительно заряженный ион стремится проникнуть в матрикс,

Рис. 9-20. Две составляющие электрохимического протонного градиента, возникающего на внутренней митохондриальной мембране. Общая протонотдвижущая сила состоит из двух компонент: большой силы, обусловленной мембранным потенциалом (обозначается как ΔV или $\Delta\psi$), и меньшей, которую создает градиент концентрации протонов (ΔpH). Обе силы стремятся перемещать протоны внутрь матрикса.



а любой отрицательный «вытягивается» из него, что усиливает влияние градиента pH на движение ионов OH^- и H^+ . Совместное воздействие двух этих сил создает электрохимический протонный градиент (рис. 9-20).

Электрохимический градиент служит источником так называемой протонотдвижущей силы, измеряемой в милливольты (мВ). Так как градиент pH (ΔpH) в 1 единицу pH эквивалентен мембранному потенциалу в 60 мВ, протонотдвижущая сила будет равна $\Delta\psi - 60 (\Delta pH)$. В типичной клетке эта сила в дышащей митохондрии составляет около 220 мВ и складывается из мембранного потенциала в 160 мВ и градиента pH в -1 единицу pH.

9.1.8. Энергия электрохимического протонного градиента на внутренней митохондриальной мембране используется для синтеза АТФ и транспорта метаболитов в матрикс митохондрии [9, 10]

Внутренняя мембрана митохондрий отличается необычно высоким содержанием белка – в весовом выражении в ней примерно 70% белка и 30% липидов. Многие из этих белков относятся к цепи переноса электронов, поддерживающей протонный градиент на внутренней мембране. Другой важный компонент белковой природы – фермент, катализирующий синтез АТФ. Этот фермент, АТФ-синтаза, представляет собой большой белковый комплекс, через который протоны перетекают обратно в матрикс по электрохимическому градиенту. Подобно турбине, этот белковый комплекс превращает одну форму энергии в другую, образуя АТФ из АДФ и неорганического фосфата в митохондриальном матриксе в ходе реакции, сопряженной с переходом протонов в матрикс (рис. 9-21).

Рис. 9-21. Общая схема окислительного фосфорилирования. По мере прохождения высокоэнергетических электронов по дыхательной цепи протоны «откачиваются» из матрикса в каждом из трех ее участков, запасая энергию. В результате этого между двумя сторонами внутренней мембраны возникает электрохимический протонный градиент, под действием которого протоны возвращаются обратно в матрикс через АТФ-синтазу – трансмембранный ферментный комплекс, использующий энергию протонного тока для синтеза АТФ из АДФ и P_i .

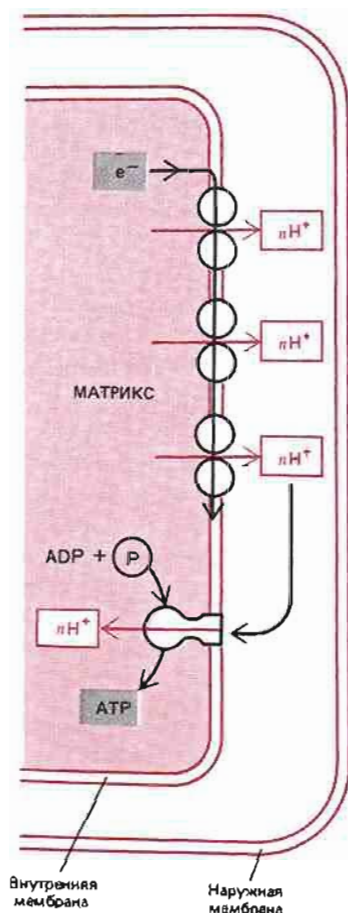
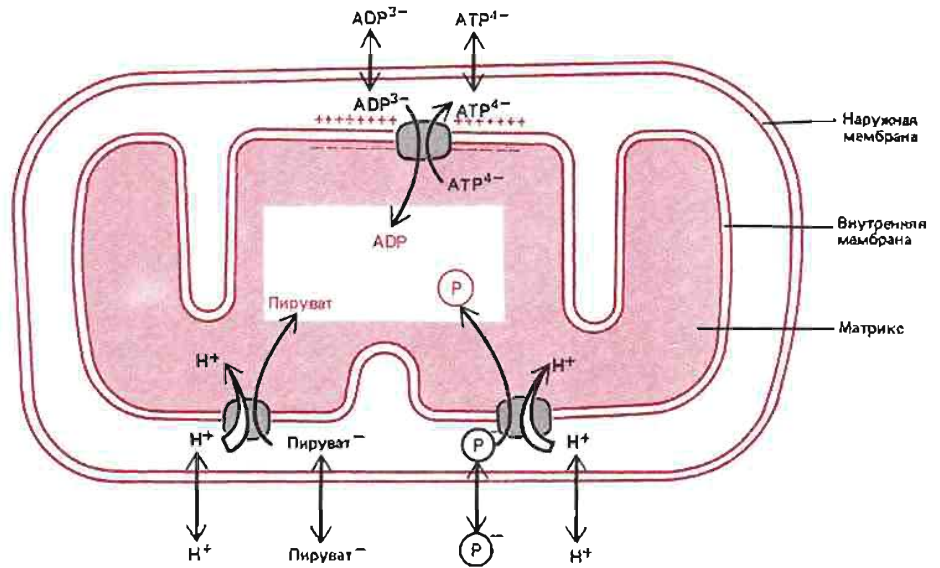


Рис. 9-22. Некоторые из процессов активного транспорта, идущих за счет энергии электрохимического протонного градиента, который поддерживается на внутренней мембране. Наружная мембрана свободно проницаема для тех же веществ. Механизмы транспорта по типу симпорта и антипорта подробно рассмотрены в гл. 6.



Но синтез АТФ—это не единственный процесс, идущий за счет энергии электрохимического градиента. В матриксе, где находятся ферменты, участвующие в цикле лимонной кислоты и других метаболических реакциях, необходимо поддерживать высокие концентрации различных субстратов; в частности, для АТФ-синтазы требуются АДФ и фосфат. Это означает, что через обычно непроницаемую мембрану должны проходить разнообразные субстраты. Обмен с цитозолем осуществляется с помощью ряда важных транспортных белков, встроенных во внутреннюю мембрану. Во многих случаях эти белки активно переносят определенные молекулы против их электрохимических градиентов, т.е. осуществляют процесс, требующий затраты энергии. Для ряда метаболитов источником этой энергии служит сопряжение с транспортом каких-то других молекул, перемещающихся «вниз» по электрохимическому градиенту (разд. 6.4.2). Например, в транспорте АДФ участвует система антипорта АДФ–АТФ: при переходе каждой молекулы АДФ в матрикс из него выходит наружу одна молекула АТФ, причем перенос последней осуществляется по электрохимическому градиенту. В то же время система симпорта сопрягает передвижение фосфата внутрь митохондрии с направленным туда же потоком H^+ : протоны входят в матрикс по градиенту и при этом «тащат» за собой фосфат. Подобным образом переносится в матриксе и важнейшее «топливо» для митохондрий—пируват (рис. 9-22).

Еще одна важная для клетки функция митохондрий—это поглощение из цитозоля ионов Ca^{2+} . Концентрация Ca^{2+} в цитозоле должна поддерживаться на очень низком уровне ($< 10^{-7}$ М), так как даже незначительные изменения концентрации этих ионов служат регуляторными сигналами для различных клеточных процессов (разд. 13.3.7). Во внутренней мембране имеется транспортный белок, эффективно переносящий Ca^{2+} в матрикс за счет энергии мембранного потенциала (рис. 9-23).

Чем больше энергии электрохимического градиента затрачивается на перенос молекул и ионов внутрь митохондрии, тем меньше остается для синтеза АТФ. Например, если к дышащим митохондриям добавить значительное количество Ca^{2+} , органеллы полностью прекратят синтез АТФ и вся энергия градиента будет расходоваться на транспорт ионов кальция. Очевидно, что должны существовать какие-то механизмы, направляющие энергию протонного градиента именно на те процессы, которые наиболее важны для клетки в данный момент.

Очень низкая концентрация Ca^{2+} в цитозоле

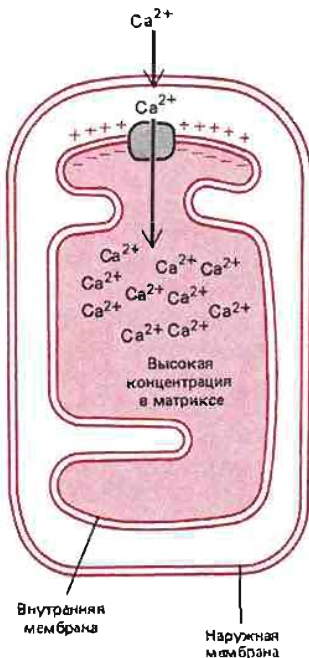


Рис. 9-23. Кальций накачивается в митохондрию за счет энергии мембранного потенциала. Полагают, что большая часть кальция осаждается внутри митохондрий в виде фосфата кальция, и поэтому для аккумуляции Ca^{2+} , вероятно, требуется очень немного энергии.

9.1.9. Быстрое превращение ADP в ATP в митохондриях поддерживает высокий уровень ATP в цитоплазме

Как мы уже видели, специальный транспортный белок внутренней митохондриальной мембраны, используя энергию электрохимического градиента, переносит ADP в матрикс в обмен на ATP по механизму антипорта (рис. 9-22). В результате молекулы ADP, высвобождаемые при гидролизе ATP в цитозоле, быстро поступают в митохондрию для «зарядки», в то время как молекулы ATP, образующиеся в матриксе в процессе окислительного фосфорилирования, так же быстро выходят в цитозоль, где они требуются. В организме человека оборачиваемость молекулы ATP за сутки составляет несколько тысяч раз, что позволяет поддерживать в клетке концентрацию ATP, в 5–10 раз превышающую концентрацию ADP.

Мы также видели, каким образом ферменты, катализирующие определенные превращения своих субстратов, часто осуществляют невыгодные процессы, сопрягая их с энергетически выгодным гидролизом ATP (см. рис. 2-29). Таким образом, высокий уровень ATP используется для питания внутриклеточных процессов энергией подобно аккумулятору, приводящему в действие электромотор: если митохондрии прекратят свою активность, то уровень ATP будет снижаться и внутриклеточный «аккумулятор», так сказать, сядет. В конце концов концентрация ATP понизится до такого уровня, при котором энергетически невыгодные реакции уже не смогут осуществляться за счет гидролиза ATP.

На первый взгляд может показаться, что такого состояния не наступит до тех пор, пока концентрация ATP не упадет до нуля. Фактически же оно наступает значительно раньше – при определенном уровне ATP, зависящем от концентраций ADP и P_i . Для того чтобы объяснить, почему так происходит, нужно обратиться к некоторым элементарным принципам термодинамики.

9.1.10. Разница между ΔG^0 и ΔG . Для того чтобы клетка могла использовать гидролиз ATP, необходима большая отрицательная величина ΔG [11].

Согласно второму закону термодинамики, химические реакции протекают спонтанно только в направлении, повышающем «неупорядоченность» во Вселенной. В главе 2 говорилось о том, что реакции, при которых высвобождаемая энергия рассеивается в виде тепла в окружающую среду (такие, как гидролиз ATP), способствуют увеличению этой неупорядоченности, так как хаотическое движение молекул в среде усиливается. Кроме того, химические реакции могут влиять на степень неупорядоченности, изменяя концентрации реагирующих веществ. Суммарное изменение неупорядоченности Вселенной в результате какой-либо реакции определяется изменением свободной энергии, ΔG , сопровождающим эту реакцию: чем больше уменьшается свободная энергия (т.е. больше отрицательное значение ΔG), тем в большей степени возрастает неупорядоченность Вселенной и тем легче протекает реакция.

Величина изменения свободной энергии для гидролиза ATP с образованием ADP и неорганического фосфата при условиях, обычно существующих в клетке, варьирует в пределах от –11 до –13 ккал/моль, что указывает на чрезвычайно благоприятные условия для протекания этой реакции. Но это обусловлено только тем, что концентрация ATP в клетке поддерживается на очень высоком уровне по сравнению с концентрациями ADP и P_i . При так называемых «стандартных условиях», когда концентрации ATP, ADP и P_i одинаковы и равны 1 моль/л, величину ΔG для гидролиза ATP называют изменением стандартной свободной энергии для данной реакции, ΔG^0 ; она составляет –7,3 ккал/моль. При какой-то еще более низкой концентрации ATP по сравнению с ADP и P_i величина ΔG упадет до нуля. В этом случае скорость образования ATP из ADP и P_i будет равна скорости гидролиза ATP; иными словами, при $\Delta G = 0$ реакция находится в состоянии равновесия (рис. 9-24).

1. Гидролиз

$$\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}$$

Скорость гидролиза = $\left(\text{Константа скорости гидролиза} \right) \times \left(\text{Концентрация ATP} \right)$

3. ПРИ РАВНОВЕСИИ: Скорость синтеза = Скорость гидролиза

$$\left(\text{Константа скорости синтеза} \right) \times \left(\text{Концентрация фосфата} \right) \times \left(\text{Концентрация ADP} \right) = \left(\text{Константа скорости гидролиза} \right) \times \left(\text{Концентрация ATP} \right)$$

$$\frac{\left(\text{Концентрация ATP} \right)}{\left(\text{Концентрация ADP} \right) \times \left(\text{Концентрация фосфата} \right)} = \frac{\left(\text{Константа скорости синтеза} \right)}{\left(\text{Константа скорости гидролиза} \right)} = \text{Константа равновесия } K$$

$$\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}]} = K$$

2. Синтез

$$\text{ADP} + \text{P} \longrightarrow \text{ATP}$$

Скорость синтеза = $\left(\text{Константа скорости синтеза} \right) \times \left(\text{Концентрация фосфата} \right) \times \left(\text{Концентрация ADP} \right)$

4. Для реакции

$$\text{ATP} \longrightarrow \text{ADP} + \text{P}$$

справедливо следующее уравнение:

$$\Delta G = \Delta G^\circ - RT \ln \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}]}$$

где ΔG и ΔG° выражены в килокалориях на моль, R — газовая постоянная ($2 \cdot 10^{-3}$ ккал·моль $^{-1}$ ·К $^{-1}$), T — абсолютная температура (°К); все концентрации выражены в молях на литр. Если концентрации всех реагирующих веществ равны 1М, то $\Delta G = \Delta G^\circ$ (так как $RT \ln 1 = 0$). Таким образом, ΔG° является величиной постоянной и определяется как изменение стандартной свободной энергии для данной реакции

Реакция, находящаяся в состоянии равновесия, не оказывает влияния на неупорядоченность во Вселенной, т. е. $\Delta G = 0$. Поэтому при равновесии

$$RT \ln \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}]} = \Delta G^\circ$$

Но концентрации реагирующих веществ при равновесии должны удовлетворять уравнению равновесия

$$\frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}]} = K$$

Следовательно, при равновесии $\Delta G^\circ = RT \ln K$

Итак, если ΔG° указывает на равновесное состояние реакции, то ΔG показывает, насколько реакция смещена от равновесия

Рис. 9-24. Принципиальная связь между изменением свободной энергии и равновесием реакции иллюстрируется здесь на примере гидролиза АТФ. Приводимая константа равновесия K выражена в литрах на 1 моль.

В то время как величина ΔG° для каждой данной реакции постоянна и зависит только от природы реагирующих веществ, ΔG изменяется в зависимости от их концентрации. Фактически значение ΔG указывает, насколько данная реакция далека от состояния равновесия. Поэтому именно ΔG , а не ΔG° определяет, может ли данная реакция обеспечивать протекание других реакций. Высокая концентрация АТФ в клетке (относительно АДФ и P_i) при активном синтезе этого вещества в митохондриях обуславливает большую отрицательную величину ΔG для реакции гидролиза АТФ и удерживает эту реакцию в состоянии, далеком от равновесия. В противном случае гидролиз АТФ не мог бы использоваться клеткой для осуществления других процессов и многие биосинтетические реакции с одинаковой скоростью шли бы как в прямом, так и в обратном направлении.

9.1.11. Клеточное дыхание необычайно эффективно

В процессе окислительного фосфорилирования перенос каждой пары электронов с NADH на молекулярный кислород доставляет энергию для образования примерно трех молекул АТФ (при переносе двух электронов с FADH₂ образуются только две молекулы АТФ, так как энергия этих электронов несколько меньше). В среднем каждая молекула ацетил-СоА, поступающая в цикл лимонной кислоты, дает около 12 молекул АТФ. Это означает, что при окислении одной молекулы глюкозы образуется 24 молекулы АТФ, а окисление одной молекулы пальмитата — жирной кислоты с 16-углеродной цепью — приводит к образованию 96 молекул АТФ. Если учесть также экзотермические реакции, предшествующие образованию ацетил-СоА, окажется, что полное окисление одной молекулы глюкозы дает около 36 молекул АТФ, тогда как

при полном окислении пальмитата образуется примерно 129 молекул АТФ. Это максимальные значения, так как фактически количество синтезируемого в митохондриях АТФ зависит от того, какая доля энергии протонного градиента идет на синтез АТФ, а не на другие процессы.

Если сравнить изменение свободной энергии при сгорании жиров и углеводов прямо до CO_2 и H_2O с общим количеством энергии, запасаемой в фосфатных связях АТФ в процессах биологического окисления, окажется, что эффективность преобразования энергии окисления в энергию АТФ часто превышает 50%. Это значительно выше эффективности большинства энергопреобразующих устройств, созданных человеком. Если бы клетка работала с эффективностью (к.п.д.) электрического мотора или автомобильного двигателя (10–20%), то организму приходилось бы для поддержания своей жизни потреблять намного больше пищи. Кроме того, так как вся неиспользованная энергия высвобождается в виде тепла, крупные организмы нуждались бы в более эффективных способах отвода тепла в окружающую среду.

Изучая клеточное дыхание, студенты иногда удивляются, почему химические взаимопревращения в клетке идут таким сложным путем. Казалось бы, вполне можно обойтись без цикла лимонной кислоты и многих звеньев дыхательной цепи и окислять сахара до CO_2 и H_2O более прямым способом. Но, хотя в этом случае процессы дыхания было бы легче запомнить и выучить, для клетки подобный путь оказался бы катастрофическим. Только многостадийное окисление с участием большого числа промежуточных продуктов, каждый из которых лишь незначительно отличается в энергетическом отношении от предыдущего, позволяет раздробить огромное количество освобождаемой энергии на мелкие порции и эффективно превратить ее в более полезные формы с помощью сопряженных реакций (см. рис. 2-17).

Заключение

В митохондриях осуществляется большая часть окислительных процессов и образуется почти весь клеточный АТФ. Митохондриальный матрикс содержит множество различных ферментов, в том числе ферменты, окисляющие пирuvat и жирные кислоты до ацетил-СоА, и ферменты цикла лимонной кислоты, использующие этот ацетил-СоА для образования больших количеств NADH (и FADH_2). Затем энергия реакционноспособных электронов, содержащихся в $\text{D}\beta\text{b}\text{b}\text{P}$ или FADH_2 , запасается с помощью цепи переноса электронов, находящейся во внутренней мембране митохондрий, в виде энергии трансмембранного электрохимического протонного градиента. Этот градиент — складываемое из мембранного потенциала и разности pH — в свою очередь используется специфическим белковым комплексом внутренней мембраны для синтеза АТФ. Этот градиент служит источником энергии для активного транспорта некоторых метаболитов в матрикс и из матрикса, в частности для обмена $\text{ATP} \rightarrow \text{ADP}$, поддерживающего высокий уровень АТФ в клетке.

9.2. Дыхательная цепь [7, 9]

Ознакомившись в общих чертах с функцией митохондрий, перейдем теперь к более детальному рассмотрению цепи дыхания (переноса электронов), имеющей столь важное значение для окислительного метаболизма в целом. Так как компоненты дыхательной цепи составляют неотъемлемую часть внутренней митохондриальной мембраны, их изучение внесло большой вклад в понимание функции биологических мембран вообще — здесь мы столкнулись с наиболее четкими примерами взаимодействия между их отдельными белковыми компонентами.

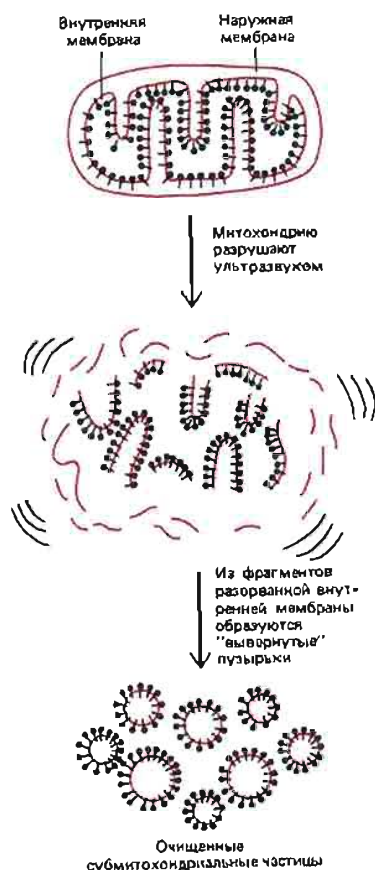


Рис. 9-25. Методика получения субмитохондриальных частиц из митохондрий. Частицы представляют собой обрывки разрушенных крист, образовавшие замкнутые пузырьки.

9.2.1. Из митохондрий можно выделить функционально активные частицы, «вывернутые панзнанку» [12]

Для изучения дыхательной цепи, которая в intactных митохондриях малодоступна для экспериментального анализа, митохондрии необходимо было разрушить. Путем обработки митохондрий ультразвуком удалось получить изолированные субмитохондриальные частицы – обрывки крист, замкнувшиеся в пузырьки около 100 нм в диаметре (рис. 9-25). При использовании метода негативного контрастирования на электронных микрофотографиях субмитохондриальных частиц видно, что их наружная поверхность усеяна сферическими выступами диаметром около 9 нм, которые прикреплены к мембране с помощью «ножки» (рис. 9-26). В intactных митохондриях эти грибовидные структуры – АТР-синтетазные комплексы – находятся на внутренней (обращенной к матриксу) стороне внутренней мембраны. Таким образом, субмитохондриальные частицы представляют собой как бы вывернутые наизнанку участки внутренней мембраны; поверхности их, ранее обращенные к матриксу, обращены теперь к окружающей среде. В результате эти частицы легко достигаемы для метаболитов, которые в нормальных условиях пришлось бы вводить в матрикс. При добавлении NADH, ADP и P_i субмитохондриальные частицы осуществляют перенос электронов с NADH на O_2 , сопрягая это окисление с синтезом АТР.

9.2.2. АТР-синтетазу можно выделить и снова встроить в мембрану в активной форме [12, 13]

В 1960 г. было впервые показано, что различные мембранные белки, катализирующие реакции окислительного фосфорилирования, могут быть отделены друг от друга без потери активности. От поверхности субмитохондриальных частиц удалось отделить и перевести в растворимую форму сферические структуры белковой природы 9 нм в диаметре. Хотя эти структуры и были способны к окислению NADH в присутствии кислорода, синтеза АТР при этом не происходило. С другой стороны, они сами по себе действовали как АТРаза, гидролизую АТР до ADP и P_i . Когда выделенные структуры (F_1 -АТРазные частицы) добавляли к субмитохондриальным пузырькам, у них восстанавливалась способность катализировать обратную реакцию: реконструированные пузырьки вновь синтезировали АТР из ADP и P_i .

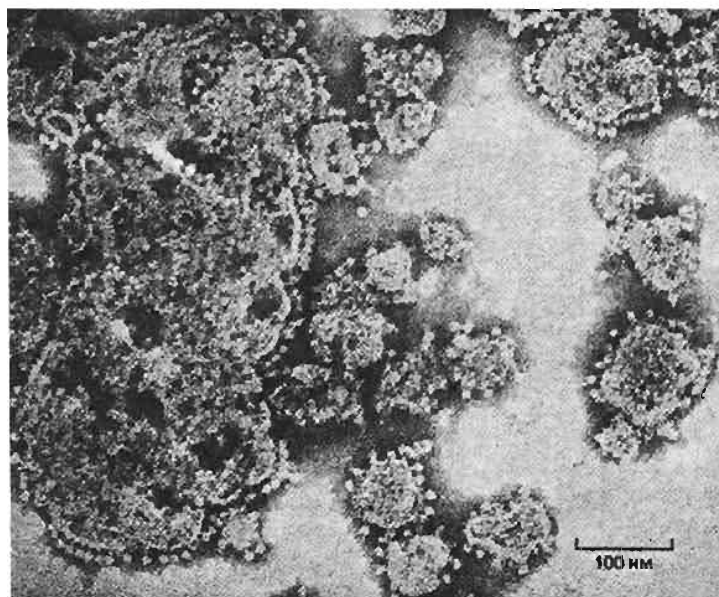


Рис. 9-26. Электронная микрофотография субмитохондриальных частиц. (С любезного разрешения Ephraim Racker.)

Впоследствии было показано, что F_1F_0 -АТРаза – это часть большого пронизывающего всю толщину мембраны комплекса (массой около 500 000 дальтон), который состоит из девяти различных полипептидных цепей. Этот комплекс получил название АТР-синтетазы (или F_0F_1 -АТРаза); он составляет 15% всего белка внутренней митохондриальной мембраны. Весьма сходные АТР-синтетазы имеются также в мембранах хлоропластов и бактерий. Такой белковый комплекс содержит трансмембранные каналы для протонов, и синтез АТР происходит только тогда, когда через эти каналы проходят протоны «вниз» по своему электрохимическому градиенту.

В экспериментах, проведенных в 1974 г., было очень наглядно показано, как работает АТР-синтетаза. К этому времени уже были разработаны методы введения интегральных мембранных белков, предварительно солюбилизованных с помощью детергента, в липидные пузырьки (липосомы), приготовленные из очищенных фосфолипидов (разд. 6.4.6). Это позволило создать «гибридную» мембрану, которая одновременно содержала очищенную митохондриальную АТР-синтетазу и бактериородопсин – светопоглощающий пигмент бактерий, выполняющий функцию светозависимого протонного насоса. При освещении таких пузырьков протоны, «накачиваемые» внутрь бактериородопсином, выходили наружу через АТР-синтетазу, и в результате в окружающем растворе накапливался АТР. Так как прямое взаимодействие между бактериальным протонным насосом (бактериородопсином) и АТР-синтетазой млекопитающих вряд ли возможно, этот эксперимент служит убедительным подтверждением того, что активный перенос протонов и синтез АТР – это два отдельных процесса в общем механизме окислительного фосфорилирования.

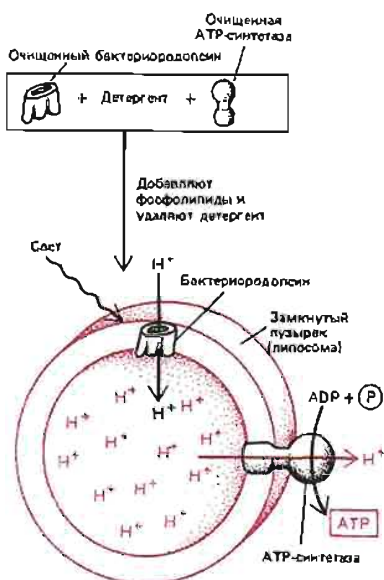


Рис. 9-27. Схема важного эксперимента, который показал, что АТР-синтетазу можно привести в действие простым током протонов. Синтетические липосомы, содержащие светозависимый бактериальный протонный насос (бактериородопсин) и АТР-синтетазу, выделенную из митохондрий бычьего сердца, при воздействии света синтезировали АТР. Среди специалистов существуют разногласия относительно того, как движутся протоны – не поступают ли они в АТР-синтетазную систему, перемещаясь прямо вдоль мембраны, вместо того чтобы переходить сначала в жидкую фазу. Однако, судя по результатам давнего эксперимента, маловероятно, чтобы имело место прямое перемещение протонов от дыхательного ферментного комплекса к АТР-синтетазе.

9.2.3. АТР-синтетаза может действовать и в обратном направлении – осуществлять гидролиз АТР, сопряженный с перемещением протонов [12, 14]

Действие АТР-синтетазы обратимо: она способна использовать как энергию гидролиза АТР для перекачивания протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану, так и энергию потока протонов по электрохимическому градиенту для синтеза АТР (рис. 9-27). Таким образом, АТР-синтетаза – это обратимая сопрягающая система, которая осуществляет взаимопревращение энергии электрохимического протонного градиента и химических связей. Направление ее действия зависит от соотношения между крутизной электрохимического протонного градиента и локальной величиной ΔG для гидролиза АТР.

АТР-синтетаза получила свое название в связи с тем, что в обычных условиях этот фермент, используя энергию электрохимического градиента, поддерживаемого дыхательной цепью (рис. 9-20), синтезирует большую часть всего АТР клетки. Считают, что при прохождении через АТР-синтетазу каждые двух-трех протонов образуется одна молекула АТР, хотя количественная сторона вопроса еще обсуждается. Для упрощения приводимых ниже расчетов мы будем предполагать, что число протонов равно трем.

Как будет работать в данный момент АТР-синтетаза – в направлении синтеза или гидролиза АТР, – зависит от точного баланса между изменениями свободной энергии для прохождения трех протонов через мембрану в матрикс (ΔG_{3H^+} меньше нуля) и для синтеза АТР в матриксе ($\Delta G_{\text{синт. АТР}}$ больше нуля). Как уже говорилось, величина $\Delta G_{\text{синт. АТР}}$ определяется концентрациями трех реагирующих веществ в митохондриальном матриксе – АТР, АДФ и P_i (рис. 9-24). С другой стороны, величина ΔG_{3H^+} будет пропорциональна протондвижущей силе на внутренней мембране. Приводимые ниже примеры помогут понять, каким образом соотношение между этими двумя изменениями свободной энергии влияет на работу АТР-синтетазы.

Как объяснено в подписи к рис. 9-28, переход одного протона в матрикс по электрохимическому градиенту, равному 220 милливольт (мВ), высвобождает 5,06 килокалорий на 1 моль (ккал/моль). Тогда $\Delta G_{3H^+} = -15,2$ ккал/

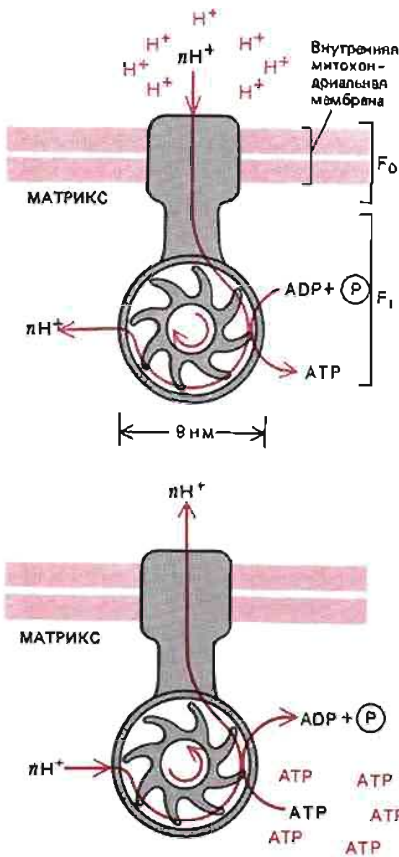


Рис. 9-28. АТФ-синтетаза – большой и сложный ферментный комплекс с мол. массой около 500 000, состоящей по меньшей мере из девяти различных полипептидных цепей. Весь этот комплекс называют F_0F_1 -АТФазой. Пять полипептидных цепей образуют сферическую головку, которая может быть выделена независимо; эту часть называют F_1 -АТФазой. Как показано на схеме, АТФ-синтетаза выполняет роль обратимого сопрягающего устройства, которое может осуществлять взаимопревращение энергии фосфатных связей и электрохимического протонного градиента. Как объяснено в тексте, направление действия фермента в любой данный момент зависит от суммарного изменения свободной энергии при сопряженных процессах – перемещении протонов через мембрану и синтезе АТФ из АДФ и P_i .

Ранее мы уже показали, что свободная энергия гидролиза АТФ зависит от концентрации трех реагирующих веществ – АТФ, АДФ и P_i (рис. 9-24). ΔG для синтеза – это та же величина, взятая с минусом. Свободная энергия перемещения протонов через мембрану равна сумме (1) ΔG для перемещения одного моля любых ионов между областями с разностью мембранных потенциалов $\Delta\psi$ и (2) ΔG для перемещения моля любых молекул между областями с различной их концентрацией. Уравнение для протонодвижущей силы, приведенное в разд. 9.1.7, объединяет те же самые составляющие, но только разность концентраций заменена эквивалентной величиной – приращением мембранного потенциала, так что получается выражение для электрохимического потенциала протона. Таким образом, ΔG для перемещения протонов и протонодвижущая сила учитывают один и тот же потенциал, только в первом случае он измеряется в килокалориях, а во втором – в милливольтках. Коэффициентом перевода из одних единиц в другие служит число Фарадея. Таким образом, $\Delta G_{H^+} = -0,023 \cdot (\text{протонодвижущая сила})$, где ΔG_{H^+} выражается в килокалориях на 1 моль (ккал/моль), а протонодвижущая сила – в милливольтках (мВ). Если электрохимический протонный градиент равен 220 мВ, то $\Delta G_{H^+} = 5,06$ ккал/моль.

/моль. Таким образом, при постоянной протонодвижущей силе (220 мВ) АТФ-синтетаза будет синтезировать АТФ до тех пор, пока отношение АТФ к АДФ и P_i не достигнет такого значения, при котором величина $\Delta G_{\text{синт. АТФ}}$ станет в точности равна $+15,2$ ккал/моль (при этом $\Delta G_{\text{синт. АТФ}} + \Delta G_{3H^+} = 0$). При таких условиях синтез АТФ будет точно уравновешиваться его гидролизом.

Предположим, что в связи с реакциями, требующими затраты энергии, в цитозоле внезапно гидролизовалось большое количество АТФ, и это привело к падению отношения АТФ : АДФ в матриксе митохондрии. В этом случае величина $\Delta G_{\text{синт. АТФ}}$ понизится (см. рис. 9-24) и АТФ-синтетаза начнет синтезировать АТФ для восстановления первоначального отношения АТФ : АДФ. С другой стороны, если протонодвижущая сила внезапно упадет до 200 мВ и будет оставаться на этом уровне, ΔG_{3H^+} изменится до $-13,8$ ккал/моль. В результате АТФ-синтетаза переключится на гидролиз АТФ, и эта реакция будет продолжаться до тех пор, пока соотношение между концентрациями АТФ и АДФ не достигнет какого-то нового значения (при котором $\Delta G_{\text{синт. АТФ}} = +13,8$ ккал/моль), и так далее.

Как мы увидим позже, во многих бактериальных клетках АТФ-синтетаза обращает свое действие при каждом переходе от аэробного метаболизма к анаэробному и обратно. Подобно АТФ-синтете, такой обратимостью дей-

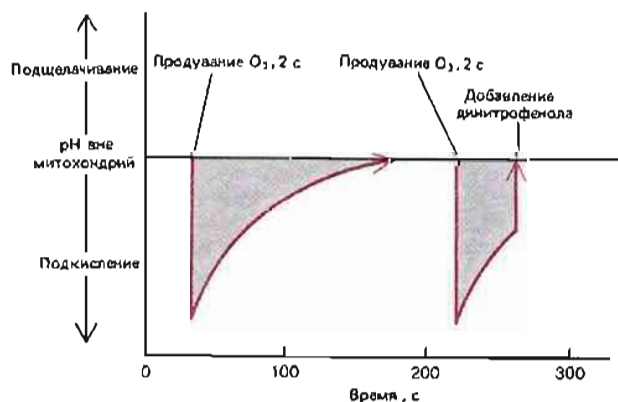
ствия обладают и другие мембранные ферменты, сопрягающие перенос ионов с синтезом или гидролизом АТФ. Например, натрий-калиевый и кальциевый насосы (второй из них описан в гл. 6) гидролизуют АТФ и используют высвобождаемую энергию для перекачки через мембрану определенных ионов (разд. 6.4.6). Если любой из этих насосов заставить работать в условиях необычно крутого градиента транспортируемых ионов, то он будет действовать в обратном направлении – синтезировать АТФ из ADP и P_i , вместо того чтобы осуществлять гидролиз АТФ. Таким образом, подобно АТФ-синтетазе, эти насосы способны преобразовывать энергию, запасаемую в трансмембранном ионном градиенте, непосредственно в энергию фосфатных связей АТФ.

9.2.4. Можно показать, что дыхательная цепь переносит ионы H^+ через внутреннюю митохондриальную мембрану

Если АТФ-синтетаза в норме не транспортирует H^+ из матрикса, то дыхательная цепь, находящаяся во внутренней митохондриальной мембране, при нормальных условиях переносит протоны через эту мембрану, создавая таким образом электрохимический протонный градиент, который в свою очередь приводит в действие АТФ-синтетазу. При определенных условиях можно экспериментально продемонстрировать способность дыхательной цепи откачивать протоны из матрикса. Можно, например, обеспечить взвесь изолированных митохондрий подходящим субстратом для окисления, а поток протонов через АТФ-синтетазу заблокировать соответствующим ингибитором. В анаэробных условиях небольшая добавка кислорода к такому препарату вызовет вспышку дыхательной активности, которая будет длиться одну-две секунды – пока весь кислород не израсходуется. Во время такой вспышки дыхания с помощью чувствительного рН-электрода можно зарегистрировать внезапное подкисление среды в результате выталкивания ионов H^+ из матрикса митохондрий. Через одну-две минуты рН вернется к первоначальному уровню, так как протоны проходят через мембрану обратно по различным «медленным» каналам (рис. 9-29).

Сходный эксперимент можно провести и на взвеси субмитохондриальных частиц. В этом случае при продувании кислорода среда будет подщелачиваться, так как мембрана здесь «вывернута наизнанку», и потому протоны будут накачиваться внутрь частиц.

Рис. 9-29. Экспериментальное доказательство перемещения протонов в митохондриях за счет энергии дыхания. В небольшой герметически закрытой камере находится анаэробная суспензия митохондрий, источник электронов для дыхания и ионофор, рассеивающий мембранный потенциал (валиномицин плюс K^+ , см. разд. 6.4.14). При кратковременной подаче в камеру кислорода с помощью полной иглы наблюдается изменение рН. Последующее добавление динитрофенола возвращает рН к первоначальному уровню, так как начинается быстрый обратный отток протонов через внутреннюю мембрану (более подробно об этом будет сказано позднее).



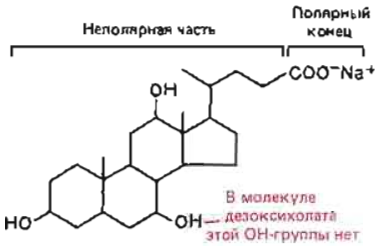


Рис. 9-30. Строение молекул относительно мягких анионных детергентов холата и дезоксихолата. Хотя оба детергента достаточно сильны, чтобы сольubilизировать мембранные белки, их часто можно применять без ущерба для активности ферментов.

9.2.5. Дыхательная цепь содержит большие ферментные комплексы, встроенные во внутреннюю мембрану [15, 16]

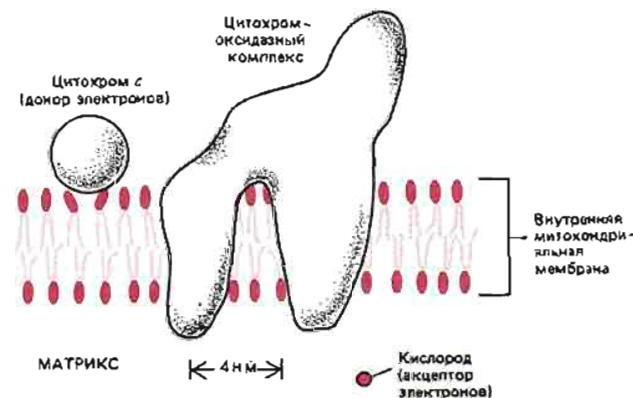
Из очищенных препаратов внутренних митохондриальных мембран были выделены различные белки, составляющие дыхательную цепь. Для разрушения мембран использовали относительно мягкие ионные детергенты, позволяющие избирательно сольubilизировать отдельные компоненты (рис. 9-30). В конечном итоге это дало возможность идентифицировать в дыхательной цепи на пути от NADH до кислорода три главных ферментных комплекса, связанных с мембраной:

1. **NADH-дегидрогеназный комплекс**, состоящий по меньшей мере из 12 полипептидных цепей, принимает электроны от NADH и передает их на убихинон (кофермент Q). Убихинон представляет собой небольшую жирорастворимую молекулу (разд. 9.1.6), которая переносит эти электроны на второй дыхательный ансамбль — комплекс $b = c_1$.
2. **Комплекс $b = c_1$** содержит 8 различных полипептидных цепей и, вероятно, существует в виде димера массой 500 000 дальтон. Этот дыхательный ансамбль, в состав которого входят два цитохрома, принимает электроны от убихинона и передает их на цитохром c . Цитохром c — небольшой периферический мембранный белок (разд. 9.1.6) — переносит эти электроны на цитохромоксидазный комплекс.
3. **Цитохромоксидазный комплекс (цитохром aa_3)** — наиболее изученный фермент из трех ферментных ансамблей дыхательной цепи. Он состоит из 7 различных полипептидных цепей и выделен в виде димера массой 250 000 дальтон. Каждый мономер располагается на мембране так, как показано на рис. 9-31.

Цитохромоксидазный комплекс принимает от цитохрома c четыре электрона (по одному) и передает их на одну молекулу связанного кислорода; при этом образуются две молекулы воды. Как и в других ферментных комплексах дыхательной цепи, в каждой единице цитохромоксидазы имеется несколько переносчиков электронов. В цитохромоксидазе два электрона, перед тем как перейти к участку связывания кислорода, попадают в центры с низким окислительно-восстановительным потенциалом (гем цитохрома a и связанный с белком атом меди). Кислород связан с другим атомом меди и с гемом цитохрома a_3 . Механизм взаимодействия связанного кислорода с четырьмя электронами и четырьмя протонами, приводящего к образованию двух молекул воды, пока не известен.

Как полагают, в большинстве клеток с цитохромоксидазой взаимодействует около 90% всего поглощаемого кислорода. Так как цианид, азид и окись углерода прочно связываются этим комплексом, блокируя тем самым весь транспорт электронов, эти соединения чрезвычайно токсичны.

Рис. 9-31. Относительные размеры и форма цитохромоксидазного комплекса и ближайших звеньев дыхательной цепи — донора и акцептора электронов. Грубое трехмерное изображение структуры комплекса было получено на основе изображений, которые дают двумерные кристаллы (кристаллические слои) при исследовании их в электронном микроскопе под разными углами.



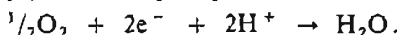
9.2.6. Перенос электронов осуществляется в ходе случайных столкновений между донорами и акцепторами электронов, свободно перемещающимися в липидном бислое [17]

По-видимому, все три главных ферментных комплекса дыхательной цепи свободно передвигаются в плоскости внутренней мембраны. В среднем за 5 мс они перемещаются примерно на 40 нм; это расстояние почти в шесть раз больше их собственного диаметра. Величина двух промежуточных переносчиков электронов — убихинона и цитохрома *c* — меньше, и передвигаются они примерно в 10 раз быстрее ферментных комплексов; по скорости диффузии эти молекулы близки к фосфолипидам (коэффициент диффузии $10^{-8} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$). Подсчитано, что случайных столкновений между такими переносчиками и ферментными комплексами вполне достаточно для того, чтобы обеспечить обычную скорость переноса электронов по дыхательной цепи (комплексы отдают и получают по одному электрону каждые 5–20 мс). Таким образом, нет необходимости постулировать структурно упорядоченную цепь белков — переносчиков электронов в двойном липидном слое.

В пользу этого говорит и тот факт, что различные компоненты цепи присутствуют в совершенно разных количествах: на одну молекулу NADH-дегидрогеназного комплекса приходится 3 молекулы комплекса *b-c*₁, 7 молекул цитохромоксидазы, 9 молекул цитохрома *c* и 50 молекул убихинона. Кроме того, можно «разбавить» белки внутренней мембраны избытком фосфолипидов, сплавляя субмитохондриальные частицы с липосомами. При электронно-микроскопическом исследовании таких частиц с применением метода замораживания — скальвания видно, что дыхательные комплексы разделены в них большими промежутками, чем в нормальных субмитохондриальных частицах, и расположены в случайном порядке.

9.2.7. Перепад окислительно-восстановительных потенциалов на каждом из трех комплексов дыхательной цепи доставляет энергию, необходимую для перемещения протонов [15, 18]

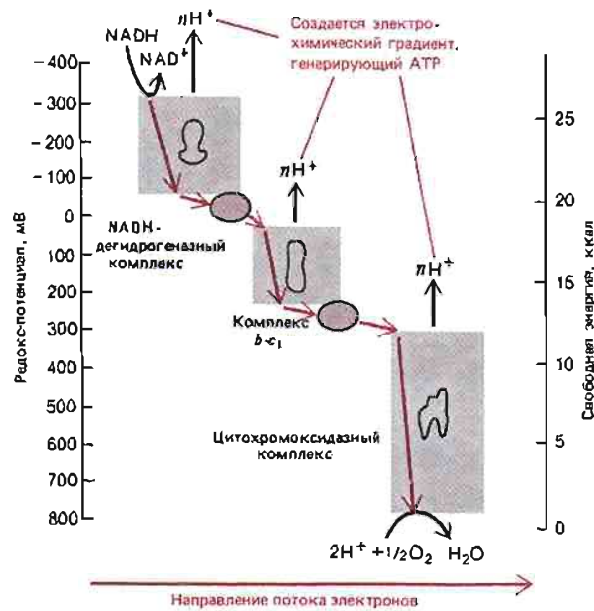
Такую пару, как H_2O и $1/2\text{O}_2$ (для NADH и NAD^+), называют сопряженной окислительно-восстановительной парой, так как один из членов пары превращается в другой, если добавить один или несколько электронов и один или несколько протонов (протоны всегда присутствуют в любом водном растворе). Так, например,



Хорошо известно, что смесь соединений, образующих сопряженную кислотно-основную пару, в соотношения 50 : 50 действует как буфер, поддерживающий определенное «давление протонов» (pH), величина которого определяется константой диссоциации кислоты. Точно таким же образом смесь компонентов сопряженной окислительно-восстановительной пары в соотношении 50 : 50 поддерживает определенное «давление электронов», или окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) *E*, служащий мерой сродства молекулы-переносчика к электронам.

Помещая электроды в растворы с соответствующими окислительно-восстановительными парами, можно измерить редокс-потенциал каждого переносчика электронов, участвующего в биологических окислительно-восстановительных реакциях. Пары соединений с наиболее отрицательными значениями редокс-потенциала обладают наименьшим сродством к электронам, т.е. содержат переносчики с наиболее слабой тенденцией принимать электроны и наиболее выраженной способностью их отдавать. Например, смесь NADH и NAD^+ (50 : 50) имеет редокс-потенциал – 320 мВ, что указывает на сильно выраженную способность NADH отдавать электроны, тогда как редокс-потенциал смеси равных количеств H_2O и $1/2\text{O}_2$ (50 : 50) равен + 820 мВ, что говорит о сильной тенденции O_2 к принятию электронов.

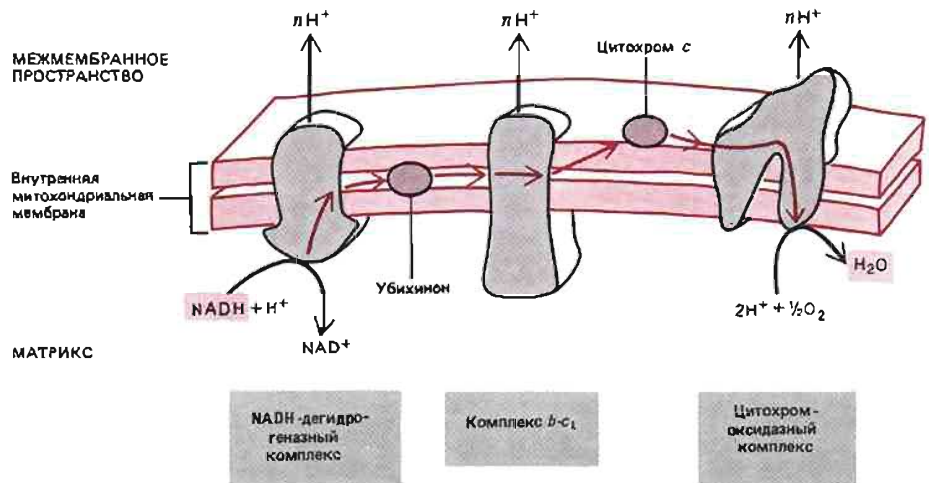
Рис. 9-32. Снижение редокс-потенциала при прохождении электрона по дыхательной цепи от NADH к кислороду. Для обозначения редокс-потенциала используются стандартные символы E'_0 или E_h . По оси ординат справа — изменение стандартной свободной энергии переноса каждого из двух электронов, отдаваемых одной молекулой NADH. Два электрона от $FADH_2$ дают меньше полезной энергии, чем два электрона от NADH. Это объясняется тем, что редокс-потенциал $FADH_2$, связанного с белком, отличается от потенциала NADH и близок к 0 мВ. Таким образом, при переносе электронов с $FADH_2$ на убихинон не происходит запасания энергии. Поэтому на пути электронов от $FADH_2$ до кислорода сопряженный перенос протонов происходит лишь в двух участках цепи (на схеме не показано), а не в трех, как в случае с NADH.



На рис. 9-32 показаны значения окислительно-восстановительного потенциала на различных участках дыхательной цепи. Резкий перепад имеет место в пределах каждого из трех основных дыхательных комплексов. Разность потенциалов двух любых переносчиков электронов прямо пропорциональна энергии, высвобождаемой при переходе электрона от одного переносчика к другому (рис. 9-32). Каждый комплекс действует как энергопреобразующее устройство, направляя эту свободную энергию на перемещение протонов через мембрану, что приводит к образованию электрохимического протонного градиента по мере прохождения электронов по цепи. Такое преобразование энергии можно прямо продемонстрировать, включив по отдельности любой изолированный комплекс дыхательной цепи в липосомы (см. рис. 9-27). В присутствии подходящего донора и акцептора электронов такой комплекс будет переносить электроны, что приведет к перекачиванию протонов через мембрану липосомы.

Для работы энергопреобразующего механизма, лежащего в основе окислительного фосфорилирования, нужно, чтобы каждый ферментный комплекс

Рис. 9-33. Схема переноса двух электронов через три главных дыхательных ферментных комплекса от NADH к кислороду. В качестве переносчиков между комплексами выступают убихинон и цитохром c.



дыхательной цепи был ориентирован в липидном бислое определенным образом — так, чтобы все протоны перемещались в одном и том же направлении, выходя из матрикса наружу (рис. 9-33). Такая ориентация мембранных белков была продемонстрирована с помощью специальных зондов, не проходящих сквозь мембрану, которыми метили комплекс только с какой-нибудь одной стороны мембраны (разд. 6.2.9). Специфическая ориентация в бислое свойственна всем мембранным белкам и очень важна для их функции.

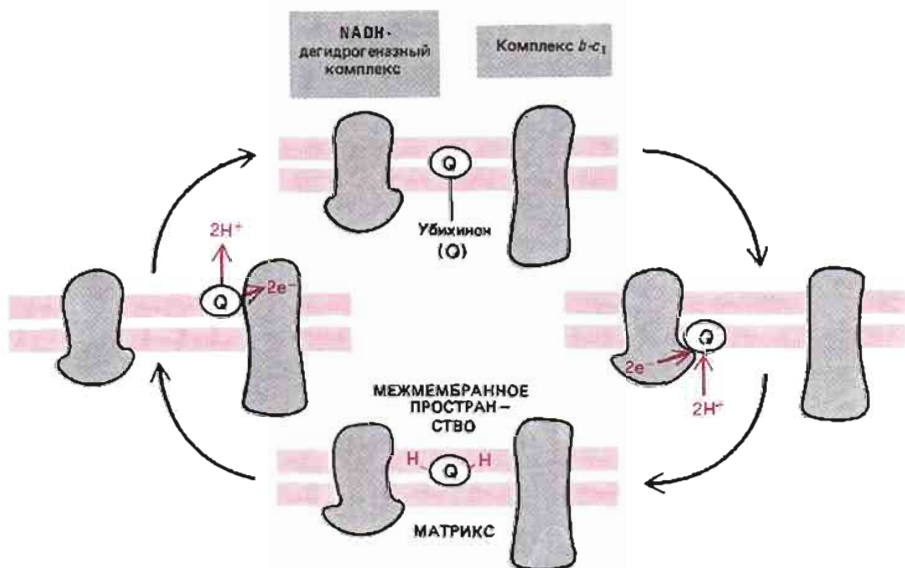
9.2.8. Механизмы перекачивания протонов компонентами дыхательной цепи еще не вполне ясны [19]

В процессе окислительного фосфорилирования при окислении одной молекулы NADH (т.е. при прохождении двух электронов через все три ферментных комплекса дыхательной цепи) образуется не более трех молекул АТФ. Если предположить, что обратное прохождение трех протонов через АТФ-синтазу обеспечивает синтез одной молекулы АТФ, можно заключить, что в среднем перенос одного электрона каждым комплексом сопровождается перемещением полутора протонов (иными словами, при транспорте одного электрона некоторые комплексы перекачивают один протон, а другие — два протона).

Вероятно, у разных компонентов дыхательной цепи существуют разные механизмы сопряжения транспорта электронов с перемещением протонов. Например, убихинон одновременно с транспортом электрона к комплексу $b-c_1$, по-видимому, переносит и протон. Это возможно потому, что при связывании каждого электрона убихинон захватывает из водной среды протон, который затем отдает в момент передачи электрона ферментному комплексу (см. рис. 9-17). Убихинон свободно диффундирует в липидном бислое и, как полагают, принимает электроны около внутренней поверхности мембраны, а отдает их комплексу $b-c_1$ вблизи наружной поверхности; таким образом при транспорте каждого электрона убихинон перемещает через мембрану один протон (рис. 9-34).

В отличие от этого молекулы, передающие электроны цитохромоксидазному комплексу, очевидно, не несут протонов, и в этом случае транспорт электрона, видимо, связан с определенным аллостерическим изменением конформации белковых молекул, в результате которого часть белкового комплекса сама переносит протоны. Конкретный механизм этих процессов пока не известен.

Рис. 9-34. Убихинон (Q) способен откачивать протоны из матрикса путем направленного принятия и отдачи электронов. Как показано, убихинон быстро перемещается в липидном бислое и может перенести два электрона и два протона (см. рис. 9-17). Другие переносчики электронов, окисление и восстановление которых сопровождается принятием и отдачей протонов, — это NADH и $FADH_2$; полагают, что они тоже подобным образом перемещают протоны. Однако такого рода механизмы перемещения протонов не позволяют обеспечить наблюдаемую величину протонного потока при данном потоке электронов (см. текст).



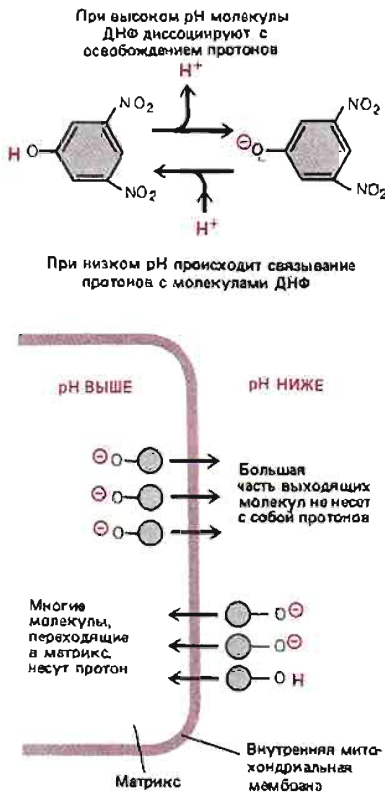


Рис. 9-35. Перенос протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану с помощью разобщающего агента динитрофенола (ДНФ). Как нейтральная (протонированная), так и отрицательно заряженная формы динитрофенола могут проходить сквозь липидный бислой без участия транспортных белков. Из-за наличия электрохимического протонного градиента молекулы динитрофенола будут переносить больше протонов в матрикс, чем из него, до тех пор пока протонодвижущая сила не исчезнет полностью.

9.2.9. H^+ -ионофоры рассеивают протонный градиент и тем самым разобщают транспорт электронов и синтез АТФ [20]

С 40-х годов известен ряд липофильных слабых кислот, способных действовать как *разобщающие агенты*. При добавлении к клеткам этих низкомолекулярных органических соединений митохондрии прекращают синтез АТФ, продолжая при этом поглощать кислород. В присутствии разобщающего агента скорость транспорта электронов остается высокой, но протонный градиент не создается. Существует простое и изящное объяснение этого эффекта: разобщающие агенты действуют как переносчики H^+ , или ионофоры (протонофоры), и открывают альтернативный путь для потока H^+ через внутреннюю митохондриальную мембрану — минуя АТФ-синтетазу. В результате такого «короткого замыкания» протонодвижущая сила полностью исчезает и АТФ больше не синтезируется. Этот механизм показан на рис. 9-35 на примере хорошо изученного разобщителя 2,4-динитрофенола.

9.2.10. В нормальных условиях скорость потока электронов по дыхательной цепи подвергается регулированию [12]

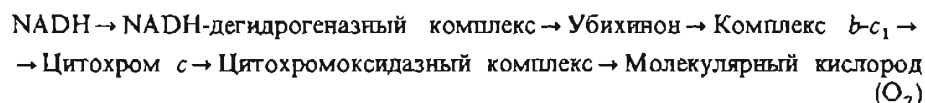
Когда к клеткам добавляют разобщающий агент, например динитрофенол, поглощение кислорода митохондриями значительно возрастает, так как скорость переноса электронов увеличивается. Такое ускорение связано с существованием *дыхательного контроля*. Полагают, что этот контроль основан на прямом ингибирующем влиянии электрохимического протонного градиента на транспорт электронов. Когда в присутствии разобщителя электрохимический градиент исчезает, не контролируемый более транспорт электронов достигает максимальной скорости, возможной при данном количестве субстрата. Напротив, возрастание протонного градиента притормаживает электронный транспорт, и процесс замедляется. Более того, если в эксперименте искусственно создать на внутренней мембране необычно высокий электрохимический градиент, нормальный транспорт электронов прекратится совсем, а на некоторых участках дыхательной цепи можно будет обнаружить *обратный поток электронов*! Это последнее наблюдение позволяет предполагать, что «дыхательный контроль» отражает просто баланс между величинами изменения свободной энергии для перекачивания протонов, сопряженного с транспортом электронов, и для самого транспорта электронов; или, другими словами, что величина электрохимического протонного градиента влияет как на скорость, так и на направление переноса электронов в принципе таким же образом, как и на направление действия АТФ-синтетазы (разд. 9.2.3).

Дыхательный контроль — это лишь одна из частей сложной системы обратных связей, координирующих скорости гликолиза, расщепления жирных кислот, реакций цикла лимонной кислоты и транспорта электронов. Скорости всех этих процессов зависят от отношения $ATP : ADP$ — они возрастают при усиленном использовании АТФ, приводящем к повышению уровня АДФ. Одним из звеньев в этой регуляторной системе является и АТФ-синтетаза внутренней митохондриальной мембраны. Этот фермент работает быстрее, когда концентрация его субстратов — АДФ и P_i — возрастает. По мере ускорения реакции все больше протонов перетекает в матрикс, понижая электрохимический градиент, а уменьшение градиента в свою очередь приводит к увеличению скорости транспорта электронов.

Сходные механизмы, в том числе ингибирование ряда ключевых ферментов аденозинтрифосфатом (АТФ) по принципу обратной связи, координируют скорость образования NADH и его утилизации дыхательной цепью. Благодаря этим многочисленным регуляторным приспособлениям организм при физической нагрузке окисляет жиры и сахара в 5–10 раз быстрее, чем во время покоя.

Заключение

На пути от $NADH$ к O_2 дыхательная цепь содержит три основных ферментных комплекса, находящиеся во внутренней митохондриальной мембране. Если любой из этих комплексов выделить и встроить в мембрану липосомы, то можно экспериментально доказать способность его переносить протоны через мембрану одновременно с транспортом электронов. В естественной мембране цепь переноса электронов дополняют мобильные переносчики – убихинон и цитохром c . Путь электронов в этой цепи можно представить следующей схемой:



Дыхательные ферментные комплексы в мембране определенным образом ориентированы: они расположены так, чтобы все протоны перемещались в одном направлении – из матрикса в межмембранное пространство.

За счет энергии электрохимического протонного градиента, поддерживаемого дыхательной цепью, другой ферментный трансмембранный комплекс, называемый АТР-синтетазой, синтезирует АТР. АТР-синтаза – это обратимый сопрягающий комплекс, который в норме преобразует энергию потока протонов, направленного внутрь матрикса, в энергию фосфатных связей АТР, но способен также использовать энергию гидролиза АТР для перемещения протонов из матрикса наружу. Этот хемиосмотический механизм свойствен как митохондриям и хлоропластам, так и бактериям, что указывает на исключительную важность его для всех клеток.

9.3. Хлоропласты [23]

Всем животным и большинству микроорганизмов необходимо все время поглощать из окружающей среды большое количество органических веществ. Эти вещества доставляют углеродные остовы для биосинтезов, а их контролируемое окисление дает метаболическую энергию для всех процессов жизнедеятельности клеток. Полагают, что первые организмы древней Земли располагали избытком органических соединений, образовавшихся в результате геохимических процессов (разд. 1.1.1). Но большая часть этих соединений была уже использована миллиарды лет назад. С того времени почти все органические материалы, необходимые для живых клеток, производятся фотосинтезирующими организмами, в том числе разного рода фотосинтезирующими бактериями. Цианобактерии, эволюционно наиболее продвинутые из фотосинтезирующих бактерий, обладают минимальными потребностями в питательных веществах. Для превращения атмосферной двуокиси углерода (CO_2) в органические соединения им достаточно солнечной энергии и воды, служащей источником электронов. Кроме того, при расщеплении воды в ходе реакции $nH_2O + nCO_2 \xrightarrow{\text{свет}} (CH_2O)_n + nO_2$ они выделяют в атмосферу кислород, не-

обходимый для окислительного фосфорилирования. Как мы объясним позже, именно эволюция цианобактерий из более примитивных фотосинтезирующих бактерий сделала возможным развитие первых аэробных форм жизни.

Важным последующим этапом было возникновение растений, у которых фотосинтез протекает во внутриклеточных органеллах – хлоропластах. Хлоропласты доставляют энергию для метаболизма только в дневные часы. Ночью они прекращают синтез высокоэнергетических метаболитов, и в это время суток растения получают АТР в результате деятельности митохондрий, которые у них очень похожи на митохондрии животных клеток.

Основываясь главным образом на биохимических данных, полагают, что хлоропласты – это потомки цианобактерий, которые захватывались эукарио-

тическими клетками путем эндоцитоза и перешли к симбиозу с ними. Согласно этой теории, многочисленные различия между хлоропластами и митохондриями обусловлены отчасти их происхождением от разных бактериальных предков, а отчасти эволюционными изменениями, отражающими их различную роль в эукариотической клетке. Тем не менее основные механизмы синтеза АТФ в хлоропластах и в митохондриях очень сходны, хотя в первых он идет за счет энергии света, а во вторых – за счет энергии, доставляемой дыханием.

9.3.1. Хлоропласты имеют дополнительный компартмент, но все же очень сходны с митохондриями [9, 24]

Хлоропласты осуществляют преобразование энергии, используя хемиосмотический механизм, подобно тому как это делают митохондрии, и в основе организации тех и других органелл лежат одни и те же принципы (рис. 9-37–9-40). Хлоропласты тоже обладают высокопроницаемой наружной мембраной и гораздо менее проницаемой внутренней, в которую встроены специальные транспортные белки, и между двумя мембранами находится узкое межмембранное пространство. Внутренняя мембрана окружает большую центральную область – так называемую строму, представляющую собой аналог митохондриального матрикса и содержащую множество различных растворимых ферментов.

Однако есть и существенное отличие. Внутренняя мембрана хлоропластов не образует крист и не содержит в себе цепи переноса электронов. Фотосинтезирующая поглощающая свет система, электронтранспортная цепь и АТФ-синтетаза находятся в третьей мембране, формирующей группу уплощенных дисковидных мешочков – тилакоидов (рис. 9-37). Внутренние полости тилакоидов сообщаются между собой, образуя третий внутренний компартмент хлоропласта, называемый *тилакоидным пространством*. Тилакоидное пространство отделено от стромы непроницаемой для ионов *тилакоидной мембраной*.

На рис. 9-41 показаны черты сходства и различия в строении митохондрий и хлоропластов. Хлоропласт можно представить себе как сильно увеличенную митохондрию, кристы которой отделились от внутренней мембраны и образовали в матриксе субмитохондриальные частицы. Важно отме-

Рис. 9-37. Хлоропласты содержат три мембраны – наружную, внутреннюю и тилакоидную, которые делят органеллу на три внутренних компартмента: межмембранное пространство, строму и тилакоидное пространство. В тилакоидной мембране находятся все энергетические системы хлоропласта. Как видно из рисунка, отдельные тилакоиды связаны между собой и образуют стопкообразные структуры, называемые грейнами.

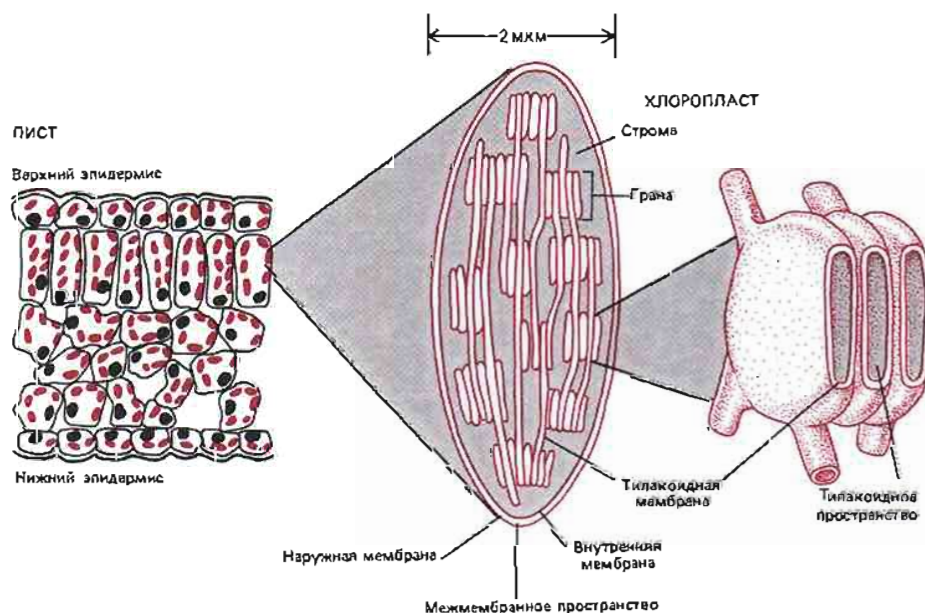


Рис. 9-38. Электронная микрофотография тонкого среза типичного хлоропласта. На снимке видны не только разного рода мембраны, но также зерна крахмала и жировые капельки, накапливающиеся в хлоропластах в результате биосинтетических процессов. (С любезного разрешения Kitty Plaskitt.)



Рис. 9-39 Внутренняя мембрана хлоропласта при большем, чем на рис. 9-38, увеличении. (С любезного разрешения Kitty Plaskitt.)

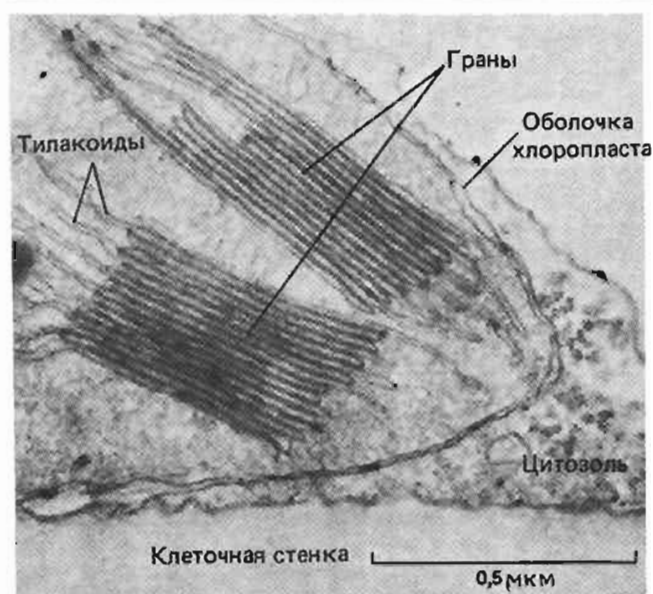


Рис. 9-40. Электронная микрофотография клетки из листа пшеницы. Обратите внимание, что цитоплазма, в которой находятся хлоропласты, окружает большую вакуоль. (С любезного разрешения Kitty Plaskitt.)

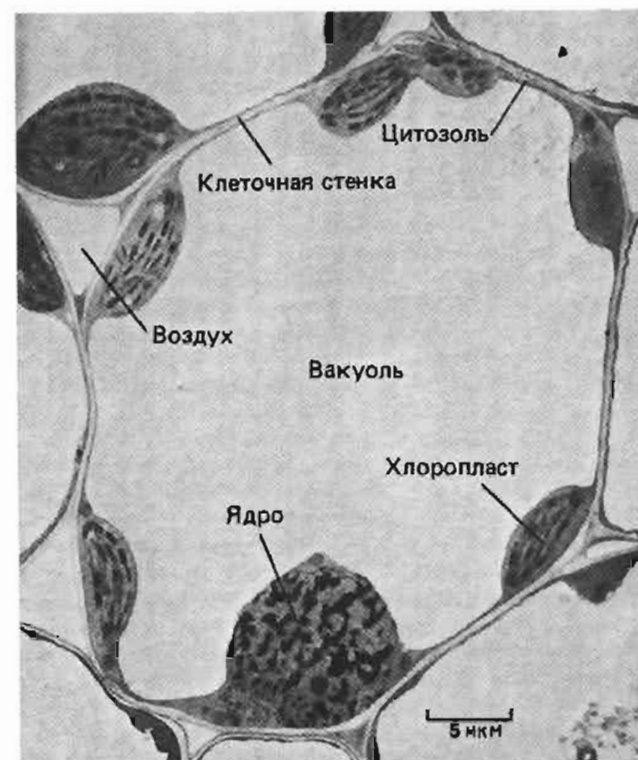
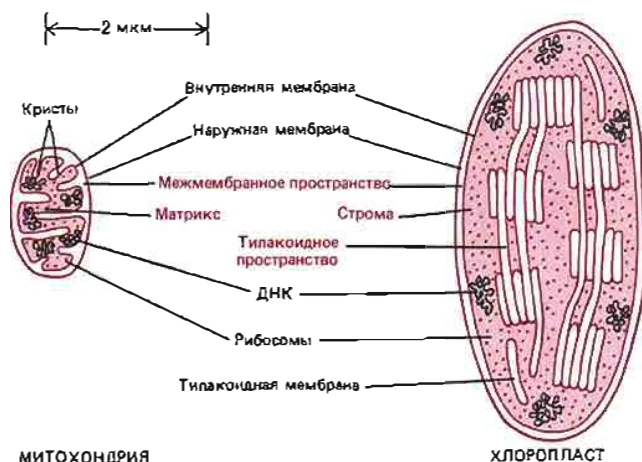


Рис. 9-41. Сравнение структуры митохондрий и хлоропластов. Хлоропласты обычно намного больше митохондрий и содержат дополнительные образования – тилакоидную мембрану, окружающую тилакоидное пространство. Однако только митохондрии имеют внутреннюю мембрану, образующую складки (кристы).



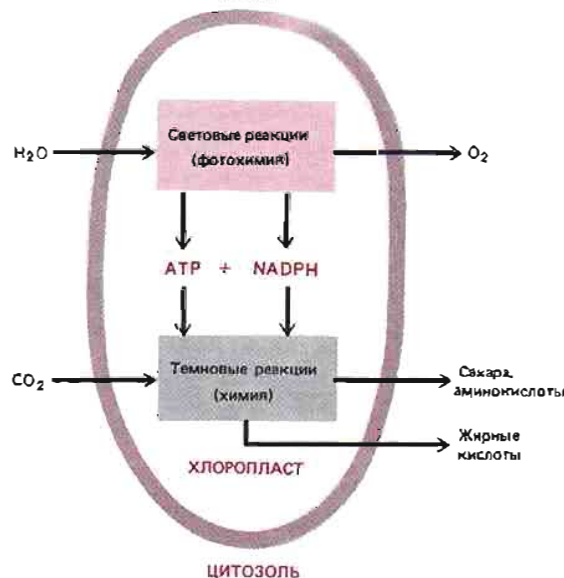
тить, что в хлоропластах сферическая «головка» АТФ-синтетазы выступает из мембраны тилакоида в область стромы, точно так же как в митохондриях она выступает из внутренней мембраны в сторону матрикса (см. рис. 9-52).

9.3.2. В хлоропластах осуществляются две уникальные реакции: образование АТФ и NADPH за счет энергии света и превращение CO_2 в углеводы

Разнообразные реакции, протекающие при фотосинтезе, можно разделить на две большие группы – светозависимые и темновые.

В светозависимых реакциях лучистая энергия возбуждает электроны в молекулах хлорофилла, что делает возможным перенос этих электронов по окислительной цепи в тилакоидной мембране, подобно тому как электроны транспортируются по дыхательной цепи в мембране митохондрий. Энергия, освобождающаяся при таком переносе электронов, используется для перекачивания протонов через тилакоидную мембрану, а возникающая в результате протондвижущая сила приводит в действие АТФ-синтетазу, образующую АТФ. В ходе описанного процесса высокоэнергетические электроны в конечном итоге восстанавливают NADP^+ до NADPH. Источником электронов,

Рис. 9-42. Реакции фотосинтеза, протекающие в хлоропласте, можно разделить на две группы – светозависимые (световые) и темновые. В световых реакциях окисляется вода, тогда как в темновых происходит фиксация углекислоты.



участвующих в этих реакциях, служит окисление воды, при котором выделяется молекулярный кислород (O_2).

В темновых реакциях происходит превращение CO_2 в углеводы (фиксация углерода), причем в качестве источника энергии и восстанавливающего агента используются соответственно АТФ и NADPH, синтезированные в ходе световых реакций. Темновые реакции начинаются в строме хлоропластов и продолжаются в цитозоле. Хотя эти реакции зависят от продуктов световых реакций, их называют темновыми, так как они не требуют прямого участия света.

Таким образом, образование O_2 (протекающее на свету) и превращение CO_2 в углеводы – это два отдельных процесса (рис. 9-42).

9.3.3. Фиксацию углерода катализирует рибулозобисфосфат-карбоксилаза – фермент, представленный в биосфере в наибольшем количестве [25]

В этой главе мы уже познакомились с тем, как клетки используют большое количество энергии, выделяющейся при окислении углеводов до CO_2 и H_2O , для синтеза АТФ. Из этого должно быть ясно, что обратный процесс – образование углеводов из CO_2 и H_2O – требует значительных затрат энергии и может происходить только при сопряжении с другими реакциями, при которых, наоборот, много энергии выделяется.

На рис. 9-43 приведена центральная реакция, в которой атом неорганического углерода (в виде CO_2) превращается в органический углерод (в виде 3-фосфоглицерата, промежуточного продукта гликолиза). Эту реакцию фиксации углерода, открытую в 1948 г., катализирует большой (~500 000 дальтон) фермент из стромы хлоропласта, называемый *рибулозобисфосфат-карбоксилазой*. На каждую молекулу CO_2 , реагирующую с пятиуглеродным соединением рибулозо-1,5-бисфосфатом, образуются две молекулы трехуглеродного соединения 3-фосфоглицерата. Так как рибулозобисфосфат-карбоксилаза работает довольно медленно (одна молекула этого фермента за одну секунду «обрабатывает» только три молекулы субстрата, в то время как большинство других ферментов – около 1000 молекул), необходимо, чтобы в хлоропласте было очень много молекул этого фермента. Поэтому рибулозобисфосфат-карбоксилаза часто составляет более 50% общего белка хлоропластов, и многие утверждают, что это самый распространенный белок в мире!

9.3.4. В цикле фиксации углерода на одну связанную молекулу CO_2 затрачиваются три молекулы АТФ и две молекулы NADPH [26]

Хотя собственно реакция фиксации углерода не требует затраты энергии, для ее протекания нужен непрерывный приток высокоэнергетического вещества – *рибулозо-1,5-бисфосфата*, с которым и связывается CO_2 (рис. 9-43). Работа по изучению сложного пути регенерации рибулозо-1,5-бисфосфата явилась од-

Рис. 9-43. Начальная реакция, в которой двуокись углерода превращается в органический углерод. Эту реакцию катализирует в строме хлоропласта содержащийся там в очень большом количестве фермент *рибулозобисфосфат-карбоксилаза* (раньше его обычно называли *рибулозодифосфат-карбоксилазой*).

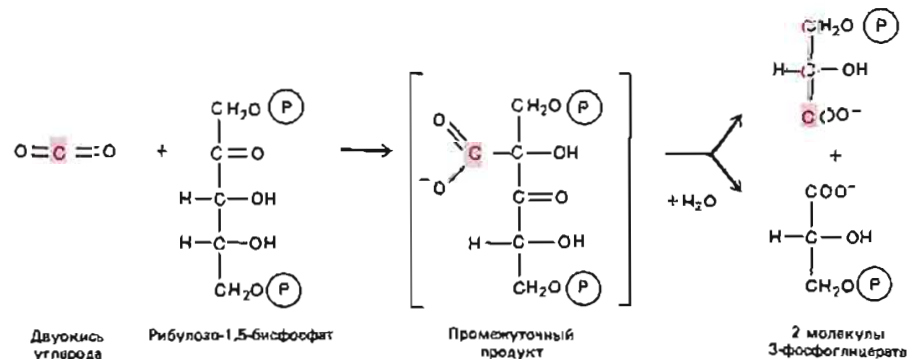


Рис. 9-44. Цикл фиксации углерода. Для упрощения схемы многие промежуточные продукты на пути от глицеральдегид-3-фосфата к рибулозо-5-фосфату опущены.



ним из самых ранних и наиболее успешных применений радиоизотопов в биохимии. Как показано на рис. 9-44, из трех молекул CO_2 , вступивших в реакцию, катализируемую рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазой, образуется шесть молекул 3-фосфоглицерата (в совокупности содержащих $6 \cdot 3 = 18$ атомов углерода: 3 от CO_2 и 15 от рибулозо-1,5-бисфосфата). Затем эти 18 атомов углерода проходят цикл реакций, в которых регенерируются три молекулы рибулозо-1,5-бисфосфата (содержащие $3 \cdot 5 = 15$ атомов С), использованные в начале цикла. В конечном итоге остается одна молекула *глицеральдегид-3-фосфата* (3 углеродных атома). В этом **цикле фиксации углерода** (цикл Кальвина—Бенсона) для связывания одной молекулы CO_2 затрачиваются три молекулы АТФ и две молекулы NADPH (рис. 9-44).

Глицеральдегид-3-фосфат, образующийся в хлоропластах в цикле фиксации углерода, представляет собой трехуглеродный углевод, являющийся также ключевым промежуточным продуктом гликолиза (разд. 2.3.2). В строме из некоторой части новообразованного глицеральдегид-3-фосфата образуются жирные кислоты, аминокислоты и крахмал. Остальная часть поступает в цитоплазму, где быстро превращается во фруктозо-6-фосфат и глюкозо-6-фосфат в результате обратного протекания некоторых реакций гликолиза. Затем эти два фосфосахара соединяются вместе, образуя в конечном итоге дисаха-

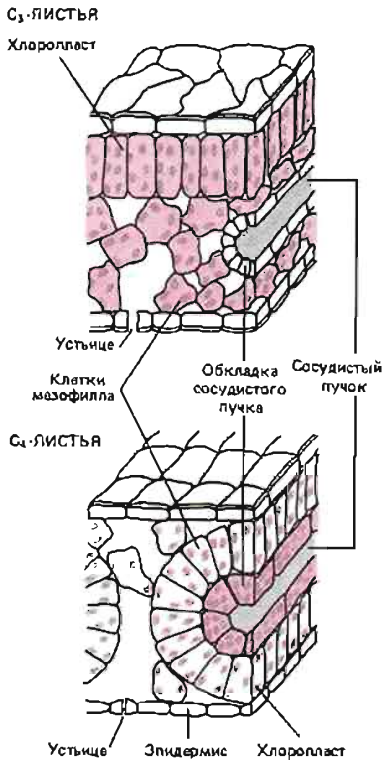


Рис. 9-45. Сравнительная анатомия листьев C_3 -растений и C_4 -растений. В обоих случаях цветом выделены клетки, хлоропласты которых способны выполнять нормальный цикл фиксации углерода. В C_4 -растениях клетки мезофилла специализируются на транспортировке CO_2 , а не на фиксации углерода; именно эти клетки создают высокое отношение $CO_2:O_2$ в клетках обкладки проводящего пучка. По проводящим пучкам образовавшаяся в листе сахароза поступает во все остальные ткани растения.

рид сахарозу. У растений сахароза выполняет ту же функцию, что и глюкоза у животных: это та основная форма, в которой углеводы транспортируются из одних клеток в другие. По мере надобности сахара переходит из листьев в остальные части растения по проводящим пучкам (рис. 9-45), подобно тому как глюкоза переносится с током крови в организме животного.

9.3.5. Для облегчения роста некоторых тропических растений в условиях низких концентраций CO_2 фиксация углерода в их листьях компартментализована [27]

Листья многих растений, адаптированных к высокой температуре и засушливым условиям (в том числе кукурузы, сахарного тростника, африканского проса), отличаются рядом особенностей, которые полезны в связи с тем, что одно свойство первого фермента в цикле фиксации углерода мешает использованию защитного механизма, выработанного растениями для уменьшения потерь влаги. Дело в том, что для этого фермента – рибулзобисфосфат-карбоксилазы – субстратом, присоединяемым к рибулзозо-1,5-бисфосфату, может служить как CO_2 , так и O_2 . И хотя CO_2 вступает в реакцию намного легче, O_2 тоже нередко присоединяется к рибулзозо-1,5-бисфосфату, что ведет к образованию одной молекулы 3-фосфоглицерата (вместо двух) и одной молекулы двууглеродного соединения гликолата. Гликолат поступает в пероксисомы, где происходит превращение двух молекул гликолата в одну молекулу 3-фосфоглицерата (с тремя атомами C) и одну молекулу CO_2 . Так как в этом процессе потребляется кислород и выделяется CO_2 , он получил название *фотодыхания*.

В жарких и засушливых условиях фотодыхание становится доминирующим процессом, когда растениям приходится закрывать устьища, чтобы терять меньше воды, а при закрытых устьищах концентрация CO_2 внутри листа быстро падает. У многих растений выработался хитроумный механизм, позволяющий им успешно расти даже при очень низких концентрациях CO_2 . У таких растений реакции цикла фиксации углерода протекают только в хлоропластах специализированных клеток в обкладке проводящего пучка, в которых содержится вся рибулзобисфосфат-карбоксилаза растения. Концентрацию двуокиси углерода для этого фермента поддерживают на высоком уровне окружающие клетки мезофилла, способные активно перекачивать CO_2 , и это предотвращает расточительную реакцию с O_2 (рис. 9-45).

Транспортировка CO_2 осуществляется с помощью цикла реакций, который протекает в цитозоле клеток мезофилла и начинается со специфической фиксации CO_2 , при участии фермента, обладающего высоким сродством к углекислоте. Образующееся четырехуглеродное соединение переносится в обкладку проводящего пучка и расщепляется там на одну молекулу CO_2 и одну трехуглеродную молекулу. Последняя возвращается в клетки мезофилла, где присоединяет следующую молекулу CO_2 , и цикл транспортировки повторяется.

После импульсного введения растению с таким CO_2 -насосом радиоактивной углекислоты ($^{14}CO_2$) было установлено, что первое меченое органическое соединение, появляющееся в мезофилле, содержит четыре углеродных атома, тогда как в других растениях оно оказывалось трехуглеродным (см. рис. 9-43). По этой причине транспортирующие CO_2 виды называют *C_4 -растениями*, а все остальные – *C_3 -растениями*.

Подобно всякому направленному транспортному процессу, реакции цикла переноса CO_2 в клетки обкладки проводящего пучка требуют затрат энергии. В жарких и сухих условиях эти затраты часто бывают намного меньше потерь от фотодыхания, происходящего в C_3 -растениях, и в таких условиях преобладают C_4 -растения. В прохладном и влажном климате расходовать энергию на транспорт CO_2 менее выгодно, и здесь хорошо растут C_3 -растения.

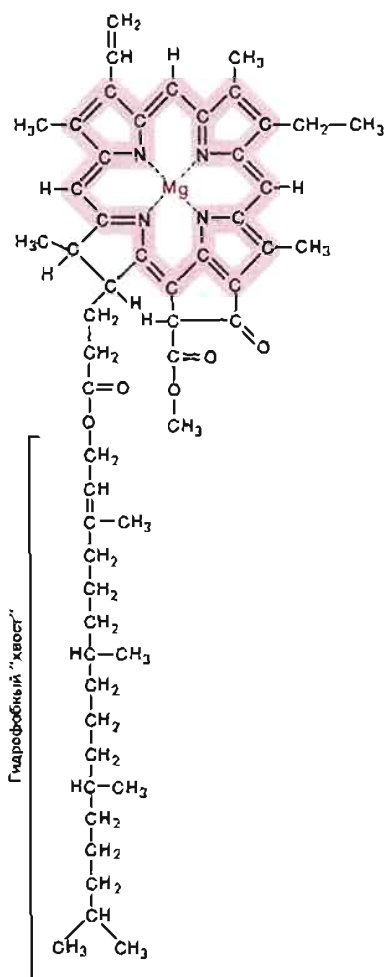


Рис. 9-46. Структура хлорофилла. Цветом выделена система сопряженных двойных связей.

9.3.6. Лучистая энергия, поглощенная хлорофиллом, используется для превращения слабых доноров электронов в сильные [28]

Вернемся теперь к вопросу о том, каким образом протекают термодинамически очень невыгодные реакции, приводящие к образованию углеводов из CO_2 и H_2O (рис. 9-44). В хлоропластах необходимая энергия извлекается из солнечного света, поглощаемого молекулами хлорофилла (рис. 9-46). Для более полного улавливания света эти светопоглощающие молекулы (пигменты) собраны в группы по несколько сотен молекул – так называемые **антенные комплексы** – с помощью специальных белков, которые прочно связывают их с тилакоидной мембраной. Помимо хлорофилла каждая такая группа содержит различное (в зависимости от вида растения) количество вспомогательных пигментов, относящихся к **каротиноидам**. Белки, связывающие сгруппированные молекулы хлорофилла, изменяют эти молекулы таким образом, что световая энергия, поглощенная любой из них, передается одной особой хлорофилльной молекуле – хлорофиллу **реакционного центра**. Таким образом, антенный комплекс представляет собой как бы «воронку», собирающую лучистую энергию и направляющую ее к единому реакционному центру (рис. 9-47).

Энергия света, поглощаемая изолированной молекулой хлорофилла, высвобождается в виде света (флуоресценция) и тепла при возвращении возбужденного электрона на исходный энергетический уровень (рис. 9-48). Но хлорофилл реакционного центра тесно связан с **акцептором электронов** и **донором электронов**, и вместе эти три молекулы образуют «сердце» **фотосистемы**. В результате реакции, катализируемой соответствующими белками, возбужденный электрон реакционного центра передается на акцептор электрона, и при этом в молекуле хлорофилла образуется положительно заряженная «дырка» с очень высоким сродством к электронам. Эту «дырку» быстро заполняет электрон, отдаваемый находящимся поблизости донором электронов (рис. 9-48).

Такая фотосистема дает возможность использовать энергию света для непосредственного переноса электрона со слабого донора электронов (молекулы с относительно высоким сродством к электронам) на другую молекулу, которая в результате принятия электрона становится сильным донором. Таким образом, энергия возбужденного электрона, которая в обычных условиях рассеялась бы в виде тепла и флуоресценции, используется для образования сильного электронного донора.

Рис. 9-47. Антенный комплекс на тилакоидной мембране действует как воронка, направляя возбужденный светом электрон к реакционному центру.

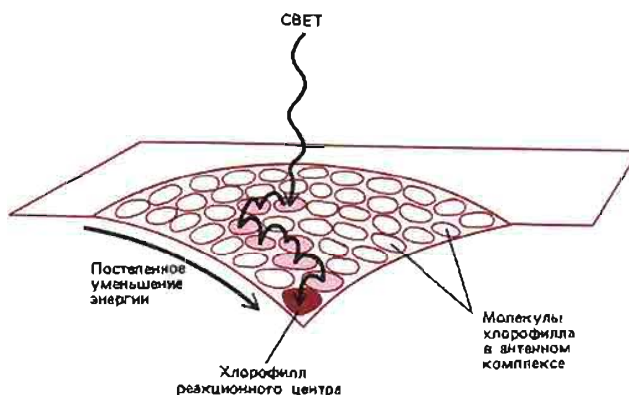
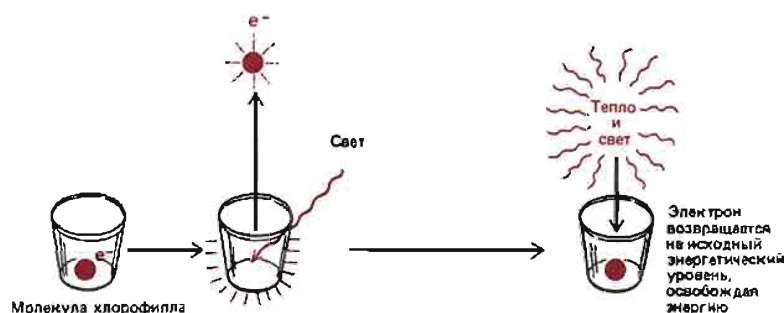
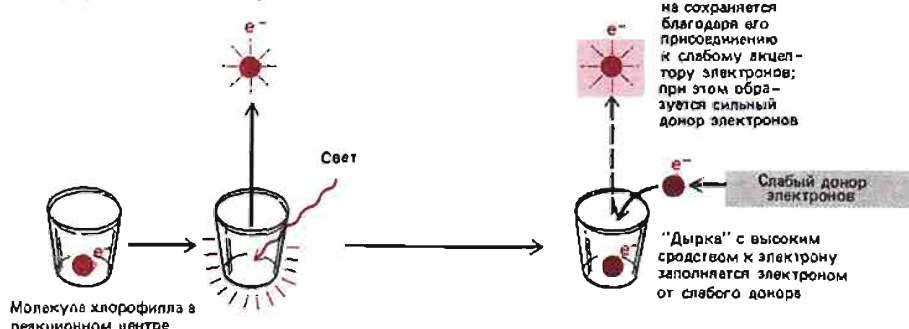


Рис. 9-48. Энергия света, поглощенная электроном в изолированной молекуле хлорофилла, освобождается в виде света и тепла (А). В отличие от этого в фотосистеме световая энергия, поглощенная хлорофиллом, используется для образования сильного донора электронов из слабого (Б).

А. Изолированная молекула хлорофилла



Б. Хлорофилл в интактном хлоропласте

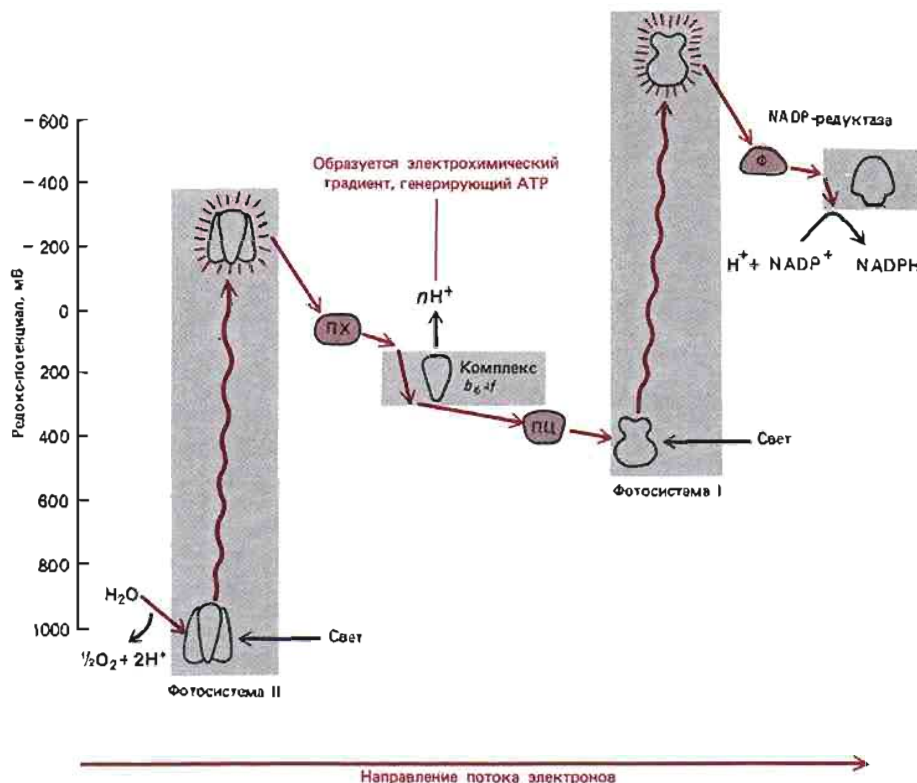


9.3.7. В процессе нециклического фотофосфорилирования образуется как АТФ, так и NADPH [9, 29]

При наиболее сложной форме фотосинтеза, когда образуются и АТФ, и NADPH (**нециклическое фотофосфорилирование**), электрон последовательно возбуждается в двух фотосистемах. В первой (по историческим причинам получившей название фотосистемы II) четыре электрона, извлеченные из воды с помощью плохо изученного расщепляющего воду фермента, заполняют образовавшиеся под действием света «дырки» в хлорофилле реакционного центра; при этом образуется молекулярный кислород: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow 4\text{H}^+ + 4\text{e}^- + \text{O}_2$. При расщеплении одной молекулы воды получают четыре сильных донора электронов и затрачиваются четыре световых кванта. Затем сильные доноры передают свои электроны на цепь переносчиков, очень сходную с частью дыхательной цепи внутренней митохондриальной мембраны. При прохождении электронов по этой цепи протоны перекачиваются через тилакоидную мембрану во внутреннее пространство тилакоида; в результате создается электрохимический градиент, который приводит в действие АТФ-синтазу, обеспечивая синтез АТФ (рис. 9-49 и 9-50). Конечным акцептором в цепи переноса электронов служат вторая фотосистема (фотосистема I), принимающая электроны в образовавшиеся под действием света «дырки» в хлорофилле ее реакционного центра. В конце концов электрон, покидающий фотосистему I и перед этим последовательно активированный двумя квантами света, переводится на такой высокий энергетический уровень, что два таких электрона (плюс протон из среды) способны восстановить NADP^+ до NADPH (рис. 9-49).

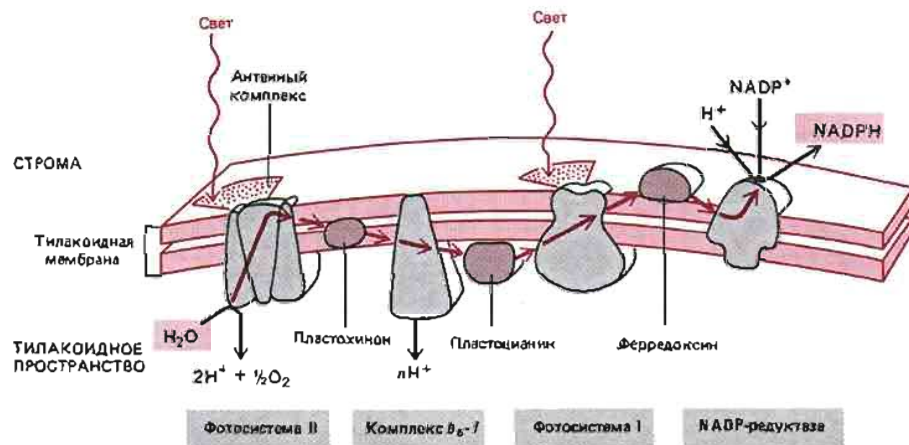
Зигзагообразную схему фотосинтеза, приведенную на рис. 9-49, называют «Z-схемой». В результате двух отдельных этапов возбуждения, каждый из которых катализируется своей фотосистемой, электрон передается от воды,

Рис. 9-49. Изменения редокс-потенциала при прохождении электронов по Z-схеме фотосинтеза, обеспечивающей образование как NADPH, так и АТФ. Суммарный поток электронов от воды на NADP^+ генерирует NADPH. В свою очередь АТФ-синтаза синтезирует АТФ, используя в качестве источника энергии электрохимический протонный градиент, создаваемый цепью переноса электронов от фотосистемы II к фотосистеме I. Кроме того (на схеме не показано), протоны, образующиеся при окислении воды, тоже вносят вклад в образование электрохимического градиента, используемого для синтеза АТФ. Образование АТФ по Z-схеме называют нециклическим фотофосфорилированием в отличие от циклического, схема которого приведена на рис. 9-51. Дополнительные подробности см. на рис. 9-50. ПХ – пластохинон; ПЦ – пластоцианин; Ф – ферредоксин.



обычно прочно удерживающей свои электроны (редокс-потенциал $+820$ мВ), на NADPH, который имеет довольно слабое сродство к электронам (редокс-потенциал -320 мВ). Эти два этапа необходимы отчасти потому, что один квант видимого света не способен сообщить электрону достаточно энергии для прохождения всего пути от начала фотосистемы II до конца фотосистемы I, т. е. обеспечить его эффективный перенос с воды на NADP^+ . Но особенно важно то, что использование двух отдельных фотосистем позволяет связать их электронтранспортную цепь, в которой энергия электронов будет достаточна для перемещения ионов H^+ через тилакоидную мембрану, и тем самым направить часть энергии возбуждаемых светом электронов на синтез АТФ.

Рис. 9-50. Перевос электронов по Z-схеме, происходящий в тилакоидной мембране. Высокоподвижными переносчиками электронов в этой цепи служат: пластохинон (очень сходен с убихиноном митохондрий), пластоцианин (небольшой медьсодержащий белок) и ферредоксин (небольшой железосодержащий белок). Комплекс b_6-f очень похож на комплекс b_c-1 митохондрий. Обратите внимание на то, что протоны выводятся из стромы комплексом b_6-f , подобно тому как из матрикса митохондрий их откачивает комплекс b_c-1 (см. рис. 9-52).

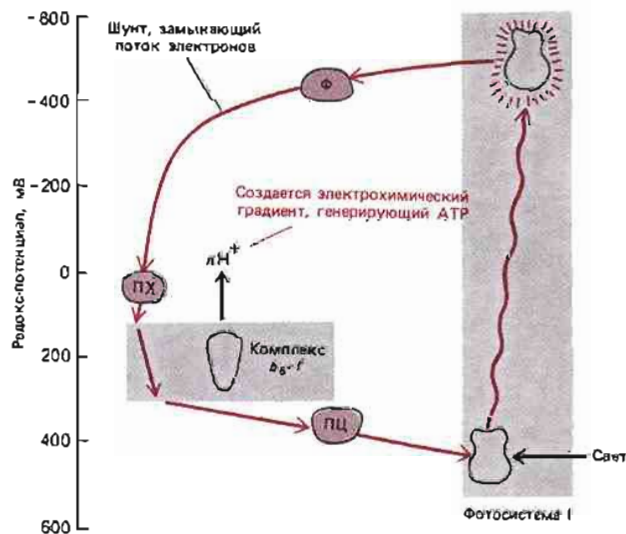


9.3.8. В процессе циклического фотофосфорилирования в хлоропластах синтезируется только АТФ, а NADPH не образуется

В результате нециклического фотофосфорилирования, рассмотренного выше, на каждую пару электронов, переходящих с H_2O на NADP^+ с образованием молекулы NADPH, синтезируется немногим больше одной молекулы АТФ. Но для фиксации углерода АТФ нужен в значительно большем количестве, чем NADPH (см. рис. 9-44). Хлоропласты способны синтезировать этот дополнительный АТФ, так как они располагают еще одним путем использования световой энергии, при котором синтез АТФ не сопровождается образованием NADPH. Этот процесс называется **циклическим фотофосфорилированием**: здесь создается замкнутый поток электронов, при котором электроны, возбужденные в фотосистеме I, не переходят на NADP^+ , а возвращаются в электронтранспортную цепь на одном из ее участков «выше по течению». Перенос электронов по цепи сопровождается перекачиванием протонов через тилакоидную мембрану, и возникающий при этом электрохимический градиент обеспечивает синтез АТФ (рис. 9-51).

Итак, процесс нециклического фотофосфорилирования, включающий фотовосстановление NADP^+ с участием воды как донора электронов, осуществляется при совместном действии фотосистемы I и фотосистемы II; в результате образуются NADPH, АТФ и O_2 . В отличие от этого при циклическом фотофосфорилировании, в котором участвует только фотосистема I, синтезируется один лишь АТФ—без образования NADPH и O_2 . Таким образом, относительная интенсивность циклического и нециклического переноса электронов будет определять, какая доля световой энергии пойдет на образование NADPH и какая превратится в энергию фосфатных связей АТФ. По крайней мере частично этот баланс регулируется автоматически в зависимости от потребности в NADPH. Будет ли поток электронов циклическим или нет, зависит от того, куда будет передавать ферредоксин свои реакционноспособные электроны—на NADP^+ или на компоненты, ведущие обратно к комплексу b_6-f (сравните рисунки 9-49 и 9-51). При низких концентрациях NADP^+ , обусловленных накоплением NADPH, будет преобладать циклическое фосфорилирование.

Рис. 9-51. Путь переноса электронов при циклическом фосфорилировании. При использовании этого пути синтезируется только АТФ, без образования NADPH и O_2 . Будет ли поток электронов нециклическим или циклическим, зависит от того, куда будет передавать свои реакционноспособные электроны ферредоксин—на NADP^+ , как показано на рис. 9-49, или на компоненты, ведущие обратно к комплексу b_6-f . Всякий раз, когда происходит аккумуляция NADPH и, следовательно, снижается уровень NADP^+ , создаются благоприятные условия для протекания фотосинтеза по циклической схеме. Ф—ферредоксин; ПХ—пластохион; ПЦ—пластоцианин.



МИТОХОНДРИЯ

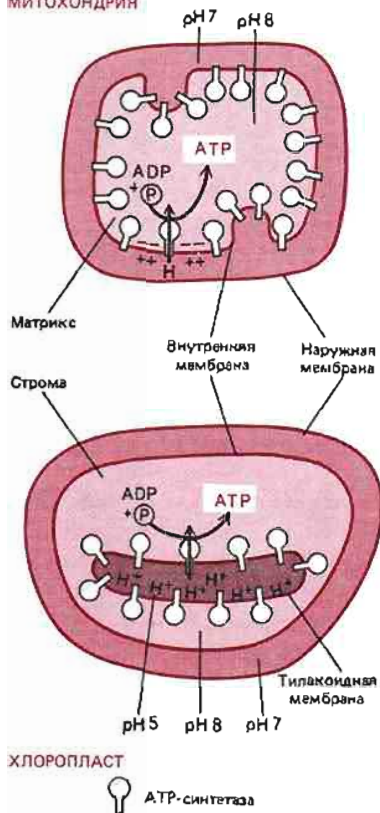


Рис. 9-52. Сравнение потока протонов и ориентации АТФ-синтазы в митохондриях и в хлоропластах. Компартменты с одинаковым рН окрашены одинаково (см. текст).

9.3.9. Геометрия перемещения протонов в митохондриях и в хлоропластах одинакова [9]

Наличие в хлоропластах третьего внутреннего компартмента – тилакоидного пространства – на первый взгляд сильно отличает их от митохондрий. Однако геометрия перемещения протонов в этих двух органеллах удивительно сходна. Как видно из рис. 9-52, в хлоропластах протоны перекачиваются из стромы (рН 8) в тилакоидное пространство (рН около 5), создавая градиент в 3–3,5 единицы рН. Это создает на тилакоидной мембране протондвижущую силу в 200 мВ (почти целиком обусловленную градиентом рН, а не мембранным потенциалом), за счет которой мембранная АТФ-синтетаза осуществляет синтез АТФ.

В митохондриальном матриксе, так же как и в строме хлоропласта, величина рН равна 8, но она создается за счет переноса протонов из оргanelлы наружу, а не в какой-то ее внутренний компартмент. Так как рН цитоплазмы поддерживается на уровне около 7,0, большая часть протондвижущей силы на внутренней митохондриальной мембране создается не градиентом рН, а мембранным потенциалом. Однако и в митохондриях, и в хлоропластах каталитический компонент АТФ-синтазы находится в большом компартменте органеллы, который имеет рН 8,0 и заполнен растворимыми ферментами (соответственно в матриксе и в строме). Поэтому именно здесь образуется весь АТФ органеллы (см. рис. 9-52).

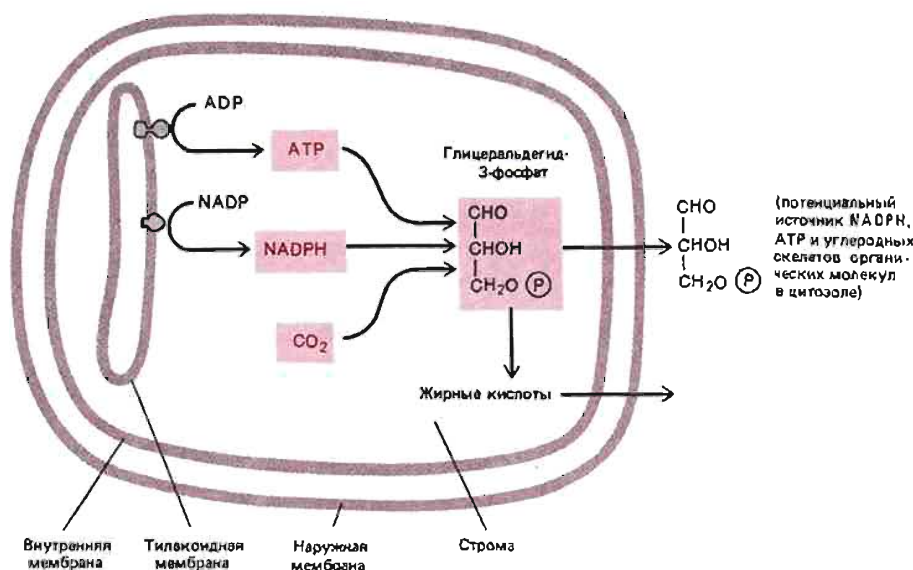
Несмотря на эти черты сходства между митохондриями и хлоропластами, последние устроены таким образом, что происходящие в них процессы переноса электронов и протонов более доступны для исследования, чем в митохондриях. Разрушив внутреннюю и наружную мембраны хлоропластов, можно получить интактные тилакоидные диски; они сходны с субмитохондриальными частицами: NADP^+ , ADP- и фосфатсвязывающие компоненты, входящие в состав цепи переноса электронов, тоже расположены здесь с внешней стороны мембраны. Но тилакоиды представляют собой неповрежденные естественные структуры, и поэтому они гораздо более активны, чем субмитохондриальные частицы, получаемые из митохондрий искусственным путем. В связи с этим некоторые из первых экспериментов, доказавших ключевую роль хемиосмотического механизма, были проведены на хлоропластах, а не на митохондриях.

9.3.10. Внутренняя мембрана хлоропласта, подобно внутренней мембране митохондрии, содержит белки-переносчики, облегчающие обмен метаболитами с цитозолем [30]

Хотя световые реакции фотосинтеза легче всего изучать на препаратах хлоропластов, у которых внутренняя и наружная мембраны разрушены и удалены, такие хлоропласты не способны к фотосинтетической фиксации CO_2 из-за отсутствия ряда важных веществ, обычно имеющих в строме. Но хлоропласты можно выделить и так, что их внутренняя мембрана останется неповрежденной. На таких препаратах может быть экспериментально показано, что внутренняя мембрана обладает избирательной проницаемостью и, значит, содержит специальные белки-переносчики. Например, большая часть глицеральдегид-3-фосфата, образующегося при фиксации углерода, выводится из хлоропластов с помощью эффективной системы антипорта, которая обменивает трехуглеродные фосфосахара на неорганический фосфат.

Глицеральдегид-3-фосфат – важный исходный материал для многих биосинтезов, протекающих в цитозоле. Но, кроме того, попав в цитозоль, глицеральдегид-3-фосфат легко превращается обратно в 3-фосфоглицерат в результате реакций, генерирующих по одной молекуле АТФ и NADPH (обращение двух реакций, ведущих к образованию глицеральдегид-3-фосфата в цикле

Рис. 9-53. Принципиальная схема главных путей метаболизма в хлоропласте. Многие другие реакции, происходящие в хлоропластах и участвующие в важных клеточных процессах, здесь не показаны. Обратите внимание, что образующиеся в хлоропласте АТФ и NADPH используются непосредственно для реакций биосинтеза в строме хлоропласта. Как можно видеть, хлоропласты в отличие от митохондрий служат лишь косвенным источником АТФ для цитозоля.



фиксации углерода; см. рис. 9-44). Таким образом, глицеральдегид-3-фосфат, транспортируемый из хлоропластов, служит также главным источником NADPH и АТФ для остальных метаболических реакций (рис. 9-53).

9.3.11. Хлоропласты осуществляют и другие биосинтетические реакции [31]

Помимо фотосинтеза в протопластах осуществляется много других биосинтетических процессов, имеющих важное значение для растительной клетки. Например, все жирные кислоты в клетке образуются с помощью ферментов, находящихся в строме хлоропластов, и при этом используются имеющиеся в строме АТФ, NADPH и углеводы. Кроме того, в хлоропластах происходит восстановление нитрита (NO_2^-) до аммиака (NH_3) за счет энергии электронов, активированных светом; в растениях этот аммиак служит источником азота при синтезе аминокислот и нуклеотидов. Таким образом, значение хлоропластов для метаболизма клетки далеко не ограничивается их уникальной ролью в фотосинтезе; именно этим и объясняется то, что они обычно занимают значительную часть внутриклеточного пространства (рис. 9-40).

Заключение

В хлоропластах протекают реакции фотосинтеза, т.е. богатые энергией электроны, поступающие в цепь переноса электронов, образуются в результате воздействия света на хлорофилл, а не при окислении питательных веществ. Таким образом, хлоропласты — это органеллы, в которых вещества главным образом синтезируются, а не распадаются. Здесь имеются электронные потоки двух типов: 1) нециклический поток, осуществляемый при участии двух последовательно связанных фотосистем, которые переносят электроны с воды на NADP^+ с образованием NADPH, причем этот процесс сопряжен с синтезом АТФ; и 2) циклический поток, который поддерживает лишь одна фотосистема, передающая электроны по замкнутой петле; в этом случае образуется только АТФ. Оба электронотранспортных процесса происходят в мембране тилакоида и приводят к переносу протонов в тилакоидное пространство. В результате обратного тока протонов через АТФ-синтазу в строме у поверхности тилакоида образуется весь АТФ хлоропластов.

Получаемые при фотосинтезе АТФ и NADPH служат источником энергии для различных биосинтетических реакций, происходящих в строме, в том чис-

ле для жизненно важного цикла фиксации CO_2 , приводящего к построению углеводов. Эти углеводы в виде трехуглеродных фосфосахаров вместе с множеством других продуктов метаболизма хлоропластов транспортируются в цитоплазму клетки.

9.4. Эволюция цепи переноса электронов

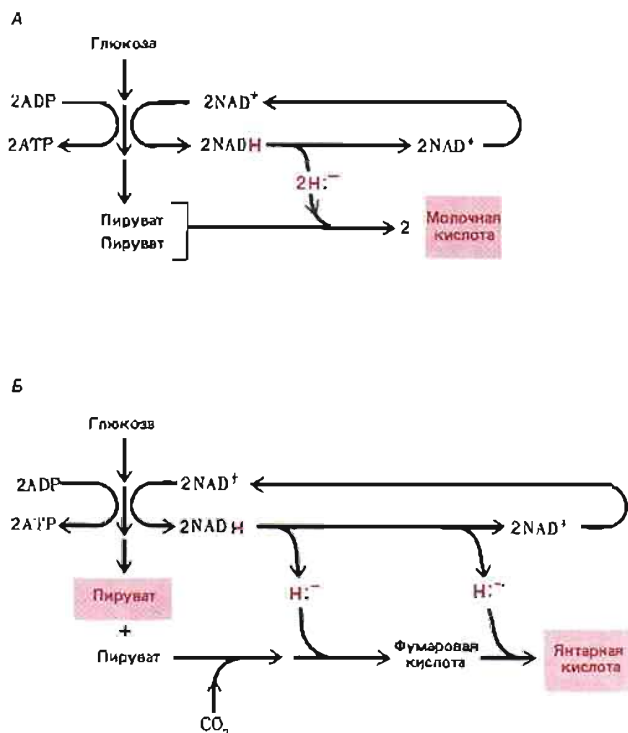
Структуру, функцию и эволюцию клеток и организмов в значительной части можно связать с их потребностью в энергии. Мы уже видели, что механизмы использования энергии таких разных источников, как свет и окисление глюкозы, в основе своей одинаковы. Очевидно, эффективный способ синтеза АТФ появился еще на ранних этапах эволюции и с тех пор подвергся лишь незначительным изменениям. Как же впервые возникли АТФ-синтетаза, протонные насосы и фотосистемы – важнейшие приспособления для преобразования энергии? Гипотезы о событиях, происходивших на заре эволюции, неизбежно носят умозрительный характер и не могут быть проверены. Но ключи к разгадке можно найти как в различных примитивных электронтранспортных цепях, имеющихся у некоторых современных бактерий, так и в геологических данных относительно условий, существовавших на Земле миллиарды лет назад.

9.4.1. Древнейшие клетки синтезировали АТФ с помощью процессов брожения [32]

Как уже говорилось в главе I, полагают, что первые живые организмы возникли в бескислородной среде при обилии органических веществ, образовавшихся в результате геохимических процессов. Поэтому самые первые пути синтеза АТФ, вероятно, были сходны с существующими ныне формами брожения.

При брожении АТФ образуется путем субстратного фосфорилирования; при этом используется энергия, высвобождаемая в реакции частичного окис-

Рис. 9-54. Схема двух разных типов брожения. **А.** Используемый в гликолизе NAD^+ регенерируется путем переноса гидрид-иона с NADH (и одного протона из раствора) на пируват с образованием молочной кислоты (механизм, обратный показанному на рис. 9-16). Молочная кислота выводится из клетки. **Б.** NAD^+ , израсходованный в ходе гликолиза, регенерируется путем двух последовательных переводов гидрид-иона с NADH (и двух протонов из раствора) на соединения, из которых образуется янтарная кислота. Последняя выводится из клетки, а пируват используется в реакциях биосинтеза.



ления органических молекул, богатых водородом, например глюкозы. В отсутствие кислорода, который мог бы служить акцептором водорода, водород, выделяемый при окислении молекул, должен переноситься (через NADH или NADPH) на какую-то другую органическую молекулу (или на другую часть той же молекулы), которая при этом восстанавливается. Из органических конечных продуктов брожения одни выводятся из клетки в окружающую среду как отходы метаболизма, а другие, такие как пируват, используются в процессах биосинтеза.

Разные организмы выделяют разные конечные продукты, но чаще всего это органические кислоты (углеродные соединения с группой COOH). Из наиболее важных продуктов брожения, осуществляемого бактериями, следует отметить молочную кислоту (которая накапливается и при анаэробном гликолизе в клетках млекопитающих; см. разд. 2.3.2), а также муравьиную, уксусную, пропионовую, масляную и янтарную кислоты. На рис. 9-54 представлены два типа брожения, встречающиеся у современных бактерий.

3.4.2. Появление электронтранспортной цепи, запасавшей энергию, позволило анаэробным бактериям использовать в качестве источника энергии несбраживаемые органические соединения [33]

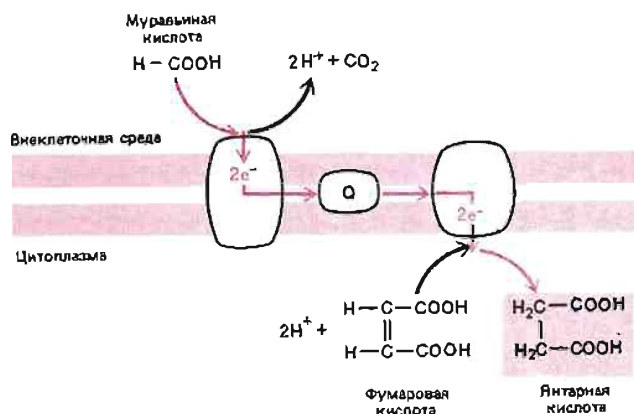
Ранние процессы брожения должны были обеспечивать образование не только АТФ, но и восстановителей (NADH и NADPH), необходимых для процессов биосинтеза, и, вероятно, многие из главных метаболических путей сложились в условиях, когда брожение было единственным способом получения энергии. Однако со временем метаболическая активность прокариот должна была изменить окружающие условия, что привело к возникновению новых биохимических путей. Накопление продуктов брожения привело, вероятно, к следующим изменениям:

Стадия 1. Из-за непрерывного выделения кислот pH окружающей среды понизился; в результате понадобился трансмембранный насос, откачивающий ионы H^+ из клетки, чтобы она не погибла от чрезмерного закисления. Вполне возможно, что один из таких насосов использовал энергию гидролиза АТФ и, таким образом, мог быть предшественником существующей ныне АТФ-синтазы.

Стадия 2. Одновременно с накоплением несбраживаемых органических кислот, которое привело к выработке протонного насоса, использующего энергию АТФ, истощались запасы сбраживаемых веществ, за счет окисления которых можно было осуществлять транспорт метаболитов и другие важные жизненные процессы. В этих условиях наиболее успешно развивались те бактерии, которые были способны выводить ионы H^+ без сопряжения с гидролизом молекул АТФ, так что последние сохранялись для других надобностей. Давление отбора, вероятно, привело к появлению первых белков, связанных с мембраной, которые могли использовать перенос электронов между молекулами с различным окислительно-восстановительным потенциалом в качестве источника энергии для откачивания протонов через плазматическую мембрану. Для некоторых из этих белков могли найтись подходящие доноры и акцепторы электронов среди накапливающихся несбраживаемых органических кислот. Подобные электрон-транспортные белки встречаются и у ныне живущих бактерий; например, на рис. 9-55 показано, как некоторые бактерии откачивают протоны за счет относительно небольшого количества энергии, извлекаемого при переносе электронов с муравьиной кислоты на фумаровую.

Стадия 3. В конце концов у некоторых бактерий создалась настолько эффективная цепь переноса электронов, что энергии запасалось больше, чем было нужно для поддержания внутриклеточного pH. Откачивание протонов генерировало большой электрохимический градиент, который позволял

Рис. 9-55. Окисление муравьиной кислоты фумаровой кислотой при участии цепи переноса электронов, запасавшей энергию. Современные бактерии, в том числе *E. coli*, могут перекачивать протоны через свою плазматическую мембрану при помощи этой электрон-транспортной системы, связанной с мембраной. Окислительно-восстановительный потенциал пары муравьиная кислота– CO_2 равен -420 мВ, а пары фумаровая кислота–янтарная кислота $+30$ мВ.



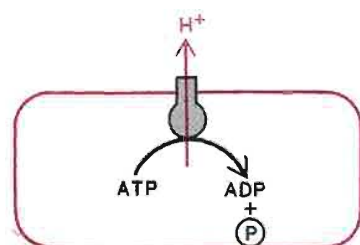
протонам переходить обратно в клетку через АТФ-зависимые протонные насосы, что приводило к обращению их действия, т.е. заставляло их функционировать как АТФ-синтазы. Поскольку таким бактериям нужно было гораздо меньше сбраживаемых питательных веществ, запасы которых все уменьшались, эти бактерии стали быстро вытеснять своих соседей.

Эти три гипотетические стадии в эволюции механизмов окислительного фосфорилирования схематически представлены на рис. 9-56.

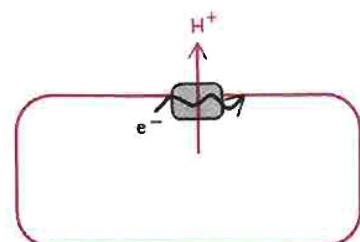
9.4.3. Найдя неисчерпаемый источник восстановителей, фотосинтезирующие бактерии смогли преодолеть серьезный кризис в эволюции клетки [34]

Хотя только что описанные эволюционные шаги разрешили проблему поддержания как нейтральной внутриклеточной среды, так и достаточных энергетических запасов, остался неразрешенным другой, не менее серьезный вопрос. Истощение запасов сбраживаемых органических веществ означало, что нужно найти иной источник углерода для синтеза сахаров – предшественников столь многих других молекул, необходимых клетке. Потенциальным источником углерода могла быть углекислота, которой было достаточно в атмосфере; однако для превращения CO_2 в органические молекулы, например углеводы, нужно восстановить связанную углекислоту сильным донором водорода (таким, как NADH или NADPH), способным отдать два электрона, необходимые для образования одной CH_2O -единицы из CO_2 (см. рис. 9-44). На ранних стадиях эволюции клетки большое количество таких восстанавливающих агентов образовывалось при брожении. Однако по мере сокращения запасов сбраживаемых субстратов и возрастания роли мембранной АТФ-синтазы в образовании АТФ запасы NADH должны были тоже иссякнуть. Таким образом, клетки столкнулись с острой необходимостью найти новый источник сильных восстанавливающих агентов.

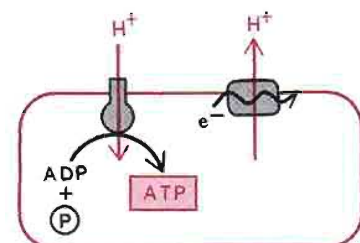
Главными донорами электронов в среде, где уже не было сбраживаемых молекул, стали органические кислоты, получаемые при анаэробном метаболизме углеводов, сероводород (H_2S) и вода. Но восстанавливающая способность всех этих соединений настолько мала, что они никак не могут быть использованы для фиксации углекислоты. Полагают, что эта проблема впервые была решена предшественниками современных зеленых серных бактерий, которые совершили необходимый «эволюционный прорыв», выработав механизм использования энергии солнечного света. Современные зеленые серные бактерии используют лучистую энергию для переноса атома водорода (электрона плюс протона) от молекулы сероводорода на NADP^+ , создавая тем самым самый восстановительный эквивалент, необходимый для фиксации углерода (рис. 9-57). Так как электроны, отнятые от H_2S , обладают гораздо более от-



Стадия 1



Стадия 2



Стадия 3

Рис. 9-56. Три гипотетические стадии эволюции механизма окислительного фосфорилирования (см. текст).

Рис. 9-57. Поток электронов в относительно примитивной схеме нециклического фотосинтеза у современных зеленых серных бактерий.

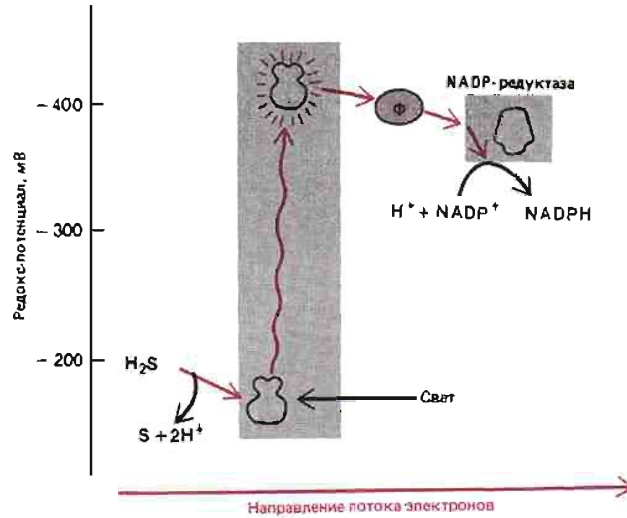
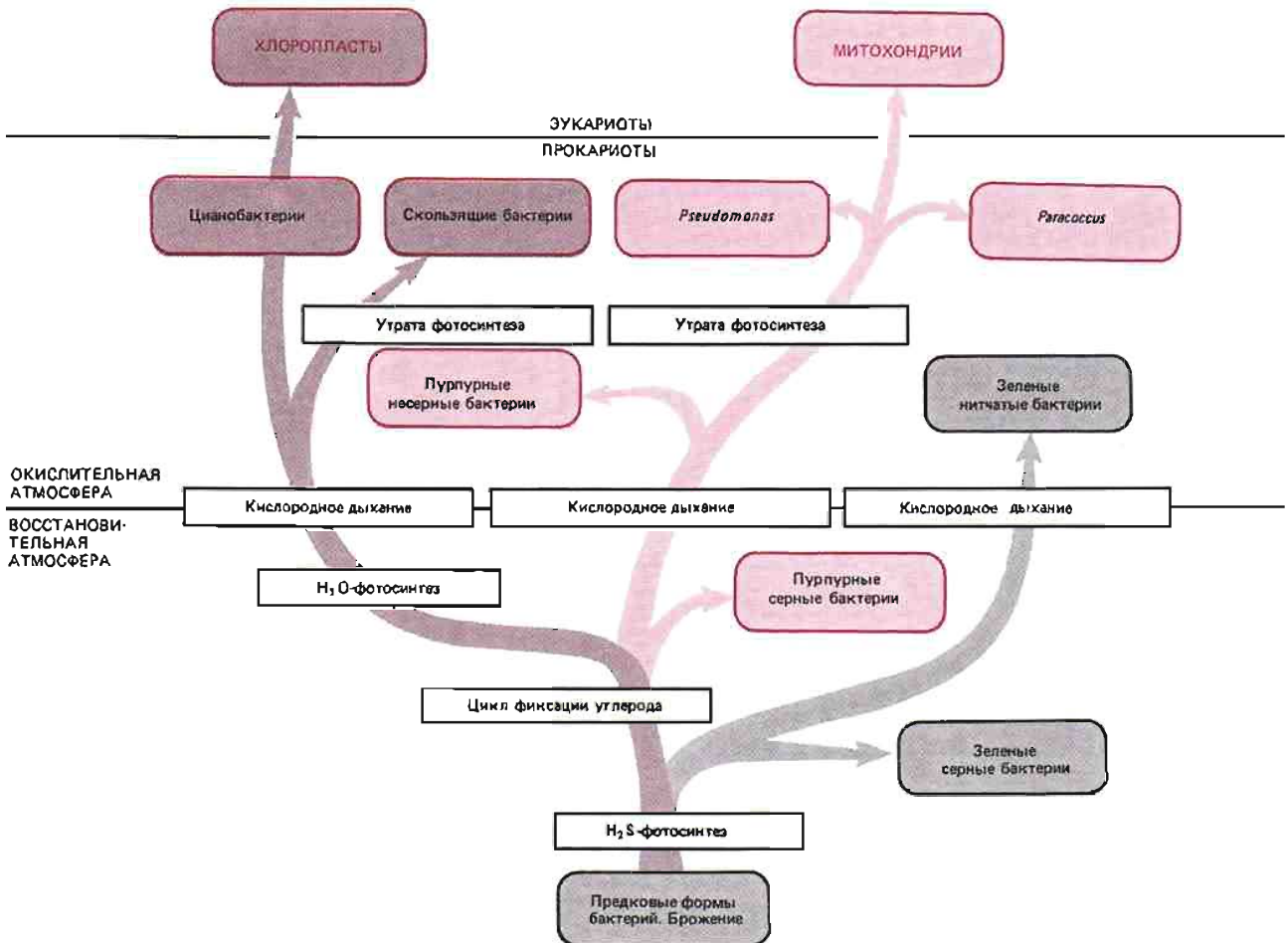


Рис. 9-58. Филогенетическое древо возможной эволюции митохондрий, хлоропластов и их бактериальных предков. Как видно из рисунка, кислородное дыхание, видимо, по крайней мере три раза независимо возникало в линиях фотосинтезирующих прокариот — у зеленых бактерий, пурпурных бактерий и сине-зеленых водорослей (цианобактерий). Аэробные пурпурные бактерии дали начало митохондриям, тогда как аэробные цианобактерии были предками хлоропластов.

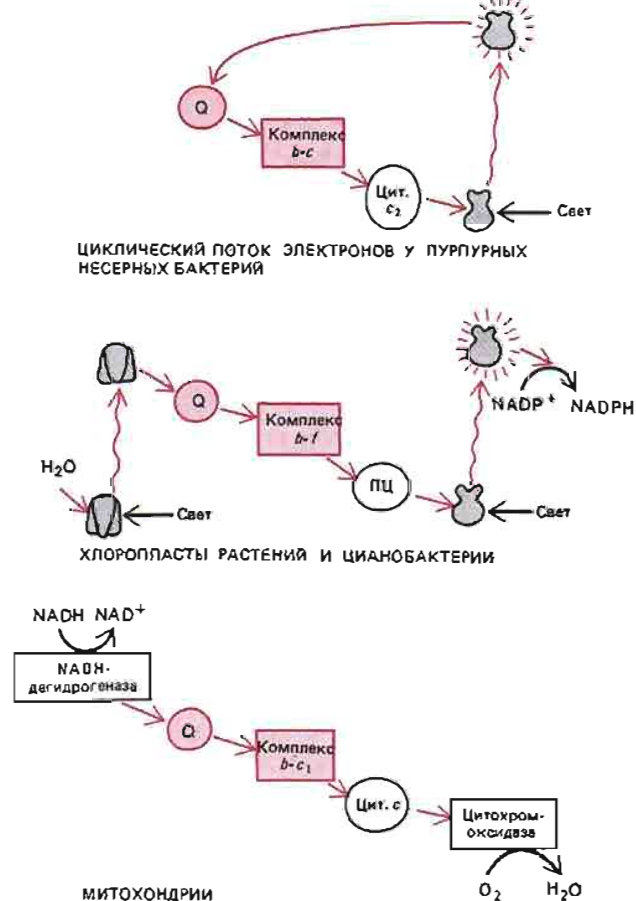


рицательным редокс-потенциалом, чем электроны в молекуле воды (-230 и $+820$ мВ соответственно), одного кванта света, поглощенного единственной имеющейся у этих бактерий фотосистемой, достаточно, чтобы достигнуть редокс-потенциала, необходимого для образования NADPH; достаточно им и сравнительно простой цепи переноса электронов.

На следующем этапе, который начался примерно $2 \cdot 10^9$ лет назад с появления цианобактерий, возникли организмы, способные использовать воду в качестве источника водорода для восстановления CO_2 . Это привело к развитию второй фотосистемы, включенной последовательно с первой, что позволило преодолеть значительный разрыв в редокс-потенциалах H_2O и NADPH (см. рис. 9-49). Этот эволюционный шаг имел далеко идущие биологические последствия. Впервые появились организмы, обладавшие минимальными потребностями в химических веществах окружающей среды, и эти организмы могли развиваться по путям, недостижимым для примитивных фотосинтезирующих бактерий, которые нуждались в H_2S и органических кислотах как донорах электронов. В результате накопилось большое количество органического материала, синтезированного живыми клетками, и впервые в атмосферу начал поступать кислород. Это открыло путь для развития бактерий и более сложных форм жизни, получающих АТФ за счет аэробного метаболизма, т.е. использующих энергию, высвобождаемую при расщеплении углеводов и других восстановленных органических молекул до CO_2 и H_2O . На рис. 9-58 дана схема предполагаемой эволюции рассмотренных выше механизмов.

Эволюция всегда консервативна — все новое создается на основе уже существующего. Например, некоторые участки электротранспортной цепи, служившей анаэробным бактериям 3 млрд. лет назад, вероятно, вошли в изме-

Рис. 9-59. Бактерия и хлоропласты содержат переносящий электроны комплекс, очень сходный с комплексом $b-c_1$ митохондрий. Все эти комплексы принимают электроны от убикиноноподобных переносчиков (Q) и перекачивают протоны через соответствующие мембраны. Как полагают, эти комплексы эволюционно родственны между собой. ПЦ — пластоцианин.



ненном виде в соответствующие цепи митохондрий и хлоропластов высших эукариот. Особенно поражает гомология между функцией ферментного комплекса, переносящего протоны в среднем участке митохондриальной дыхательной цепи (комплекс $b-c_1$), и определенными участками электронтранспортной цепи бактерий и хлоропластов (рис. 9-59).

Заклучение

Древнейшие клетки представляли собой организмы, сходные с бактериями, и жили в среде, богатой восстановленными органическими молекулами, образовавшимися естественным путем за сотни миллионов лет. Эти организмы получали почти весь свой АТФ путем превращения восстановленных соединений в различные органические кислоты, которые выводились в окружающую среду. Процессы брожения привели к закислению среды, в связи с чем, возможно, и возник первый протонный насос, связанный с мембраной, при помощи которого внутри клетки поддерживалась нейтральная реакция. Из особенностей современных бактерий ясно, что полезное взаимодействие между протонным насосом, использующим энергию переноса электронов, и обратной АТФазой, сопряженной с переносом протонов, впервые осуществилось еще в анаэробных условиях. Это позволило использовать для синтеза АТФ то небольшое количество энергии, которое высвобождалось при окислительно-восстановительных реакциях между накопившимися несбраживаемыми соединениями.

Размножение бактерий, использовавших в качестве источника углерода и восстановителей преобразованные органические молекулы, не могло продолжаться длительное время, так как этот источник пополнялся в результате геохимических процессов очень медленно. Истощение запасов сбраживаемых органических веществ привело к возникновению фотосинтезирующих бактерий, способных создавать углеводы из CO_2 . Примитивные клетки, сходные с современными зелеными серобактериями, стали использовать определенные участки уже имевшейся у них электронтранспортной цепи, чтобы улавливать световую энергию и направлять ее на синтез сильных восстановителей, необходимых для фиксации углерода. Последующее появление более сложной фотосинтетической цепи переноса электронов у цианобактерий привело к тому, что в атмосферу начали поступать большие количества кислорода. При этом в результате распространения жизни на обширных пространствах снова стали накапливаться восстановленные органические вещества. В условиях обилия кислорода и органических молекул электронтранспортная цепь адаптировалась для переноса электронов с $NADH$ на кислород; по мере выработки у многих бактерий эффективного аэробного метаболизма все больше освобождавшейся энергии превращалось в биологически полезные формы. Точно такой же аэробный метаболизм характерен для митохондрий эукариотических клеток, и сейчас получено уже много данных в пользу того, что митохондрии произошли от ранее независимых бактерий.

9.5. Биогенез митохондрий и хлоропластов [35]

По мере роста и деления клеток в их цитоплазме должны возникать новые органеллы; кроме того, в покоящихся клетках происходит постоянное обновление органелл—вместо распадающихся образуются новые. Для создания органелл необходим «строительный материал»—белки и липиды, и каждый из этих компонентов должен быть доставлен в надлежащий компартмент клетки. Эти сложные процессы биогенеза клеточных органелл могут осуществляться по двум принципиально различным схемам. В одном случае возникает совершенно новая органелла; например, лизосомы образуются *de novo* путем отпочковывания специализированных участков от аппарата Гольджи (см. гл. 7). В другом случае уже существующая органелла растет и делится на две—именно так образуются новые митохондрии и хлоропласты. Ввиду сход-

ства путей их образования эти два вида органелл будут часто рассматриваться в этом разделе вместе.

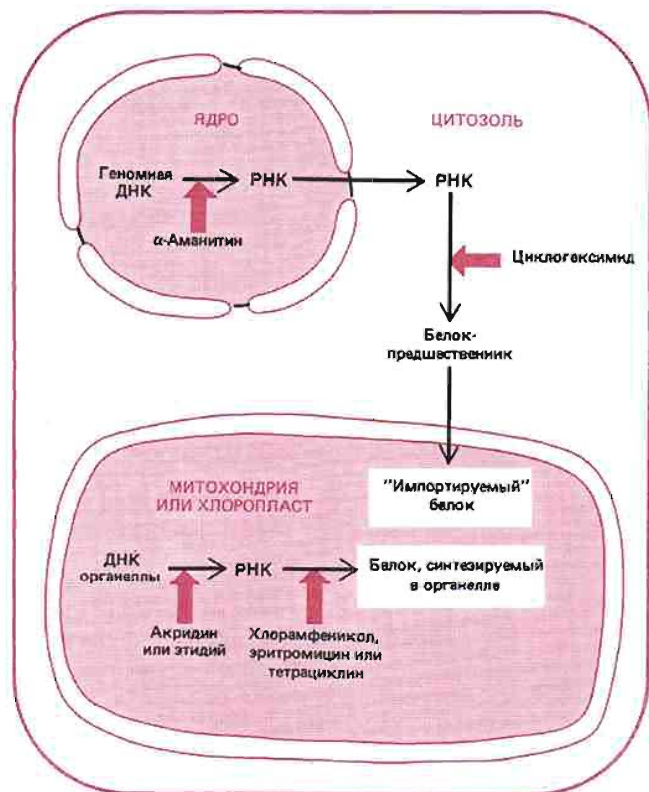
9.5.1. Митохондрии и хлоропласты содержат собственную генетическую систему, необходимую для их воспроизведения [36]

В построении как митохондрий, так и хлоропластов участвуют две разные генетические системы: сравнительно немногие белки кодируются собственной ДНК и синтезируются на рибосомах внутри органеллы, тогда как большинство белков кодируется ядерной ДНК, синтезируется рибосомами цитоплазмы и только после этого переходит в органеллу.

В intactных клетках функции этих генетических систем в процессе построения органеллы тесно координированы с помощью пока еще малоизвестных механизмов обратной связи. К счастью для исследователя, эта координация не абсолютна: изолированные органеллы продолжают некоторое время синтезировать специфичные для них ДНК, РНК и белки. Это позволило выяснить, какие именно гены содержатся в ДНК органеллы и какие белки синтезируются на ее рибосомах. Можно также вводить в intactные клетки специфические ингибиторы. Например, антибиотик *циклогексимид* ингибирует белковый синтез в цитоплазме, но не влияет на синтез белка в митохондриях и хлоропластах. Некоторые другие антибиотики, такие как *хлорамфеникол*, *тетрациклин* и *эритромицин*, наоборот, подавляют синтез белка в энергетических органеллах, но не оказывают заметного влияния на его цитоплазматический синтез. На рис. 9-60 показано избирательное действие ряда подобных ингибиторов.

Транспорт белков между цитоплазмой и энергетическими органеллами идет только в одном направлении: определенные белки «импортируются» митохондриями и хлоропластами, но не известно ни одного белка, который бы

Рис. 9-60. Обобщенная схема синтеза белка в митохондриях и хлоропластах. Толстыми стрелками указаны места воздействия ингибиторов белкового синтеза, специфичных либо для митохондрий, либо для цитозоля. Подробности в тексте.



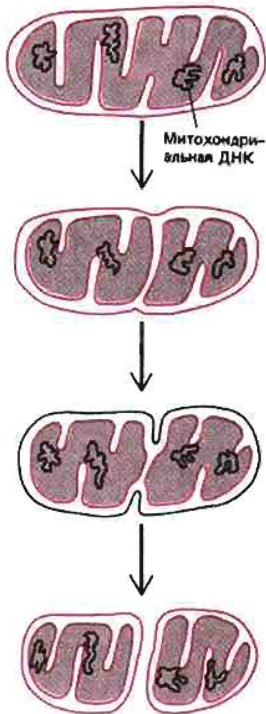


Рис. 9-61. Схема деления митохондрии. Представленный здесь ход событий предполагают, основываясь на статичных изображениях делящихся митохондрий, таких как микрофотография, приведенная на рис. 9-62.



Рис. 9-62. Электронная микрофотография делящейся митохондрии из клетки печени. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

эти органеллы «экспортировали». Между органеллами и остальной клеткой не происходит также обмена молекулами РНК или ДНК, поэтому утрата органеллой какого-либо генетического материала не может быть восполнена.

9.5.2. В растущей клетке число митохондрий и хлоропластов увеличивается в результате их деления [37]

Митохондрии и хлоропласты никогда не возникают de novo, они всегда образуются путем деления уже существующих органелл. Как показывают наблюдения над живыми клетками, митохондрии не только делятся, но иногда могут и сливаться друг с другом. Однако в среднем каждая органелла должна удвоить свою массу и затем разделиться пополам один раз за одну клеточную генерацию. Электронные микрофотографии дают основание полагать, что деление митохондрий начинается с образования кольцевой бороздки на внутренней мембране, подобно тому как это происходит при делении бактериальных клеток (рис. 9-61 и 9-62); таким образом, деление митохондрий — это, по-видимому, контролируемый процесс, а не случайное расщепление надвое.

В большинстве клеток митохондрии делятся на протяжении всей интерфазы; таким образом, каждая отдельная митохондрия делится независимо от остальных и от всей клетки. Точно так же репликация ДНК органеллы происходит не только в период синтеза ядерной ДНК (S-фаза), но в другие фазы клеточного цикла. Хотя, по-видимому, индивидуальные молекулы ДНК реплицируются случайным образом (так что в данном клеточном цикле некоторые могут удвоиться несколько раз, а другие — ни разу), общее число молекул ДНК органелл за каждый клеточный цикл удваивается, поддерживая постоянно количество этой ДНК в клетке.

Однако есть и исключения из общего правила: хлоропласты некоторых водорослей, содержащих только одну или несколько таких органелл, делятся непосредственно перед цитокинезом, причем деление органеллы происходит в той же плоскости, что и будущее деление клетки. Из этого видно, что в определенных случаях клетка может точно контролировать деление органелл (рис. 9-63).

9.5.3. В большинстве случаев геном митохондрии или хлоропласта представлен сравнительно небольшой кольцевой молекулой ДНК [38]

Как видно из табл. 9-2, молекулы ДНК органелл относительно малы и просты, и у высших эукариот они замкнуты в кольцо. Некоторые из них по размерам сходны с вирусными ДНК. В то время как геном хлоропластов при-

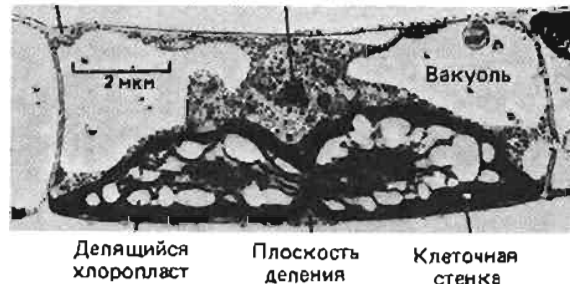


Рис. 9-63. У примитивной нитчатой водоросли *Klebsormidium* деление хлоропласта происходит в определенное время на равней стадии митоза. В клетке имеется только один хлоропласт, и плоскость его деления совпадает с плоскостью деления клетки. (Из J. D. Pickett-Heaps, Cytobios, 1972, 6, 167-183.)

Таблица 9-2. Размеры и строение молекул ДНК в органеллах

Вид	Структура	Масса, млн. дальтон ¹	Примечания
Митохондриальная ДНК			
Животные (от плоских червей до человека)	Кольцевая	9–12	У каждого отдельного вида все молекулы одного размера
Высшие растения	Кольцевая	Варьирует	У всех изученных видов имеются разные по величине кольцевые ДНК, в которых общее содержание генетической информации соответствует массе от 300 до 1000 млн. дальтон в зависимости от вида
Грибы			
Пекарские дрожжи (<i>Saccharomyces</i>)	Кольцевая	50	
<i>Kluyveromyces</i>	»	22	
Простейшие			
<i>Plasmodium</i> (возбудитель малярии)	»	18	
<i>Paramecium</i>	Линейная	27	
ДНК хлоропластов			
Водоросли			
<i>Chlamydomonas</i>	Кольцевая	120	
<i>Euglena</i>	»	90	
Высшие растения	»	85–97	У каждого отдельного вида найдены молекулы только одного размера

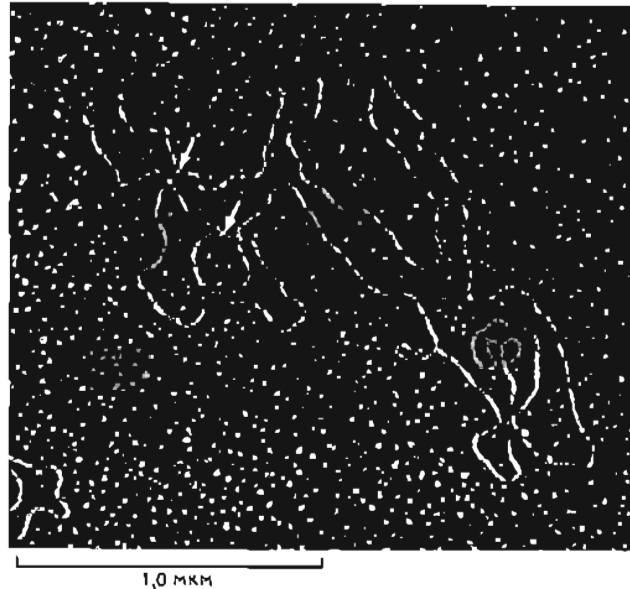
¹ На каждые 10⁶ дальтон спирали ДНК приходится около 1500 пар оснований.

Таблица 9-3. Относительное количество ДНК органелл в некоторых клетках и тканях

Организм	Ткань или тип клеток	Число молекул ДНК на 1 органеллу	Число органелл в клетке	Доля ДНК органелл во всей ДНК клетки, %
Митохондриальная ДНК				
Крыса	Печень	5–10	1000	1
Мышь	Клетки линии L	5–10	100	< 1
Лягушка	Яйцеклетка	5–10	10 ²	99
Дрожжи ¹	Вегетативные диплоидные клетки	2–50	2–50	15
ДНК хлоропластов				
<i>Chlamydomonas</i>	Вегетативные диплоидные клетки	80	2	7
Кукуруза	Листья	20–40	20–40	15

¹ Значительная изменчивость числа и размеров митохондрий у дрожжей обусловлена слиянием и фрагментацией митохондрий.

Рис. 9-64. Электронная микрофотография кольцевой ДНК из митохондрии млекопитающего во время репликации. Пока реплицировался только участок между двумя точками, указанными стрелками. (С любезного разрешения David Clayton.)



мерно одинаков по величине у всех организмов, митохондриальные геномы у растений намного больше, чем у животных. В митохондриях млекопитающих геном представлен одной кольцевой молекулой ДНК (рис. 9-64) массой около 11 млн. дальтон (т.е. в 100 с лишним тысяч раз меньше ядерного генома). Однако в митохондриях растений геном в 30–100 раз больше и составлен из нескольких различных кольцевых ДНК. Значение этого различия между высшими растениями и животными неизвестно.

Все митохондрии и хлоропласты содержат по несколько (иногда по многу) копий своей геномной ДНК (табл. 9-3). Эти ДНК обычно распределены в виде отдельных групп молекул в матриксе митохондрий и в строме хлоропластов, где, как полагают, они прикреплены к внутренней мембране. В органеллах нет гистонов, и хотя неизвестно, каким образом упакована их ДНК, можно думать, что структура генома органеллы скорее напоминает структуру бактериального генома, чем хроматин эукариот.

У млекопитающих ДНК митохондрий составляет менее 1% всей клеточной ДНК. Однако в других клетках – таких, как клетки листьев высших растений или очень крупные яйца амфибий, – доля ДНК органелл может быть значительно больше (табл. 9-3); и соответственно на них приходится и большая доля РНК и белкового синтеза.

9.5.4. Митохондрии и хлоропласты обладают полноценной генетической системой [39, 40]

Несмотря на небольшое число белков, закодированных в геноме митохондрий и хлоропластов, эти органеллы осуществляют репликацию и транскрипцию своей ДНК и белковый синтез. Эти процессы протекают во внутренних компартментах – в матриксе митохондрий и строме пластид. Хотя белки, участвующие во всех этих процессах, специфичны для органелл, большая часть их кодируется ядерным геномом (разд. 9.5.17). Это тем более удивительно, потому что ведь аппарат белкового синтеза в органеллах сходен с бактериальным, а не с эукариотическим. У хлоропластов это сходство особенно заметно:

1. Рибосомы хлоропластов очень напоминают рибосомы *E. coli* как по их чувствительности к различным антибиотикам (хлорамфениколу, стрептомицину, эритромицину, тетрациклину и т.п.), так и по структуре. Например, нуклеотидные последовательности рибосомных РНК хлоропластов (из клеток кукурузы) и бактерий *E. coli* поразительно сходны.

Таблица 9-4. Различия между «универсальным» генетическим кодом и двумя митохондриальными кодами¹

Кодон	Митохондриальный код млекопитающих	Митохондриальный код дрожжей	«Универсальный» код
UGA	<i>Trp</i>	<i>Trp</i>	Стоп
AUA	<i>Met</i>	<i>Met</i>	Leu
CUA	Leu	<i>Thr</i>	Leu
AGA } AGG }	<i>Stop</i>	Arg	Arg

¹ Курсивом выделены значения кодонов, отличающиеся от «универсального» кода.

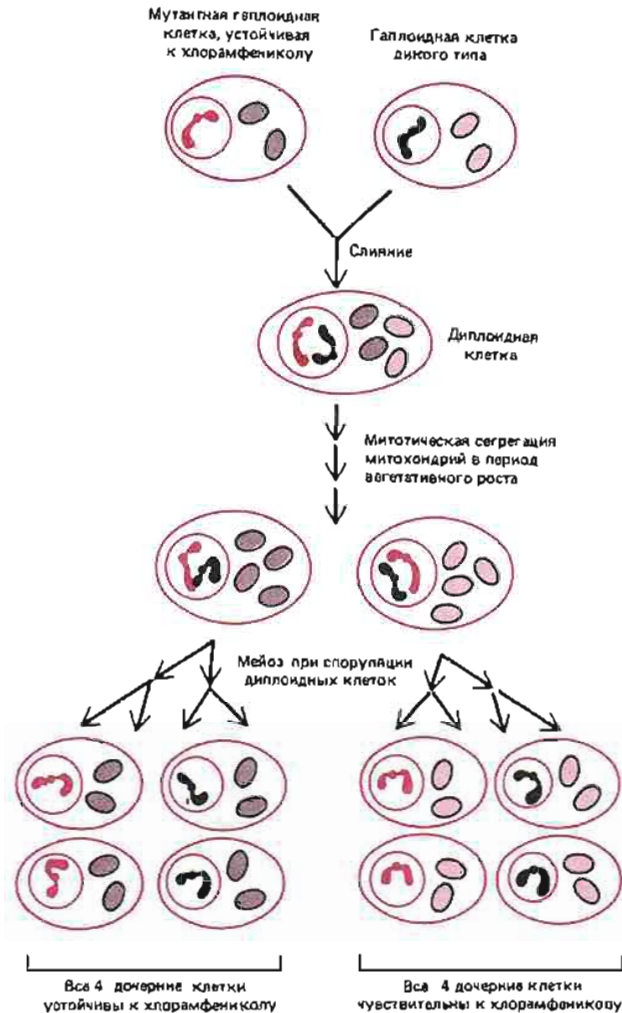
2. Синтез белка в хлоропластах начинается с N-формилметионина, как и у бактерий, а не с метионина, как в цитоплазме эукариотических клеток.
3. Рибосомы хлоропластов способны использовать при синтезе белка бактериальные тРНК. Можно даже создать функционирующую гибридную рибосому, соединив малую субъединицу рибосомы из хлоропласта с большой из *E. coli*. Во всех этих отношениях рибосомы хлоропластов отличаются от рибосом, находящихся в цитоплазме клеток того же растения.
4. мРНК хлоропластов успешно транслируется белоксинтезирующим экстрактом из *E. coli*.

Митохондриальная транслирующая система тоже имеет общие черты с бактериальными белоксинтезирующими системами; рибосомы митохондрий чувствительны к антибактериальным антибиотикам, синтез белка начинается с N-формилметионина. Однако есть и существенные различия. Самые поразительные из них выявляются при сопоставлении нуклеотидных последовательностей митохондриальных генов с аминокислотной последовательностью кодируемых ими белков. Например, триплет UGA, который служит в «универсальном» генетическом коде терминирующим кодоном, в митохондриях млекопитающих и дрожжей кодирует триптофан. Кроме того, отличаются значения нескольких других кодонов, причем здесь есть даже различия между кодами, действующими в митохондриях млекопитающих и дрожжей (табл. 9-4). Эти последние различия обусловлены особенностями митохондриальных тРНК, которые кодируются митохондриальным геномом и свойства которых мы подробнее рассмотрим позже. Почему генетический код в митохондриях отличен от кода бактерий и эукариот, пока не ясно.

9.5.5. Дрожжи – во многих отношениях весьма удобный объект для изучения биогенеза митохондрий; в частности, здесь возможен генетический анализ [41, 42]

По ряду причин механизмы биогенеза митохондрий изучают сейчас в большинстве случаев на культурах *Saccharomyces carlsbergensis* (пивные дрожжи) и *S. cerevisiae* (пекарские дрожжи). Во-первых, при росте на глюкозе эти дрожжи обнаруживают уникальную способность существовать только за счет гликолиза, т.е. обходиться без функции митохондрий. Это дает возможность изучать мутации в митохондриальной и ядерной ДНК, препятствующие развитию этих органелл. Такие мутации летальны почти у всех других организмов. Во-вторых, дрожжи – простые одноклеточные эукариоты – легко культивировать и подвергать биохимическому исследованию. И наконец, дрожжи могут размножаться как в гаплоидной, так и в диплоидной фазе, обычно бесполом способом – почкованием (асимметричный митоз). Но у дрожжей встречается и половой процесс: время от времени две гаплоидные клетки сливаются, образуя диплоидную зиготу, которая затем либо делится путем митоза,

Рис. 9-65. Здесь схематически показано различие в наследовании митохондриальных и ядерных генов у дрожжей. Две дрожжевые клетки из четырех, образовавшихся в результате мейоза, получают тот или иной ядерный ген от одного родителя, а две другие – от другого (*менделевское наследование*). В отличие от этого при передаче митохондриальных генов легко может случиться, что в период вегетативного роста (см. текст) все четыре клетки, образовавшиеся в результате мейоза, получают эти гены от одного и того же родителя (*неменделевское, или цитоплазматическое, наследование*).



либо претерпевает мейоз и снова дает гаплоидные клетки. Контролируя в ходе эксперимента чередование бесполого и полового размножения, можно многое узнать о генах, ответственных за функцию митохондрий. С помощью этих методов можно, в частности, выяснить, локализованы ли такие гены в ядерной ДНК или в митохондриальной, так как мутации митохондриальных генов не наследуются по законам Менделя, которым подчиняется наследование ядерных генов.

Для того чтобы понять механизм **немелделевского (цитоплазматического) наследования** митохондриальных генов, рассмотрим, что происходит с такими генами, когда две гаплоидные клетки сливаются, образуя диплоидную зиготу. В случае, представленном на рис. 9-65, одна дрожжевая клетка несет мутацию, определяющую резистентность митохондриального белкового синтеза к хлорамфениколу, тогда как другая – клетка дикого типа – чувствительна к этому антибиотику. Мутантные гены легко выявить, выращивая дрожжи на среде с глицеролом, использовать который способны только клетки с интактными митохондриями; поэтому в присутствии хлорамфеникола на такой среде смогут расти только клетки, несущие мутантный ген. Наша диплоидная зигота вначале будет иметь митохондрии как мутантного, так и дикого типа. От зиготы в результате митоза отпочкуется диплоидная дочерняя клетка, которая будет содержать лишь небольшое число митохондрий. После нескольких митотических циклов в конце концов какая-то из новых клеток получит

все митохондрии либо мутантного, либо дикого типа. Поэтому все потомство такой клетки будет иметь генетически идентичные митохондрии. Такой случайный процесс, в результате которого образуется диплоидное потомство, содержащее митохондрии только одного типа, называют *митотической сегрегацией*. Когда диплоидная клетка с одним лишь типом митохондрий претерпевает мейоз, все четыре дочерние гаплоидные клетки получают одинаковые митохондриальные гены. Этот тип наследования называют *неменделевским* или *цитоплазматическим* в отличие от менделевского наследования ядерных генов (рис. 9-65). Передача генов по цитоплазматическому типу означает, что изучаемые гены находятся в митохондриях.

9.5.6. У млекопитающих митохондриальные гены наследуются по материнской линии [43]

Последствия цитоплазматической передачи генов для некоторых животных, в том числе и для человека, более серьезны, нежели для дрожжей. Две сливающиеся гаплоидные дрожжевые клетки имеют одинаковую величину и вносят в образующуюся зиготу одинаковое количество митохондриальной ДНК. Таким образом, у дрожжей митохондриальный геном наследуется от *обоих* родителей, которые вносят равный вклад в генофонд потомства (хотя, как мы уже видели, спустя несколько генераций *отдельные* потомки нередко будут содержать митохондрии только одного из родительских типов). В отличие от этого у высших животных яйцеклетка вносит в зиготу больше цитоплазмы, чем спермий, а у некоторых животных спермии могут вообще не вносить цитоплазмы. Поэтому можно думать, что у высших животных митохондриальный геном будет передаваться только от одного родителя (а именно по *материнской* линии); и действительно, это было подтверждено экспериментами. Оказалось, например, что при скрещивании крыс двух лабораторных линий с митохондриальной ДНК, слегка различающейся по последовательности нуклеотидов (типы А и В), получается потомство, содержащее митохондриальную ДНК только материнского типа.

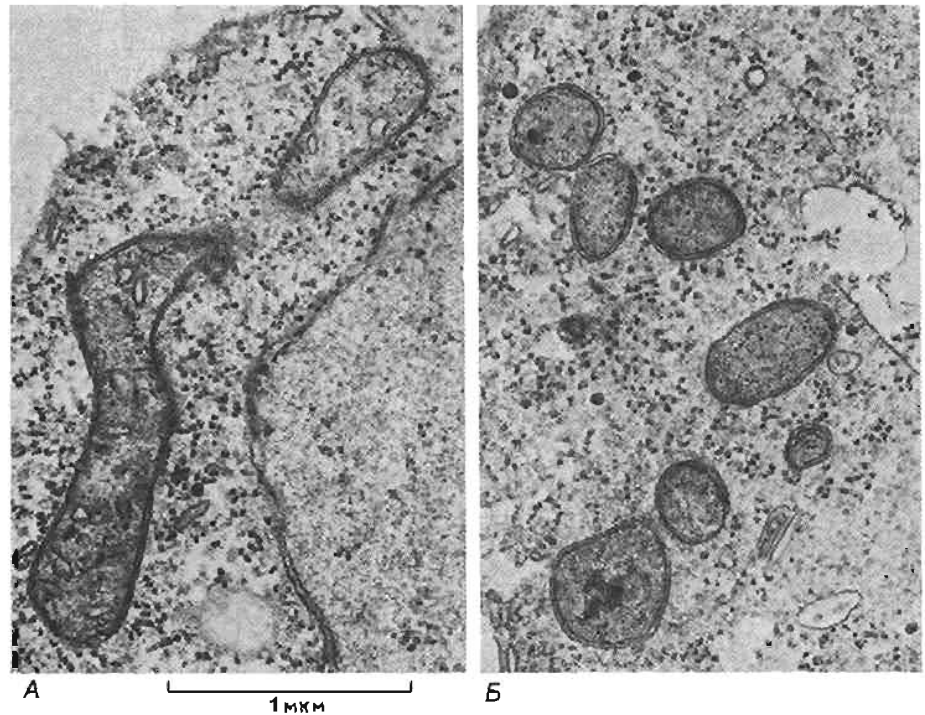
9.5.7. Как показывает изучение мутантов «petite» у дрожжей, важнейшую роль в биогенезе митохондрий играет клеточное ядро [44]

У мутантных дрожжей определенного типа имеется обширная делеция в митохондриальной ДНК, что ведет к полному прекращению белкового синтеза в митохондриях; в результате эти органеллы не способны выполнять свою функцию. Так как при росте на среде с низким содержанием глюкозы такие мутанты образуют мелкие колонии, их называют *цитоплазматическими мутантами petite*.

Хотя у мутантов *petite* нет митохондриального синтеза белков и поэтому нормальных митохондрий не образуется, тем не менее такие мутанты содержат *промитохондрии*, которые в известной мере сходны с обычными митохондриями, имеют нормальную наружную мембрану и внутреннюю мембрану со слабо развитыми кристами (рис. 9-66). В промитохондриях имеются многие ферменты, кодируемые ядерными генами и синтезируемые на рибосомах цитоплазмы, в том числе ДНК- и РНК-полимеразы, все ферменты цикла лимонной кислоты и многие белки, входящие в состав внутренней мембраны. Это наглядно демонстрирует преобладающую роль ядерного генома в биогенезе митохондрий.

Интересно отметить, что, хотя утраченные фрагменты ДНК составляют от 20 до более чем 99,9% митохондриального генома, общее количество митохондриальной ДНК у мутантов *petite* всегда остается на том же уровне, что и у дикого типа. Это обусловлено еще мало изученным процессом амплификации ДНК, в результате которого образуется молекула ДНК, состоящая из тандемных повторов одного и того же участка и равная по величине нор-

Рис. 9-66. Электронные микрофотографии тонких срезов дрожжевых клеток; можно видеть строение нормальных митохондрий (А) и строение митохондрий у мутанта *petite*, у которого отсутствуют все белки, кодируемые митохондриальным геномом (Б). В последнем случае органелла всецело состоит из белков, кодируемых ядерными генами. (С любезного разрешения Barbara Stevens.)



мальной молекуле. Например, митохондриальная ДНК мутанта *petite*, сохранившая 50% нуклеотидной последовательности ДНК дикого типа, будет состоять из двух повторов, тогда как молекула, сохранившая только 0,1% генома дикого типа, будет построена из 1000 копий оставшегося фрагмента. Таким образом, мутанты *petite* могут быть использованы для получения в большом количестве определенных участков митохондриальной ДНК, которые, можно сказать, клонируются самой природой.

9.5.8. Значительная часть митохондриальной ДНК дрожжей не выполняет кодирующей функции [41]

В митохондриальном геноме дрожжей с помощью генетических методов в сочетании с другими подходами были обнаружены два гена рРНК, примерно 30 генов тРНК и 8 генов, кодирующих белки. Семь из этих восьми белков локализованы во внутренней митохондриальной мембране, а один входит в состав рибосом. Все эти белки являются составными частями больших ферментных комплексов, образованных в основном из субъединиц, импортируемых органеллой из цитоплазмы.

У дрожжей для кодирования всех известных продуктов митохондриальных генов нужно менее 20% информации, которая может быть потенциально заключена в ДНК митохондрий, но все попытки найти в ней какие-то дополнительные гены не привели к успеху. Причина такого противоречия — то, что митохондриальная ДНК дрожжей содержит очень много некодирующих участков, которые можно разделить на три категории. *Во-первых*, в некоторых генах имеются длинные вставочные последовательности (интроны); например, гены цитохрома *b* и субъединицы I цитохромоксидазы почти в десять раз больше, чем можно было бы ожидать, исходя из размера кодируемых ими белков. Разные штаммы могут резко отличаться друг от друга по числу и длине таких интронов. *Во-вторых*, некоторые митохондриальные мРНК имеют некодирующие «лидерные» последовательности, которые намного длиннее кодирующих участков. *В-третьих*, около половины митохондриальной ДНК дрожжей состоит из сегментов, на 95% образо-

важных из пар оснований А-Т. Хотя функция этих сегментов неизвестна, в них вряд ли может заключаться информация о каком-либо белке или структурной РНК.

Поскольку в митохондриальной ДНК дрожжей так много некодирующих участков, даже наименьшие из приведенных в табл. 9-2 митохондриальных ДНК могли бы содержать те же самые гены, что и ДНК больших размеров, если здесь будет меньше некодирующих последовательностей. Все полученные до сих пор данные согласуются с этим предположением, хотя полного сравнения геномов еще не проведено.

9.5.9. Расшифрована полная нуклеотидная последовательность митохондриального генома человека и выявлен ряд его поразительных особенностей [45]

Генетические методы, столь успешно использованные при изучении митохондриального генома дрожжей, неприменимы в случае клеток человека. Однако благодаря своим относительно малым размерам наша митохондриальная ДНК – весьма подходящий объект для определения нуклеотидных последовательностей с помощью современной методики (разд. 4.5.4), и в 1981 г. была опубликована полная первичная структура молекулы этой ДНК, содержащей 16 569 нуклеотидов. Сопоставляя эту структуру с уже известными нуклеотидными последовательностями митохондриальных тРНК и аминокислотными последовательностями белков, кодируемых митохондриальной ДНК, удалось определить локализацию многих генов в кольцевой молекуле ДНК из митохондрий человека (рис. 9-67).

Картирование митохондриальных генов человека (2 гена рРНК, 22 гена тРНК и 13 генов, кодирующих белки) позволило обнаружить несколько поразительных особенностей:

1. В отличие от митохондриального генома дрожжей почти вся нуклеотидная последовательность ДНК из митохондрий человека кодирует белки и РНК.
2. Если в цитоплазме имеется по меньшей мере 31 тРНК для различных аминокислот, то в митохондриях для осуществления белкового синтеза используются всего лишь 22 тРНК: здесь обычные правила кодон-антикодового спаривания соблюдаются не так строго, и многие молекулы тРНК способны узнавать любой из четырех нуклеотидов в третьей (неоднозначной) позиции (разд. 5.1.6). Такое считывание «двух из трех» дает возможность одной тРНК связываться с любым из четырех различных кодонов. Это позволяет обходиться меньшим числом тРНК, но в то же время делает белковый синтез менее точным.
3. Как уже отмечалось, генетический код в митохондриях видоизменен – 4 из 64 кодонов имеют другие значения, чем при синтезе белка в цитоплазме (табл. 9-4).

Рис. 9-67. Организация митохондриального генома человека, установленная в результате определения полной нуклеотидной последовательности ДНК. По данным аналогичного анализа, так же организованы митохондриальные геномы мыши и коровы. Обратите внимание на то, что, хотя имеется 13 участков, кодирующих белки, функции известны только для 5 из них (это три субъединицы цитохромоксидазы, одна субъединица АТФ-синтетазы и цитохром *b*).



9.5.10. Хлоропласты имеют более сложный геном, чем митохондрии дрожжей и человека [39, 46]

Цитоплазматическая наследственность впервые была открыта при изучении сегрегации мутантных признаков хлоропластов у растений. Однако наши знания о генах хлоропластов на молекулярном уровне и сейчас еще недостаточны. Это обусловлено двумя причинами. Во-первых, у растения имеются две отдельные цитоплазматические генетические системы, и часто трудно бывает определить, принадлежит ли данный мутантный ген митохондриям или пластидам. Во-вторых, ДНК хлоропластов больше и намного сложнее митохондриальной ДНК животных и дрожжей (табл. 9-2), что затрудняет анализ находящихся в ней генов. Однако есть и преимущества: близкое сходство генетических систем хлоропластов и бактерий позволяет осуществлять точную транскрипцию или трансляцию (или то и другое вместе) ДНК и тРНК хлоропластов с помощью бактериальной системы транскрипции – трансляции. Декодирование ДНК хлоропластов *in vitro* в экстракте бактериальных клеток можно использовать для идентификации генов, кодирующих определенные белки.

Известно, что в хлоропластах синтезируется много белков, но специфическая функция установлена только для нескольких из них. В геноме хлоропластов (так же как и митохондрий) закодированы субъединицы ряда мультиферментных комплексов, в состав которых входят также и субъединицы, образующиеся на рибосомах цитоплазмы.

Если митохондрии существуют только как зрелые формы, то хлоропласты в зародышах растений находятся в незрелом состоянии – в виде пропластид (разд. 19.3.1). Когда растение выращивают в темноте, пропластиды не превращаются в зрелые формы. Развитие хлоропластов останавливается на стадии пропластид и в том случае, если ДНК хлоропласта дефектна или вовсе отсутствует. У высших растений подобные мутации хлоропластов летальны, но у таких одноклеточных водорослей, как *Euglena*, мутанты прекрасно выживают, если их обеспечить субстратом для окисления. Эти мутанты аналогичны митохондриальным мутантам *petite* у дрожжей.

Примерно у двух третей высших растений хлоропласты мужской родительской формы (содержащиеся в пыльцевых зернах) не переходят в зиготу, поэтому хлоропласты наследуются строго по материнской линии. У других растений хлоропласты обоих родителей попадают в зиготу и, таким образом, наследуются. Дефектные хлоропласты служат причиной *пестролистности*: смесь нормальных и дефектных хлоропластов, существовавшая в зиготе, разделяется во время роста растения в результате митотической сегрегации (разд. 9.5.5), что приводит к образованию листьев с чередующимися белыми и зелеными участками: в зеленых содержатся нормальные хлоропласты, а в белых – дефектные.

9.5.11. Молекулы РНК, транскрибируемые с митохондриальной ДНК, подвергаются затем процессингу [47]

Синтез РНК в хлоропластах мало чем отличается от синтеза РНК у *E. coli*. Матричные РНК хлоропластов, подобно бактериальным, не имеют ни «экзона» на 5'-конце, ни длинных 3'-концевых хвостов поли(А), характерных для большинства эукариотических мРНК. При образовании зрелых мРНК транскрипт, по-видимому, в большинстве случаев не подвергается значительному процессингу.

В отличие от этого процессинг РНК-предшественников играет важную роль в обеих детально изученных митохондриальных системах – человеческой и дрожжевой. В клетках человека обе цепи митохондриальной ДНК транскрибируются с одинаковой скоростью от единственного промотора каждой цепи. При этом образуются две гигантские молекулы РНК, каждая из которых представляет собой полную копию одной цепи ДНК. Таким образом,

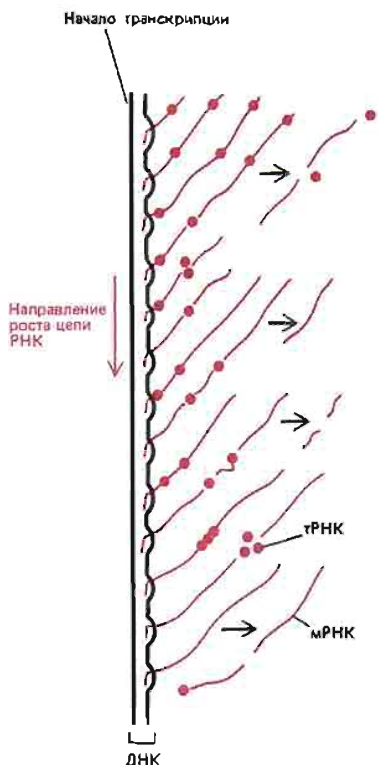


Рис. 9-68. Схема процессинга одного большого транскрипта, синтезируемого на Н-цепи митохондриальной ДНК. В ходе процессинга отделяются две рРНК, 14 тРНК и 10 поли(А)-содержащих РНК; как показано на схеме, большинство этих этапов осуществляется еще во время транскрипции. Кружочками представлены короткие участки РНК-транскрипта, содержащие последовательности тРНК. (По D. Ojala, J. Montoya, G. Attardi, Nature, 1981, 290, 470-474; видоизменено.)

транскрипция совершенно симметрична. Молекула РНК, транскрибированная с одной из цепей ДНК, которую называют *тяжелой цепью* (H-strand) из-за ее высокой плотности, выявляемой в градиенте CsCl, расщепляется нуклеазами, и в результате получают две молекулы рРНК, почти все митохондриальные тРНК и около десятка РНК, содержащих концевой поли(А) (рис. 9-68). В отличие от этого процессинг РНК, транскрибированной с *легкой цепи* (L-strand), приводит к образованию только восьми тРНК и одной малой РНК, содержащей поли(А). Оставшиеся 90% нуклеотидов этого транскрипта, видимо, не несут полезной информации и расщепляются. Как полагают, РНК, содержащие концевой поли(А), представляют собой митохондриальные мРНК; у них отсутствует «кэп» на 5'-конце, а 3'-концевой участок поли(А) содержит около 55 нуклеотидов. Этот полинуклеотидный хвост добавляется после транскрипции при участии митохондриальной поли-А-полимеразы.

У некоторых дрожжей, в отличие от человека, митохондриальные гены содержат интроны, которые, вероятно, удаляются из мРНК с последующим сплайсингом. Однако нет никаких данных о симметричной транскрипции у дрожжей: все гены, кроме одного, транскрибируются с одной цепи ДНК, причем существует несколько промоторов для различных генов.

Открытие интронов в митохондриальных генах дрожжей (а также и в некоторых генах хлоропластов) было неожиданным с точки зрения эндосимбиотической теории происхождения митохондрий, так как в геноме бактерий интроны не обнаружены. Кроме того, интроны часто имеются в митохондриальном гене одного штамма дрожжей, но отсутствуют в том же гене у другого штамма. По этой и другим причинам было высказано предположение, что интроны в ДНК некоторых биоэнергетических органелл представляют собой остатки каких-то перемещающихся элементов (разд. 8.6.7). Однако до сих пор не выяснено ни происхождение этих расщепленных генов в ДНК органелл, ни их влияние на организм.

9.5.12. Перенос белков в митохондрии и хлоропласты требует затраты энергии [48]

Большая часть белков, содержащихся в митохондриях и хлоропластах, импортируется в эти органеллы из цитозоля (разд. 7.6). В связи с этим возникают два вопроса: как клетка направляет белки к надлежащей органелле и каким образом эти белки проникают в нее?

Частичный ответ был получен при изучении транспорта в строму хлоропласта малой субъединицы (S) фермента *рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы*. Если мРНК, выделенную из цитоплазмы одноклеточной водоросли *Chlamydomonas* или из листьев гороха, ввести в качестве матрицы в белоксинтезирующую систему *in vitro*, то один из многих образующихся белков будет связываться специфическим анти-S-антителом. S-белок, синтезируемый *in vitro*, называют про-S, так как он больше обычного S-белка примерно на 50 аминокислотных остатков. При инкубации белка про-S с интактными хлоропластами он проникает в органеллы и превращается там под действием эндопептидазы в S-белок. Затем S-белок связывается с большой субъединицей *рибулозо-1,5-бисфосфат-карбоксилазы*, синтезируемой на рибосомах хлоропласта, и образует с нею в строме хлоропласта активный фермент.

Механизм переноса S-белка неизвестен. Полагают, что про-S связывается с белком-рецептором, находящимся на наружной мембране хлоропласта или в месте контакта наружной и внутренней мембран (разд. 7.6.2), а затем переносится в строму через трансмембранные каналы в результате процесса, требующего затраты энергии.

Сходным образом осуществляется транспорт белков внутрь митохондрий. Если очищенные митохондрии дрожжей инкубировать с клеточным экстрактом, содержащим только что синтезированные радиоактивные дрожжевые белки, то можно наблюдать, что митохондриальные белки, кодируемые ядерным геномом, отделяются от немитохондриальных белков цитоплазмы

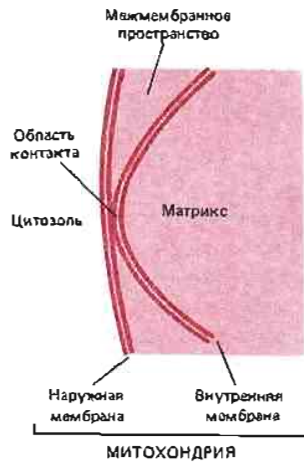


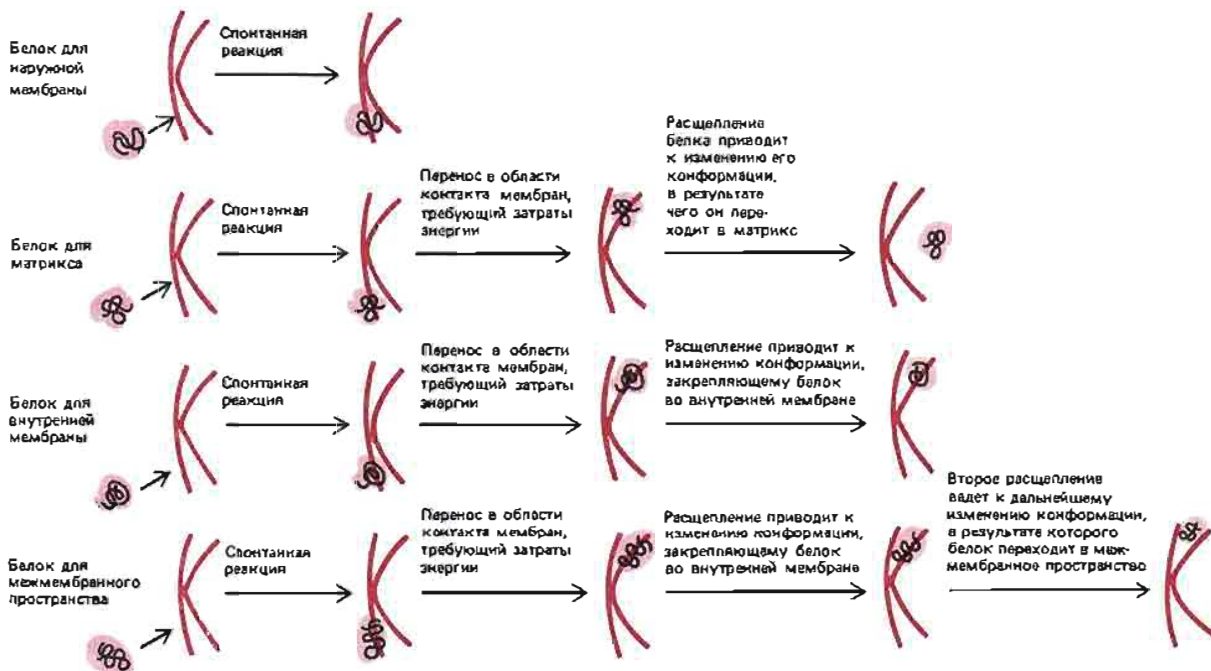
Рис. 9-69. Схематическое изображение небольшого участка митохондрии с одним из мест контакта наружной и внутренней мембран, где, как полагают, белки проникают в органеллу. В митохондрию переносятся те белки, которые кодируются ядерным геномом и синтезируются в цитозоле.

Рис. 9-70. Предполагаемые пути, обеспечивающие доставку импортируемых митохондрией белков точно к месту назначения. (См. также рис. 9-69.)

и избирательно включаются в митохондрии — так же, как это происходит в интактной клетке. При этом белки наружной и внутренней мембран, матрикса и межмембранного пространства находят свой путь к соответствующему компартменту митохондрии.

Многие из вновь синтезированных белков, предназначенных для внутренней мембраны, матрикса и межмембранного пространства, имеют на своем N-конце лидерный пептид, который во время транспортировки отщепляется специфической протеазой, находящейся в матриксе. Для переноса белков в эти три митохондриальных компартмента необходима энергия электрохимического протонного градиента, создаваемого на внутренней мембране. Механизм переноса белков для наружной мембраны иной: в этом случае не требуется ни затрат энергии, ни протеолитического расщепления более длинного белка-предшественника. Эти и другие наблюдения позволяют думать, что все четыре группы митохондриальных белков транспортируются в органеллу с помощью механизма, схематично представленного на рис. 9-69 и 9-70. Предполагается, что все белки, кроме тех, которые предназначены для наружной мембраны, включаются во внутреннюю мембрану в результате процесса, требующего затраты энергии и происходящего в местах контакта наружной и внутренней мембран. По-видимому, после этого первоначального включения белка в мембрану он подвергается протеолитическому расщеплению, которое приводит к изменению его конформации; в зависимости от того, как изменится конформация, белок либо закрепляется в мембране, либо «вытаскивается» в матрикс или в межмембранное пространство (рис. 9-70).

Перенос белков через мембраны митохондрий и хлоропластов в принципе аналогичен переносу их через мембраны эндоплазматического ретикулума, описанному в главе 7. Однако здесь есть несколько важных отличий. Во-первых, при транспорте в матрикс или строму белок проходит как через наружную, так и через внутреннюю мембрану органеллы, тогда как при переносе в просвет эндоплазматического ретикулума молекулы проходят только через одну мембрану (см. разд. 7.3.5). Кроме того, перенос белков в ретикулум осуществляется с помощью механизма *направленного выведения* (*vesicoidal discharge*) — он начинается тогда, когда белок еще не полностью сошел с рибосомы (*котрансляционный импорт*, см. разд. 7.3.9), а перенос в митохондрии



и хлоропласты происходит уже после того, как синтез белковой молекулы будет полностью завершен (*посттрансляционный импорт*).

Несмотря на эти различия, и в том и в другом случае клетка синтезирует белки-предшественники, содержащие сигнальную последовательность, которая определяет, к какой мембране направится данный белок. По-видимому, во многих случаях эта последовательность отщепляется от молекулы-предшественника после завершения транспортного процесса. Однако некоторые белки сразу синтезируются в окончательном виде. Полагают, что в таких случаях сигнальная последовательность заключена в полипептидной цепи готового белка. Сигнальные последовательности еще плохо изучены, но, вероятно, должно быть несколько типов таких последовательностей, каждый из которых определяет перенос белковой молекулы в определенную область клетки. Например, в растительной клетке некоторые из белков, синтез которых начинается в цитозоле, транспортируются затем в митохондрии, другие – в хлоропласты, третьи – в пероксисомы, четвертые – в эндоплазматический ретикулум. Сложные процессы, приводящие к правильному внутриклеточному распределению белков, только сейчас становятся понятными (подробности см. в гл. 7).

9.5.13. Хлоропласты сами синтезируют большую часть своих липидов, в то время как митохондрии получают их из цитоплазмы [31]

Помимо нуклеиновых кислот и белков для построения новых митохондрий и хлоропластов нужны липиды. Все необходимые хлоропластам липиды обычно образуются в самих органеллах. В листьях шпината, например, все жирные кислоты клетки синтезируются в хлоропластах, хотя образование ненасыщенных связей в их молекулах происходит в цитоплазме. Даже важнейшие гликолипиды хлоропластов образуются в них самих.

В отличие от этого митохондрии получают большую часть своих липидов извне. В животных клетках фосфолипиды, синтезированные в эндоплазматическом ретикулуме, транспортируются к наружной мембране митохондрий с помощью особых белков (разд. 7.3.15), а затем включаются во внутреннюю мембрану; как полагают, это происходит в месте контакта двух мембран. Основная реакция биосинтеза липидов, катализируемая самими митохондриями, – это превращение фосфатидной кислоты в фосфолипид кардиолипин, который содержится главным образом во внутренней митохондриальной мембране и составляет около 20% всех ее липидов.

9.5.14. Биогенез митохондрий и хлоропластов контролируется преимущественно ядерным геномом

Мы почти ничего не знаем о том, каким образом генетические системы ядра и органелл координируют свою активность при построении митохондрий и хлоропластов. Ясно, однако, что преобладает контроль со стороны ядерного генома. На это указывает тот факт, что у мутантов, у которых блокирован белковый синтез в органеллах, все же образуется нормальное количество «проорганелл» и в них продолжается синтез всей ДНК и части РНК органеллы, из чего можно заключить, что эти процессы, так же как и транспорт участвующих в них ферментов, находятся всецело под контролем ядерного генома. Кроме того, ядро, вероятно, регулирует количество белков, образующихся на рибосомах внутри органеллы. Относительно некоторых белков хлоропласта есть данные, что такая регуляция осуществляется на уровне транскрипции, но ее механизм неизвестен.

Хотя биогенез органелл контролируется главным образом ядерными генами, сами органеллы тоже, судя по некоторым данным, оказывают какое-то регулирующее влияние по принципу обратной связи; во всяком случае так обстоит дело с митохондриями. Если блокировать синтез белка в митохондриях интактных клеток, то в цитоплазме начинают в избытке образовываться фер-

менты, участвующие в митохондриальном синтезе ДНК, РНК и белков, как будто клетка пытается преодолеть воздействие блокирующего агента. Но, хотя существование какого-то сигнала со стороны митохондрий и не вызывает сомнений, природа его до сих пор не известна.

9.5.15. Почему лекарственные препараты, ингибирующие белковый синтез в митохондриях, не причиняют вреда больному? [49]

Если клетки человека в культуре ткани обработать антибиотиком, например тетрациклином или хлорамфениколом, то после одного-двух делений их рост прекратится. Это связано с ингибированием митохондриального белкового синтеза, приводящим к появлению дефектных митохондрий и как следствие к недостаточному образованию АТР. Почему же тогда антибиотики можно использовать при лечении бактериальных инфекций? Есть несколько ответов на этот вопрос:

1. Некоторые антибиотики (такие, как эритромицин) не проходят через внутреннюю мембрану митохондрий млекопитающих.
2. Большинство клеток нашего тела не делятся или делятся очень медленно, поэтому столь же медленно происходит и замена существующих митохондрий новыми (во многих тканях половина митохондрий заменится примерно за пять дней или еще дольше). Таким образом, количество нормальных митохондрий снизится до критического уровня только в том случае, если блокада митохондриального белкового синтеза будет поддерживаться на протяжении многих дней.
3. Определенные условия внутри ткани препятствуют проникновению некоторых препаратов в митохондрии наиболее чувствительных клеток. Например, высокая концентрация Ca^{2+} в костном мозге приводит к образованию Ca^{2+} -тетрациклинового комплекса, который не может проникнуть в быстро делящиеся (и потому наиболее уязвимые) предшественники клеток крови.

Эти факторы дают возможность использовать некоторые препараты, ингибирующие митохондриальный синтез белка, в качестве антибиотиков при лечении высших животных. Только два таких препарата оказывают побочное действие: длительное лечение большими дозами хлорамфеникола может привести к нарушению кроветворной функции костного мозга (подавить образование эритроцитов и лейкоцитов), а длительное применение тетрациклина – к повреждению кишечного эпителия. Но в обоих случаях еще не вполне ясно, вызываются ли эти побочные эффекты блокадой биогенеза митохондрий или какими-то иными причинами.

9.5.16. Митохондрии и хлоропласты произошли, вероятно, от эндосимбиотических бактерий [50]

Мы уже отмечали «прокариотический» характер генетической системы органелл, который особенно ярко выражен у хлоропластов, и упоминали о том, что он может быть обусловлен происхождением органелл от бактерий-эндосимбионтов (симбиотическая гипотеза, см. гл. 1). В соответствии с этой гипотезой эукариотические клетки в начале своего эволюционного пути были примитивными организмами без митохондрий и хлоропластов, а затем вступили в тесный симбиоз с бактериями и приспособили их систему окислительного фосфорилирования для своих нужд. Так как митохондрии животных и растений очень сходны, полагают, что событие, приведшее к возникновению этих органелл, произошло на раннем этапе эволюции эукариотической клетки, еще до разделения линий животных и растений. Вероятно, позднее в результате отдельного эволюционного события клеткой были захвачены цианобактерии (будущие хлоропласты), что привело к возникновению первых растительных клеток (см. рис. 1-21).

Так как большинство генов, кодирующих белки энергетических органелл, находится в ядерном геноме, кажется вероятным, что значительная часть генов органеллы была перенесена в ядерную ДНК еще на раннем этапе эволюции эукариот. Это позволяло бы объяснить, почему некоторые из ядерных генов, кодирующих митохондриальные белки, обладают заметным сходством с генами бактерий. Так, например, у курицы N-концевая аминокислотная последовательность митохондриального фермента супероксиддисмутазы гораздо больше похожа на соответствующий сегмент супероксиддисмутазы бактерий, чем на N-концевой участок того же фермента, выделенного из цитозоля эукариотической клетки.

Какой же тип бактерий дал начало митохондриям? Расшифровка полной аминокислотной последовательности и трехмерный рентгеноструктурный анализ цитохромов из различных бактерий выявили близкое сходство этих белков между собой и с цитохромом с дыхательной цепи митондрий растительных и животных клеток. На основании этих и других биохимических данных было предложено эволюционное древо, изображенное на рис. 9-58. По-видимому, митохондрии произошли от особого рода пурпурных фотосинтезирующих бактерий, которые утратили способность к фотосинтезу и сохранили только дыхательную цепь (разд. 9.4.3).

9.5.17. Для чего митохондриям и хлоропластам собственная генетическая система?

Почему митохондриям и хлоропластам необходима собственная генетическая система, тогда как другие органеллы, например пероксисомы и лизосомы, ее не имеют? Этот вопрос совсем не тривиален, так как поддержание отдельной генетической системы дорого обходится клетке, если учесть необходимое количество дополнительных генов в ядерном геноме. Здесь должны быть закодированы рибосомные белки (по меньшей мере 53), аминокислот-тРНК-синтетазы, ДНК- и РНК-полимеразы, ферменты процессинга и модификации РНК и т. д. — не менее 90 дополнительных белков (рис. 9-71). Большинство изученных белков из митондрий и хлоропластов отличаются по аминокислотной последовательности от своих аналогов из других частей клетки, и есть основание полагать, что в этих органеллах очень мало таких белков, которые могли бы встретиться еще где-нибудь. Это означает, что только для поддержания генетической системы каждого вида энергетических органелл в ядерном геноме должно быть 90 дополнительных генов. Причины такого «расточительства» неясны, и надежда на то, что разгадка будет найдена в нуклеотидной последовательности митохондриальной ДНК, не оправдалась. Трудно представить себе, почему образующиеся в митондриях белки должны непременно синтезироваться именно там, а не в цитозоле.

Обычно существование генетической системы в энергетических органеллах объясняют тем, что некоторые из синтезируемых внутри органеллы белков слишком гидрофобны, чтобы пройти сквозь митохондриальную мембрану извне. Однако изучение АТР-синтетазного комплекса (рис. 9-72) показало, что такое объяснение неправдоподобно. Хотя отдельные белковые субъединицы АТР-синтетазы весьма консервативны в ходе эволюции, места их синтеза изменяются. В хлоропластах несколько довольно гидрофильных белков, в том числе четыре из пяти субъединиц F_1 -АТР-разной части комплекса, образуются на рибосомах внутри органеллы. Напротив, у гриба *Neurospora* и в животных клетках весьма гидрофобный компонент (субъединица 9) мембранной части АТР-азы синтезируется на рибосомах цитоплазмы и лишь после этого переходит в органеллу. Различную локализацию генов, кодирующих субъединицы функционально эквивалентных белков у разных организмов (рис. 9-72), трудно объяснить с помощью какой бы то ни было гипотезы, постулирующей определенные эволюционные преимущества современных генетических систем митондрий и хлоропластов.

Рис. 9-71. Белки, синтезируемые в цитозоле и переносимые затем в митохондрию, не только составляют основную часть всех белков органеллы, но и играют важную роль в функционировании митохондриальной генетической системы.

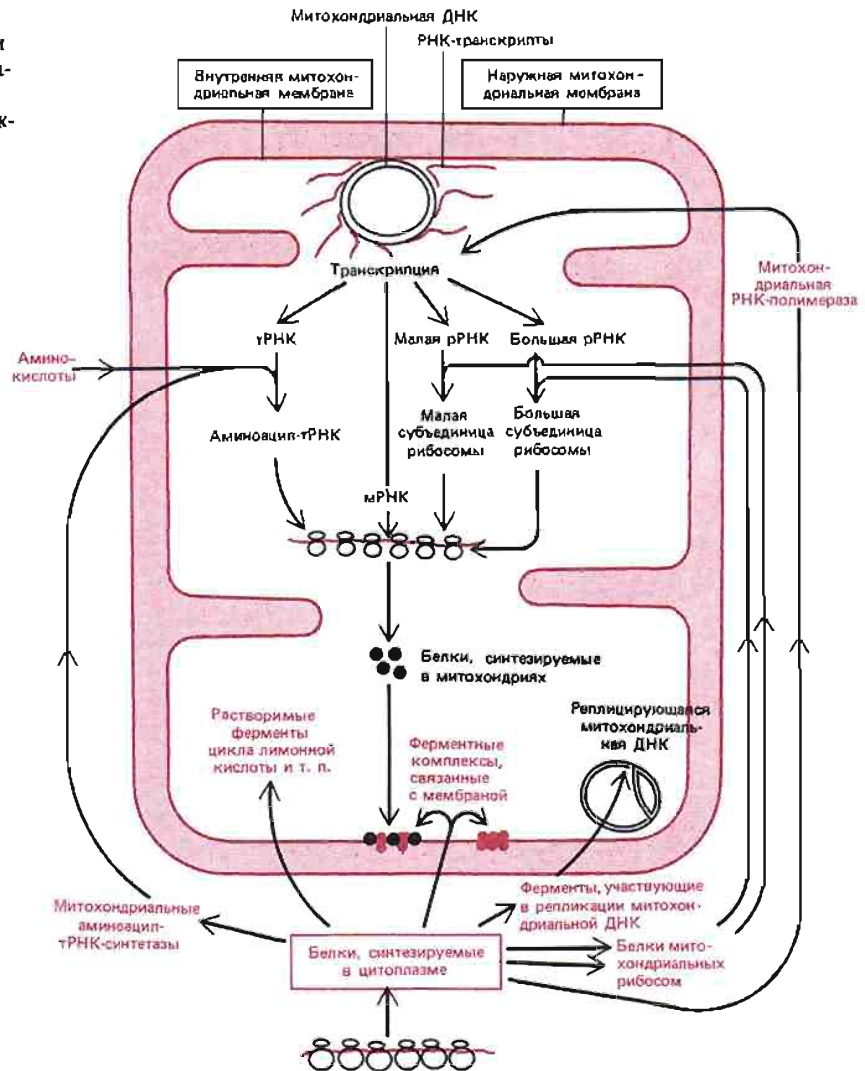
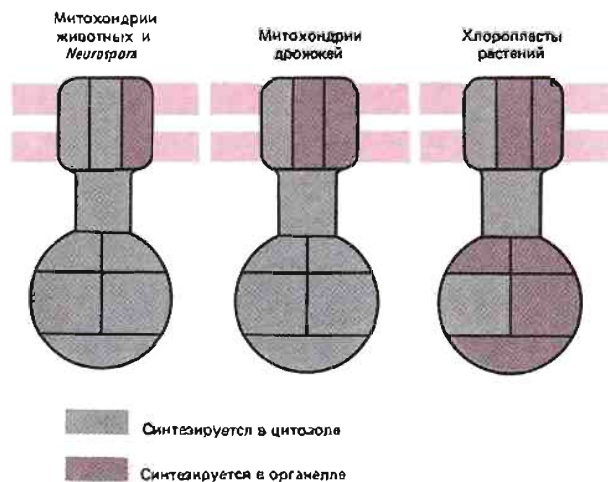


Рис. 9-72. В митохондриях и хлоропластах разных организмов места синтеза субъединиц АТФ-синтетазы различны. Структура ферментного комплекса представлена схематически, без учета относительных размеров и стехиометрии субъединиц.



Учитывая все сказанное выше, остается только предположить, что генетические системы этих органелл представляют собой эволюционный тупик. В рамках эндосимбиотической гипотезы это означает, что процесс переноса генов эндосимбионта в ядерный геном хозяина прекратился раньше, чем был полностью завершен.

Заключение

Рост и деление митохондрий и хлоропластов контролируются двумя отдельными генетическими системами: геномом самой органеллы и ядерным геномом. Большая часть белков этих органелл закодирована в ядерной ДНК, синтезируется в цитозоле и затем переносится в органеллу. Однако сравнительно немногие белки этих органелл и все их РНК кодируются в ДНК органеллы и синтезируются самой органеллой. Определение полной последовательности более чем 16 000 нуклеотидов в митохондриальном геноме человека показало, что в нем содержатся структурные гены двух рибосомных РНК, 22 транспортных РНК и 13 различных полипептидных цепей. Геномы хлоропластов примерно в 10 раз больше генома митохондрий человека и, как полагают, содержат гораздо больше генов. Однако преобладающая роль в биогенезе органелл обоих типов принадлежит ядерному геному; это видно из того факта, что «проорганеллы» образуются даже у таких мутантов, у которых полностью отсутствует функционирующий геном органелл.

Рибосомы хлоропластов очень сходны с бактериальными рибосомами, тогда как рибосомы митохондрий несколько больше отличаются от последних. Поэтому проследить происхождение митохондрий сложнее. Однако сходство между остальными белками дает основание предполагать, что обе органеллы произошли от бактерий, вступивших в тесный симбиоз с какими-то примитивными эукариотическими клетками; как полагают, митохондриям дали начало пурпурные бактерии, а хлоропластам (позднее) — цианобактерии. Хотя многие из генов этих древних бактерий все еще используются для синтеза белков внутри органеллы, большая их часть по неясным причинам вошла в ядерный геном.

Список литературы

Основная

- Karp G. Cell Biology, pp. 342–417, New York, McGraw-Hill, 1979.
 Lehninger A. L. Principles of biochemistry, New York, Worth, 1982 (Chapters 16, 17, and 23).
 [Имеется перевод: Ленинджер А. Основы биохимии: В трех томах, М.: Мир, 1985–1986.]
 Nicholes D. G. Bioenergetics, An Introduction to the Chemiosmotic Theory, New York, Academic Press, 1982.
 Stryer L. Biochemistry, 2nd ed. San Fransisco, Freeman, 1981. (Chapters 13, 14, and 19).

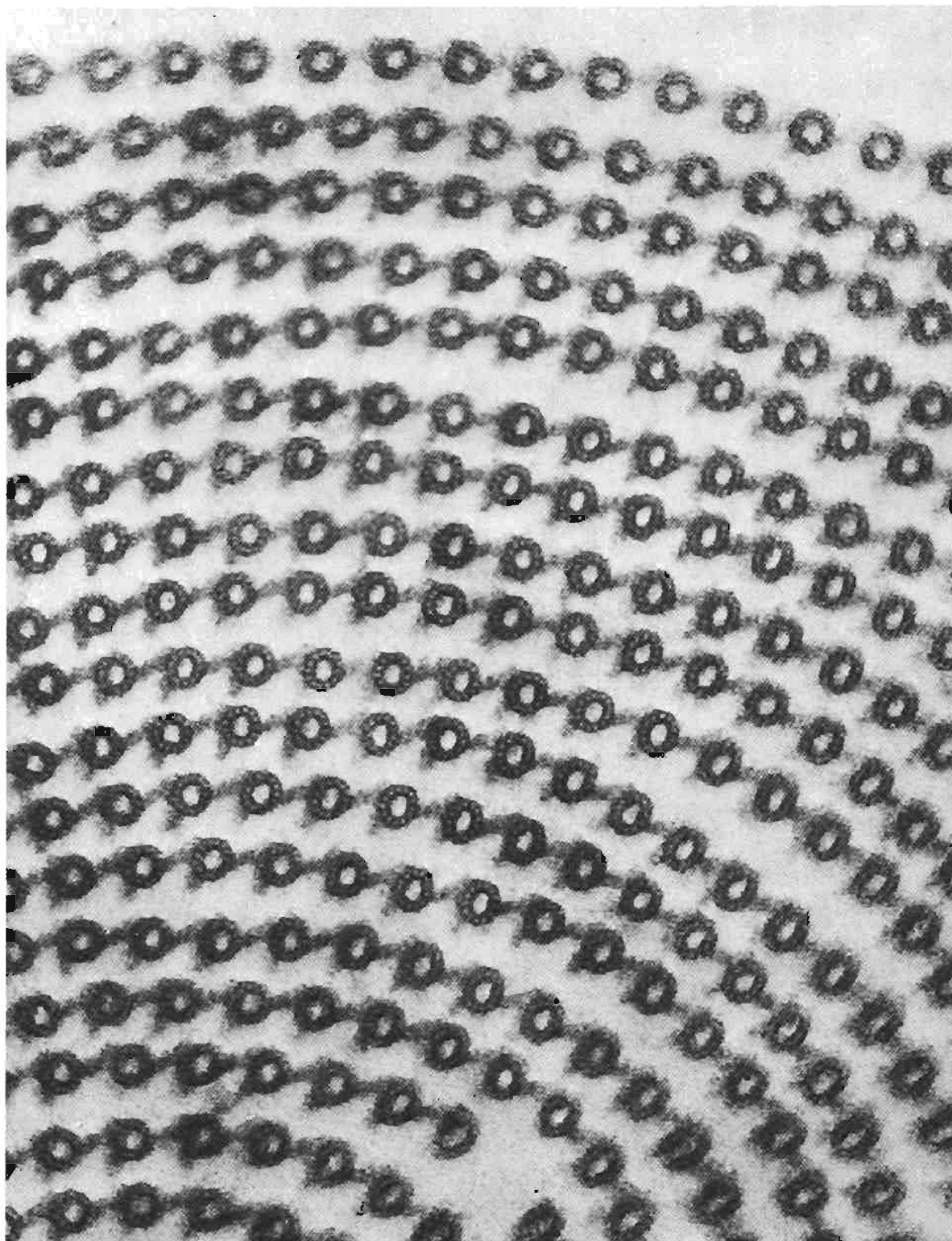
Цитируемая

1. Ernster R., Schatz G. Mitochondria, a historical review, J. Cell Biol., 91, 227s–255s, 1981.
 Tzagoloff A. Mitochondria, New York, Plenum, 1982.
 Fawcett D. W. The cell, 2nd ed., pp. 410–485, Philadelphia, Saunders, 1981.
 Whittaker P. A., Danks S. M. Mitochondria: Structure, Function and Assembly, New York, Longman, 1979.
2. DePierre J. W., Ernster R. Enzyme topology of intracellular membranes, Annu. Rev. Biochem., 46, 201–262, 1977.
 Srere P. A. The infrastructure of the mitochondrial matrix, Trends Biochem. Sci., 5, 120–121, 1980.
3. Krstić R. V. Ultrastructure of the Mammalian cell, pp. 28–57, New York, Springer-Verlag, 1979.
 Pollak J. K., Sutton R. The differentiation of animal mitochondria during development, Trends Biochem. Sci., 5, 23–27, 1980.
4. McGilvery R. W. Biochemistry, A Functional Approach, 2nd ed. Philadelphia, Saunders, 1979. (Chapter, 28).

5. Krebs H. A. The history of the tricarboxylic acid cycle, *Perspect. Biol. Med.*, 14, 154-170, 1970.
6. Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism, *Nature*, 191, 144-148, 1961.
Racker E. From Pasteur to Mitchell: a hundred years of bioenergetics, *Fed. Proc.*, 39, 210-215, 1980.
7. Capaldi R. A., ed. *Membrane Proteins in Energy Transduction*, New York, Dekker, 1979.
8. Wood W. B., Wilson J. H., Benbow R. M., Hood L. E. *Biochemistry. A Problems Approach*, 2nd ed. Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1981. (See problems, Chapters 9, 12, and 14.)
Nicholls D. G. *Bioenergetics: An Introduction to the Chemiosmotic Theory*, New York, Academic Press, 1982. (Chapter 3.)
9. Hinkle P. C., McCarty R. E. How cells make ATP, *Sci. Am.*, 238(3), 104-123, 1978.
10. Klingenberg M. The ADP, ATP shuttle of the mitochondrion, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 249-252, 1979.
Durand R., Briand Y., Touraille S., Alziari S. Molecular approaches to phosphate transport in mitochondria, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 211-214, 1981.
Nicholls D. Some recent advances in mitochondrial calcium transport, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 36-38, 1981.
LaNoue K. F., Scoolwerth A. C. Metabolite transport in mitochondria, *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 871-922, 1979.
11. Eisinger D., Crothers D. *Physical Chemistry with Applications to the Life Sciences*, Menlo Park, Ca., Benjamin-Cummings, 1979. (Chapters 4 and 5.)
12. Racker E. *A New look at Mechanisms in Bioenergetics*, New York, Academic Press, 1976. (A personal account of the concepts and history.)
13. Racker E., Stoekenius W. Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation, *J. Biol. Chem.*, 249, 662-663, 1974.
14. Racker E. Structure and function of ATP-driven ion pumps, *Trends Biochem. Sci.*, 1, 244-247, 1976.
15. Fillingame R. H. The proton-translocating pumps of oxidative phosphorylation, *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 1079-1113, 1980.
16. Fuller S. D., Capaldi R. A., Henderson R. Structure of cytochrome c oxidase in deoxycholate-derived two-dimensional crystals, *J. Mol. Biol.*, 134, 305-327, 1979.
17. Hackenbrock C. R. Lateral diffusion and electron transfer in the mitochondrial inner membrane, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 151-154, 1981.
18. White A., Handler P., Smith E. L., Hill R. L., Lehman I. R. *Principles of Biochemistry*, 6th ed., pp. 271-282, New York, McGraw-Hill, 1978.
19. Wikström M., Krab K., Saraste M. Proton-translocating cytochrome complexes, *Annu. Rev. Biochem.*, 50, 623-655, 1981.
20. Hanstein W. G. Uncoupling of oxidative phosphorylation, *Trends Biochem. Sci.*, 1, 65-67, 1967.
21. Nicholls D. G. Brown fat mitochondria, *Trends Biochem. Sci.*, 1, 128-130, 1976.
Lin C. S., Klingenberg E. M. Isolation of the uncoupling protein from brown adipose tissue mitochondria, *FEBS Lett.*, 113, 299-303, 1980.
22. Konings W. N., Michels P. A. M. Electron-transfer-driven solute translocation across bacterial membranes. In: *Diversity of Bacterial Respiratory Systems*, Vol. 1 (C. J. Knowles, ed.), pp. 33-86. Boca Raton, FL: CRC Press, 1980.
23. Bogorad L. Chloroplasts, *J. Cell Biol.*, 91, 256s-270s, 1981. (A historical review.)
Halliwell B. *Chloroplasts Metabolism—The Structure and Function of Chloroplasts in Green Leaf Cells*, Oxford, Eng., Clarendon, 1981.
Hatgh M. D., Boardman N. K., eds. *Photosynthesis*. In: *The Biochemistry of Plants. A Comprehensive Treatise*, Vol. 8. New York. Academic Press, 1981.
24. Miller K. B. The photosynthetic membrane, *Sci. Am.*, 241(4), 102-113, 1979.
25. Ellis R. J. The most abundant protein in the world, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 241-244, 1979.
26. Bassham J. A. The path of carbon in photosynthesis, *Sci. Am.*, 206(6), 88-100, 1962.
27. Björkman O., Berry J. High-efficiency photosynthesis, *Sci. Am.*, 229(4), 80-93, 1973. (C₄ plants.)
Chollet R. The biochemistry of photorespiration, *Trends Biochem. Sci.*, 2, 155-159, 1977.
Heber U., Krause G. H. What is the physiological role of photorespiration? *Trends Biochem. Sci.*, 5, 32-34, 1980.
28. Govindjee, Govindjee R. The absorption of light in photosynthesis, *Sci. Am.*, 231(6), 68-82, 1974.

- Bennet J. The protein that harvests sunlight, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 268-271, 1979.
- Thornber J.P., Markwell J.P. Photosynthetic pigment-protein complexes in plant and bacterial membranes, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 122-125, 1981.
29. Levine R.P. The mechanism of photosynthesis, *Sci. Am.*, 221(6), 58-70, 1969.
30. Heber U., Walker D.A. The chloroplast envelope-barrier or bridge? *Trends Biochem. Sci.*, 4, 252-256, 1979.
- Heber U., Heldt H.W. The chloroplast envelope: structure, function, and role in leaf metabolism, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32, 139-168, 1981.
31. Stumpf P.K. Plants, fatty acids, compartments, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 173-176, 1981.
- Raven J.A. Division of labor between chloroplast and cytoplasm. In: *The Intact Chloroplast* (J. Barber, ed.), pp. 403-443, Amsterdam Elsevier, 1976.
32. Gest H. The evolution of biological energy-transducing systems, *FEMS Microbiol. Lett.*, 7, 73-77, 1980.
- Gottschalk G. *Bacterial Metabolism*, New York, Springer-Verlag, 1979. (Chapter 8 covers fermentations.)
33. Knowles C.J., ed. *Diversity of Bacterial Respiratory Systems*, Vol. 1, Boca Raton, FL, CRC Press, 1980.
34. Gromet-Elhanan Z. Electrochemical gradients and energy coupling in photosynthetic bacteria, *Trends Biochem. Sci.*, 2, 274-277, 1977.
- Dickerson R.E. Cytochrome *c* and the evolution of energy metabolism, *Sci. Am.*, 242(3), 136-153, 1980.
- Blankenship R.E., Parson W.W. The Photochemical electron transfer reactions of photosynthetic bacteria and plants, *Annu. Rev. Biochem.*, 47, 625-653, 1978.
35. Gielham N.W. *Organelle Heredity*, New York, Raven, 1978.
- Kirk J.T.O., Tilney-Bassett R.A. *The Plastids: Their Chemistry, Structure, Growth and Inheritance*, 2nd ed. Amsterdam, Elsevier, 1979.
- Lewin B. *Gene Expression*, Vol. 2, *Eucaryotic Chromosomes*, 2nd ed., New York, Wiley, 1980. (Chapter 21 covers organelle genomes.)
- Kroon A.M., Saccone C., eds. *The Organization and Expression of the Mitochondrial Genome*, Amsterdam, Elsevier/North-Holland, 1980.
36. Tzagoloff A., Macino G., Sebald W. Mitochondrial genes and translation products, *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 419-441, 1979.
37. Possakony J.W., England G.M., Attardi G. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells, *J. Cell Biol.*, 74, 468-491, 1977.
38. Attardi G., Borst P., Slonimski P.P. *Mitochondrial Genes*, Cold Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- Cummings D.J., Borst P., David I.B., Weissman S.M., Fox C.F., eds. *Extrachromosomal DNA: ICN-UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology*, Vol. 15, New York, Academic Press, 1979.
- Clayton D.A. Replication of animal mitochondrial DNA, *Cell*, 28, 693-705, 1982.
39. von Wettstein D. Chloroplast and nucleus: concerted interplay between genomes of different cell organelles. In: *International Cell Biology, 1980-1981* (H.G. Schweiger, ed.), pp. 250-272, New York, Springer-Verlag, 1981.
40. Buetow D.E., Wood W.M. The mitochondrial translation system, *Subcell. Biochem.*, 5, 1-85, 1978.
- Edwards K., Kössel H. The rRNA operon from *Zea mays* chloroplasts: nucleotide sequence of 23S rDNA and its homology with *E. coli* 23S rDNA, *Nucleic Acids Res.*, 9, 2853-2869, 1981.
41. Borst P. The biogenesis of mitochondria in yeast and other primitive eucaryotes. In: *International Cell Biology, 1980-1981* (H.G. Schweiger, ed.), pp. 239-249, New York, Springer-Verlag, 1981.
42. Birky C.W., Jr. Transmission genetics of mitochondria and chloroplasts, *Annu. Rev. Genet.*, 12, 471-512, 1978.
43. Giles R.E., Blane H., Cann H.M., Wallace D.C. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 6715-6719, 1980.
44. Bernardi G. The petite mutation in yeast, *Trends Biochem. Sci.*, 4, 197-201, 1979.
- Locker J., Lewin A., Rabinowitz M. The structure and organization of mitochondrial DNA from petite yeast, *Plasmid*, 2, 155-181, 1979.
- Montisano D.F., James T.W. Mitochondrial morphology in yeast with and without mitochondrial DNA, *J. Ultrastruct. Res.*, 67, 288-296, 1979.
45. Anderson S. et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature*, 290, 457-465, 1981.
- Bibb M.J., Van Etten R.A., Wright C.T., Walberg M.W., Clayton D.A. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA, *Cell*, 26, 167-180, 1981.

46. Ciferri O. The chloroplast DNA mystery, *Trends Biochem. Sci.*, 3, 256-258, 1978.
47. Attardi G. Organization and expression of the mammalian mitochondrial genome: a lesson in economy, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 86-89, 100-103, 1981.
Ojala D., Montoya J., Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria, *Nature*, 29, 470-474, 1981.
Levens D., Ticho B., Ackerman E., Rabinowitz M. Transcriptional initiation and 5' termini of yeast mitochondrial RNA, *J. Biol. Chem.*, 256, 5226-5232, 1981.
Borst P., Grivell L. A. One gene's intron is another gene's exon, *Nature*, 289, 439-440, 1981. (Review of the introns found in organelle DNAs.)
48. Chua, N.-H., Schmidt G. W. Post-translational transport into intact chloroplasts of a precursor to the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 6110-6114, 1978.
Schatz G. How mitochondria import proteins from the cytoplasm, *FEBS Lett*, 103, 203-211, 1979.
Neupert W., Schatz G. How proteins are transported into mitochondria, *Trends Biochem. Sci.*, 6, 1-4, 1981.
Gasser S. N. et al. Imported mitochondrial proteins, cytochrome b_2 and cytochrome c_1 are processed in two steps, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 267-271, 1982.
Ellis R. J. Chloroplast proteins: synthesis, transport and assembly, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32, 111-138, 1981.
49. van den Bogert C., Kroon A. M. Tissue distribution effect on mitochondrial protein synthesis of tetracyclines after prolonged continuous intravenous administration to rats, *Biochem. Pharmacol.*, 30, 1706-1709, 1981.
50. Whatley J. N., John P. Whatley F. R. From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts, *Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)* 204, 165-187, 1979.
Doolittle W. F. Revolutionary concepts in evolutionary cell biology, *Trends Biochem. Sci.*, 5, 146-149, 1980.
51. Dickerson R. E. Cytochrome c and the evolution of energy metabolism, *Sci. Am.*, 242(3), 136-153, 1980.
Schwartz R. M., Dayhoff M. O. Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts, *Science*, 199, 395-403, 1978.



Поперечный срез пучка микротрубочек (электронная микрофотография). Микротрубочки с наружным диаметром около 25 нм — главные структурные компоненты сократимого стержня (*аксостилья*), имеющегося у многих жгутиконосцев. (Woodrum, Linck, J. Cell. Biol., 87, 404–414.)

Разные клетки эукариот обладают различной характерной формой и имеют весьма сложное внутреннее строение. Кроме того, они способны изменять свою форму и расположение своих органелл, а во многих случаях и передвигаться с места на место. Всеми этими способностями эукариотические клетки обязаны развитой сети белковых нитей (филаментов), образующих в их цитоплазме своего рода опорно-двигательную систему, называемую **цитоскелетом**.

Два наиболее важных типа таких нитей – это *актиновые филаменты* (часто называемые микрофиламентами) и *микротрубочки*. Те и другие состоят из глобулярных белковых субъединиц, которые в клетке легко могут соединяться между собой и разъединяться. Существуют тонкие механизмы, контролирующие сборку этих полимерных структур в цитоплазме из свободных субъединиц-мономеров. В большинстве животных клеток имеются еще белковые нити третьего типа, по своей толщине занимающие промежуточное положение между актиновыми филаментами и микротрубочками и потому называемые *промежуточными филаментами*; эти структуры состоят из фибриллярных белковых субъединиц, и они гораздо более стабильны, чем микрофиламенты и микротрубочки.

Помимо этих трех основных типов белковых филаментов цитоскелет включает также множество различных вспомогательных белков, которые либо связывают филаменты друг с другом или с другими клеточными структурами (например, с плазматической мембраной), либо влияют на скорость и степень полимеризации филаментов. Специфические комплексы вспомогательных белков, взаимодействуя с белковыми филаментами, обеспечивают процессы движения. Два наиболее изученных примера – мышечное сокращение, за которое ответственны актиновые филаменты, и подвижность ресничек и жгутиков, связанная с функцией микротрубочек. Хотя в этих видах движения участвуют разные наборы белков, в обоих случаях движение связано с гидролизом АТФ и основано на одном принципе – на скольжении белковых нитей относительно друг друга.

Системы филаментов, обеспечивающие сокращение мышц и биение ресничек и жгутиков, необычайно стабильны и обладают высокой упорядоченностью. Это позволило идентифицировать их компоненты и понять механизм их действия гораздо глубже, чем при изучении каких-либо других цитоскелетных структур. Именно с описания мышц и жгутика мы и начнем эту главу, чтобы познакомить читателя с главными компонентами цитоскелета. В следующем разделе тоже будут обсуждаться актиновые филаменты и микротрубочки, но уже организованные в менее регулярные и менее стабильные ансамбли; там же мы рассмотрим и механизмы, контролирующие их агрегацию и дезагрегацию. Далее последует описание промежуточных филаментов и взаимодействий между основными компонентами цитоскелета. Заключительный раздел будет касаться двух очень важных и трудных вопросов современной клеточной биологии, а именно: 1) как клетка поддерживает свою структурную организацию? и 2) как она движется?

10.1. Мышечное сокращение [1]

Из всех типов движения, свойственных живым организмам, более всего нам близки (и наиболее изучены) те, которые связаны с сокращением мышц. Бег, ходьба, плавание и полет – все эти виды локомоции основаны на способности мышечной ткани позвоночных быстро сокращаться, приводя в движение части скелета. **Скелетная мускулатура** – удивительно эффективный аппарат для осуществления быстрых произвольных движений. Близко родственные ей виды мышечной ткани – *сердечная* и *гладкая* мускулатура – специализировались как основа непроизвольных двигательных функций, таких как деятельность сердца и кишечная перистальтика.

Все виды мышечной ткани порождают движение, активно сокращаясь. Их сокращение обеспечивает сложная внутриклеточная белковая система, которая в более примитивной форме используется в клетках почти всех остальных типов. Наиболее мощные клетки скелетной мускулатуры (и аналогичных тканей беспозвоночных, например летательных мышц насекомых). Сократительный аппарат в этих клетках столь совершенен, что механизм его действия явственно угадывается в его ультраструктуре. Благодаря этому мы имеем весьма детальное представление о его функционировании и из этого примера видим, как живые клетки могут превращать химическую энергию в механическую работу.

10.1.1. Миофибрилла – сократимый элемент клеток скелетной мускулатуры

Скелетные мышцы состоят из длинных и тонких **мышечных волокон**, каждое из которых представляет собой одну необычайно крупную клетку, образовавшуюся путем слияния множества отдельных клеток. Поэтому мышечное волокно содержит большое число ядер. Около двух третей сухой массы волокна приходится на **миофибриллы** – цилиндрические нити толщиной 1–2 мкм, идущие от одного конца клетки до другого (рис. 10-1). Поскольку изолированная миофибрилла способна сокращаться в присутствии АТФ, ясно, что именно она и есть сократимый элемент мышечной клетки. Как мы увидим, каждая миофибрилла представляет собой цепочку еще более миниатюрных сократимых единиц, содержащих упорядоченную систему цитоскелетных белков.

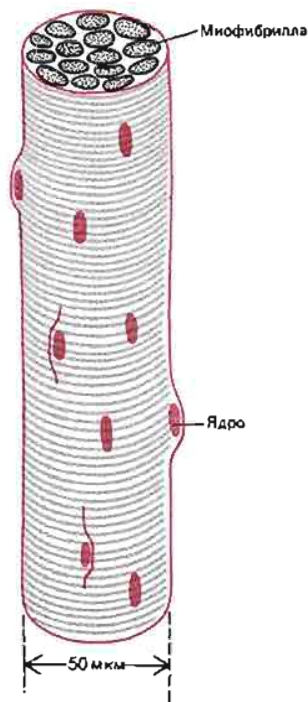
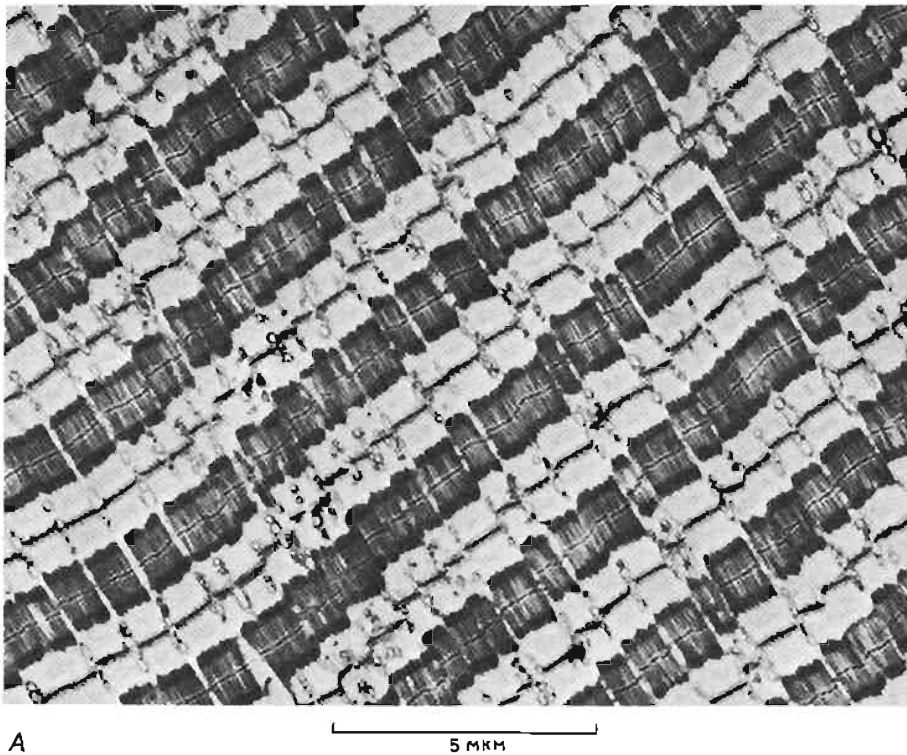


Рис. 10-1. Схематическое изображение небольшого отрезка волокна скелетной мышцы.

10.1.2. Миофибриллы состоят из повторяющихся ансамблей толстых и тонких филаментов

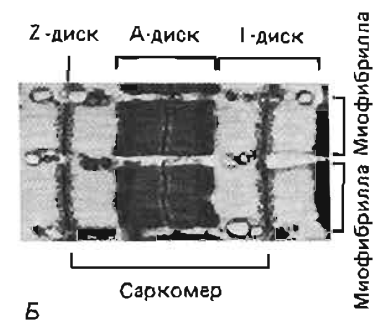
Сократимые единицы миофибрилл легко различимы в световом микроскопе: именно они обуславливают «полосатость» скелетных мышц. Каждая из таких единиц – **саркомеров** – имеет длину около 2,5 мкм. Границы саркомеров в соседних миофибриллах совпадают, поэтому вся мышечная клетка приобретает регулярную исчерченность (рис. 10-2). На продольном срезе мышцы при большом увеличении в пределах каждого саркомера видны чередующиеся светлые и темные полосы. Темные полосы получили название **А-дисков**, а светлые – **І-дисков**. Плотная линия в центре І-диска, отделяющая один саркомер от другого, известна под названием **Z-линии**, или **Z-диска** (рис. 10-3).

Молекулярная основа поперечной исчерченности, явившаяся ключом к пониманию функционального значения такой структуры, была раскрыта в 1953 г. с помощью электронного микроскопа (это был один из первых опытов применения электронного микроскопа для исследования тонких срезов биологического материала). Оказалось, что каждый саркомер состоит из множества параллельных белковых филаментов (нитей). Существуют филаменты двух типов – **толстые** (длиной около 1,6 мкм и толщиной 15 нм), которые тянутся от одного края А-диска до другого, и **тонкие** (длиной около 1 мкм и толщиной 8 нм), которые идут от Z-линии через І-диск и заходят в А-диск – в промежутки между толстыми филаментами (рис. 10-3). Изучение по-



А

5 мкм



Б

Саркомер

Миофибрилла

Рис. 10-2. А. Электронная микрофотография волокна поясничной мышцы кролика, сделанная при малом увеличении. Видна регулярная поперечная исчерченность. Продольная ось волокна и образующих его многочисленных миофибрилл (рис. 10-1) направлена по диагонали от верхнего левого угла к нижнему правому углу фотографии. Б. Деталь того же фото: показаны фрагменты двух смежных миофибрилл. (С любезного разрешения Roger Staig.)

перечных срезов мышцы показало, что на участке А-диска, содержащем перекрывающиеся тонкие и толстые филаменты, последние расположены в виде регулярной гексагональной системы, причем каждый толстый филамент окружен тонкими, тоже расположенными регулярно (рис. 10-4).

10.1.3. Сокращение – результат скольжения филаментов относительно друг друга [2]

Если через живую мышечную клетку пропустить пучок монохроматического света, например лазерный луч, возникает интерференционная картина, позволяющая достаточно точно определять длину саркомеров в данный момент. Исследования показали, что при мышечном сокращении каждый саркомер укорачивается пропорционально всей мышце. Например, если миофибрилла, состоящая из 20 000 саркомеров, укоротится с 5 до 4 см (т.е. на 20%), то длина каждого из 20 000 саркомеров уменьшится соответственно с 2,5 до 2 мкм.

При уменьшении длины саркомера сжимается только I-диск, тогда как плотный А-диск не изменяет своих размеров. Это легко объяснить, предположив, что сокращение миофибриллы происходит в результате скольжения толстых филаментов относительно тонких, причем длина тех и других остается неизменной (рис. 10-5). Эта простая модель скольжения нитей, впервые предложенная в 1954 г., имела основополагающее значение для понимания природы мышечного сокращения. В частности, она привлекла внимание к молекулярным механизмам скольжения филаментов.

Модель скольжения филаментов подтверждается рядом различных экспериментальных данных. Электронно-микроскопические исследования показали, что укорочение мышцы не сопровождается изменением собственной длины филаментов. Судя по данным рентгеноструктурного анализа, характер упаковки субъединиц, образующих филаменты обоих типов, также не изменяется. Максимальная сила, развиваемая мышцей, изменяется пропорционально степени взаимного перекрывания толстых и тонких филаментов, т.е. именно

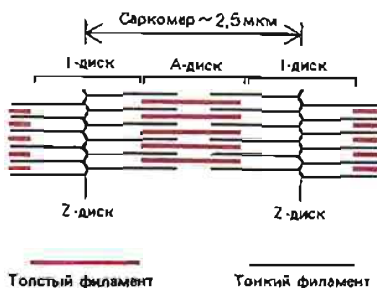
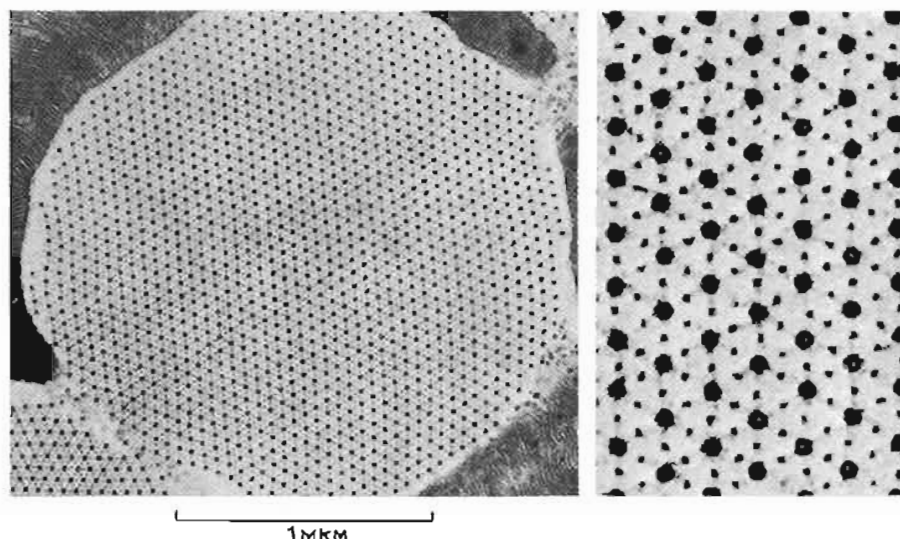


Рис. 10-3. Схема строения отдельного саркомера, объясняющая происхождение I- и А-дисков, видимых на микрофотографиях волокон скелетных мышц (см. рис. 10-2, Б).

Рис. 10-4. Электронные микрофотографии поперечного среза летательной мышцы насекомого. Видна кристаллоподобная упаковка толстых и тонких филаментов. В отличие от аналогичных структур в мышцах позвоночных, толстые филаменты имеют здесь полую сердцевину, как можно видеть при более сильном увеличении (справа). (J. Auer, J. de Microsc., 8, 197-232, 1969.)



так, как если бы напряжение в мышце возникало благодаря взаимодействию между филаментами на всем участке их соприкосновения.

Использование электронной микроскопии с высоким разрешением позволило понять ультраструктурную основу этого взаимодействия: на толстых филаментах удалось увидеть множество боковых отростков, образующих *поперечные мостики* между толстыми филаментами и расположенными на расстоянии 13 нм от них тонкими филаментами (рис. 10-6). В настоящее время известно, что при сокращении мышцы толстые и тонкие нити перемещаются относительно друг друга именно с помощью этих поперечных мостиков, которые работают циклично, подобно рядам миниатюрных весел. Взаимодействующие белки тонких и толстых филаментов были выделены и охарактеризованы, получив соответственно названия *актина* (этот белок содержится в цитоскелетных структурах в наибольших количествах) и *миозин* (он обычно встречается в ассоциации с актином в клеточных структурах, ответственных за подвижность). Практически все, что мы знаем сейчас об этих двух важных белках, имеющих почти во всех эукариотических клетках, является результатом изучения актина и миозина, экстрагированных из мышечной ткани.

Рис. 10-5. Схема, иллюстрирующая механизм мышечного сокращения, основанный на принципе скользящих нитей: тонкие и толстые филаменты перемещаются относительно друг друга, не изменяя собственной длины.

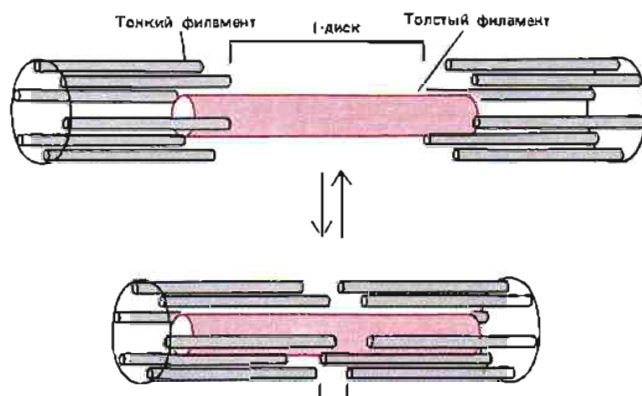
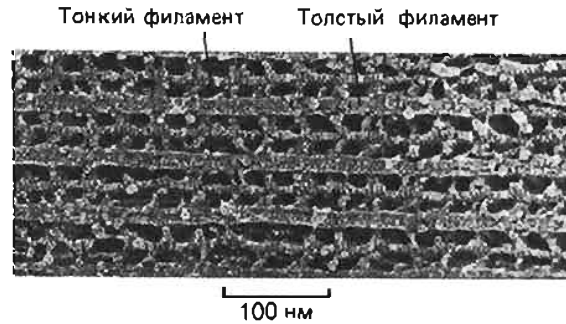


Рис. 10-6. Электронная микрофотография препарата летательной мышцы насекомого, демонстрирующая почти кристаллический характер укладки толстых и тонких филаментов. Поперечные мостики, соединяющие нити двух типов,—это миозиновые головки. Препарат получен методом быстрого замораживания, скалывания и глубокого травления. (С любезного разрешения John Heuser и Roger Cooke.)



10.1.4. Тонкие филаменты состоят в основном из актина

Актин скелетных мышц—только один из шести различных типов актина, синтезируемых в клетках позвоночных. У всех эукариотических организмов, кроме самых примитивных (таких, например, как дрожжи), имеются множественные актиновые гены; они кодируют слегка различающиеся белки, которые экспрессируются в клетках различных тканей или на разных стадиях развития. При этом актиновые гены весьма консервативны: различия между белками настолько малы, что по крайней мере в опытах *in vitro* актины, выделенные из различных таксономически отдаленных источников, оказались функционально взаимозаменяемыми. Таким образом, основные свойства актина из скелетных мышц являются общими для всех видов актина.

Стандартная процедура выделения актина заключается в экстракции высушенной и измельченной мышечной ткани разбавленным солевым раствором. Такая обработка расщепляет актиновые филаменты на глобулярные субъединицы, каждая из которых образована одной полипептидной цепью с молекулярной массой 41 800; это так называемый глобулярный актин, или **G-актин**. С каждой молекулой G-актина прочно связан один ион Ca^{2+} , стабилизирующий ее глобулярную конформацию; кроме того, к ней нековалентно присоединена одна молекула АТФ. При полимеризации G-актина концевой фосфат АТФ отщепляется. В результате полимеризации образуются актиновые филаменты, называемые также фибриллярным актином или **F-актином**. Полимеризацию можно вызвать простым повышением концентрации соли до уровня, близкого к физиологическому: раствор актина, который был лишь ненамного более вязок, чем чистая вода, быстро становится очень вязким в результате агрегации молекул G-актина и образования филаментов.

Хотя полимеризация актина сопровождается гидролизом АТФ, она не требует затраты энергии: актин полимеризуется и в присутствии негидролизуемого аналога АТФ. Однако гидролиз АТФ значительно повышает скорость полимеризации и оказывает заметное влияние на динамику процесса; причину этого мы объясним позже, когда будем рассматривать клеточную активность, связанную с контролируемой полимеризацией актина. Сократительная же активность мышц не зависит от этого процесса, а связана с функционированием стабильных актиновых филаментов.

По данным электронной микроскопии, **актиновые филаменты** состоят из двух цепей глобулярных молекул, имеющих диаметр около 4 нм и образующих двойную спираль, на каждый виток которой приходится 13,5 молекулы (рис. 10-7 и 10-8). Эти цепи составляют основу тонких филаментов скелетных мышц, что следует из результатов рентгеноструктурного анализа и окрашивания I-дисков флуоресцентными антителами к актину. Однако тонкие филаменты мышц состоят не только из актина—они содержат также несколько других белков (см. ниже, разд. 10.1.12).

Актиновые филаменты—полярные структуры, т.е. два их конца различаются между собой. Структурная полярность актиновых филаментов, которая весьма существенна для их функционирования в двигательном аппарате

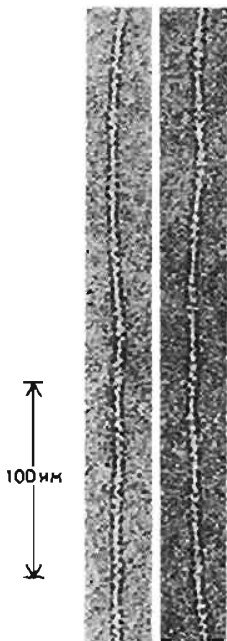


Рис. 10-7. Электронные микрофотографии актиновых филаментов (негативное контрастирование). (С любезного разрешения R. Craig)

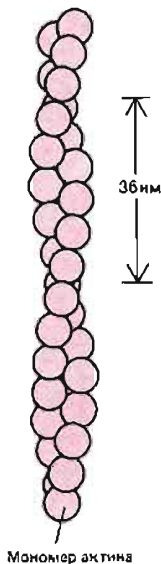


Рис. 10-8. Схема строения актинового филамента, показывающая спиральную укладку молекул глобулярного актина. Хотя последние изображены в виде шариков, на самом деле они, по данным рентгеноструктурного анализа, имеют грушевидную форму. Длина каждой молекулы около 6,5 нм, толщина в самой широкой части около 4 нм. (См. также рис. 10-7.)

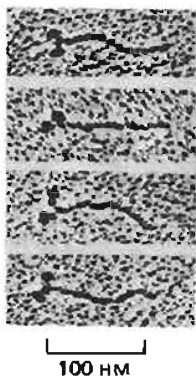


Рис. 10-9. Электронные микрофотографии молекул миозина (напыление платиной). Обратите внимание, что каждая молекула состоит из двух глобулярных «головок», прикрепленных к фибриллярному «хвосту». (С любезного разрешения David Shotton.)

клетки, проявляется в способах их взаимодействия с молекулами миозина. Но, прежде чем обсуждать это взаимодействие, мы должны познакомиться со свойствами самого миозина.

10.1.5. Толстые филаменты состоят главным образом из миозина

Миозин можно выделить практически из любых клеток позвоночных; он всегда присутствует там, где актиновые филаменты образуют в клетке сократительные пучки. В эволюционном отношении миозин значительно менее консервативен, чем актин, и встречается в нескольких различных формах. Особенности миозинов немускульных тканей будут рассмотрены позже. Основная отличительная черта миозина скелетных мышц — это его способность при спонтанной полимеризации *in vitro* образовывать гигантские полимеры, намного превосходящие по величине агрегаты миозина других типов.

Миозин извлекают из скелетных мышц концентрированными солевыми растворами, в которых он хорошо растворим. Обработанная таким образом мышца теряет только толстые филаменты, которые распадаются на составлявшие их молекулы миозина. Последние имеют мол. массу около 500 000 и на электронных микрофотографиях выглядят как длинные палочковидные структуры с двумя глобулярными головками (рис. 10-9). При обработке концентрированным раствором мочевины или детергентом молекулы миозина распадаются на шесть полипептидных цепей: на две идентичные тяжелые цепи с мол. массой 200 000 и две пары легких цепей с мол. массой около 20 000 и 16 000 соответственно. Тяжелая цепь содержит длинный участок α -спирали, прикрепленный к глобулярной головке. В интактной молекуле миозина α -спирали двух тяжелых цепей закручены одна вокруг другой в суперспираль, образующую палочковидный хвост, из которого выступают две головки; каждая головка образована глобулярной частью тяжелой цепи и включает по одной молекуле легкой цепи каждого из двух типов (рис. 10-10).

Даже при высоких концентрациях соли молекулы миозина склонны образовывать димеры, а при физиологических величинах ионной силы раствор миозина становится вязким вследствие агрегации димеров с образованием крупных волокон. В определенных случаях последние весьма напоминают интактные толстые филаменты мышц. Миозиновые филаменты в отличие от актиновых не образуются путем последовательного добавления субъединиц к растущей цепи. Ассоциация молекул миозина происходит за счет их палочковидных хвостов: несколько сотен молекул, располагаясь параллельно со сдвигом по длине, формируют пучок, из которого выступают латерально расположенные миозиновые головки (рис. 10-11, А и Б). Вся структура является биполярной; выступающие головки отсутствуют лишь в небольшом среднем участке филамента, где соединяются два противоположно направленных пучка миозиновых хвостов («голый» участок). Глобулярные головки миозиновых молекул взаимодействуют с актином и образуют поперечные мостики между толстыми и тонкими филаментами.

10.1.6. Гидролиз АТФ — источник движущей силы мышечного сокращения [3]

Взаимодействие между актином и миозином порождает силу, реализующуюся в мышечном сокращении. — химическая энергия превращается в механическую работу. Эффективность этого превращения в скелетной мышце очень высока: лишь 30–50% энергии рассеивается в виде тепла. Автомобильный двигатель, например, растрчивает в виде тепла от 80 до 90% энергии сгоревшего в нем бензина.

Необходимая для мышечного сокращения энергия получается в результате гидролиза АТФ до АДФ и неорганического фосфата (P_i), однако содержание АТФ в покоящейся и в активно работающей мышце почти одинаково. Этот кажущийся парадокс объясняется наличием в цитоплазме мышечных

Рис. 10-10. Схема строения молекулы миозина: показаны составляющие ее две тяжелые и четыре легкие цепи. Легкие цепи представлены молекулами двух типов – по одной молекуле каждого типа в каждой из двух головок.

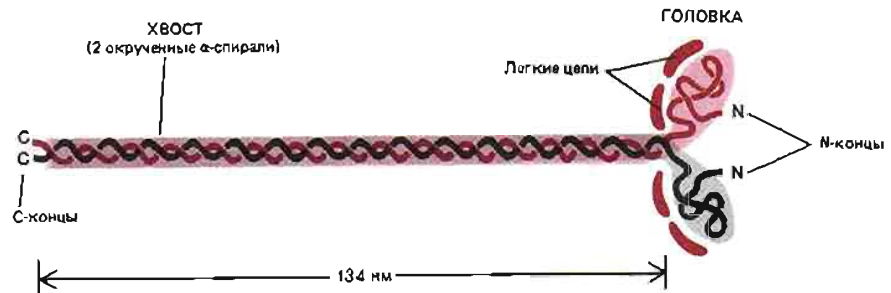


Рис. 10-11. А. Схематическое (без сохранения масштаба) изображение толстого филамента скелетной мышцы. Молекулы миозина связаны хвостовыми участками в пучок, на поверхности которого выступают головки. Обратите внимание на гладкую («толую») зону в средней части филамента, целиком состоящую из хвостов миозиновых молекул. **Б.** Электронная микрофотография миозинового толстого филамента из мышцы морского гребешка. Видна центральная гладкая зона. (С любезного разрешения R. Staig.)



Б

500 нм

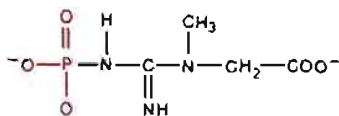


Рис. 10-12. Креатинфосфат. Он выполняет функции аккумулятора энергии в мышцах и других тканях позвоночных благодаря наличию энергонасыщенной фосфатной группы. Эта группа (выделена цветом) переносится на ADP с помощью фермента креатинкиназы.

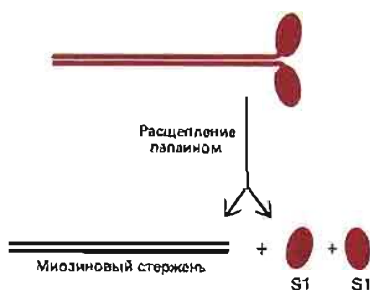


Рис. 10-13. В условиях ограниченного гидролиза протосольный фермент папаин расщепляет молекулу миозина так, что образуются миозиновый стержень (почти полный хвостовой участок) и два S1-фрагмента.

клеток весьма совершенной системы регенерации АТФ. Здесь в большом количестве имеется другое высокоэнергетическое фосфорное соединение – *креатинфосфат* (рис. 10-12); фермент *креатинкиназа* катализирует реакцию переноса фосфатной группы с этого соединения на ADP, в результате чего образуются АТФ и свободный креатин. Поэтому после короткого периода активности в мышце падает уровень креатинфосфата, хотя сократительный аппарат потребляет АТФ. Таким образом, креатинфосфат служит своего рода аккумулятором, который подпитывает основной источник энергии во время интенсивной мышечной работы и сам подзаряжается от него (за счет вновь синтезируемого АТФ) в покое мышце.

10.1.7. Миозин – это актин-зависимая АТРаза [1, 2]

Гидролиз АТФ во время мышечного сокращения – это прямой результат взаимодействия миозина с актином. Сам по себе миозин тоже обладает свойствами АТРАЗы, т.е. фермента, способного гидролизовать АТФ; однако АТРАЗная активность очищенного миозина невелика: для гидролиза одной молекулы АТФ молекуле фермента требуется около 30 с. Этап, лимитирующим скорость реакции, является не связывание молекулы АТФ и не собственно гидролиз (обе эти стадии протекают чрезвычайно быстро), а освобождение продуктов гидролиза – ADP и неорганического фосфата, которые остаются прочно связанными с миозином в нековалентный комплекс и препятствуют началу следующего каталитического акта.

Скорость расщепления АТФ миозином резко возрастает в присутствии актина: каждая молекула миозина способна теперь гидролизовать от 5 до 10 молекул АТФ в секунду, что вполне сравнимо с интенсивностью гидролиза АТФ в работающей мышце. Стимуляция миозиновой АТРАЗы актиновым филаментом определяется их физической ассоциацией. Эта ассоциация не влияет на стадию собственно гидролиза – она лишь облегчает отделение ADP и P_i от молекулы миозина, что дает миозину возможность связать новую молекулу субстрата и расщепить ее. Это будет описано в двух следующих разделах.

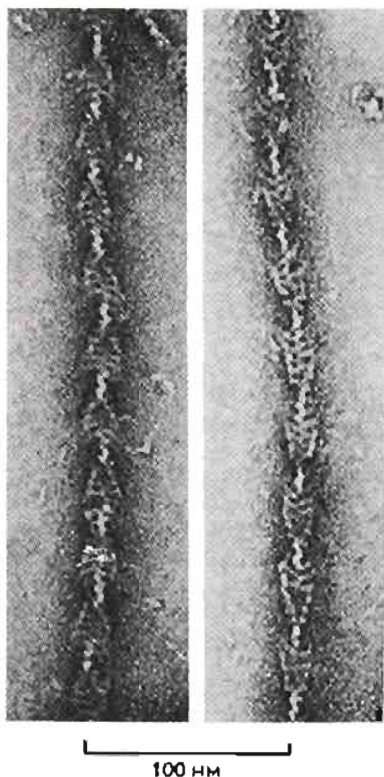


Рис. 10-14. Электронная микрофотография актиновых филаментов с присоединившимися к ним S1-фрагментами миозина. Спиральное расположение S1-фрагментов, имеющих одинаковый наклон к оси филамента, делает последний похожим на цепочку, составленную из наконечников стрел. Эти «стрелки» выявляют полярность актиновых филаментов. (С любезного разрешения R. Craig.)

10.1.8. Миозиновые головки прикрепляются к актиновым филаментам [1, 2]

Глобулярные головки молекул миозина ответственны как за связывание с актиновыми филаментами, так и за гидролиз АТФ. Если молекулу миозина расщепить на несколько кусков, подвергнув ее ограниченному протеолизу, получившиеся фрагменты можно выделить и исследовать. Протеаза папаин, например, расщепляет миозиновую субъединицу у основания глобулярной части, освобождая почти целиком хвост молекулы — так называемый *миозиновый стержень* — и две отдельные *миозиновые головки* (рис. 10-13). Миозиновые стержни, подобно intactным молекулам миозина, способны при физиологических концентрациях солей к самосборке с образованием крупных упорядоченных агрегатов, у которых, однако, отсутствуют боковые выступы. Две миозиновые головки, отделившиеся под действием папаина и имеющие мол. массу около 120 000, получили название *миозиновых субфрагментов I* (S1-фрагментов). Поскольку эти субфрагменты сохраняют АТФазную активность intactного миозина и обладают способностью присоединяться к актиновым филаментам, их можно использовать для изучения взаимодействия актина и миозина.

Каждая молекула актина в составе актинового филамента способна соединяться с одной молекулой S1. Именно в комплексе с S1-фрагментами миозина выявляется полярность актиновых филаментов. На электронных микрофотографиях негативно контрастированных препаратов эти регулярно повторяющиеся комплексы имеют характерный вид (рис. 10-14): каждый S1-фрагмент образует боковой выступ, располагающийся таким образом, что все вместе они создают картину, напоминающую нить с нанизанными на нее наконечниками стрел. Все эти стрелы направлены в одну сторону и выявляют таким образом структурную полярность актиновых филаментов.

Наличие у актиновых филаментов структурной полярности позволяет сделать одно предсказание относительно ориентации тонких филаментов в саркомере. Как уже говорилось, многочисленные миозиновые головки (каждая из которых представляет собой S1-фрагмент) располагаются по обе стороны от срединного «голового» участка толстого филамента (т.е. по краям А-дисков) и смотрят в противоположные стороны. Поскольку участки толстых филаментов, покрытые миозиновыми головками, должны взаимодействовать с тонкими филаментами в зоне перекрывания с ними, логично предположить, что тонкие филаменты на обеих сторонах саркомера тоже имеют противоположную полярность. Это предсказание легко проверить, если взять препарат, состоящий из изолированных Z-дисков с прикрепленными к ним актиновыми филаментами, и привести его в соприкосновение с S1-фрагментами. Когда это

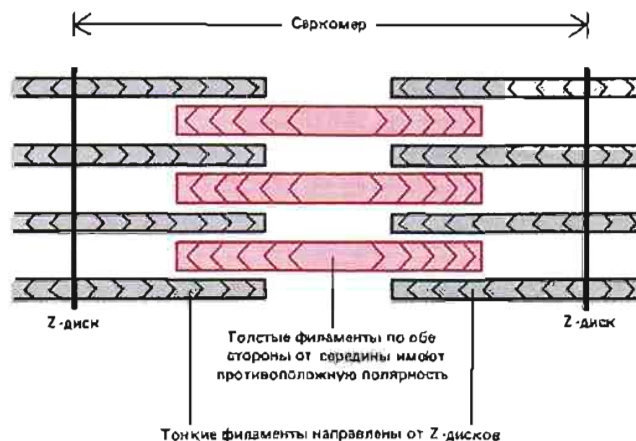


Рис. 10-15. Схема структуры саркомера, показывающая симметричную относительно его середины полярность перекрывающихся толстых и тонких филаментов.

было сделано, оказалось, что все образовавшиеся «стрелки», как и следовало ожидать, были направлены от Z-дисков к середине саркомера (рис. 10-15).

10.1.9. Миозиновые головки «шагают» вдоль актиновых филаментов

Каков молекулярный механизм относительного смещения толстых и тонких филаментов и создания механической силы при сокращении мышцы? Множество экспериментальных данных, полученных с применением электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа, кинетического анализа и других методов, согласуется со следующей моделью. Миозиновая головка на толстом филаменте с присоединенными к ней продуктами предшествующего гидролиза ATP (ADP и P_i) изменяет свое положение и вплотную приближается к соседней актиновой субъединице. Это перемещение, по-видимому, объясняется случайной диффузией и предполагает определенную гибкость молекулы миозина. Как только происходит соединение миозина с актином, ADP и

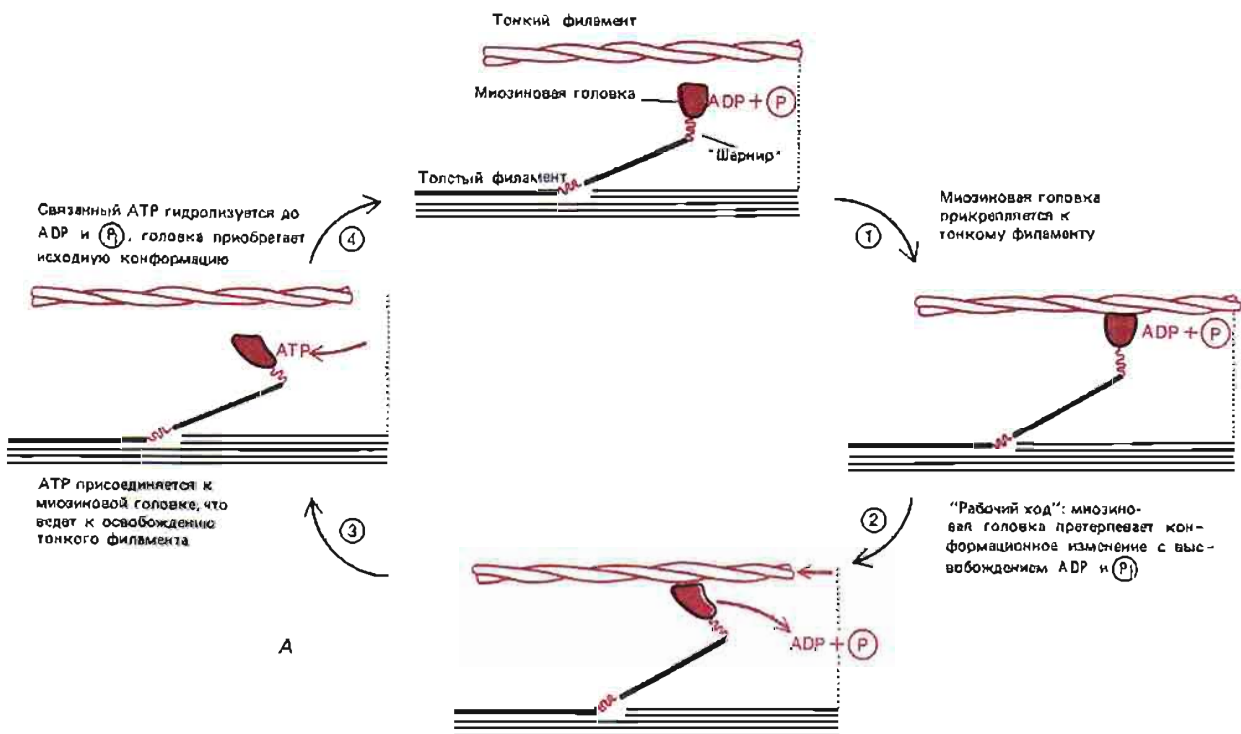
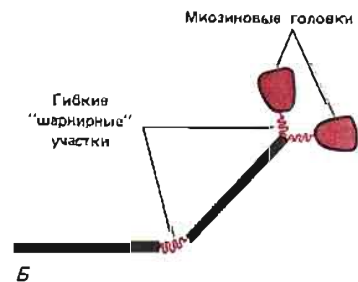


Рис. 10-16. А. Эта схема показывает, каким образом молекула миозина может использовать энергию гидролиза ATP для того, чтобы передвигаться вдоль актинового филамента. На этапе 1 миозиновая головка, несущая продукты гидролиза ATP (ADP и P_i), приближается к соседнему актиновому филаменту; это перемещение, по-видимому, обусловлено диффузией и возможно благодаря тому, что в молекуле миозина есть эластичные участки, играющие роль шарниров (см. Б). При совершении работы (этап 2) миозиновая головка изменяет свою конформацию, ADP и P_i освобождаются, и в результате этот молекулярный рычаг развивает тянущее усилие по отношению к тонкому филаменту. Затем (этап 3) к миозиновой головке присоединяется новая молекула ATP, что вызывает отделение всего «рычага» от тонкого филамента. Цикл заканчивается этапом 4, когда связанная молекула ATP гидролизуется



и миозиновая головка приобретает первоначальную конформацию. Как полагают, каждая из двух головок миозиновой молекулы проходит весь цикл независимо от другой. Б. Схематическое изображение гибких шарнирных участков в молекуле миозина, которые позволяют головкам свободно двигаться.

Таблица 10-1. Главные белковые компоненты миофибрилл

Белок (молекулярная масса полипептидов)	Функция
Актин (42 000)	Основной компонент тонких филаментов
Миозин (2 · 200 000 + 4 · 20 000)	Основной компонент толстых филаментов и АТРаза, взаимодействующая с актином; это взаимодействие приводит к мышечному сокращению
α -Актинин (2 · 95 000)	Закрепляет концы актиновых филаментов в Z-дисках
Тропомиозин (2 · 35 000)	Прикрепляется латерально вдоль актиновых филаментов; участвует в регулировании процессов сокращения ионами кальция
Тропонин (18 000 + 21 000 + 37 000)	Ассоциирован с филаментами; препятствует взаимодействию актина и миозина в отсутствие ионов кальция
Другие белки, ассоциированные с миофибриллами скелетных мышц позвоночных; так называемый C-белок, прикрепляющийся к толстым филаментам, и десмин – белок промежуточных филаментов, связанный с Z-дисками (см. табл. 10-6)	



Рис. 10-17. Иммуофлуоресцентная микрофотография слоя Z-дисков скелетной мышцы, окрашенного антителами к десмину. Поскольку Z-диски соседних миофибрилл связаны друг с другом, их можно выделить из мышцы в виде отдельного плоского слоя. На приведенной фотографии Z-диски имеют вид темных пор с яркими границами; это позволяет предполагать, что десмин играет важную роль в соединении Z-дисков друг с другом. (С любезного разрешения Bruce Granger и Elias Lazarides.)

Р; освобождаются, заставляя миозиновую головку наклоняться и таким образом тянуть за собой толстый филамент. В самом конце этого *рабочего хода* к миозиновой головке присоединяется новая молекула АТР, что приводит к отделению головки от актина. Происходящий затем гидролиз АТР восстанавливает исходную конформацию миозиновой молекулы, после чего ее головка готова вступить в следующий цикл (рис. 10-16). Общие принципы описанного процесса обсуждались ранее (разд. 3.4.11).

Таким образом, каждая миозиновая головка как бы шагает вдоль прилегающего актинового филамента. В определенный момент цикла своих конформационных изменений она упирается в актиновый филамент и заставляет его смещаться относительно толстого филамента. В те периоды, когда данная миозиновая головка отделена от актиновой нити, последнюю продолжают сдвигать остальные головки, входящие в состав того же самого толстого филамента, так что в каждый момент времени в сокращающейся мышце только часть миозиновых головок толстого филамента прикреплена к актиновым филаментам, другие же остаются свободными. Для осуществления описанного процесса необходимо, чтобы молекула миозина обладала некоторой эластичностью. Каждый толстый филамент содержит около 500 миозиновых головок, и каждая из них при быстром сокращении мышцы совершает около пяти шагов-циклов в секунду.

10.1.10. Актин и миозин закреплены на своих местах в миофибрилле с помощью других белков

Хотя актин и миозин играют в мышечном сокращении главную роль, это далеко не единственные белки миофибрилл. Здесь имеется еще целый ряд «вспомогательных» белков (табл. 10-1). Часть из них выполняет регуляторные функции (см. ниже), а другие, по-видимому, играют чисто структурную роль, как, например, α -актинин и десмин, находящиеся в области Z-дисков. Предполагается, что α -актинин обеспечивает надлежащую упаковку филаментов в саркомере, а десмин связывает между собой соседние саркомеры. На концах каждого саркомера параллельные актиновые филаменты закреплены в Z-дисках. Поскольку α -актинин связывается с концами актиновых филаментов *in vitro*, а в мышечной клетке специфически локализуется в области Z-дисков, можно думать, что именно он фиксирует здесь актиновые филаменты. Дес-

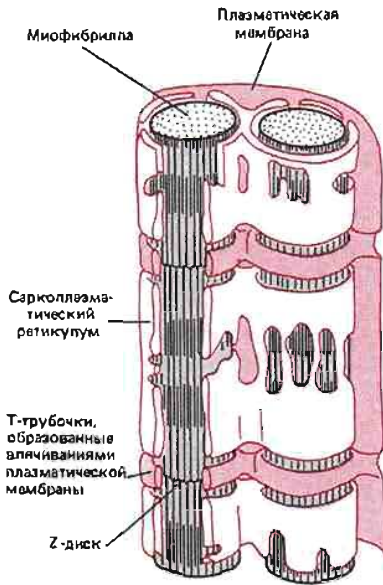


Рис. 10-18. Схематическое изображение системы мембранных каналов, обеспечивающей передачу активирующего сигнала от плазматической мембраны ко всем миофибриллам данной клетки.

мин-белок промежуточных филаментов (разд. 10.6) – в большом количестве содержится в участках между Z-дисками соседних миофибрилл и, по-видимому, обеспечивает совпадение границ саркомеров в миофибриллах (рис. 10-17).

10.1.11. Мышечное сокращение индуцируется повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} [4]

Все скелетные мышцы находятся под контролем воли и сокращаются только при получении сигнала от соответствующих мотонейронов. Цепь событий, связывающих возбуждение нерва с сокращением мышцы, обусловлена свойствами высокоспециализированных мембран мышечной клетки, передающих сигнал. Нервные импульсы индуцируют в цитоплазматической мембране потенциал действия, и электрическое возбуждение быстро распространяется по каналам, образованным впячиваниями этой мембраны, – так называемым Т-трубочкам, которые окружают каждую миофибриллу в области Z-дисков (рис. 10-18). Здесь электрический сигнал передается на саркоплазматический ретикулум – систему разветвленных, сообщающихся между собой уплотненных пузырьков (особая форма эндоплазматического ретикулума), которая охватывает каждую миофибриллу подобно сетчатому чулку.

В момент активации электрическим импульсом, прошедшим по Т-трубочкам, саркоплазматический ретикулум выбрасывает в цитозоль большие количества ионов Ca^{2+} , запасенных в пузырьках. Резкое повышение концентрации свободного кальция инициирует сокращение миофибрилл. Поскольку сигнал от плазматической мембраны мышечной клетки через Т-трубочки и саркоплазматический ретикулум доходит до саркомера за несколько миллисекунд, все миофибриллы мышечной клетки сокращаются одновременно.

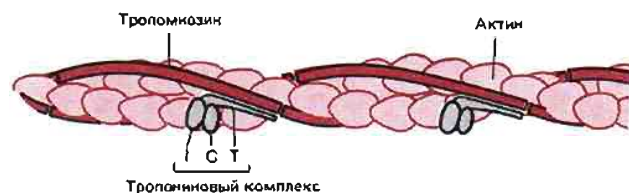
10.1.12. Тропонин и тропмиозин осуществляют Ca^{2+} -зависимую регуляцию мышечного сокращения [5]

Связь мышечного сокращения с изменениями концентрации Ca^{2+} , а значит, и с двигательными нервными импульсами всецело обусловлена функцией особых вспомогательных белков, тесно ассоциированных с активными филаментами. Если миозин смешать с чистым активом в пробирке, миозиновая АТРаза активируется независимо от того, имеются ли в среде ионы кальция. Между тем в интактной миофибрилле АТРазная активность миозина весьма чувствительна к концентрации этих ионов. Это различие связано с тем, что регуляция мышечного сокращения ионами Ca^{2+} осуществляется при участии вспомогательных белков, которых нет в искусственно реконструированных филаментах (рис. 10-19).

Один из таких белков – тропмиозин. Его жесткие палочковидные молекулы лежат в продольных бороздках, тянущихся вдоль обеих сторон активного филамента, и придают последнему необходимую жесткость.

Другой важный белок, участвующий в Ca^{2+} -зависимой регуляции, называется тропонином и представляет собой комплекс из трех полипептидов (тропонины Т, I и С). Тропонин Т имеет участок для связывания тропмиозина и, как полагают, ответствен за прикрепление всего комплекса к активному филаменту (рис. 10-19). Если к тропонину Т и тропмиозину добавить тропонин I, образуется комплекс, препятствующий взаимодействию актина с миозином

Рис. 10-19. Схематическое изображение тонкого филамента, показывающее локализацию тропмиозина и тропонина на его поверхности. (По данным Carolyn Cohen.)



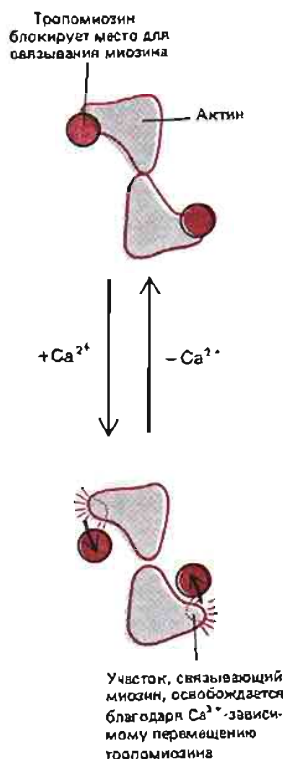


Рис. 10-20. Поперечный разрез актинового филамента (схема). Показано, каким образом в отсутствие Ca^{2+} тропомиозин может блокировать взаимодействие миозиновых головок с актином.

даже в присутствии ионов кальция. Дополненный тропонином С, этот комплекс продолжает блокировать актин-миозиновое взаимодействие, но только в отсутствие Ca^{2+} ; при наличии в среде свободного кальция тропонин С связывает четыре иона Ca^{2+} и в таком состоянии снимает блокаду. Именно этот эффект и лежит в основе индукции мышечного сокращения ионами кальция.

Каким образом тропонин и тропомиозин контролируют взаимодействие миозина с актином? Ведь на каждые семь актиновых субъединиц приходится лишь один Са-связывающий полипептид – тропонин С (рис. 10-19), в то время как контроль взаимодействия осуществляется по всей длине актинового филамента. Детальные структурные исследования показали, что в состоянии покоя, когда мышца не создает никакого механического усилия, палочковидные молекулы тропомиозина прикрывают те участки актинового филамента, с которыми в сокращающейся мышце должны соприкасаться головки молекул миозина. Иными словами, тропомиозин может стерически препятствовать взаимному контакту актина и миозина. При повышении концентрации ионов Ca^{2+} молекулы тропомиозина слегка изменяют свое положение (что, видимо, обусловлено изменением формы связанных с ними молекул тропонина), и это смещение дает возможность головкам миозина вступить во взаимодействие с актином (рис. 10-20). Таким образом, мышечное сокращение блокируется с помощью своего рода клина, «вбитого» между актином и миозином и препятствующего их взаимному контакту; и выбить этот клин можно только кальциевым «молотком».

10.1.13. Миозин гладких мышц активируется Ca^{2+} -зависимым фосфорилированием [6]

Мы подробно описали лишь один из трех типов мышечной ткани позвоночных, а именно скелетную мускулатуру. Два других типа – это *сердечная мышца* (которая на протяжении человеческой жизни сокращается около 3 миллиардов раз) и *гладкая мускулатура*, ответственная за медленные и длительные сокращения стенок желудка, кишечника и кровеносных сосудов. Мышцы всех трех типов содержат актин и миозин и сокращаются по принципу скользящих нитей. Сердечные мышечные волокна, подобно скелетным, обнаруживают поперечную исчерченность, что отражает большое сходство в организации актиновых и миозиновых филаментов.

Гладкие мышцы, наоборот, лишены поперечных полос. Они состоят из длинных, заостренных на концах клеток, которые имеют лишь одно ядро и содержат как тонкие, так и толстые филаменты, ориентированные вдоль длинной оси клетки. Однако расположены эти филаменты не столь упорядоченно, как в клетках скелетной мускулатуры и сердечной мышцы, и, по-видимому, не образуют миофибрилл.

Гладкая мускулатура содержит актин и миозин особого типа, свойственного этой ткани. Актин несколько отличается по аминокислотной последовательности от актина скелетных и сердечной мышц, но функциональное значение этих отличий неизвестно. С другой стороны, миозин, будучи очень сходен по структуре с миозином скелетных мышц, отличается от последнего по двум важным функциональным параметрам. Во-первых, его АТРазная активность даже в оптимальных условиях почти в 10 раз ниже, чем у миозина скелетных мышц, и ее регулирование кальцием носит более прямой характер. Во-вторых, миозин гладких мышц, подобно миозину немышечных клеток, способен взаимодействовать с актиновыми филаментами и таким образом вызывать сокращение только тогда, когда его легкие цепи фосфорилированы; когда они дефосфорилированы, миозин не может взаимодействовать с актином и мышца расслабляется.

Фосфорилирование и дефосфорилирование легких цепей миозина гладких мышц производят специфические ферменты. Миозиновая АТРаза гладких мышц Ca^{2+} -зависима, так как фосфорилирующий фермент – *киназа легких*



Рис. 10-21. Каскад реакций, с которыми связана индукция сокращения гладких мышц в присутствии Ca^{2+} . Под киназой подразумевается фермент, катализирующий сайтспецифическое фосфорилирование одного из двух типов легких цепей миозина. Аналогичный механизм действует в случае немышечного миозина.

цепей миозина — регулируется концентрацией ионов кальция. Эффект изменения концентрации этих ионов опосредуется Ca^{2+} -связывающим белком кальмодулином, который в структурном и функциональном отношении очень сходен с тропонином С (см. разд. 13.4.5). Кальмодулин в комплексе с Ca^{2+} активирует киназу легких цепей миозина (рис. 10-21). На активность киназы легких цепей влияют и некоторые другие факторы, например уровень циклического АМР в клетке, который в свою очередь регулируется гормонами. Таким образом, гладкие мышцы, подобно скелетным, тоже сокращаются в ответ на повышение концентрации Ca^{2+} , однако пусковые механизмы их сокращения различны. В случае гладких мышц это не волевые команды, переданные по двигательным нервам, а импульсы, пришедшие по вегетативным нервам, или же гормональные сигналы.

Ферментативные реакции, происходящие после связывания кальция кальмодулином, протекают довольно медленно. Однако быстрой активации мышцы не требуется, поскольку сам цикл взаимодействия миозина с актином здесь сильно замедлен, так что быстрое сокращение все равно невозможно. Если кальмодулин — вездесущий белок, участвующий в Ca^{2+} -зависимых процессах во многих клетках (см. гл. 13), то тропонин С можно рассматривать как специализированную форму кальмодулина, характерную для скелетных мышц, — форму, которая непосредственно связывается с тонкими филаментами и тем самым обеспечивает более оперативную регуляцию сокращения кальцием.

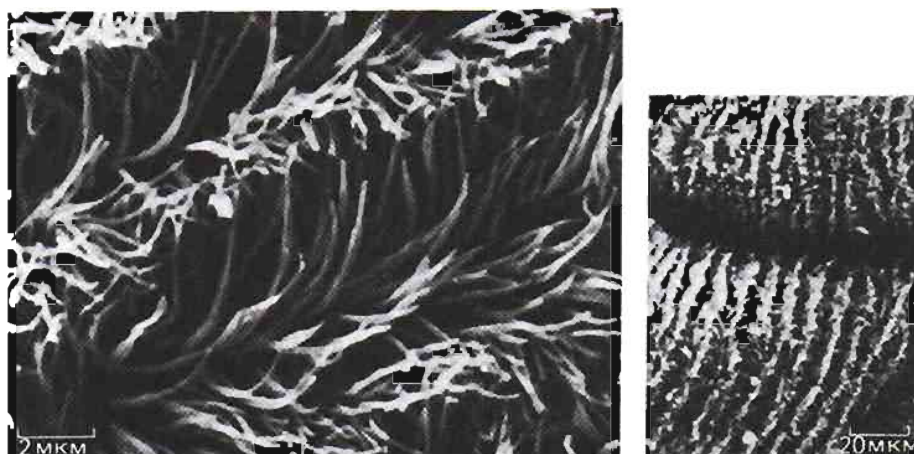
Не следует, однако, рассматривать гладкие мышцы как медленно работающий «второсортный» аналог скелетных мышц, пригодный только потому, что к нему предъявляются меньшие требования. На самом деле гладкие мышцы специально приспособлены для того, чтобы поддерживать длительное напряжение, затрачивая на это в 5–10 раз меньше АТФ, чем понадобилось бы для выполнения той же задачи скелетной мышце. Медленное образование и разрушение актив-миозиновых спайков не позволяет гладкой мышце быстро сокращаться, но зато дает ей возможность с гораздо большей эффективностью сохранять постоянный тонус.

Заключение

Сокращение мышц происходит в результате скольжения актиновых филаментов относительно миозиновых. «Головки» молекул миозина, выступающие по бокам миозиновых филаментов, осуществляют АТФ-зависимый цикл, в котором присоединяются к соседним актиновым филаментам, изменяют свою конфигурацию таким образом, что заставляют актиновые и миозиновые филаменты смещаться относительно друг друга, а затем снова отделяются от нитей актина. Протекание этого цикла облегчают вспомогательные мышечные белки, поддерживающие нужное пространственное расположение актиновых и миозиновых филаментов. Два других вспомогательных белка — тропонин и тропомиозин — участвуют в регуляции сокращения скелетной мышцы ионами кальция. При низкой концентрации Ca^{2+} эти белки присоединяются к актиновым филаментам таким образом, что препятствуют их контакту с головками миозина. Когда под действием электрического стимула уровень Ca^{2+} повышается, положение тропонин-тропомиозинового комплекса изменяется так, что миозин получает возможность взаимодействовать с актином, и в результате мышца сокращается.

Актин и миозин являются основными компонентами также и гладких мышц и обеспечивают их сокращение по тому же самому принципу. Однако в клетках гладкой мускулатуры филаменты обоих типов расположены значительно менее упорядоченно, и для их взаимодействия требуется фосфорилирование миозина, регулируемое ионами кальция.

Рис. 10-22. Микрофотографии ресничного эпителия из кишечника одного морского червя, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Хотя реснички распределены по всей поверхности равномерно, их биевание координировано таким образом, что возникают однонаправленные бегущие волны. Такие волны видны наиболее отчетливо при малом увеличении (*справа*). (J.S. Mellor, J.S. Hyatt, *Microscop*, 9, 91-94, 1978.)



10.2. Движение ресничек и жгутиков [7]

После мышечного сокращения наиболее изученным типом клеточной подвижности является движение ресничек. **Реснички** (и **жгутики**) — это миниатюрные волосовидные образования толщиной около 0,25 мкм, содержащие в середине пучок параллельно расположенных микротрубочек. Они имеются на поверхности клеток многих типов и встречаются у большинства животных и некоторых физицих растений. Их главная функция состоит в продвижении жидкости вдоль поверхности клетки или в проталкивании клетки сквозь толщу воды. Простейшие, например, используют реснички для собственного передвижения и для сбора пищевых частиц. В организме человека огромное множество ресничек, принадлежащих клеткам эпителия (до 10^9 и более на 1 см^2), покрывает поверхность нижних дыхательных путей, где они заставляют постоянно двигаться вверх слой слизи с частицами осевшей пыли и остатками отмерших клеток. Реснички обеспечивают также продвижение яйцеклетки по яйцеводу.

Так же как и структура сократительного аппарата мышцы, ультраструктура ресничек дает ясное представление об используемом механизме движения. В свою очередь знание того, как работают реснички и жгутики, помогает нам понять, каким образом системы микротрубочек могли бы порождать движение иного рода, например обеспечивать внутриклеточный транспорт или процессы, связанные с митозом.

10.2.1. Для ресничек и жгутиков характерны колебательные движения (волны изгиба)

Реснички движутся координированно, образуя на поверхности клетки однонаправленные бегущие волны (рис. 10-22). Каждая ресничка работает подобно крошечному хлысту: активный удар вперед, при котором ресничка полностью выпрямляется и может передать в окружающую жидкость максимальное усилие, а затем фаза расслабления, во время которой она возвращается в исходное положение, изгибаясь, чтобы уменьшить сопротивление среды (рис. 10-23). Каждый цикл длится от 0,1 до 0,2 с. Циклы соседних ресничек едва заметно сдвинуты во времени, что и приводит к волнообразной картине, изображенной на рис. 10-22.

Жгутики спермиев и многих простейших по своему внутреннему строению очень похожи на реснички, но намного длиннее, и характер их движения иной: по ним обычно пробегают квазисинусоидальные волны. Тем не менее принцип движения здесь тот же, и во многих случаях сами термины «ресничка» и «жгутик» можно считать синонимами. [Важно, однако, подчеркнуть, что речь идет о жгутиках эукариотических клеток; бактериальные жгутики — это нечто совсем иное (см. разд. 13.5.5).]

10.2.2. Ресничка содержит пучок параллельных микротрубочек, образующих структуру типа 9 + 2

Биепия ресничек обусловлены изгибанием их осевой структуры, так называемой аксонемы. Это сложный комплекс микротрубочек и связанных с ними белков. Микротрубочки – главный структурный компонент аксонемы. Это полые белковые цилиндры с внешним диаметром 25 нм, расположенные весьма характерным образом. Открытие этой системы явилось одним из самых интересных результатов ранних электронно-микроскопических исследований.

В аксонеме микротрубочки организованы в пучок таким образом, что девять двойных трубочек расположены по кругу, а в центре находятся две одиночные микротрубочки (рис. 10-24). Система «9 + 2» характерна для ресничек и жгутиков почти всех эукариотических организмов, начиная от простейших и кончая клетками человека. Микротрубочки тянутся непрерывно по всей длине реснички, которая обычно составляет около 10 мкм, но в некоторых клетках достигает 200 мкм и более.

Микротрубочки *центральной пары* одинаковы, и каждая представляет собой отдельный полый цилиндр, периферийные же дублеты состоят из двух микротрубочек, несколько различных по своей структуре: одна из них полная, а другая неполная (субфибриллы А и В соответственно). В области латерального контакта двух субфибрилл имеется участок общей стенки. На поперечном срезе видно, что полная микротрубочка каждого дублета построена из 13 субъединиц, а неполная (субфибрилла В) – только из 10.

10.2.3. Микротрубочки – это полые цилиндры, образованные молекулами тубулина [8]

Микротрубочки состоят из тубулина – глобулярного полипептида с мол. массой 50 000. Поскольку огромное количество микротрубочек тянется вдоль аксонов нервных клеток, богатейшим источником тубулина для биохимических исследований может служить мозг. Тубулин, экстрагированный из нервной ткани, имеет мол. массу около 100 000 и представляет собой димер, образованный двумя полипептидами – α -тубулином и β -тубулином, которые весьма сходны между собой по аминокислотной последовательности. При формировании микротрубочек молекулы тубулина соединяются друг с другом в *протофиламенты* – нитевидные комплексы, в которых β -тубулин одного димера связан с α -тубулином следующего. Обычно 13 таких протофиламентов, расположенных параллельно и примыкающих друг к другу, образуют цилиндрическую структуру – собственно микротрубочку (рис. 10-25). Исследование методом дифракции видимого света и рентгеновских лучей показывает, что тубулиновые полипептиды в соседних протофиламентах несколько смещены относительно друг друга, так что в стенке цилиндра они образуют регулярно чередующиеся спиральные ряды (рис. 10-26).

Сборка микротрубочек из молекул тубулина в некоторых важных отношениях сходна со сборкой актиновых филаментов из глобулярных субъединиц. Во-первых, она происходит спонтанно *in vitro* и в норме сопровождается гидролизом одной молекулы связанного нуклеотида [хотя в случае тубулина нуклеотид – это не АТФ, а GTP (табл. 10-2)]. Во-вторых, как и в случае актина, гидролиз нуклеотида оказывает решающее влияние на кинетику полимеризации. В клетке сборку микротрубочек обеспечивают различные специализированные структуры, служащие своего рода базой для роста микротрубочек.

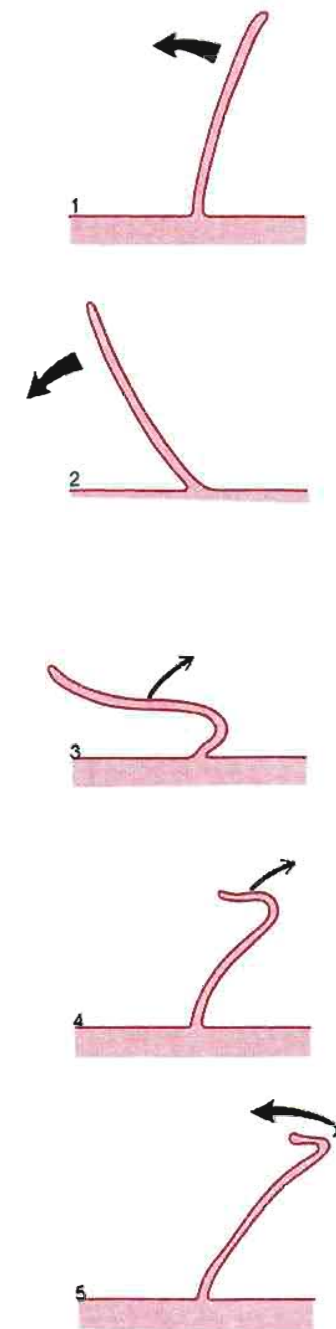


Рис. 10-23. Схема движения реснички на поверхности эукариотической клетки. Активный упругий удар (1 и 2), при котором жидкость проталкивается вдоль клеточной поверхности, сменяется расслабленным состоянием и возвращением в исходное положение (3–5).

Рис. 10-24. Поперечный срез жгутика одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas* (электронная микрофотография). Видна характерная структура типа 9 + 2, свойственная почти всем эукариотическим ресничкам и жгутикам. (С любезного разрешения Lewis Tilney). Схема, иллюстрирующая основные компоненты этой структуры, представлена на рис. 10-27.

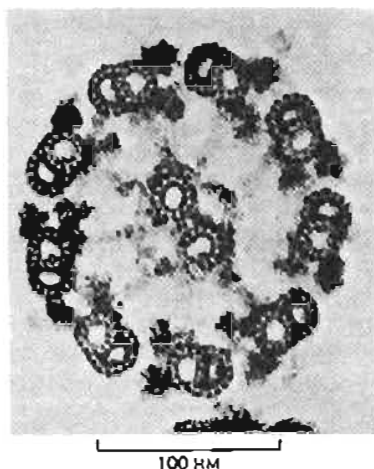


Рис. 10-25. А. Электронная микрофотография микротрубочек (негативный контраст). Б. Поперечный срез микротрубочки. Хорошо видны все ее 13 субъединиц, каждая из которых соответствует отдельному тубулиновому полипептиду. [С любезного разрешения Robley Williams (А) и Richard Linck (Б).]



А



Б

Эти так называемые *центры организации* инициируют построение разнообразных временных систем микротрубочек, о которых мы будем говорить позже.

Микротрубочки эукариотических ресничек и жгутиков связаны в единый пучок (аксонему) специализированной клеточной органеллой, называемой *базальным тельцем*. Эта органелла служит матрицей для организации системы микротрубочек типа 9 + 2 и ответственна за формирование дублетов, которые спонтанно *in vitro* не образуются. Аксонема дополнительно стабилизируется различными вспомогательными белками. Подобно актиновым филаментам мышц, микротрубочки ресничек и жгутиков способны порождать движение благодаря своей структурной полярности.

Чтобы лучше понять это, нам нужно будет подробнее рассмотреть структуру и функционирование аксонемы.

Рис. 10-26. Схема строения микротрубочки, показывающая, каким образом тубулиновые полипептиды, связываясь друг с другом, образуют цилиндрическую стенку. А. Поперечный срез: видны 13 полипептидов, расположенных по окружности. Б. Короткий отрезок микротрубочки: тубулиновые полипептиды образуют ряды *протофиламентов*. В. Участок развернутой стенки микротрубочки: показана укладка в ней тубулиновых полипептидов двух разных типов; каждый из 13 протофиламентов представляет собой цепочку гетеродимеров $\alpha\beta$. (По данным Linda Amos.)

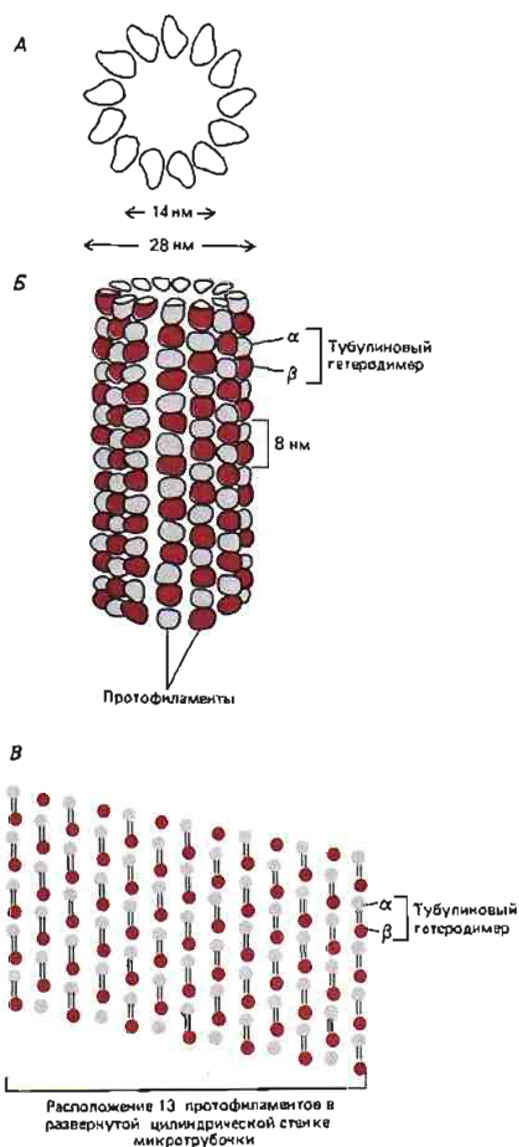
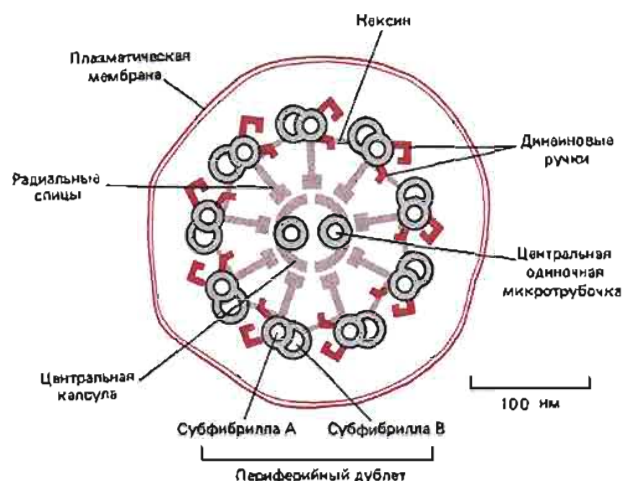


Таблица 10-2. Сравнение актина и тубулина

	Актин	Тубулин
Мол. масса полипептидов	42 000	50 000 (α -тубулин) 50 000 (β -тубулин)
Неполимеризованная форма	Глобулярная, мономер	Глобулярная, димер ($1\alpha + 1\beta$)
Связываемый нуклеотид (в неполимерной форме)	АТФ (1 на мономер)	ГТФ (2 на димер)
Факторы, необходимые для полимеризации	Ca^{2+} или Mg^{2+} ; NaCl	Mg^{2+} ; хеллирующий агент для удаления Ca^{2+} ; NaCl
Форма полимера	Двойная спираль	Трубка из 13 протофиламентов
Диаметр нитевидной структуры	7 нм	25 нм

Рис. 10-27. Схема поперечного сечения реснички (соответствующая электронная микрофотография представлена на рис. 10-24). Вдоль всей реснички с определенной периодичностью расположены разного рода структуры, отходящие от микротрубочек (см. табл. 10-2).



10.2.4. Аксонема ресничек и жгутиков содержит белковые связки, «ручки» и «спицы»

В аксонеме с микротрубочками связано много других белковых структур, взаимодействие которых обеспечивает ресничку энергией и дает возможность использовать эту энергию для производства волнообразных движений. Самые важные из этих структур – короткие боковые выступы («ручки»), отходящие от каждого дублета микротрубочек внешнего кольца по направлению к соседнему дублету. Пары таких выступов располагаются по всей длине микротрубочки с интервалами в 24 нм (рис. 10-27). Они состоят из белка, называемого *динеином*, и, как мы увидим, играют важную роль в движении реснички. Другой белок – *нексин* – образует между соседними дублетами поперечные связки, расположенные на несколько большем расстоянии друг от друга, чем динеиновые ручки. По-видимому, они весьма эластичны и стягивают аксонему по окружности подобно обручам, скрепляющим бочку.

От каждого периферийного дублета внутрь отходит радиальная «спица», заканчивающаяся глобулярным образованием в непосредственной близости от так называемой *центральной капсулы* аксонемы, образованной тонкими загнутыми белковыми отростками, прикрепленными к микротрубочкам центральной пары (рис. 10-27). Видимо, центральная капсула, окружающая центральные микротрубочки, способствует выполнению ими регуляторных функций при движении аксонемы. Если смотреть на аксонему сбоку, то все описанные структуры – динеиновые ручки, нексиновые связки, радиальные спицы и отростки центральной капсулы – предстанут в виде боковых выступов, повторяющихся с характерной для каждого их типа периодичностью (табл. 10-3).

Таблица 10-3. Основные белковые структуры в аксонеме реснички

Компонент аксонемы (периодичность расположения вдоль аксонемы)	Функция
Димеры тубулина (8 нм)	Основные компоненты микротрубочек
Динеиновые ручки (24 нм)	Отходят от дублетов микротрубочек; обеспечивают их взаимодействие с соседними дублетами, вызывающее изгибание реснички
Нексиновые связки (86 нм)	Соединяют друг с другом соседние дублеты микротрубочек
Радиальные спицы (29 нм)	Отходят от каждого из девяти внешних дублетов по направлению к центральной паре
Выросты центральной капсулы (14 нм)	Отходят в виде серия боковых ручек от центральной пары микротрубочек; вместе с радиальными спицами определяют характер биения реснички



Структура
типа 9 + 2
в ресничке

9 триплетов
микротрубочек
в базальном тельце

Рис. 10-28. Тонкий срез кортикального слоя инфузория *Tetrahymena* (электронная микрофотография). Плоскость среза пересекает поверхность клетки таким образом, что можно проследить постепенный переход от структуры типа 9 + 2, свойственной аксонеме, к девяти триплетам микротрубочек в базальном тельце.

Внутри клетки реснички и жгутики заканчиваются **базальным тельцем** (рис. 10-28). Базальное тельце имеет форму короткого цилиндра; его внешний диаметр равен диаметру аксонемы, а образующие его параллельные микротрубочки располагаются аналогично микротрубочкам аксонемы. Каждый из девяти периферийных дублетов аксонемы продолжается в базальное тельце, где к нему присоединяется третья неполная микротрубочка. Таким образом, в базальном тельце по окружности расположено девять **триплетов** слившихся микротрубочек; в центре его микротрубочек нет, так как обе центральные микротрубочки аксонемы оканчиваются, не дойдя до базального тельца (см. также рис. 10-49 и 10-51).

10.2.5. Аксонема движется благодаря скольжению микротрубочек [9]

Если эукариотический жгутик отделить от клетки с помощью лазерного луча, он сохраняет способность производить волнообразные движения. Это означает, что двигательный аппарат находится в самой аксонеме жгутика, а не в его основании (как в случае бактериального жгутика – разд. 13.5.5). Изолированная аксонема продолжает двигаться в растворе, содержащем АТФ и ионы Mg^{2+} или Ca^{2+} , даже после удаления плазматической мембраны.

Прямые данные в пользу того, что изгибание ресничек и жгутиков обусловлено взаимным скольжением микротрубочек, было получено в экспериментах с обработкой изолированных аксонем протеолитическими ферментами. Такая обработка разрушает нексиновые связки и радиальные спицы, в то время как динеиновые ручки и сами микротрубочки остаются, по-видимому, интактными. Такая частично гидролизованная структура чрезвычайно чувствительна к АТФ: в присутствии всего лишь 10 мкМ АТФ она расщепляется вдоль, распадаясь на составляющие ее дублеты микротрубочек. Кроме того, под действием АТФ аксонема удлиняется, так как микротрубочки начинают телескопически выдвигаться из ослабленного пучка, и в конце концов ее длина может в 9 раз превысить первоначальную (рис. 10-29). Вероятно, смежные периферийные дублеты способны активно скользить относительно друг друга, и в отсутствие поперечных сшивок (после расщепления нексина) это скольжение ограничивается лишь их собственной длиной. В интактной

Рис. 10-29. Электроновые микрофотографии изолированной аксонемы (из реснички *Tetrahymena*), которую подвергли кратковременной обработке протеолитическим ферментом трипсином, чтобы удалить белковые связки, поддерживающие целостность всей структуры. После добавления АТФ отдельные дублеты микротрубочек (на нижнем фото они показаны в более крупном масштабе) начинают скользить относительно друг друга, что может приводить к удлинению всей структуры в 9 раз. (F. Warner, D. Mitchel, J. Cell. Biol., 89, 35-44, 1981.)

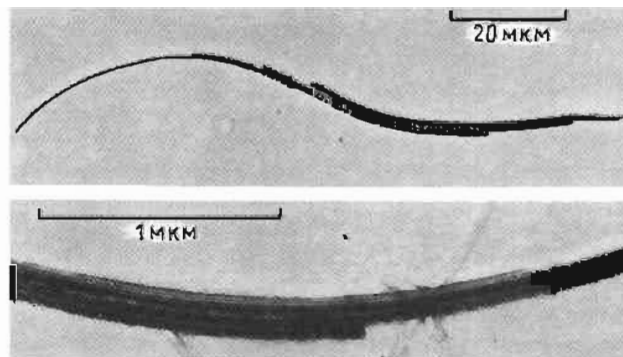


Рис. 10-30. Эта схема показывает, каким образом взаимное скольжение периферических дублетов микротрубочек (А) приводит к их изгибу, если дублеты на одном из концов закреплены (Б).

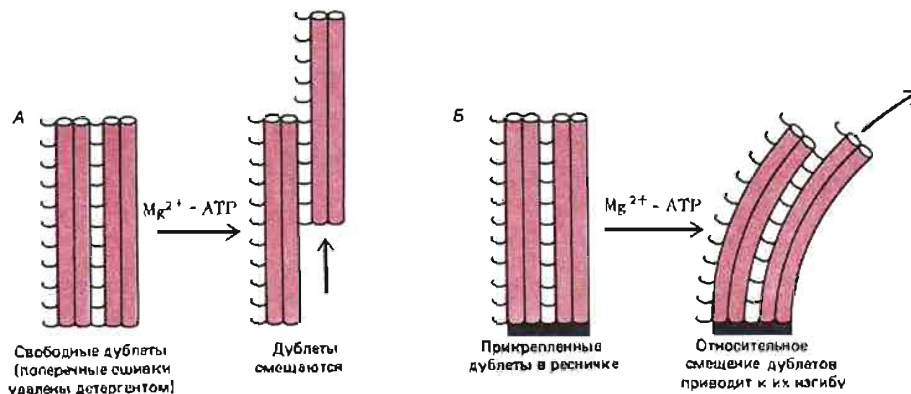


Рис. 10-31. Схематическое изображение базального участка изогнувшейся реснички: видно, как можно использовать радиальные спицы (они пронумерованы группами по три) в качестве маркеров положения для каждого дублета микротрубочек. Прогрессирующее взаимное смещение соответствующих спиц на противоположных сторонах реснички указывает на то, что дублеты микротрубочек скользят относительно друг друга. Это скольжение выявляется также около кончика аксонемы, где дублеты, расположенные на малой кривизне изогнутой реснички, выступают дальше, чем находящиеся на ее большой кривизне (см. рис. 10-30, Б).

структуре взаимное скольжение микротрубочек заставляет ресничку или жгутик изгибаться, как это схематически показано на рис. 10-30.

Идею скользящих микротрубочек подкрепляют результаты электронно-микроскопического исследования ресничек на различных стадиях ее движения. Было показано, что длина микротрубочек не изменяется. Кроме того, правильные ряды радиальных спиц, расположенные в определенном порядке и служащие хорошими маркерами для каждого из девяти дублетов, оказываются смещенными в области изгиба реснички, что указывает на относительное продольное смещение микротрубочек в аксонеме (рис. 10-31).

10.2.6. За скольжение ответствен динеин [10]

Если дублеты микротрубочек активно скользят относительно друг друга, то должна существовать сила, вызывающая это движение. В неповрежденной аксонеме взаимный контакт соседних микротрубочек обеспечивают динеиновые ручки и нексиновые связки, но так как последние разрушаются при ограниченном протеолизе, а мы продолжаем наблюдать скольжение (см. выше), нексин вряд ли может активно участвовать в этом скольжении. Остается динеин. Обычно динеиновые ручки, отходящие от каждого периферического дублета аксонемы, «не дотягиваются» до соседнего дублета. Однако этот контакт возможен, если ресничка использует весь свой запас АТР (рис. 10-32); при этом ориентация ручек изменяется: в присутствии АТР они направлены вниз, в сторону базального тельца, а в его отсутствие — под прямым углом к микротрубочкам.

Многие данные указывают на то, что динеиновые ручки действительно необходимы для движения ресничек и жгутиков. Если динеин селективно экстрагировать из оголенной аксонемы в тщательно контролируемых условиях, то по мере его удаления движение аксонемы замедляется; оно полностью прекращается, когда все динеиновые ручки удалены. Описанные события обратимы: очищенный динеин, добавленный после экстрагирования, вновь образует боковые ручки и восстанавливает способность микротрубочек к АТР-зависимому взаимному скольжению.

Каким же образом динеин порождает силу, заставляющую микротрубочки перемещаться? Этот вопрос существенно прояснило открытие того факта, что динеин сам по себе действует как АТРаза. Это очень крупный белок, состоящий из многих полипептидов, главные из которых имеют мол. массу около 400 000. АТРазная активность изолированного динеина невелика, но она возрастает при добавлении очищенных микротрубочек. Этот эффект аналогичен стимуляции миозиновой АТРазы актиновыми филаментами (хотя и не так резко выражен). Каждая динеиновая ручка развивает примерно такое же усилие, как одна молекула миозина в сокращающейся мышце. Сила при-



Рис. 10-32. Электронная микрофотография препарата реснички, полученного методом замораживания-травления. Динеиновые ручки (ДР) равномерно расположены вдоль всего периферийного дублета микротрубочек (ПД), связывающая его с соседним дублетом. (С любезного разрешения John Heuser.)

кладывается к соседнему дублету микротрубочек, с которым контактируют ручки, и стремится сдвинуть его по направлению к кончику реснички.

10.2.7. Реснички можно изучать генетическими методами [11]

Обычно нетрудно бывает отобрать мутантные организмы, потерявшие способность двигаться. После того как нормальные особи разбегутся, разлетятся или разползутся в разные стороны, останутся либо мертвые, либо парализованные особи. И если за подвижность организма ответственны структурные элементы только одного типа (например, скелетные мышцы или реснички), то для изучения внутреннего строения этих элементов можно использовать всю мощь генетического анализа.

Излюбленный объект подобных исследований — одноклеточная водоросль *Chlamydomonas reinhardtii*, имеющая два жгутика. Было найдено много различных мутантов этой водоросли, лишенных подвижности. У некоторых оказался дефектным механизм образования жгутиков, и последние отсутствовали или сохранялись в зачаточной форме; у других жгутики выглядели вполне нормальными, но были неподвижны. В последнем случае, вероятно, пострадал какой-то белковый компонент их двигательного аппарата. На электронных микрофотографиях таких мутантных жгутиков хорошо видны различные структурные аномалии (рис. 10-33). У одной группы мутантов единственным заметным дефектом было отсутствие динеиновых ручек; у других отсутствовали только радиальные спицы, у третьих — центральная пара микротрубочек вместе с центральной капсулой. Во всех трех случаях изолированные и освобожденные от плазматической мембраны аксономы не были способны двигаться в присутствии АТФ.

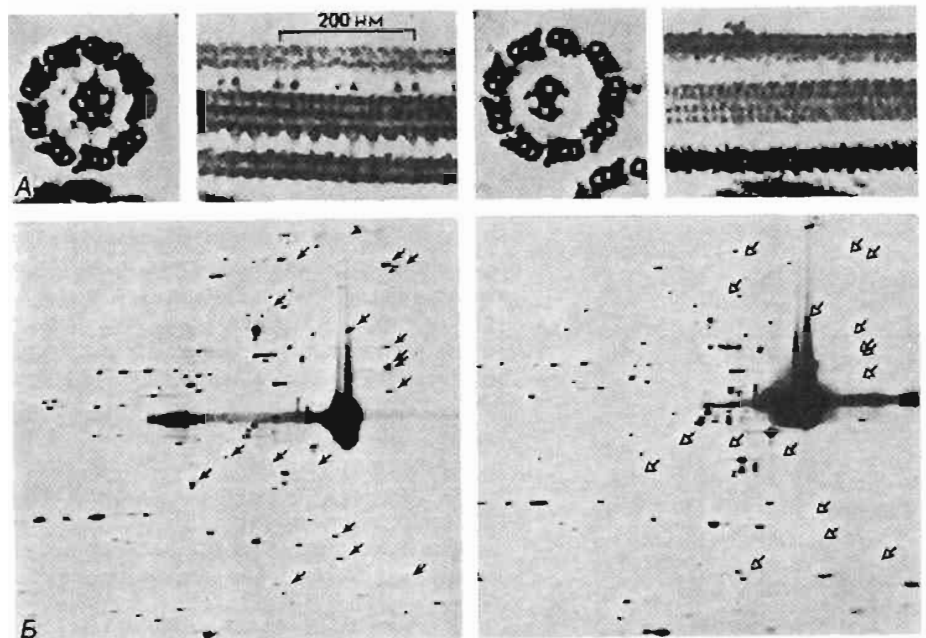


Рис. 10-33. А. Электронные микрофотографии поперечных и продольных срезов жгутиков *Chlamydomonas*: справа — неподвижного мутанта, слева — организма дикого типа. Б. Результаты анализа белков этих жгутиков с помощью двумерного гель-электрофореза. У мутанта нет целого ряда белков. Стрелками указаны позиции 17 таких белков, входящих в состав радиальных спиц. У мутанта первично изменен лишь один из этих 17 белков, однако именно он ответствен за сборку радиальных спиц. В результате формирующиеся жгутики лишены и остальных 16 белков. (G. Piperno et al., J. Cell. Biol., 88, 73–79, 1981.)

Дефекты ресничек и жгутиков встречаются и у человека. Например, различные формы наследственного мужского бесплодия обусловлены неподвижностью спермиев: в зависимости от типа генетической аномалии, жгутик сперматозоида может быть лишен динеиновых ручек (внешних, внутренних или тех и других) либо центральной капсулы с одной или обеими центральными микротрубочками. В точности те же дефекты можно обнаружить и у клеток ресничного эпителия таких индивидуумов, и эти люди нередко страдают хроническими респираторными заболеваниями – рецидивирующим бронхитом и хроническим синуситом: из-за нарушенной функции ресничных эпителиев у них не происходит надлежащего удаления слизи из бронхов и придаточных пазух носа.

Примечательно, что почти у половины людей, страдающих этим синдромом неподвижных ресничек, обнаруживается также весьма редкая особенность – *situs inversus viscerum*, т. е. обращенная асимметрия тела, когда сердце расположено справа, печень и аппендикс слева и т. д. (весь комплекс аномалий носит название *синдрома Картагенера*). В этой связи было высказано предположение, что однонаправленное биение ресничек на ранних стадиях развития может играть ключевую роль в определении нормальной асимметрии нашего тела.

10.2.8. Преобразование скользящего движения микротрубочек в изгиб реснички происходит благодаря центральной капсуле аксонемы [12]

По-видимому, радиальные спицы и центральная капсула регулируют работу динеиновых ручек таким образом, что получается волна движения, распространяющаяся вдоль реснички. Если бы все динеиновые ручки проявили активность одновременно (подобно молекулам миозина в сокращающейся мышце), аксонема попросту закрутилась бы в тугую спираль. Для того чтобы возник локальный изгиб реснички и чтобы этот изгиб в виде бегущей волны распространился от ее основания до самого кончика, нужны специальные регуляторные механизмы, координирующие активность динеиновых ручек. Эта регуляция не может быть связана с потоками ионов Ca^{2+} или каких-либо других ионов, поскольку, как уже говорилось, аксонема сохраняет нормальную подвижность даже в отсутствие плазматической мембраны. Вероятно, активация отдельных динеиновых ручек зависит от механического перемещения других компонентов аксонемы, обусловленного взаимодействием между белками.

По-видимому, преобразование скользящего движения микротрубочек в изгиб реснички происходит с участием центральной капсулы. У некоторых ресничек направление изгиба определяется ориентацией центральной пары микротрубочек и лежит в плоскости, разделяющей две центральные микротрубочки. Существуют, однако, реснички, в которых эта центральная пара микротрубочек отсутствует (их аксонема имеет структуру типа 9 + 0). Они либо неподвижны, как, например, одиночная видоизмененная ресничка (так называемая *первичная ресничка*), которая появляется во время интерфазы у клеток многих типов, либо движутся очень медленно, как, например, жгутики спермиев некоторых насекомых. Интересные наблюдения были сделаны над мутантами *Chlamydomonas*, у которых в жгутиках не было радиальных спиц или же центральной капсулы. Хотя изолированные аксонемы этих мутантов неподвижны, дубликаты микротрубочек в препаратах, обработанных протеолитическими ферментами, оказались способными скользить относительно друг друга. Этот факт наводит на мысль, что активация динеиновых ручек в норме блокируется какими-то другими белками, а сигналы, передаваемые по радиальным спицам и центральной капсуле, снимают эту блокаду, обеспечивая тем самым согласованную работу динеиновых ручек по всей длине жгутика.

Закключение

Реснички и жгутики имеют цилиндрическую сердцевину с девятью дублетами микротрубочек, способными скользить относительно друг друга, что заставляет ресничку изгибаться. От каждого дублета микротрубочек отходят боковые «ручки», состоящие из белка динеина. Как полагают, контакт между динеиновыми ручками одного дублета и микротрубочками соседнего дублета активирует динеиновую АТФазу, что в свою очередь приводит к относительно-му продольному смещению этих двух дублетов. Вспомогательные белки, такие как нексин, связывают дублеты микротрубочек в единый пучок и ограничивают свободу их скольжения. Другие вспомогательные белки, действуя совместно с парой одиночных микротрубочек, расположенных в центре реснички, регулируют скольжение периферийных дублетов микротрубочек, обеспечивая циклический характер движения ресничек.

10.3. Общие черты микротрубочек и актиновых филаментов как динамических ансамблей

Миофибриллы и микротрубочки – относительно стабильные образования, специализированные для производства повторяющихся движений. Однако большинство форм клеточной подвижности связано с лабильными структурами, появляющимися на определенных стадиях клеточного цикла или в ответ на внешний сигнал, а затем снова исчезающими. Из них наиболее известны митотическое веретено и сократимое кольцо, образующиеся при делении клетки. Эти и другие двигательные структуры клетки строятся из микротрубочек и актиновых филаментов, которые по мере необходимости образуются в цитоплазме из растворимого тубулина и актина и распадаются, когда они больше не нужны.

В этом разделе будут описаны некоторые типы движений, связанные с такими временными структурами, и рассмотрены те свойства тубулина и актина, которые делают возможными этого рода движения.

10.3.1. Микротрубочки – это высоколабильные структуры, чувствительные к антимитотическим агентам [13]

Многие микротубулярные системы в клетке весьма лабильны, причем функции некоторых из них прямо связаны именно с их лабильностью. Во время интерфазы микротрубочки лучами расходятся из клеточного центра по всей цитоплазме, однако на раннем этапе деления, когда начинает формироваться веретено, эти цитоплазматические микротрубочки распадаются. В конце митоза происходит обратный процесс. Более специализированная перестройка наблюдается в ловчих щупальцах (псевдоподиях) солнечников – одноклеточных организмов, родственных амёбам. Каждое щупальце содержит несколько сотен параллельно лежащих микротрубочек, связанных в единый пучок (рис. 10-34). Когда животное пытается, щупальца вместе с захваченной добычей быстро втягиваются; такое втягивание щупалец обусловлено быстрой деполимеризацией микротрубочек. Деполимеризация может также быть вызвана воздействием низких температур или ионов Ca^{2+} ; при повышении температуры или удалении ионов кальция микротрубочки и щупальца быстро образуются вновь.

Процессы, подобные только что описанным, возможны благодаря тому, что микротрубочки легко обмениваются молекулами с цитоплазматическим пулом растворенного тубулина: по произведенной оценке, в типичных клетках культуры *in vitro* лишь около половины всего тубулина находится в полимеризованном состоянии. При этом стабильность различных микротубулярных структур сильно варьирует. Одно из самых лабильных образований – митотическое веретено. Оно чрезвычайно чувствительно к различным

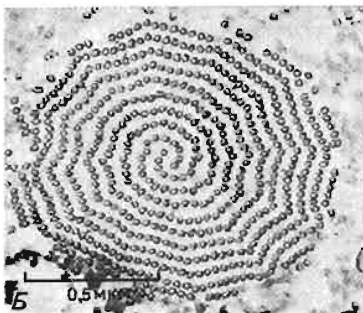
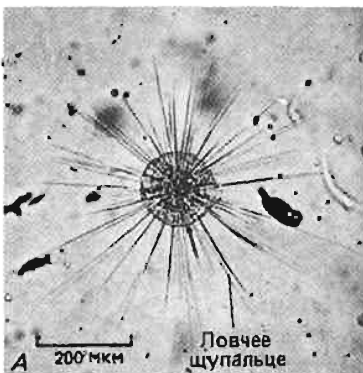


Рис. 10-34. А. Солнечник *Acinosphaerium*. Б. Электронная микрофотография поперечного среза одного из ловчих щупалец этого организма. Сердцевину щупальца образуют две концентрические спирали микротрубочек. (С любезного разрешения L. Tilney.)

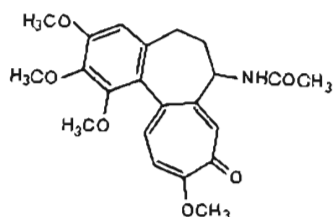


Рис. 10-35. Химическая структура колхицина.

Таблица 10-4. Некоторые химические агенты, связывающиеся с актином или тубулином

	Характер действия
<i>Связываются с тубулином:</i>	
Колхицин, колцемид	Ингибируют присоединение молекул тубулина к микротрубочкам, что приводит к деполимеризации последних
Винбластин, винкристин	Вызывают образование паракристаллических агрегатов тубулина
Таксол	Стабилизирует микротрубочки
<i>Связываются с актином:</i>	
Цитохалазины (В, D, Е и др.)	Ингибируют присоединение молекул актина к актиновым филаментам, что приводит к деполимеризации последних
Фаллоидин	Стабилизирует актиновые филаменты

веществам, способным связываться с тубулином и таким образом препятствовать его полимеризации. Из таких веществ наиболее известен **колхицин** – алкалоид, получаемый из безвременника осеннего; еще древние египтяне применяли его как средство для лечения подагры. Молекула колхицина (рис. 10-35) прочно связывается с тубулиновым димером и не позволяет ему участвовать в полимеризации. Обработка делящихся клеток колхицином (или родственным ему соединением *колцемидом*) приводит к исчезновению митотического веретена и блокирует клетки на стадии митоза (разд. 11.5.2). Поэтому такого рода вещества называют *антимитотическими агентами* (табл. 10-4). Удаление подобного вещества дает возможность веретену образоваться вновь, после чего митоз может продолжаться. *Винбластин* и *винкристин*, тоже ингибирующие образование микротрубочек, широко применяются в качестве противоопухолевых препаратов; их действие связано с тем, что разрушение микротрубочек веретена ведет к избирательной гибели быстро делящихся клеток.

Другое вещество – **таксол** – не подавляет, а, напротив, активирует процессы полимеризации тубулина *in vitro*. Если им обработать живые клетки, большая часть свободного клеточного тубулина войдет в состав новообразованных микротрубочек. Тяжелая вода (D_2O) тоже способствует полимеризации тубулина и тем самым увеличивает количество микротрубочек, например в митотическом веретене. Однако дополнительная стабилизация микротрубочек, вызываемая таксолом или D_2O , так же вредна для клетки, как и их усиленная деполимеризация: клетка с такими «зафиксированными» микротрубочками не может продолжать свой цикл и останавливается на стадии митоза. Таким образом, для нормального функционирования микротрубочек, по-видимому, нужно, чтобы по крайней мере некоторые из них находились в лабильном состоянии, готовые и к дальнейшей сборке, и к деполимеризации.

Факторы, регулирующие сборку микротрубочек или влияющие на их стабильность, будут рассмотрены несколько позже, а сейчас мы обратимся к некоторым клеточным процессам, связанным со сборкой актиновых филаментов, и рассмотрим динамику полимеризации актина и тубулина.

10.3.2. Актиновые филаменты в клетке постоянно образуются и разрушаются [14]

Известно несколько случаев, когда актин быстро полимеризуется в клетке с образованием филаментов. Один из наиболее впечатляющих примеров – *акросомальная реакция* спермиев беспозвоночных. Например, спермий голотурии, приближаясь к яйцеклетке, внезапно выпускает тонкий *акросомальный отросток*, который, подобно гарпуну, пронзает оболочку яйца; этим обеспечивается слияние мембран спермия и яйцеклетки (рис. 10-36; см. также

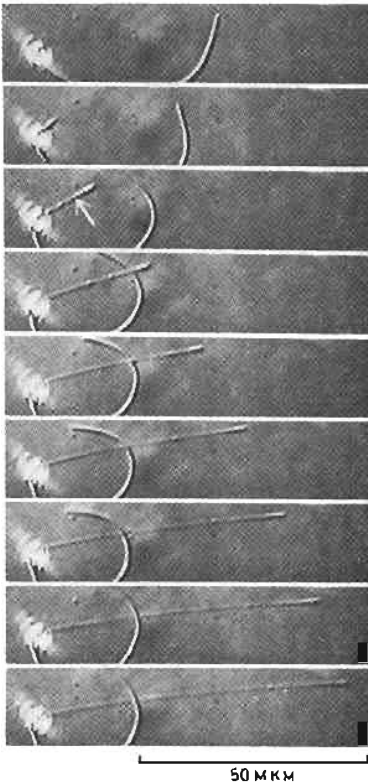


Рис. 10-36. Последовательные стадии удлинения акросомального отростка спермия морского ежа. Фотографии сделаны с помощью светового микроскопа с интервалом 0,75 с, первая из них — через 2 с после искусственной стимуляции акросомальной реакции. Дугообразная структура справа от головки спермия — участок его хвоста, попавший в поле зрения. (L. Tilney, S. Inoué, J. Cell. Biol., 93, 820–827, 1982.)

разд. 14.4.1). Зрелый акросомальный отросток содержит около 25 длинных актиновых филаментов, образующихся в результате почти «взрывной» полимеризации актина: филаменты удлиняются со скоростью примерно 20 мкм/с.

Другой пример — образование отростков у кровяных пластинок. Это округленные фрагменты клеток, лишенные ядра и рибосом, но способные быстро изменять свою форму и выделять в кровь определенные вещества в ответ на повреждение стенок кровеносного сосуда (см. рис. 16-35). В процессе этой реакции кровяные пластинки образуют множество тонких выростов, играющих важную роль в формировании и сжатии кровяного сгустка. Эти выросты содержат большое число актиновых филаментов, быстро образующихся из фракции растворимого актина. Последующее укорочение выростов вызывается не дезагрегацией актиновых филаментов, а взаимодействием последних с молекулами миозина.

Клетки многих типов образуют на своей поверхности *микроворсинки* (рис. 10-37). Эти пальцевидные выросты имеют сердцевину из актиновых филаментов, а их способность удлиняться и укорачиваться основана на полимеризации и деполимеризации актина. Например, поверхность неоплодотворенной яйцеклетки морского ежа покрыта более чем 130 000 коротких микроворсинок. Когда происходит оплодотворение, слияние кортикальных гранул с плазматической мембраной более чем вдвое увеличивает площадь ее поверхности, что сопровождается удлинением микроворсинок. Длина каждой из них за какие-то секунды увеличивается с 0,3 до 1 мкм. Биохимические эксперименты показали, что такое удлинение сопровождается интенсивной полимеризацией актина.

В таких клетках, как кровяные пластинки или неактивированные спермии, значительная доля неполимеризованного актина связана с белком **профилином**. Подобные актин-связывающие белки найдены практически во всех клетках позвоночных и беспозвоночных. Профилин, обладающий мол. массой 16 000, связывается с актином в эквимольном соотношении, образуя легко диссоциирующий комплекс, и таким образом замедляет полимеризацию актина. По-видимому, изолируя часть молекул актина, профилин выполняет роль буфера, поддерживающего в клетке эффективную концентрацию растворимого актина на постоянном уровне; кроме того, регуляторные механизмы, ослабляющие взаимодействие актина с профилином, могли бы в принципе служить «включателями» полимеризации актина. В клетке содержится также целый ряд других связывающих актин белков, и некоторые из них совместно с профилином контролируют процессы образования актиновых филаментов в цитоплазме (см. рис. 10-72 и табл. 10-5).

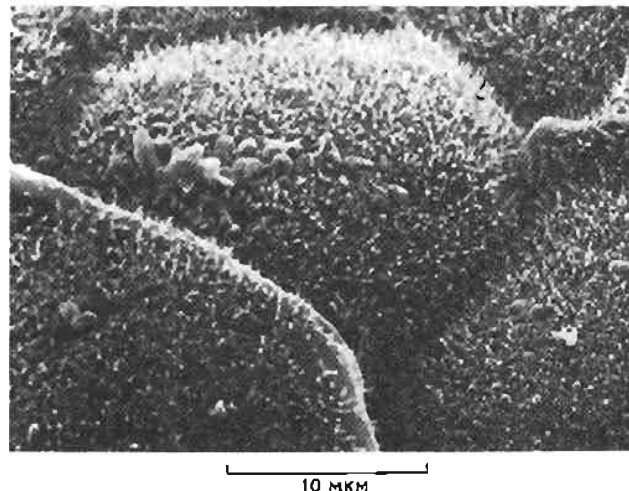


Рис. 10-37. Фотография коротких актинсодержащих микроворсинок на поверхности раковых клеток, растущих в культуре (получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). (С любезного разрешения Günter Albrecht-Buehler.)

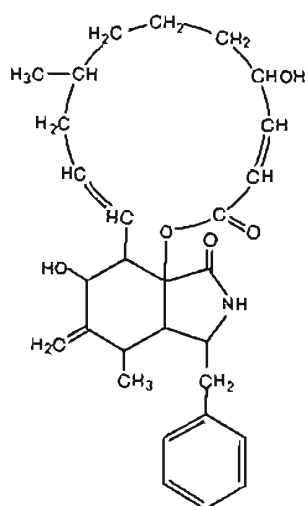


Рис. 10-38. Химическая структура цитохалазина В.

10.3.3. Вещества, влияющие на полимеризацию актина, изменяют поведение клеток [15]

Весьма вероятно, что во всех клетках существует динамическое равновесие между актиновыми филаментами и растворимым актином и что это равновесие играет какую-то роль в клеточной подвижности, например в локомоции или фагоцитозе. Однако в таких случаях трудно выявлять изменения в полимеризации актина, поскольку (в отличие от активации спермиев или кровяных пластинок) здесь они не сопровождаются длительными и легко наблюдаемыми эффектами.

Тем не менее можно показать, что вещества, влияющие на полимеризацию актина, нарушают эти процессы (табл. 10-4). Например, **цитохалазины** (рис. 10-38) — группа метаболитов, выделяемых различными видами плесневых грибов, — ингибируют многие формы подвижности клеток позвоночных: локомоцию, фагоцитоз, цитокинез, образование тонких клеточных выростов, называемых микрошипами (разд. 10.5.3), и сворачивание эпителиальных слоев в трубки. В то же время эти вещества не затрагивают митоз, в основном зависящий от функционирования микротрубочек, и не влияют на мышечное сокращение, которое не связано со сборкой и разборкой актиновых филаментов. Действие цитохалазинов основано на их способности специфически связываться с одним из концов растущего актинового филамента, что препятствует дальнейшему присоединению молекул актина к этому концу.

Фаллоидин — высокотоксичный алкалоид гриба *Amanita phalloides* — в противоположность цитохалазинам стабилизирует актиновые филаменты и подавляет их деполимеризацию. Этот агент не может легко проходить через цитоплазматическую мембрану, поэтому его приходится инъектировать в клетку. Оказалось, что он блокирует миграцию не только амёб, но и различных клеток позвоночных в культуре; по-видимому, процессы сборки и деполимеризации актиновых филаментов играют ключевую роль в амёбоидном движении. Фаллоидин стабилизирует актиновые филаменты, высокоспецифичным образом связываясь с ними по всей их длине; это позволяет использовать его флуоресцентные производные для окрашивания актиновых филаментов внутри клетки (см. рис. 10-78).

10.3.4. Полимеризацию актина и тубулина можно изучать *in vitro* [16]

Изучение свойств очищенного актина в пробирке помогает понять, каким образом полимеризация этого белка регулируется в живой клетке. Как уже упоминалось, актин из скелетных мышц способен *in vitro* к спонтанной агрегации с образованием филаментов; очень сходным образом ведут себя и актины из других источников. Более того, актины, выделенные из таких таксономически отдаленных организмов, как плесневые грибы и позвоночные животные, могут сополимеризоваться и образовывать смешанные филаменты. Ниже мы рассмотрим кинетику этой спонтанной реакции.

Для эффективной полимеризации актина необходим АТФ. Этот нуклеотид присоединяется к молекуле актина и подвергается гидролизу в момент ее присоединения к растущему полимеру. Полимеризация происходит не с постоянной скоростью — она начинается *лаг-фазой*, во время которой не наблюдается заметных изменений вязкости раствора (рис. 10-39). (Напомним, что полимеризацию актина инициирует повышение ионной силы и что за ходом процесса можно следить, измеряя вязкость.) Как полагают, *лаг-фаза* обусловлена тем, что первая стадия образования филамента, когда две или три молекулы должны соединиться друг с другом вполне определенным образом, связана с наибольшими затруднениями. Эта стадия называется *нуклеацией*. Как только она будет преодолена, начнется быстрое последовательное присоединение молекул актина к концу растущего филамента.

В конце концов концентрация мономеров актина в среде снизится до такого уровня, при котором молекулы будут присоединяться к филаменту

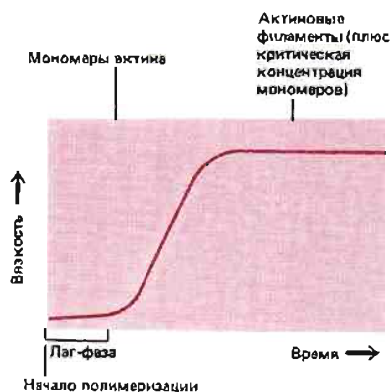
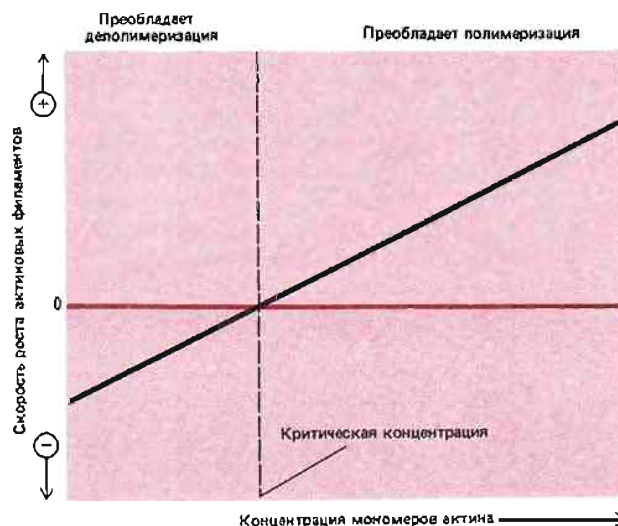


Рис. 10-39. Временной ход полимеризации актина по данным измерений вязкости его раствора. В норме процесс полимеризации инициируется повышением ионной силы и, как показывает кривая, имеет начальную *лаг-фазу*.

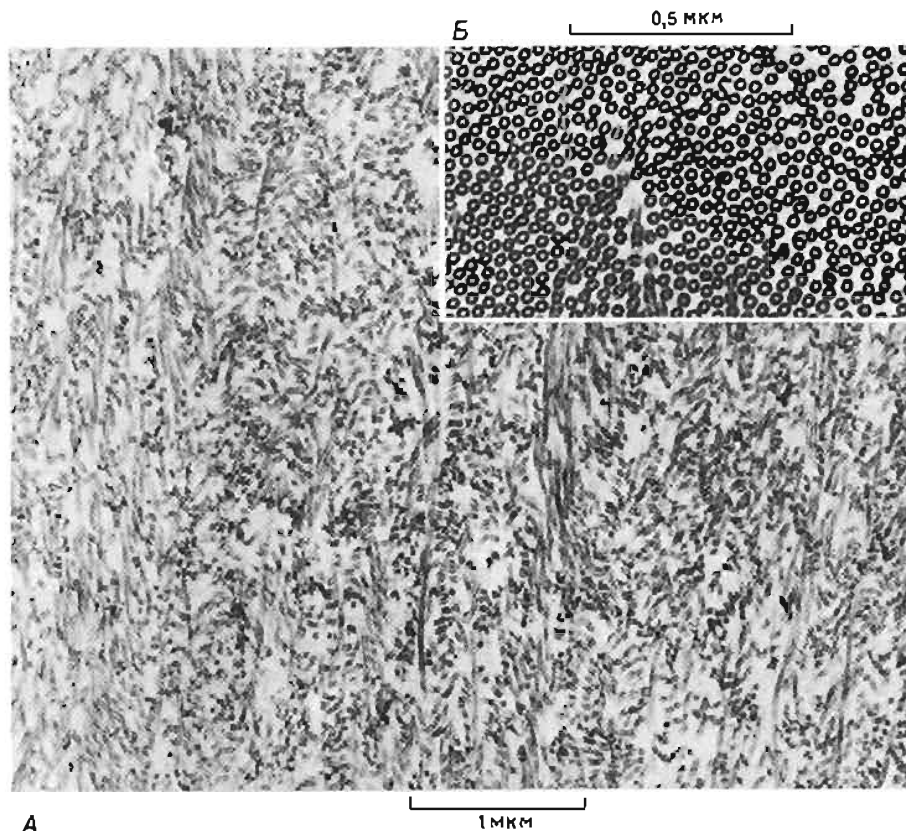
Рис. 10-40. Скорость роста актиновых филаментов при различной концентрации свободных молекул актина. При концентрациях ниже критической новые филаменты не образуются, а уже существующие подвергаются «негативному росту», т.е. распадаются. При концентрациях выше критического уровня происходит формирование филаментов и их удлинение путем присоединения к их концам новых молекул актина. По мере истощения пула свободных мономеров их концентрация падает и в конце концов достигает критической точки, при которой эффективность роста равна нулю: свободные молекулы и филаменты находятся в равновесии друг с другом.



и отщепляться от него с одинаковой скоростью, — до критического уровня. При еще более низких концентрациях сборка актиновых филаментов прекращается, а уже сформировавшиеся филаменты начинают распадаться (рис. 10-40). Некоторые белки, ассоциированные в клетке с актином, могут *in vitro* инициировать его полимеризацию и влиять на образование филаментов (разд. 10.5.10).

Опыты, аналогичные описанным выше, можно провести и с очищенным тубулином — растворимым белком, из которого строятся микротрубочки. Как упоминалось ранее, молекула тубулина в нормальных условиях существует

Рис. 10-41. А. Электронная микрофотография микротрубочек, образовавшихся в результате полимеризации *in vitro*. С помощью центрифуги микротрубочки были осаждены, а затем сделан тонкий срез осадка. Б. Аналогичный препарат микротрубочек (главным образом поперечные профили) при большем увеличении. [С любезного разрешения Olav Behneke (А) и Richard Linck (Б).]



в форме димера, состоящего из одной полипептидной цепи α -тубулина и одной цепи β -тубулина; к димеру обычно присоединена молекула GTP, которая в процессе полимеризации тубулина гидролизует до GDP и фосфата. Но помимо гидролизующейся молекулы GTP тубулиновый димер содержит еще одну, прочно связанную, молекулу GTP, которая не участвует в полимеризации; ее роль пока не известна. Таким образом, в состав микротрубочек входят GTP и GDP – по одной молекуле на каждый димер.

Микротрубочки, построенные *in vitro*, весьма сходны с теми, которые образуются в живой клетке (рис. 10-41). Они полимеризуются при относительно высокой температуре (37°C), а деполимеризуются при низких температурах (4°C). Вещества, вызывающие деполимеризацию микротрубочек в клетке (такие, как колхицин и винбластин) или стабилизирующие микротрубочки (например, таксол) оказывают такое же действие и в системе *in vitro*. Кроме того, в присутствии некоторых вспомогательных белков (разд. 10.4.1) и связывающего кальций регуляторного белка *кальмодулина* (разд. 13.4.5) сборка микротрубочек *in vitro* полностью блокируется или сменяется их распадом при добавлении микромолярных количеств Ca^{2+} ; это заставляет предполагать, что ионы кальция регулируют сборку микротрубочек и в живых клетках.

Кинетика полимеризации тубулина очень сходна с кинетикой полимеризации актина, представленной на рис. 10-39 и 10-40. Относительно быстрой стадии удлинения микротрубочек предшествует лаг-фаза, связанная с образованием начального фрагмента (нуклеацией). Здесь тоже существует некая критическая концентрация свободного тубулина, ниже которой полимеризация невозможна. Центрами нуклеации микротрубочек как в системе *in vitro*, так и в живых клетках могут служить базальные тельца (эти структуры мы рассмотрим в конце главы).

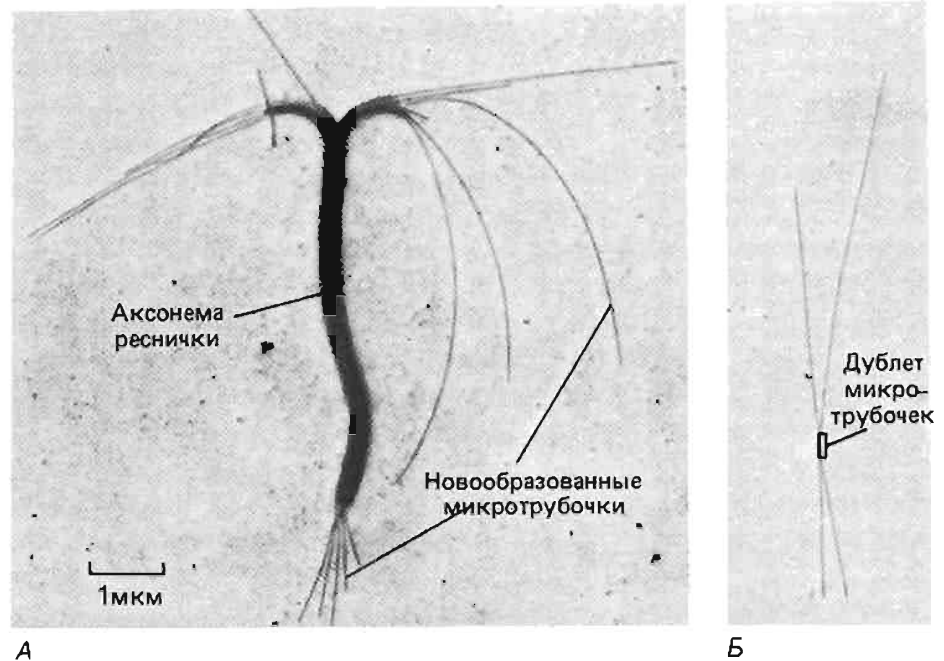
10.3.5. Актиновые филаменты и микротрубочки обладают структурной полярностью и наращиваются с разных концов с неодинаковой скоростью [17]

Актиновые и тубулиновые полимеры обладают структурной полярностью. Это связано с тем, что асимметричные субъединицы располагаются в полимере в определенной ориентации. Структурная полярность полимера как в мышце, так и в ресничке или жгутике необходима для упорядоченного движения. Кроме того, структурное различие между двумя концами полимера имеет важное значение для регуляции его сборки.

Для определения полярности актиновых и тубулиновых полимеров используют связывание их со специфическими белками. Например, S1-фрагменты миозина, представляющие собой его «головки», присоединяются к актиновому филаменту строго упорядоченно, образуя характерные «стрелки», показанные на рис. 10-14. Для микротрубочек не найдено такого удобного маркера, однако недавно выяснилось, что в определенных, не совсем обычных экспериментальных условиях молекулы тубулина могут присоединяться к поверхности уже сформировавшихся микротрубочек, в результате чего образуются искривленные пластинки из протофиламентов, напоминающие в поперечном сечении крючок. Полярность микротрубочки проявляется в том, что этот крючок может загигаться либо по часовой стрелке, либо против часовой стрелки. Оказалось, что микротрубочки в аксонах нервных клеток, в ресничках и около центриолей в митотических и интерфазных клетках имеют одинаковую полярность относительно направления роста.

Как у актиновых филаментов, так и у микротрубочек два противоположных конца наращиваются и деполимеризуются с различной скоростью. Асимметричный рост микротрубочек можно наблюдать, если позволить молекулам тубулина полимеризоваться непродолжительное время на коротких фрагментах аксонымы из ресничек. На рис. 10-42 представлена электронная микрофотография такого препарата; можно видеть, что один конец удлиняется втрое быстрее другого. Как выяснилось, быстро растущий конец (обозна-

Рис. 10-42. Эти электронные микрофотографии демонстрируют преимущественный рост микротрубочек с одного конца. При инкубации фрагмента аксонемы с тубулином из мозговой ткани в условиях, благоприятных для полимеризации, микротрубочки на апикальном конце аксонемы растут быстрее, чем на базальном конце (А). Микротрубочки, образующиеся на концах короткого фрагмента периферийного дублета аксонемы, тоже обнаруживают асимметричный рост (Б). (С любезного разрешения Gary Borisy.)

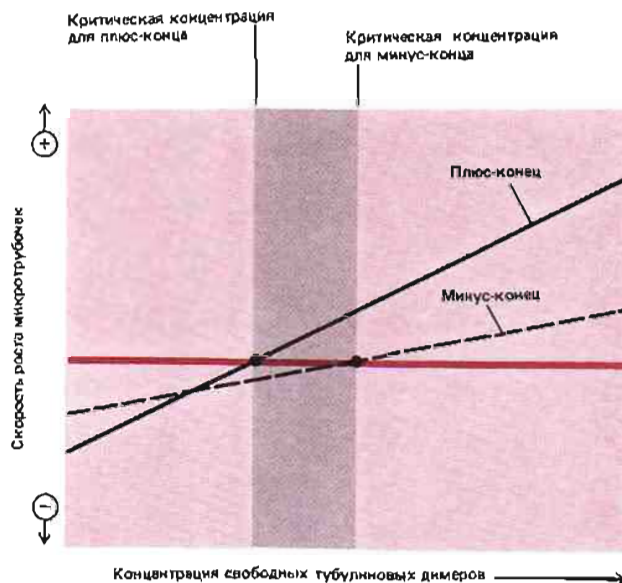


чаемый +) ориентирован в сторону естественной верхушки микротрубочки – это тот самый конец, к которому присоединяются молекулы тубулина в растущей ресничке живой клетки. Аналогичный опыт с актиновыми филаментами показал, что быстро растущий конец соответствует тому, который в мышце закреплен в Z-диске. Весьма вероятно, что во всех клетках имеются белки, способные избирательно связываться с тем или другим концом актиновых филаментов или микротрубочек. Предполагают, что такие *кэпрующие белки* играют ключевую роль в создании определенной пространственной структуры цитоскелета – обеспечивают прикрепление филаментов и микротрубочек к другим клеточным структурам в нужной ориентации, а также независимую регуляцию наращивания или деполимеризации с того или другого конца. Таким образом, структурная организация и стабильность актиновых филаментов и микротрубочек могут в большой степени зависеть от белков, присоединенных к их концам.

10.3.6. Полимеры актина и тубулина могут претерпевать «тредмиллинг» [18]

Полимеризация актина и тубулина не требует затраты энергии – мономеры присоединяются и в присутствии негидролизуемых аналогов нуклеозидтрифосфатов. Однако гидролиз нуклеозидтрифосфатов при полимеризации в естественных условиях способствует конформационному изменению мономеров, включающихся в состав полимера, подобно тому как гидролиз АТФ приводит к изменению конформации миозиновой головки. В результате сродство свободных мономеров к одному из концов полимера становится больше, чем к другому. Иными словами, *критическая концентрация* мономера (т. е. та концентрация, при которой устанавливается динамическое равновесие между полимеризацией и деполимеризацией; разд. 10.3.4) для одного из концов филамента (+) будет ниже, чем для другого (–). С этим связано важное следствие: при некоторых промежуточных концентрациях свободных молекул актина или тубулина в среде соответствующий полимер – филамент или микротрубочка – может находиться в своеобразном стационарном состоянии, в котором к одному концу мономеры будут преимущественно присоединяться, а от другого – преимущественно отщепляться. Это явление получило на-

Рис. 10-43. Скорость роста микротрубочек при различных концентрациях свободных димеров тубулина. График аналогичен представленному на рис. 10-40, за исключением того, что здесь два конца полимера (в данном случае микротрубочки) растут с неодинаковой скоростью и критические концентрации мономеров для них различны. Поэтому существует такой интервал концентраций тубулина (он выделен темным цветом), в котором микротрубочки с одного конца (+) полимеризуются, а с другого (–) – деполимеризуются. Если микротрубочки *in vitro* находятся в равновесии со свободным тубулином, эффективность их роста равна нулю – скорости процесса полимеризации и деполимеризации одинаковы. В этих условиях микротрубочки сохраняют постоянную длину, но обнаруживают явление тредмиллинга (см. рис. 10-44).



звание «тредмиллинг» (рис. 10-43). В таком состоянии скорость наращивания одного конца (+) равна скорости разрушения другого (–), так что суммарный прирост полимера равен нулю. Но, хотя длина полимера и остается неизменной, каждая отдельная молекула мономера непрерывно перемещается вдоль полимера от одного его конца к другому (рис. 10-44). Тредмиллинг актиновых филаментов и микротрубочек требует затраты энергии, источником которой служит гидролиз нуклеозидтрифосфатов, — иначе мы имели бы дело с своего рода вечным двигателем, нарушающим законы термодинамики. Хотя тредмиллинг удавалось наблюдать лишь в довольно необычных условиях *in vitro*, это явление вполне могло бы иметь место и в живой клетке, где при наличии соответствующих сопрягающих механизмов его можно было бы использовать для получения полезной работы.

Помимо всего прочего, существование у полимера двух концов (+ и –), для которых критическая концентрация мономера различна, имеет важное значение для пространственной организации филаментов в клетке. В отношении тубулина, например, есть данные, что концентрация свободных мономеров в цитоплазме очень низка, поэтому свободные незакрепленные микротрубочки должны были бы гораздо быстрее терять молекулы с деполимеризующегося минус-конца, чем наращивать плюс-конец, и в результате попросту растворялись бы. Следовательно, стабильными в клетке могут быть лишь те микротрубочки, у которых минус-конец заблокирован или «заякорен» (рис. 10-45). И в самом деле, микротрубочки в клетке растут из специальных образований, называемых центрами организации микротрубочек, которые за-

Рис. 10-44. Схема тредмиллинга тубулиновых молекул в составе микротрубочки. В условиях равновесия эти молекулы (гетеродимеры $\alpha\beta$) непрерывно присоединяются и отделяются на каждом из концов микротрубочки. Однако в присутствии GTP преобладает связывание мономеров на одном конце (+) и деполимеризация — на другом (–). Вследствие этого образующие микротрубочку молекулы все время перемещаются в ней от одного конца к другому (показано более темным цветом). Сходное явление может наблюдаться и в актиновых филаментах, где тредмиллинг сопряжен с гидролизом АТФ.

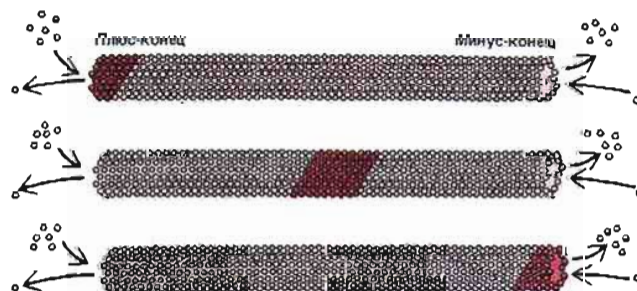
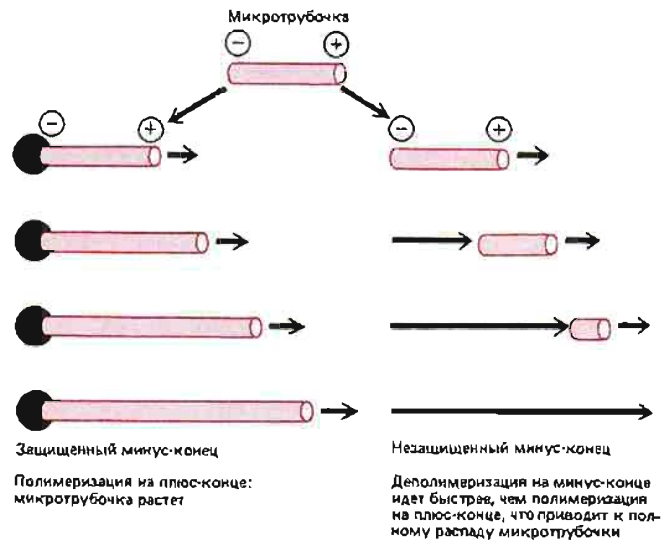


Рис. 10-45. Модель, иллюстрирующая возможный механизм контроля образования микротрубочек в цитоплазме. Предполагается, что концентрация свободного тубулина поддерживается на таком уровне, что микротрубочки с двумя свободными концами постепенно деполимеризуются, а те, у которых свободен только плюс-конец, успешно растут. В этих условиях микротрубочки в клетке могли бы существовать только при наличии специальных мест для прикрепления их минус-концов, а свободных микротрубочек не было бы.



щипают их минус-конец от деполимеризации. В следующем разделе мы рассмотрим некоторые из этих структур, а также другие клеточные компоненты, регулирующие активность микротрубочек в клетках.

Закключение

Актиновые филаменты и микротрубочки в клетке весьма лабильны, если только они не входят в состав таких стабильных структур, как миофибриллы, реснички и жгутики. Они могут быстро формироваться из пула растворимых субъединиц и быстро распадаться, когда нужды в них больше нет. Динамическое равновесие между процессами сборки и расщепления полимеров нарушается под действием специфических веществ, усиливающих или, наоборот, подавляющих полимеризацию, что приводит соответственно к избыточному накоплению в клетке белковых филаментов или к их разрушению.

Актиновые филаменты и микротрубочки могут спонтанно образовываться *in vitro* из актина и тубулина. Полимеризация в обоих случаях протекает сходным образом: имеет место начальная лаг-фаза, связанная с формированием ядер полимеризации; оба процесса сопровождаются гидролизом нуклеозидтрифосфатов—АТФ в случае актина и GTP в случае тубулина. Образующиеся полимеры обладают структурной полярностью и растут в двух противоположных направлениях с неодинаковой скоростью. Есть данные о том, что присоединение филаментов к другим клеточным структурам, а также их сборка и деполимеризация могут независимо контролироваться на обоих концах. Гидролиз нуклеозидтрифосфатов, сопровождающий полимеризацию, по крайней мере *in vitro* может приводить к «тредмиллингу», при котором актиновые или тубулиновые мономеры присоединяются к одному из концов филамента или микротрубочки с такой же скоростью, с какой они отщепляются от другого конца.

10.4. Центры организации микротрубочек; белки, связанные с микротрубочками

Если бы микротрубочки были просто гибкими нитями, плавающими в цитоплазме, они не приносили бы клетке большой пользы. Для того чтобы служить структурным каркасом или выполнять двигательные функции, они должны быть связаны с другими компонентами клетки. У большинства микротрубочек один конец закреплен: реснички и жгутики закорены ба-

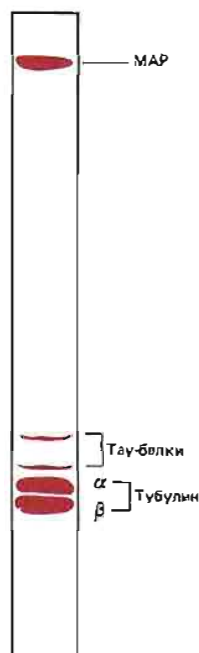


Рис. 10-46. Картина электрофоретического разделения полипептидов из частично очищенных микротрубочек мозговых клеток в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

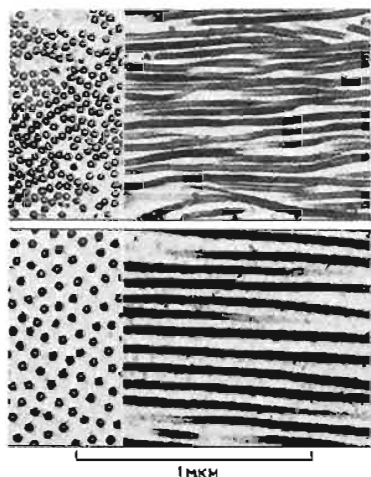


Рис. 10-47. Электронные микрофотографии поперечных и продольных срезов микротрубочек, сформировавшихся в отсутствие (вверху) и в присутствии (внизу) MAP. Обратите внимание, что MAP прикрепляются по всей длине микротрубочек и увеличивают расстояние между ними. (Н. Kim et al., J. Cell Biol., 80, 266–276, 1979.)

зальными тельцами, а цитоплазматические микротрубочки в интерфазных клетках, по-видимому, прикрепляются к особому образованию, лежащему около ядра и называемому *клеточным центром*. Базальные тельца и клеточный центр служат местами, от которых микротрубочки вновь отрастают после искусственно вызванной деполимеризации; по этой причине их называют *центрами организации микротрубочек*. Кроме того, многие микротрубочки, видимо, стабилизируются или прикрепляются к другим клеточным структурам с помощью вспомогательных белков.

10.4.1. Цитоплазматические микротрубочки ассоциированы с другими, вспомогательными белками [19]

Высокоочищенные препараты тубулина в присутствии GTP спонтанно полимеризуются с образованием микротрубочек, однако эффективность этого процесса намного ниже, чем в опытах с менее чистыми препаратами. Примесями, способствующими полимеризации тубулина, выделенного из мозга, оказались белки, которые можно разделить на две группы: белки, ассоциированные с микротрубочками (MAP, microtubule-associated proteins), с мол. массой от 200 000 до 300 000 и так называемые тау-белки с мол. массой от 60 000 до 70 000 (рис. 10-46). В чистом виде белки обеих групп индуцируют полимеризацию очищенного тубулина и связываются с новообразованными микротрубочками. По-видимому, тау-белки присоединяются к нескольким молекулам тубулина одновременно и таким образом повышают интенсивность полимеризации. MAP действуют сходным образом, но отличаются тем, что состоят из двух доменов: один из них присоединяется к микротрубочке, а другой выступает наружу и, возможно, сшивает микротрубочки с другими клеточными компонентами (рис. 10-47). Антитела к белкам обеих групп связываются в клетке с микротрубочками по всей их длине. MAP и тау-белки обнаружены в большинстве клеток позвоночных, где, как полагают (хотя это пока не доказано), они играют определенную роль в регуляции процессов сборки микротрубочек.

10.4.2. Микротрубочки растут из отдельных центров организации [20]

В цитоплазме интерфазных клеток, растущих в культуре, микротрубочки можно выявлять с помощью флуоресцентных антител к тубулину, обрабатывая ими клетки после фиксации. Больше всего микротрубочек вокруг клеточного ядра, от которого они расходятся к периферии подобно нитям тонкой паутины (см. рис. 10-61). Места, из которых вырастают микротрубочки, будут лучше всего видны, если после деполимеризации колхицином позволить им некоторое время расти вновь, а затем фиксировать препарат (рис. 10-48). Регенерирующие микротрубочки сначала появляются в виде одной или двух небольших звездчатых структур, после чего происходит их удлинение в сторону клеточной периферии, пока не восстановится первоначальная картина. Если в культивируемых клетках вызвать образование крючкообразных в поперечном сечении структур (для определения полярности), окажется, что у всех микротрубочек свободными остаются плюс-концы, а минус-концы прикреплены к точке инициации роста, т.е. к центру организации.

Почти во всех животных клетках в середине главного центра организации микротрубочек, называемого *клеточным центром* или *центросомой*, находится пара *центриолей*. Структура *центриолей* показана на рис. 10-49; это цилиндр около 0,3 мкм длиной и 0,1 мкм в диаметре, едва различимый в световом микроскопе. Подобно базальному тельцу реснички или жгутика, центриоль образована девятью триплетами микротрубочек, на поперечном срезе расположенными по окружности (рис. 10-49, Б). Однако не все центры организации микротрубочек содержат центриоли. Например, в делящихся клетках высших растений микротрубочки заканчиваются в неясно отграниченном электроно-

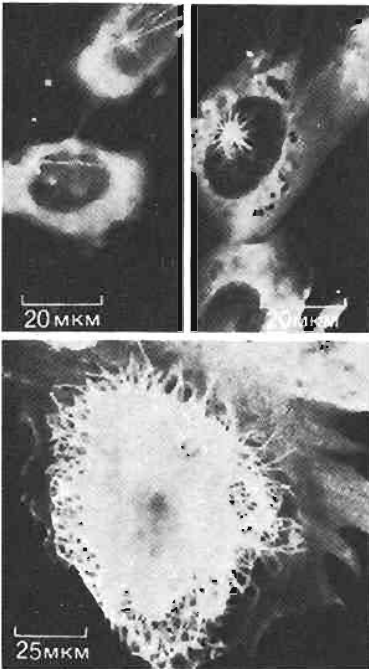


Рис. 10-48. Иммунофлуоресцентные микрофотографии, показывающие восстановление микротрубочек в культивируемых клетках, подвергавшихся в течение часа воздействию колцемияда. В разные сроки после удаления колцемия клетки обрабатывали флуоресцирующими антителами к тубулину. Микротрубочки сначала появляются в виде звездчатых структур, а затем растут по направлению к периферии клетки. (M. Osborn, K. Weber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 867-871, 1976.)

Рис. 10-49. А. Схема строения центриоли. Центриоль состоит из десяти триплетов микротрубочек, причем каждый триплет содержит одну полную микротрубочку (а) и две примыкающие к ней неполные микротрубочки (b и c). Особые белки образуют поперечные ступки, поддерживающие цилиндрическую структуру (выделены цветом). Строение центриоли идентично строению базального тельца реснички. Б. Электронная микрофотография поперечного среза, проходящего через три базальных тельца уже из кортикального слоя простейшего *Saccinobacculus ambloaxostylus*. (С любезного разрешения D. T. Woodrum и R. W. Linck.)

плотном участке, лишенном центриолей. Центриоли не выявляются и в мейотическом веретене ооцитов мыши — здесь они возникают позже, на ранних стадиях развития эмбриона.

10.4.3. Центриоли и базальные тельца идентичны в структурном отношении и функционально взаимозаменяемы [21]

Центриоли и базальные тельца очень сходны, если не идентичны, по своей структуре и во многих случаях могут превращаться друг в друга. Так, например, одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas* имеет два жгутика, каждый со своим базальным тельцем; в начале митоза жгутики исчезают, а базальные тельца мигрируют в глубь клетки, ближе к ядру, где служат центрами организации митотического веретена. По завершении митоза центриоли снова становятся базальными тельцами, от которых вновь отрастают жгутики. У клеток позвоночных в культуре часто появляется так называемая **первичная ресничка**, растущая от клеточного центра, с системой микротрубочек типа 9 + 0. Эта ресничка неподвижна, и начало ей дает лишь одна из пары центриолей, исчезающая перед началом митоза.

У многих организмов яйцеклетки, по-видимому, лишены активных центриолей, в то время как спермии содержат базальные тельца (или центриоли), которые они передают яйцеклетке при оплодотворении. Эти образования служат центрами организации митотического веретена для первых делений дробления. Сходный эффект был получен экспериментально путем инъекции очищенных базальных телец из *Chlamydomonas* или инфузории *Tetrahymena* в яйца лягушки: в цитоплазме формировались фигуры митотических звезд. Это показывает, что базальные тельца могут выполнять функцию центриолей в клетке, готовящейся к делению.

10.4.4. Центриоли обычно возникают путем дупликация [22]

На фоне непрерывного увеличения массы животной клетки в клеточном цикле выделяются два дискретных акта дупликации: первый — это удвоение числа хромосом, а второй — удвоение центриолей. В результате последнего процесса

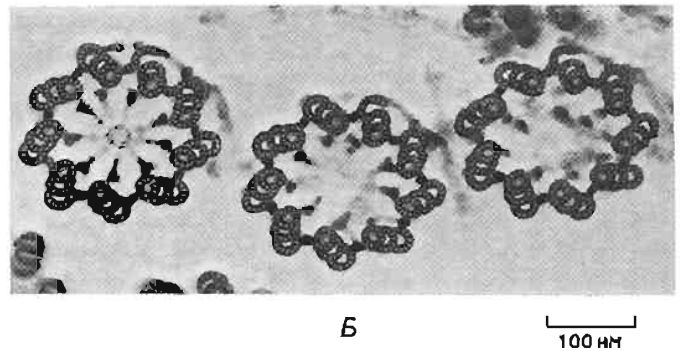
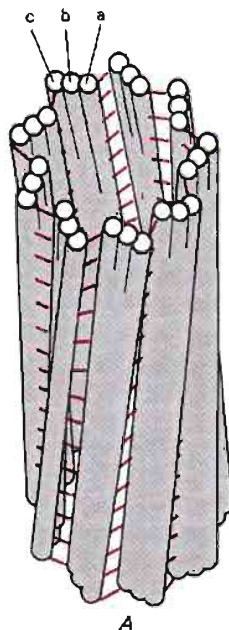
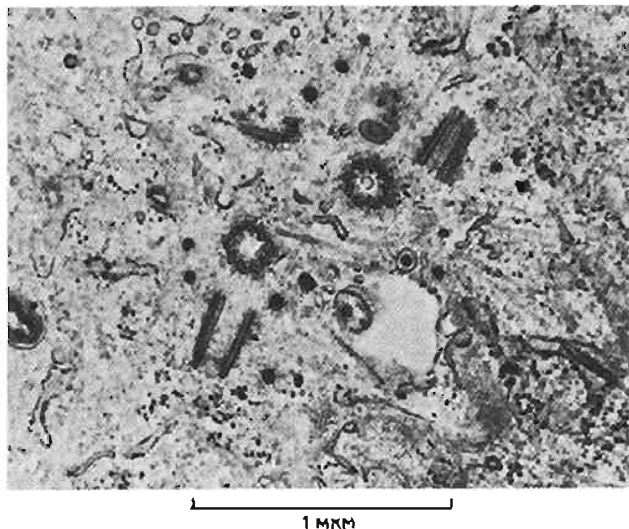


Рис. 10-50. На этой электронной микрофотографии видны две новые центриоли, образовавшиеся в результате репликации двух материнских центриолей. На срезе одна центриоль из каждой пары видна в поперечном сечении, а другая – в продольном, так как в каждой паре центриоли расположены под прямым углом друг к другу. (M. McGill et al., J. Ultrastruct., 57, 43–53, 1976.)



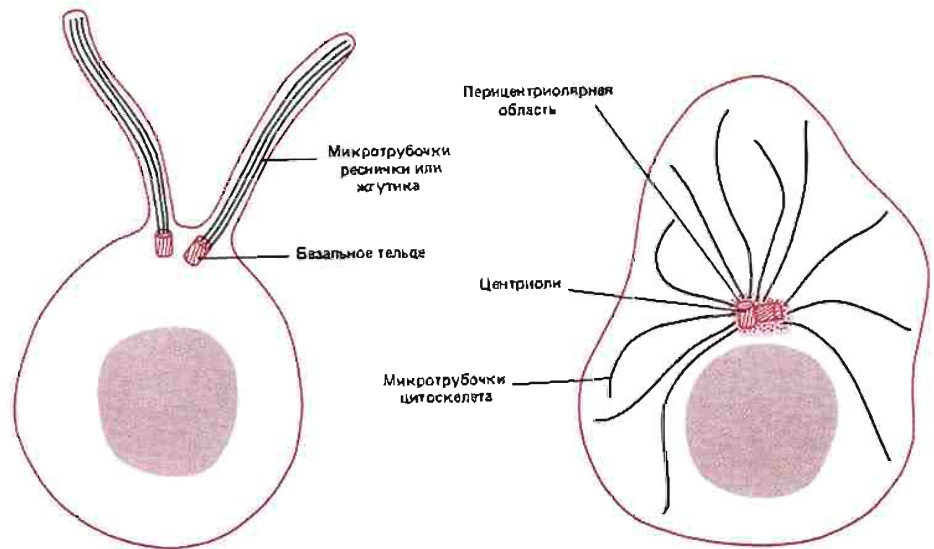
образуются полюсы митотического веретена. В культивируемых фибробластах удвоение центриолей приблизительно совпадает по времени с началом синтеза ДНК. Центриоли обычно представлены парами, члены которых расположены под прямым углом друг к другу. Новая пара центриолей формируется по соседству с уже существующей, и этот процесс протекает сходным образом почти у всех эукариотических организмов. Сначала члены первоначальной пары расходятся; затем у базального конца каждой материнской центриоли (этот конец соответствует тому концу базального тельца, который не связан с ресничкой) перпендикулярно к ней возникает дочерняя центриоль (рис. 10-50; см. также рис. 11-19). Новообразованная незрелая центриоль содержит 9 одиночных микротрубочек; по-видимому, каждая микротрубочка служит матрицей при сборке триплетов, свойственных зрелой центриоли.

У позвоночных ресничные клетки имеют сотни ресничек, и центриоли клеток-предшественников обеспечивают образование необходимого количества базальных телец. Например, в процессе дифференцировки клеток ресничного эпителия, выстилающих яйцевод и трахею, пара центриолей мигрирует со своего обычного места около ядра в апикальную область клетки, где формируются реснички. Там, вместо того чтобы образовать, как обычно, одну дочернюю центриоль, каждая материнская центриоль дает начало многочисленным электроплотным «сателлитам». Из этих сателлитов затем образуются базальные тельца, которые перемещаются в сторону клеточной мембраны, чтобы там инициировать рост ресничек.

Известны, однако, случаи, когда центриоли, по всей видимости, возникают *de novo*. Например, несмотря на то что неоплодотворенные яйцеклетки некоторых видов как будто бы не содержат функционирующих центриолей и для первого митоза после оплодотворения используют центриоли спермия (см. выше), в определенных условиях (таких, как резкое нарушение ионного баланса или электрическая стимуляция) они могут образовывать то или иное число собственных центриолей. Каждая такая центриоль формирует небольшую фигуру звезды, одна из которых может затем использоваться клеткой во время деления, приводящего в дальнейшем к развитию гаплоидного организма (описанный процесс называют *партеногенезом*). Таким образом, есть основания предполагать, что в цитоплазме неоплодотворенных яиц существуют какие-то предшественники центриолей.

Необычный способ дупликации и непрерывность поколений центриолей наводят на мысль, что последние являются саморегулирующимися автономными органеллами, может быть даже имеющими собственный геном. Хотя у нас еще нет прямых подтверждений этой гипотезы, имеются косвенные данные, указывающие на присутствие в центриолях функциональной РНК.

Рис. 10-51. Хотя центриоли и базальные тельца чрезвычайно сходны (если не идентичны) в структурном отношении, они, как видно из этих схем, служат центрами организации микротубулярных систем совершенно разного типа.



10.4.5. Какова функция центриолей?

Сравнительно легко представить себе, каким образом девять триплетов микротрубочек, образующих базальное тельце или центриоль, дают начало аксоному реснички или жгутика, содержащей столько же периферийных дублетов. Но такого прямого соответствия уже нет, когда в интерфазной или митотической клетке образуются сотни микротрубочек, лучами расходящихся из центриоли (рис. 10-51). И действительно, детальное исследование показало, что большинство цитоплазматических микротрубочек не возникает прямо из центриолей, а исходит из окружающей их интенсивно окрашивающейся области — так называемого **перицентриолярного материала**. В клетках, лишенных центриолей, микротрубочки тоже начинаются в электроноплотной области, которая, видимо, служит подлинным центром их организации.

Так какова же действительная роль центриолей? Согласно одной из крайних точек зрения, центриоли — это органеллы, единственная функция которых состоит в образовании ресничек или жгутиков; их физическая ассоциация с клеточным центром и с полюсами веретена нужна лишь для равномерного распределения материала, способного к образованию базальных телец, между дочерними клетками. Однако митотическое веретено с центриолями на обоих полюсах и множеством расходящихся от них микротрубочек представляет собой четко локализованную структуру, тогда как в клетках, лишенных центриолей, например у растений, нити веретена в гораздо меньшей степени «сфокусированы» у полюсов. Кроме того, ряд косвенных данных указывает на то, что в животных клетках центриоли играют роль главных организующих элементов, от которых зависит точное положение перицентриолярного материала, а тем самым и структурная полярность всей клетки (см. разд. 10.74).

Заключение

Большинство микротрубочек ассоциировано с вспомогательными белками, такими как MAP или тау-белки, которые, по-видимому, регулируют сборку микротрубочек и обеспечивают их взаимодействие с другими компонентами клетки. Вспомогательные белки входят также в состав центров организации микротрубочек, к которым последние прикреплены одним концом. Наиболее важным центром организации микротрубочек служит так называемый клеточный центр, который окружает пару центриолей.

Базальные тельца и центриоли имеют одинаковую структуру и взаимозаменяемы по своим функциям, однако различаются по способу образования микротрубочек. Базальное тельце лежит у основания аксонемы реснички или жгутика; микротрубочки, составляющие аксонему, являются прямым продолжением микротрубочек базальных телец. В отличие от этого цитоплазматические микротрубочки не растут прямо из центриоли, а возникают в окружающей ее аморфной перичентриолярной области. Центриоли существуют парами и обычно образуются рядом с уже имеющимися. Пара центриолей, находящихся в клеточном центре, вероятно, играет ключевую роль в организации цитоскелета: многочисленные цитоплазматические микротрубочки расходятся во все стороны именно из этой области.

10.5. Актиновые филаменты и белки, связывающиеся с актином, в немых мышечных клетках [23]

Актин составляет значительную долю белка всех эукариотических клеток; например, в фибробластах эта доля достигает почти 10%, причем около половины входит в состав филаментов. В немых мышечных клетках актиновые филаменты выполняют по меньшей мере две функции. Во-первых, они образуют пучки с поперечными сшивками, служащие опорой для различных внутриклеточных структур и наружных отростков. Во-вторых, совместно с миозином они формируют различные сократительные системы, которые, по-видимому, ответственны за многие проявления клеточной подвижности.

В этом разделе мы сначала познакомимся с опорными структурами, состоящими из актиновых филаментов, затем рассмотрим некоторые актомиозиновые сократительные системы немых мышечных клеток и, наконец, расскажем о ряде белков, связывающихся с актином, при участии которых актиновые филаменты в клетке организуются в трехмерную сеть.

10.5.1. Микроворсинки содержат пучки актиновых филаментов [24]

Многие наружные выросты клеток имеют внутри пучок актиновых филаментов. Некоторые из этих образований обладают подвижностью, например способны быстро вытягиваться и втягиваться, но главная функция актиновой «сердцевинки» состоит, по-видимому, в обеспечении механической жесткости.

Наиболее известный пример такого рода выростов — микроворсинки. Они покрывают свободную поверхность многих эпителиальных клеток, особенно там, где нужно обеспечить наибольшую площадь для всасывания, например в кишечнике или почках. Эти пальцевидные выросты длиной около 1 мкм и диаметром 0,1 мкм часто образуют в совокупности подобие густой щетки. В тонком кишечнике человека одна эпителиальная клетка имеет на своей рабочей поверхности (которую называют *щеточной каймой*) несколько тысяч микроворсинок (рис. 10-52) — они в 25 раз увеличивают площадь всасывающей плазматической мембраны.

Сердцевина микроворсинки состоит примерно из 40 актиновых филаментов, тянущихся параллельным пучком по всей ее длине. В самой верхушке микроворсинки эти филаменты закреплены в сгустке аморфного материала, а у основания они входят в густое сплетение, образованное в основном актиновыми филаментами и называемое *терминальной сетью*. Терминальная сеть содержит также миозин и, возможно, создает определенный тонус, необходимый для того, чтобы микроворсинки стояли прямо.

Актиновые филаменты в микроворсинках имеют одинаковую ориентацию, которая была определена по связыванию с ними S1-фрагментов миозина: плюско-концы закреплены в верхушке микроворсинки (рис. 10-53). Такая ориентация обычна для актиновых филаментов, прикрепляющихся к мембранам; она также совпадает с ориентацией актиновых нитей, прикрепленных к Z-дискам в скелетных мышцах (рис. 10-53). Филаменты связаны с мембраной ми-

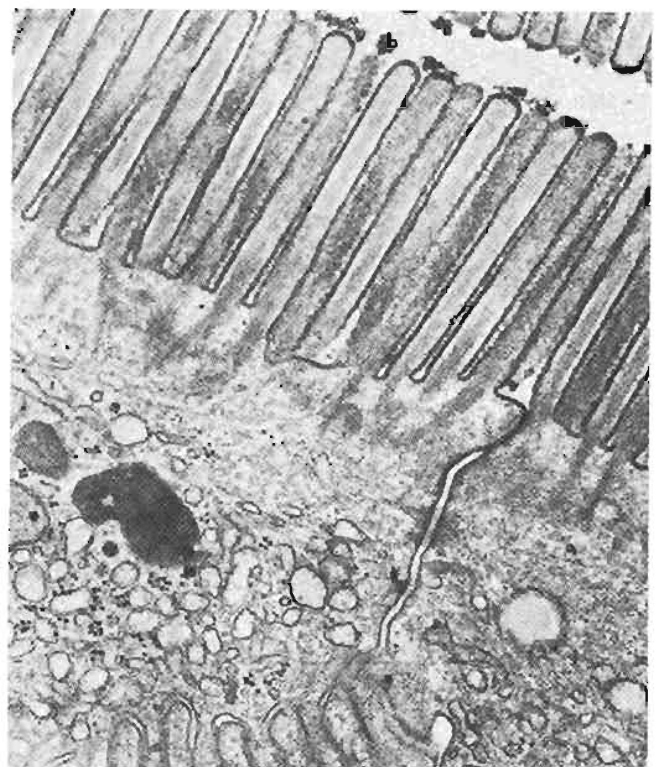
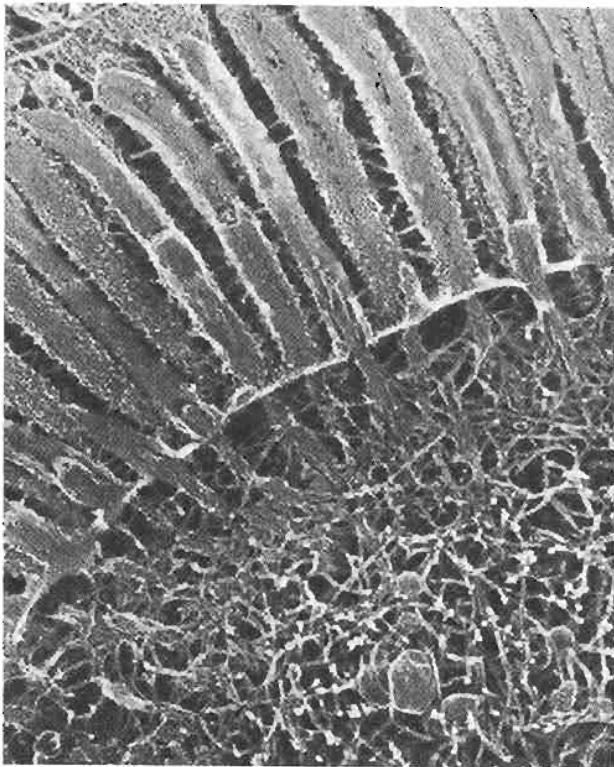


Рис. 10-52. Две электронные микрофотографии щеточной каймы клеток из тонкого кишечника. А. Препарат, полученный методом замораживания – травления с предварительной экстракцией детергентом. (С любезного разрешения John Heuser.) Б. Обычный тонкий срез. (P. T. Matsudaiga, D. R. Burgess, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 845–854, 1982.)

кроворсинки не только в ее верхушке, но и по всей длине: для этого служит спиральная «лестница» из тонких боковых мостиков.

Жесткость всего пучка обеспечивают поперечные сшивки между соседними актиновыми филаментами. Важным компонентом этих поперечных сшивок является белок *фимбрин*, который имеется и в других актин-содержащих выступах клеточной поверхности. Кроме фимбрина в состав микроворсинок входит много других белков, связывающихся с актином; из них наиболее изучен *виллин*, однако его функции неясны. Эти и другие подобные актин-связывающие белки мы подробнее рассмотрим позже.

10.5.2. Жесткие пучки поперечношпигтых актиновых филаментов участвуют в рецепции звука [25]

Содержащие актин микроворсинки участвуют не только в процессах всасывания. В глазу кальмара, например, каждая ретикулярная клетка несет на своей поверхности сотни тысяч плотно упакованных микроворсинок, покрытых светочувствительной мембраной. В соседних клетках правильные ряды этих микроворсинок расположены под прямым углом друг к другу, что дает животному возможность распознавать плоскость поляризации света (рис. 10-54).

Еще более удивительным примером специализации могут служить *волосковые клетки* в улитке и преддверии внутреннего уха. Эти клетки чрезвычайно чувствительны к малейшему движению, будь то вибрация, вызы-

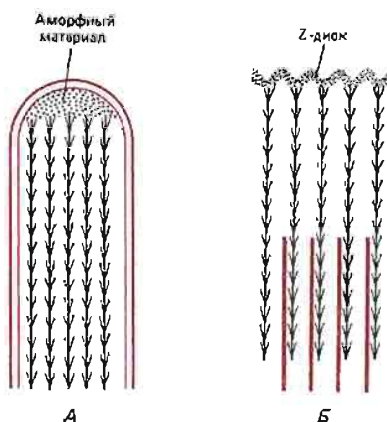


Рис. 10-53. Полярность актиновых филаментов в микроворсинке (А) и в мышечном саркомере (Б). В виде стрелок изображены S1-фрагменты миозина. Плюс-концы филаментов расположены у верхушки микроворсинки и в Z-диске саркомера.

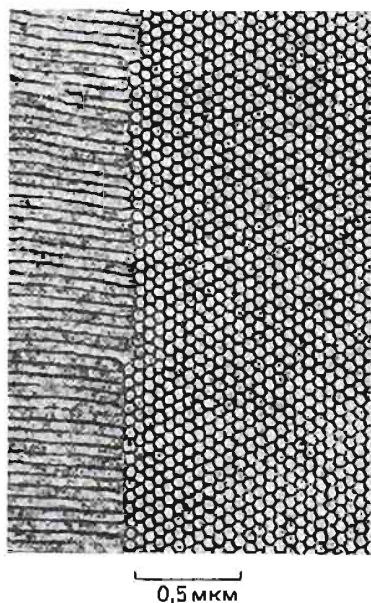


Рис. 10-54. Электронная микрофотография микроворсинок в сетчатке глаза кальмара. Микроворсинки покрыты светочувствительной мембраной и уложены в виде параллельных рядов. Показана зона контакта двух смежных клеток (плоскость среза перпендикулярна плоскости сетчатки). Видно, что микроворсинки одной клетки располагаются под прямым углом к микроворсинкам соседней клетки; это позволяет животному воспринимать плоскость поляризации света. (С любезного разрешения Helen Saibil.)

ваемая звуковыми волнами, или перемещение жидкости в полукружных каналах при изменении положения головы. Эти движения детектируются с помощью очень больших специализированных микроворсинок на поверхности волосковых клеток (рис. 10-55). Их называют **стереоцилиями**, хотя этот термин и не совсем точен: у стереоцилии, как и у микроворсинки, сердцевину образуют актиновые филаменты, в то время как истинные реснички (цилии) содержат микротрубочки. На поверхности волосковой клетки стереоцилии различной длины располагаются в строгом порядке—«по росту», подобно трубам органа (рис. 10-56); это жесткие образования цилиндрической формы, суженные у основания. Едва заметные колебания стереоцилий, вызываемые внешними силами, преобразуются в клетке в электрические сигналы, которые затем передаются в мозг (разд. 18.5.2).

Вероятно, особые механические свойства стереоцилий, такие как жесткость и способность сгибаться только у основания, необходимы для тонкой избирательной чувствительности волосковых клеток, благодаря которой они могут, например, реагировать на звуки определенной высоты, выделяя их среди шума в тысячи раз большей интенсивности (разд. 18.5.2). Возможно, что эти механические свойства стереоцилий зависят от расположения поперечных шпиков между актиновыми филаментами, составляющих их сердцевину. Так, например, на поперечном срезе стереоцилии ящерицы актиновые нити образуют довольно нерегулярную структуру, в то время как на продольных срезах виден строгий порядок в их расположении—точки перекреста цепей у всех актиновых спиралей находятся в одной поперечной плоскости. Как показано на рис. 10-57, это результат того, что связующий белок присоединяется к стериически строго определенным участкам двух соседних актиновых спиралей: при этом создается регулярный пучок филаментов даже при неправильном расположении последних в поперечной плоскости.

10.5.3. Динамичные поверхностные структуры с актиновыми филаментами свойственны многим клеткам [26]

Микроворсинки щеточной каймы в тонком кишечнике и стереоцилии, ответственные за рецепцию звука,—относительно постоянные специализированные образования, характерные для определенных типов эпителиальных клеток. В то же время очень многим эукариотическим клеткам свойственны динамичные поверхностные структуры—такие, например, как упоминавшиеся ранее микроворсинки, быстро образующиеся на поверхности яйцеклетки морского ежа после оплодотворения. Клетки, растущие в культуре, тоже нередко образуют множество волосовидных выростов, называемых **микрошпирами**, толщиной около 0,1 мкм и длиной от 5 до 10 мкм. Обычно это происходит тогда, когда клетка прикрепляется к твердому субстрату, мигрирует или округляется перед делением (рис. 10-58). У кончика растущего аксона нервной клетки возникают еще более крупные микрошпиры, называемые **филоподиями**; их длина достигает 50 мкм (см рис. 18-63). Описанные структуры способны быстро вытягиваться и втягиваться—возможно, за счет локальной полимеризации и деполимеризации актиновых филаментов, что, однако, еще достоверно не установлено. Эти филаменты в микрошпирах ориентированы так же, как в микроворсинках кишечного эпителия, но расположены гораздо менее упорядоченно (рис. 10-59). Предполагают, что микрошпиры служат сенсорными приспособлениями, с помощью которых клетка исследует свое окружение (см. гл. 18).

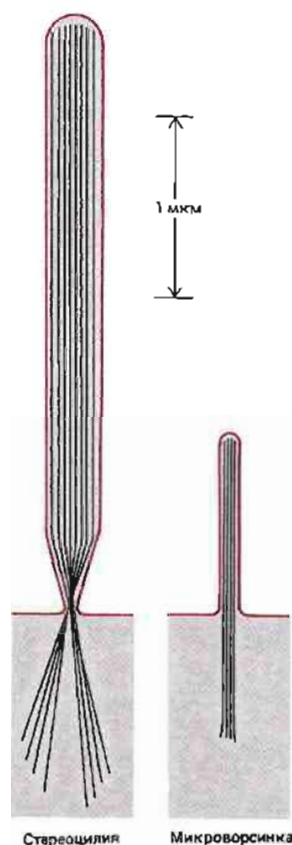


Рис. 10-55. Схематическое изображение тилочной стереоцилии и тилочной микроворсинки, показывающее их относительные размеры. Структурным каркасом обеих органелл служат пучки актиновых филаментов.

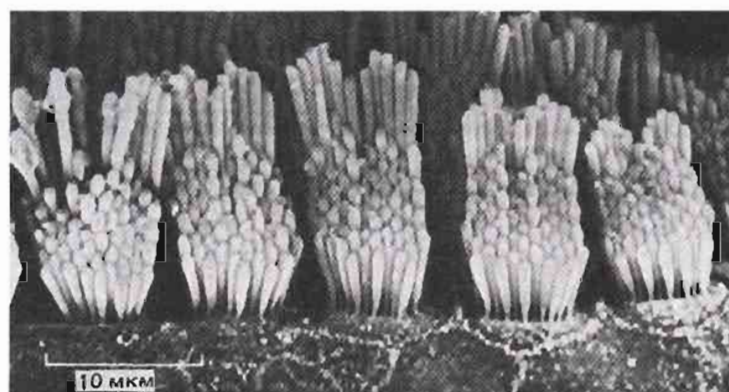


Рис. 10-56. Стереоцилии расположены на поверхности волосковых клеток наподобие органических труб. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения Lewis Tilney.)

Рис. 10-57. Схема расположения актиновых филаментов и поперечных сшивок между ними в стереоцилиях ящерицы. Пять филаментов, изображенных слева, уложены не только параллельно друг другу, но еще и так, что положение витков спирали во всех двойных нитях одинаково (отдельные мономеры актина не показаны). Справа изображена серия поперечных срезов данного пучка. Обратите внимание, что сшивочный белок, например фимбриан (выделен красным цветом), на разных уровнях может связывать разные пары смежных филаментов, поэтому в поперечном сечении филамент имеет нерегулярную структуру.

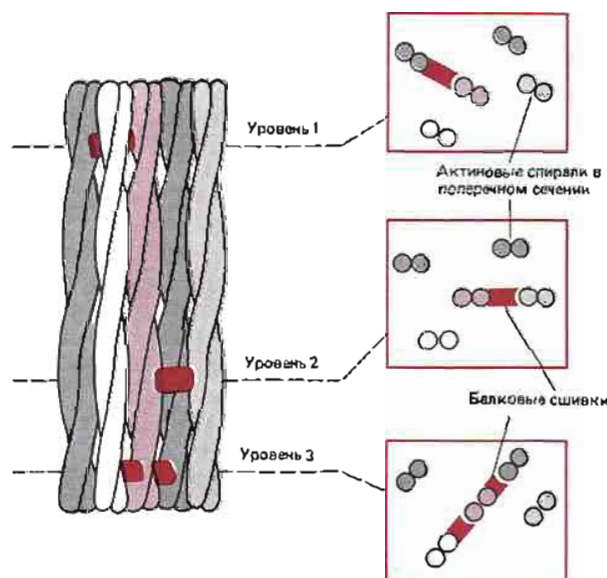


Рис. 10-58. Микрофотография фибробласта, растущего на поверхности культуральной чашки (получена с помощью сканирующего электронного микроскопа). Показаны три типа выростов клеточной поверхности: пузыри (указаны стрелками вниз), ламеллоподии (указаны стрелками слева) и микрошипы (указаны стрелками справа) (см. рис. 10-86). Последние, видимо, служат сенсорными образованиями, позволяющими клетке ориентироваться в окружающей обстановке. (С любезного разрешения G. Albrecht-Buehler.)

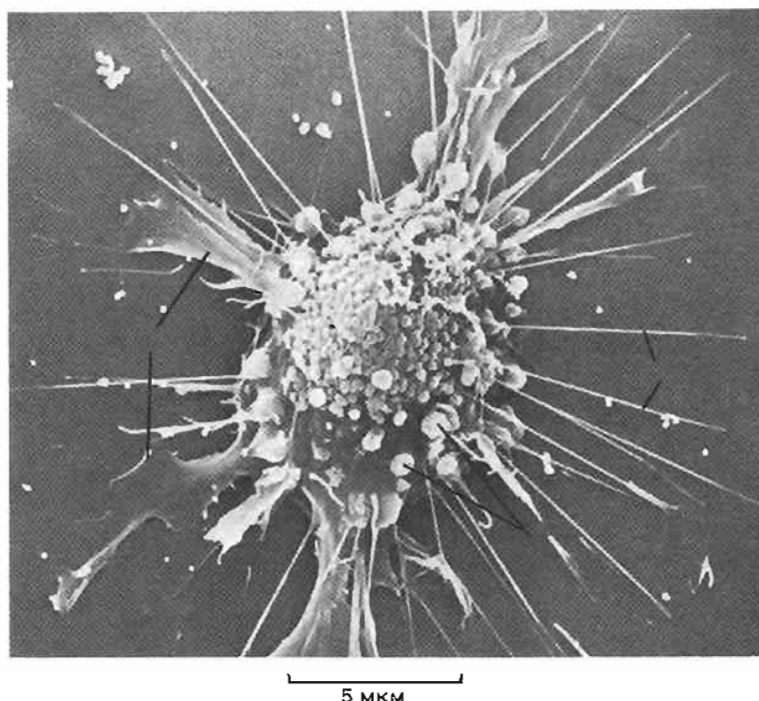


Рис. 10-59. Электронная микрофотография микрофила глияльной клетки человека, растущей в культуре (большое увеличение). Клеточная мембрана и растворимые белки были удалены с помощью детергента; актиновые филаменты выявлены методом негативного контрастирования. (С любезного разрешения Uno Lindberg, Anna-Stina Höglind, Roger Karlson.)

10.5.4. И в немышечных клетках есть небольшие сократимые комплексы, напоминающие сократительный аппарат мышц [27]

Пучки актиновых филаментов имеются не только в поверхностных выступках, таких как микроворсинки или микрошипы. Они есть и в самой цитоплазме почти всех эукариотических клеток. Взаимодействуя с молекулами миозина, такие пучки могут создавать механические напряжения, хотя и гораздо более слабые, чем те, которые генерируются в мышечных клетках. Одним из наиболее ярких примеров может служить опоясывающее клетку **сократимое кольцо** из актина и миозина, которое формируется в делящейся клетке под самой плазматической мембраной. Сокращение этого кольца приводит к образованию перетяжки в середине клетки и в конце концов к разделению ее на две дочерние клетки (рис. 10-60; см. также разд. 11.5.13).

Сократимое кольцо иллюстрирует две основные черты актиновых сократительных систем немышечных клеток. Во-первых, они работают при участии миозина: если в яйцо морского ежа, готовое к делению, ввести антимиозиновые антитела, то ядерное деление будет протекать нормально, но сократимое кольцо не сможет выполнить свою функцию и цитоплазма не разделится. Это позволяет предполагать, что работа сократительных систем цитоплазмы основана на взаимодействии актиновых филаментов с молекулами миозина. Во-вторых, сократимое кольцо не является постоянной структурой: оно обра-



Рис. 10-60. Три основных типа сократительных пучков актиновых филаментов в немых мышечных клетках. В состав этих пучков входят также миозин и другие белки, связывающиеся с актином.

зуется в начале клеточного деления, а в конце его разрушается. Многие другие актиновые сократительные системы – тоже временные образования, формирующиеся в цитоплазме только в случае надобности.

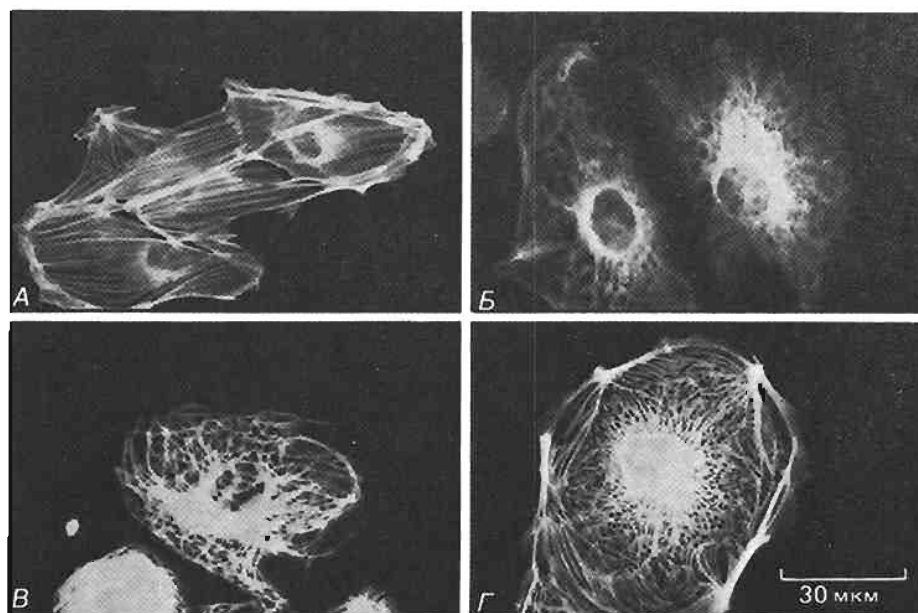
Однако в немых мышечных клетках существуют и более долговременные сократимые комплексы. Таковы, например, кольцевые пучки актиновых филаментов в *опоясывающих десмосомах* (разд. 12.2.1). Они располагаются у апикальной поверхности эпителиальных клеток и, по-видимому, играют важную роль в изменении формы клетки, особенно во время эмбриогенеза. Например, координированное сокращение этих кольцевых пучков сжимает апикальные концы клеток, и в результате эпителиальный слой образует правильную складку (это часто происходит на ранних этапах эмбрионального развития; подробнее см. в гл. 15).

В то время как функции сократимого кольца и опоясывающих десмосом достаточно ясны, роль других систем актиновых филаментов не столь очевидна. Хорошим примером могут служить организованные пучки таких филаментов, называемые *напряженными нитями*, – характерные компоненты цитоскелета культивируемых клеток (рис. 10-60). Они имеют толщину 0,5 мкм и длину около 5 мкм, содержат наряду с актином некоторые другие белки и располагаются в цитоплазме у нижней (прикрепленной к подложке) поверхности клетки. Эти волокна можно отделить от других клеточных компонентов, и в изолированном виде они способны сокращаться в присутствии АТФ. Особенно четко напряженные нити выявляются при иммунофлуоресцентном окрашивании (рис. 10-61), и с помощью этого метода было показано, что они содержат актин, миозин, α -актинин и тропомиозин. Некоторые из этих белков, включая миозин, располагаются вдоль волокна с определенной периодичностью, однако детали строения всего этого комплекса (как, впрочем, и других сократительных систем немых мышечных клеток) остаются неясными. Тем не менее нам все же кое-что известно о свойствах немых мышечных миозина.

10.5.5. Для агрегации миозина в немых мышечных клетках необходимы ионы кальция [28]

Миозин присутствует в различных формах почти во всех эукариотических клетках. Все типы миозина связывают актин, что ведет к активации миозиновой АТФазы, но только в сердечной и скелетных мышцах миозиновые

Рис. 10-61. Иммунофлуоресцентные микрофотографии интерфазных эпителиальных клеток кенгуровой крысы. Для окрашивания были применены: антитела к актину, позволяющие выявить пучки филаментов, называемые напряженными нитями (А); антитела к виментину (см. разд. 10.6.3) – составной части одного из типов промежуточных филаментов (Б); антитубулиновые антитела, выявляющие цитоплазматические микротрубочки (В); антитела к кератину для выявления промежуточных филаментов другого типа, свойственного этим клеткам (Г). (С любезного разрешения Mary Osborn.)



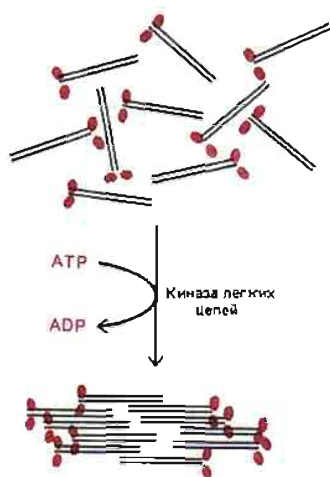


Рис. 10-62. Фосфорилирование легких цепей немышечного миозина Ca^{2+} -зависимой протеинкиназой не только активирует миозин (как это описано для миозина мышц – см. рис. 10-21), но вызывает также агрегацию миозиновых молекул в короткие биполярные пучки.

толстые филаменты можно увидеть с помощью электронного микроскопа. В других клетках миозин можно выявить лишь методом иммунофлуоресценции, особенно там, где актиновые нити организованы в сократительные пучки, но расположение миозиновых молекул в этих комплексах не позволяет определить даже электронная микроскопия. Соотношение миозин/актин в немышечных клетках гораздо меньше, чем в мышцах, и миозиновые филаменты здесь гораздо более тонки и лабильны, чем толстые филаменты скелетных мышц. Это не удивительно, так как они призваны развивать гораздо меньшее напряжение.

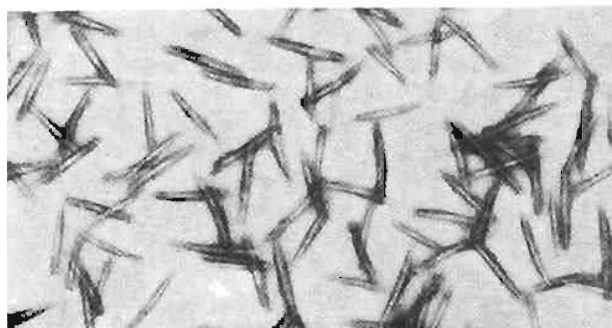
Относительно малые размеры филаментов, образуемых **немышечным миозином**, – лишь одна из трех важных особенностей, отличающих его от миозина скелетных мышц. Вторая особенность – это то, что он активируется, подобно миозину гладких мышц, в результате фосфорилирования легких цепей (разд. 10.1.13). И наконец, третья особенность: фосфорилирование вызывает агрегацию в небольшие биполярные ассоциаты, содержащие от 10 до 20 молекул (тогда как в толстых филаментах скелетных мышц насчитывается около 500 молекул миозина!). Ассоциация происходит за счет хвостовых участков молекул (рис. 10-62 и 10-63). Как и в случае миозина гладких мышц, фосфорилирование немышечного миозина катализирует Ca^{2+} -зависимый фермент миозинкиназа. Поэтому и агрегация молекул немышечного миозина, и его взаимодействие с актиновыми филаментами весьма чувствительны к небольшим изменениям концентрации ионов кальция в цитоплазме. Такие изменения часто происходят в результате реакции клетки на различные внешние сигналы (см. разд. 13.3.8).

10.5.6. Актиновые филаменты часто прикрепляются к клеточной мембране [29]

Для того чтобы сократимый комплекс мог создать реальное механическое напряжение, он должен иметь опору, т.е. должен быть связан с другими клеточными компонентами. Поэтому многие актиновые филаменты (если не большинство их) прикреплены одним концом к клеточной мембране. Это относится и к несократительным актиновым комплексам (вспомним, например, что в микроворсинке центральный пучок актиновых филаментов прикрепляется к плазматической мембране как в верхушке, так и по всей длине). Напряженные нити в культивируемых клетках закориваются в особых участках плазматической мембраны, известных под названием *пластинок прикрепления* или *фокальных контактов* (рис. 10-64). Однако функциональное значение прикрепления филаментов к мембране наиболее очевидно в таких системах, как сократимое кольцо и опоясывающие десмосомы; филаменты должны быть здесь прямо или опосредованно связаны с плазматической мембраной, так как их сокращение призвано изменять форму клеточной поверхности.

Как именно актиновые филаменты прикрепляются к мембране, неизвестно. Иногда можно отчетливо различить тонкие тяжи, идущие от конца фила-

Рис. 10-63. Короткие филаменты немышечного миозина, образовавшиеся в результате фосфорилирования его легких цепей. Электронная микрофотография, негативное контрастирование. (С любезного разрешения John Kendrick-Jones.)



1 мкм

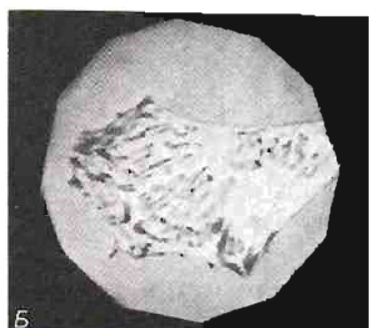
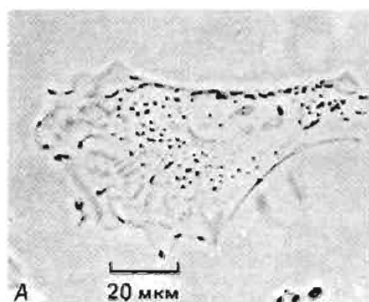


Рис. 10-64. Фазово-контрастная (А) и рефлексно-интерференционная (Б) микрофотографии культуры фибробласта. Видны пластинки прикрепления (фокальные контакты)—особые участки клеточной поверхности, находящиеся в тесном контакте с поверхностью субстрата. Наиболее отчетливо они выявляются с помощью рефлексно-интерференционной микроскопии (Б), в которой используется эффект отражения света от нижней поверхности клетки, прикрепленной к стеклянной пластинке; фокальные контакты видны как более темные участки. (С любезного разрешения Julian Heath.)

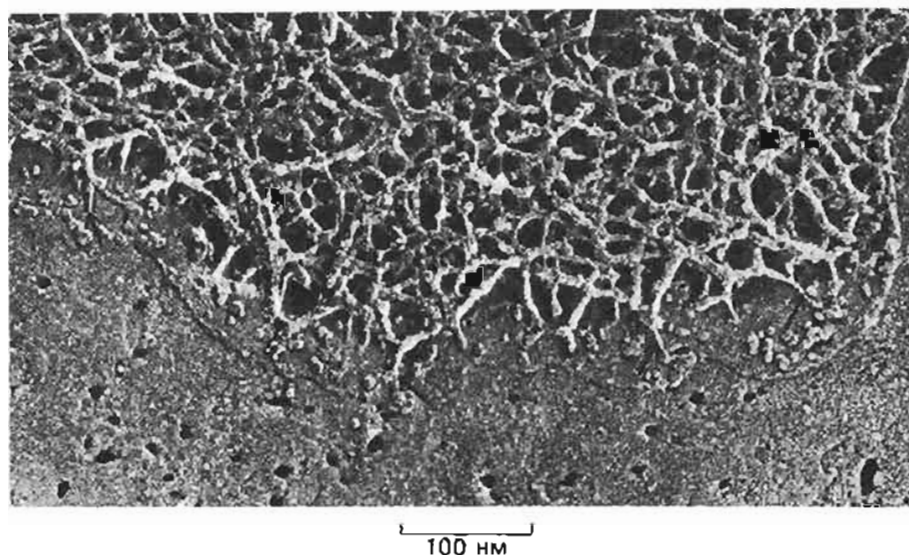
Рис. 10-65. Прикрепление актиновых филаментов к плазматической мембране волосковой клетки из внутреннего уха курицы на участке, свободном от стереоцилий (электронная микрофотография, замораживание—травление). Плоскость скола пересекает мембрану клетки и подстилающую ее сеть актиновых филаментов. Тонкие белковые тяжи (указаны стрелками) соединяют концы актиновых филаментов с плазматической мембраной. (С любезного разрешения N. Higokawa и L. G. Tilney.)

мента к плазматической мембране (рис. 10-65). В других случаях есть косвенные данные об участии особого связующего белка, получившего название **винкулина**. Этот белок был идентифицирован с помощью флуоресцентных антител в местах прикрепления напряженных нитей и в опоясывающих десмосомах. В то же время сам винкулин не является мембранным белком; вероятно, он связывает актиновые филаменты с каким-то интегральным белком мембраны.

10.5.7. Движение амёб и фибробластов связано с функционированием актиновых филаментов [30]

Пожалуй, наиболее сложны и динамичны те ансамбли актиновых нитей, которые обеспечивают перемещение всей клетки. Как мы увидим в последнем разделе этой главы, такой тип движения требует координированной деятельности очень многих компонентов цитоскелета. Однако наиболее прямое участие в нем принимает тонкий слой относительно малопорядоченных актиновых филаментов, находящийся под самой плазматической мембраной. Функционирование этого **кортикального слоя** удобнее всего изучать на некоторых примитивных эукариотах, таких как амёбы и плазмодияльные слизистые грибы. Амёба передвигается, непрерывно выпуская и втягивая короткие отростки, называемые **псевдоподиями**, которые действуют наподобие маленьких ножек (рис. 10-66). Относительно большая величина псевдоподий (более 100 мкм у гигантской амёбы) позволяет видеть их кортикальный слой и другие внутренние детали с помощью светового микроскопа, а скорость их движений вполне подходит для непосредственного наблюдения.

Передвижение большинства клеток позвоночных по своему характеру сильно отличается от локомоции амёбы и происходит гораздо медленнее. Этот процесс больше всего изучали на **фибробластах**—соединительнотканых клетках, которые хорошо растут и передвигаются в культуре. Они почти в 10 раз меньше амёб, и движения их настолько медленны, что наблюдать их лучше всего с помощью видеозаписи или цейтраферной микрокиносъемки. В процессе передвижения фибробласт непрерывно образует на своем переднем конце тонкие уплощенные выступы, называемые **ламеллоподиями**. Некоторые из них прикрепляются к субстрату, но многие волнообразно перемещаются по верхней стороне клетки к ее заднему концу [так называемый раффлинг (ruffling)]. На ламеллоподиях могут формироваться микрошипы,



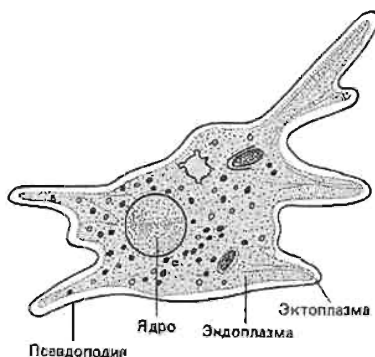


Рис. 10-66. Схематическое изображение движущейся амебы. Гигантская амеба может достигать размеров 0,5 мм – ее видно невооруженным глазом.



Рис. 10-67. Фотографии глияльной клетки человека, движущейся по поверхности культуральной чашки (получены с помощью сканирующего электронного микроскопа). Внизу – передний край клетки при большем увеличении; видны ламеллоподии и микрошпили. (С любезного разрешения Ulf Brunk и Peter Collins.)

напоминающие пальцы на руке (рис. 10-67). Хотя раффлиг, вероятно, имеет место лишь в том случае, если верхняя сторона клетки свободна (как, например, в монослойной культуре), он, по-видимому, связан со смещением клеточной мембраны и/или внутриклеточными процессами, которые обеспечивают передвижение клетки также и в других условиях.

Несмотря на видимые различия между движениями амёб и фибробластов, возможно, что в основе их лежат принципиально сходные механизмы. В самом деле, некоторые клетки позвоночных, например лейкоциты, тоже передвигаются, выпуская псевдоподии, правда, гораздо более миниатюрные, чем у амёб, и движущиеся намного медленнее. Кроме того, на подвижность как амёб, так и фибробластов влияют присоединяющиеся к актину вещества, например цитохалазин В и фаллоидин, которые препятствуют соответственно полимеризации и деполимеризации актина. Это указывает на то, что в обоих случаях движение клеток, возможно, связано с процессами сборки и распада актиновых филаментов.

Для того чтобы понять, какую роль может играть полимеризация и деполимеризация актина в перемещении всей клетки, нам нужно будет рассмотреть сначала некоторые цитоплазматические процессы, сопровождающие амёбное движение, а затем взаимодействия актина *in vitro* с различными белками, возможно лежащие в основе этих процессов.

10.5.8. Амёбное движение сопровождается переходами гель $\rightleftharpoons$ золь в цитоплазме [31]

С помощью светового микроскопа в цитоплазме амёбы выявляются две области: центральная зона жидкой цитоплазмы, называемая **эндоплазмой** (золь), где много различных преломляющих свет частиц и органелл, и окружающая ее студнеобразная прозрачная **эктоплазма** (гель), которая представляет собой необычайно утолщенный кортикальный слой клетки. Во время образования псевдоподии хорошо видно, что в направлении ее выпячивания устремляется поток жидкой эндоплазмы, которая у вершины отростка заметно загустевает и превращается в эктоплазму; в это же время в каких-то других участках клетки эктоплазма преобразуется в более жидкую эндоплазму, которая течет по направлению к новой псевдоподии. Эти взаимные превращения двух слоев цитоплазмы, сопровождающиеся изменением их вязкости и внутренней структуры, носят название переходов гель $\rightleftharpoons$ золь. Существует мнение, пока еще спорное, что движение амёбы отчасти обусловлено сокращением ее толстого кортикального слоя (эктоплазмы), выжимающего более жидкую эндоплазму наружу, что ведет к образованию и удлинению клеточных выступов – псевдоподий. Интенсивные токи цитоплазмы наблюдаются также в плазмодии слизистого гриба *Physarum* и в гигантских клетках водоросли *Nitella* (разд. 19.3.9).

Целый ряд косвенных данных указывает на то, что направленное движение цитоплазмы у амёбы и *Physarum* связано с функцией актина. Во-первых, актиновых филаментов у этих организмов намного больше, чем каких-либо иных белковых волокон, и они сосредоточены в эктоплазме; во-вторых, при введении в клетку присоединяющегося к актину вещества фаллоидина направленные токи в цитоплазме мгновенно исчезают; в-третьих, неочищенные экстракты из цитоплазмы этих клеток обогащены актином, и в них могут наблюдаться сокращения и создаваться направленные потоки.

Последнее обстоятельство дало возможность изучать молекулярную основу движения цитоплазмы. Оказалось, что обогащенные актином экстракты не только из амёб, но и из клеток позвоночных, например макрофагов и фибробластов, при небольших изменениях ионного состава среды могут изменять свою вязкость, сжиматься и расслаиваться на энергично движущиеся потоки. Хотя химический состав этих экстрактов весьма сложен, их главным фибриллярным компонентом является актин; они содержат также различные связывающиеся с актином белки.

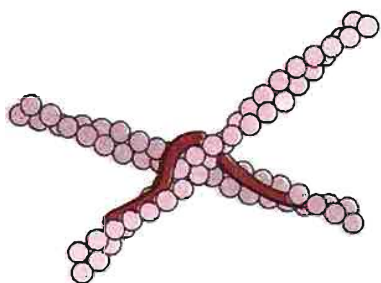


Рис. 10-68. Филамин, образуя гибкие сшивки между соседними актиновыми филаментами, способствует созданию трехмерной сети, обладающей свойствами геля.

10.5.9. В формировании актинового геля участвуют белки, образующие поперечные сшивки [23, 32]

Небольшие компактные молекулы таких белков, как **фимбрин**, могут прочно связывать параллельные актиновые филаменты в плотные пучки (рис. 10-57). Однако не все сшивающие актин белки действуют подобным образом: длинные и гибкие молекулы некоторых из них могут связывать актиновые филаменты независимо от взаимной ориентации последних, и в результате создается неупорядоченная трехмерная сеть (рис. 10-68). Два таких белка – **α -актинин** и **филамин** – первоначально были выделены из мышечной ткани, но сейчас их близкие аналоги найдены в клетках многих типов. Длинные гибкие молекулы филамина (мол. масса около 230 000) имеют тенденцию образовывать в растворе димеры. Каждый мономер имеет участок для связывания с актиновым филаментом, так что димеры филамина идеально приспособлены для формирования «узлов» трехмерной актиновой сети. α -Актинин выполняет аналогичные функции (рис. 10-69). Даже сравнительно небольшие количества филамина или α -активина при добавлении их к раствору, содержащему актиновые филаменты, вызывают резкое изменение его физических свойств – вязкая жидкость превращается в плотный гель.

10.5.10. Фрагментирующие белки могут вызывать Ca^{2+} -зависимое разжижение актиновых гелей [23, 33]

Переходы гель $\rightleftharpoons$ золь в неочищенных экстрактах цитоплазмы из амёб и других клеток очень чувствительны к изменениям концентрации ионов Ca^{2+} : ее повышение с 10^{-7} до 10^{-5} М ведет к разжижению геля, и в образовавшейся жидкости часто возникают сильные потоки.

Реконструированные гели, содержащие актиновые филаменты и филамин, не обнаруживают подобной чувствительности к кальцию. Это означает, что действие Ca^{2+} опосредуется какими-то другими факторами. Было найдено несколько белков, которые при добавлении к актин-филаминным гелям вызвали их разжижение при повышенной концентрации Ca^{2+} . Была высказана мысль, что эти белки в присутствии кальция образуют с актином очень прочный комплекс и могут «вклиниваться» в актиновые филаменты, разъединяя составляющие их субъединицы (рис. 10-70), а это в свою очередь приводит к разрушению актин-филаминной сети. Присутствие даже одной молекулы такого актин-фрагментирующего белка на каждые 400 молекул актина может резко уменьшить вязкость системы. Следует заметить, что описанный процесс происходит только при концентрациях ионов кальция выше 10^{-6} М, т.е. при таких концентрациях, которые создаются в клетке лишь временно, обычно в связи с реакцией клетки на изменения среды.

Ca^{2+} -зависимые актин-фрагментирующие белки обнаружены почти во всех типах клеток позвоночных. Из них наиболее известны **гельзолин**, впервые выделенный из макрофагов, и **виллин** – один из главных белков микроворсинок эпителиальных клеток тонкого кишечника. Интересно, что эти белки, обладающие способностью соединяться сразу с несколькими свободными мономерами актина, могут служить мощными инициаторами полимеризации актина в растворе. Пока не ясно, какова главная функция этих белков в живой клетке: укорочение актиновых филаментов или, наоборот, инициация их сборки.

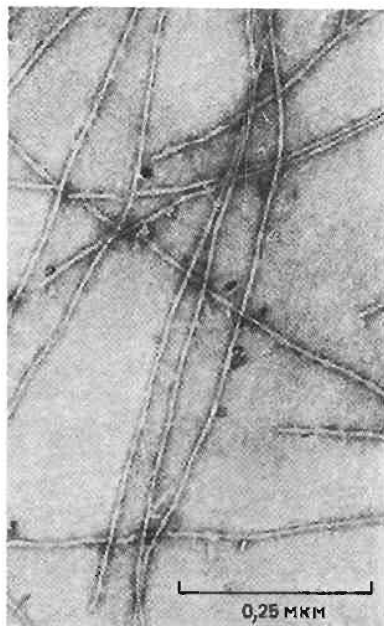


Рис. 10-69. Препарат актиновых филаментов, сшитых α -актинином (электронная микрофотография, негативное контрастирование). (B.M. Jockusch, G. Isenberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3005–3009, 1981.)

10.5.11. Сокращение цитоплазматических гелей происходит при участии миозина [34]

В смеси актиновых филаментов, филамина и гельзолина могут происходить Ca^{2+} -зависимые переходы гель $\rightleftharpoons$ золь. Однако в отличие от обогащенных актином клеточных экстрактов эти искусственные системы не способны к сокращению, и в них не возникают направленные потоки. Недостающим компо-

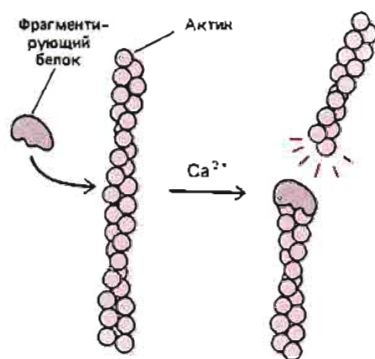


Рис. 10-70. Фрагментирующие белки вызывают разрыв актиновых филаментов. Вероятно, это обусловлено их энергичным взаимодействием с глобулярными актиновыми субъединицами. Как правило, для этого необходимы ионы Ca^{2+} . Примерами такого рода белков могут служить виллин и гельзолин.



Рис. 10-71. Эта схема поясняет, каким образом биполярные агрегаты молекул немышечного миозина могут вызывать скольжение двух актиновых филаментов противоположной полярности, подобно тому как это происходит в мышце.

нентом, по-видимому, является немышечный миозин, так как после его избирательного удаления из неочищенных богатых актином гелей последние теряют способность сокращаться и создавать потоки, хотя в них по-прежнему может наблюдаться Ca^{2+} -зависимое снижение вязкости. Таким образом, как и в случае мышечного сокращения, движущей силой сократительных процессов в цитоплазме является Ca^{2+} -зависимое взаимодействие актина и миозина.

Каким же образом актин и миозин обеспечивают упорядоченные движения цитоплазмы, если сами актиновые филаменты объединены в трехмерную сеть случайным образом? По-видимому, дело здесь (по крайней мере отчасти) в том, что актиновые филаменты обладают четко выраженной структурной полярностью, а миозиновые головки могут присоединяться к актиновому филаменту и перемещаться по нему только при их определенной взаимной ориентации. Маленькие биполярные агрегаты молекул немышечного миозина (см. рис. 10-63) могли бы образовывать подобие миниатюрных саркомеров, в которых происходило бы перемещение противоположно направленных актиновых филаментов относительно друг друга (рис. 10-71).

Хотя мы еще весьма далеки от детального понимания молекулярной основы движения цитоплазмы, изучение взаимодействия миозина, филамина и гельзолина с актиновыми филаментами дает некоторое представление о возможном механизме этого явления. Трехмерная сетка актинового геля образуется в результате сшивания актиновых филаментов такими белками, как филамин. Повышение концентрации ионов Ca^{2+} ведет к резкому понижению вязкости геля благодаря действию актин-фрагментирующих белков, например гельзолина. Кроме того, увеличение концентрации кальция активирует молекулы миозина и заставляет их тянуть актиновые филаменты так, что происходит их взаимное перемещение, а это в свою очередь вызывает течение цитоплазмы.

Свойства некоторых актин-связывающих белков, характерных для немышечных клеток позвоночных, представлены на рис. 10-72 и в табл. 10-5.

Закключение

Актин входит в состав многих клеточных структур и может связываться с целым рядом специфических белков. Жесткие пучки параллельно расположенных актиновых филаментов, скрепленных белковыми шпильками (например, фимбриновыми), имеются в микроворсинках и стереоцилиях, где они выполняют главным образом структурную роль. Пучки актиновых нитей, связанные с короткими биполярными агрегатами молекул немышечного миозина, встречаются в определенных участках клетки, где нужна сократительная активность, например в сократимом кольце делящейся клетки, в опоясывающих десмосомах у апикальной поверхности эпителиальных клеток, а также в напряженных нитях, характерных для клеток, растущих в монослойной культуре. Менее упорядоченные системы актиновых филаментов содержатся во всей цитоплазме и могут придавать ей свойства геля. Густая сеть таких филаментов образует непосредственно под плазматической мембраной так называемый кортикальный слой. Эта сеть формируется с помощью гибких сшивающих белков, таких как филамин; она способна обратимо изменять свои механические свойства в зависимости от концентрации ионов Ca^{2+} , что сопровождается повышением или понижением вязкости цитоплазмы; эти изменения происходят при участии актин-фрагментирующих белков, таких как гельзолин. Предполагается, что актиновые сети, прикрепленные с помощью специальных белков к плазматической мембране, взаимодействуют с немышечным миозином, обеспечивая подвижность клеточной поверхности, и играют ключевую роль в сложном процессе передвижения всей клетки.

Рис. 10-72. Упрощенная схема различных изменений в структурном состоянии актина, обусловленных взаимодействием его со специфическими белками (см. табл. 10.5). Показаны только главные типы белков, способных связываться с актином; условно каждый из них изображен как действующий только одним способом. На схеме не показаны за-якоривающие белки (такие, как винкулин), которые связывают актиновые нити с другими клеточными компонентами, и различные малоизученные копирующие белки.

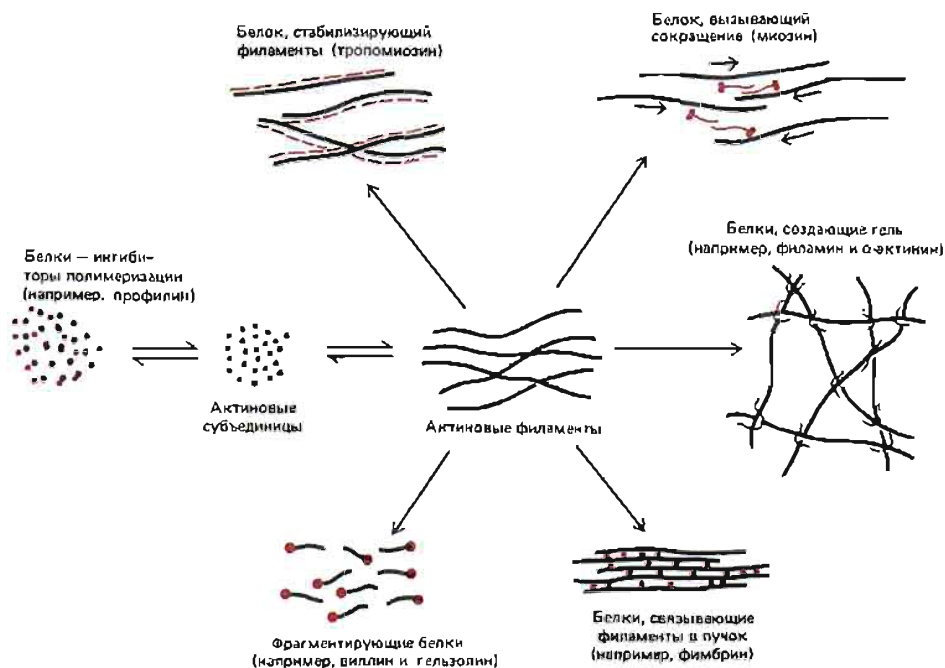


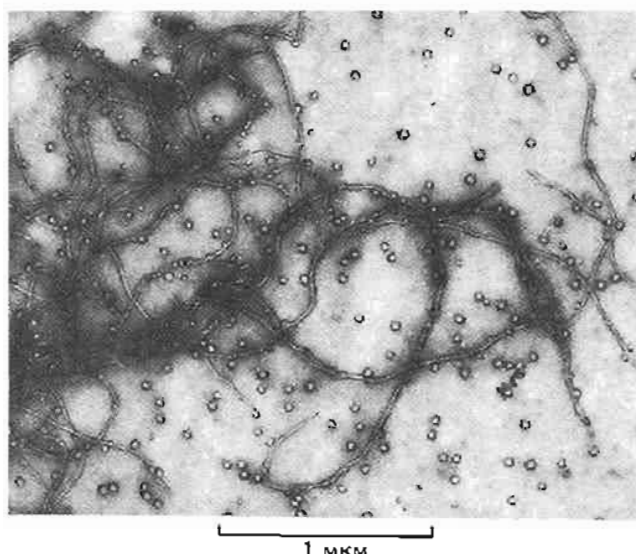
Таблица 10-5. Основные типы актин-связывающих белков немышечных клеток

Белок	Действие на актин
Немышечный миозин	АТФ-аза, взаимодействие которой с актином порождает движение (как в мышце)
Немышечный тропомиозин	Палочковидный белок, прикрепляющийся латерально вдоль актиновых филаментов
Филамин, α-актинин	Белки, которые образуют гибкие связи между актиновыми филаментами, в результате чего создается трехмерная сетчатая структура
Фимбрия	Белок, сшивающий отдельные актиновые филаменты в параллельные пучки
Профилин	Белок, присоединяющийся к актиновым мономерам; препятствует полимеризации актина
Виллин, гельзолин	Белки, вызывающие Ca^{2+} -зависимую фрагментацию актиновых филаментов; обеспечивают также нуклеацию при их сборке
Кэпирующие белки	Белки, присоединяющиеся к тому или иному концу актиновых филаментов; предотвращают добавление или отщепление актиновых мономеров

10.6. Промежуточные филаменты

Промежуточные филаменты представляют собой прочные и относительно долговечные белковые фибриллы, которые на электронных микрофотографиях большинства эукариотических клеток выглядят как прямые или слегка изогнутые волокна (см. рис. 10-61). Их толщина составляет от 8 до 10 нм, т. е. в этом отношении они занимают промежуточное место между актиновыми филаментами и микротрубочками (рис. 10-73). Наиболее богаты промежуточными филаментами те части клетки, которые подвергаются механическим нагрузкам. Например, эти структуры располагаются по всей длине отростков нервных клеток, в области дисковидных десмосом между соседними эпителиальными клетками, а также во всей цитоплазме клеток гладкой мускулатуры. Их роль в поддержании надлежащего положения Z-дисков соседних

Рис. 10-73. Нейрофиламенты в аксоплазме гигантского аксона одного морского червя (электронная микрофотография, негативное контрастирование). Видимые на фото сферические образования – белковые агрегаты нефибриллярной природы. (С любезного разрешения David Gilbert.)



саркомеров в скелетной мышце обсуждалась ранее (разд. 10.1.10). Промежуточные филаменты – самые стабильные компоненты цитоскелета и самые труднорастворимые компоненты клетки. Они сохраняются при экстрагировании клеток растворами как с высокой, так и с низкой ионной силой, а также неионными детергентами, в то время как другие белковые филаменты и большинство белков цитозоля в этих условиях солюбилизируются. Фактически термин «цитоскелет» был первоначально введен для обозначения именно этих необычайно стойких волокон.

10.6.1. Промежуточные филаменты состоят из фибриллярных полипептидов весьма различной величины [35]

При электронно-микроскопическом изучении препаратов, напыленных металлом, можно видеть, что промежуточные филаменты – в отличие от актиновых полимеров и микротрубочек, состоящих из глобулярных субъединиц – образованы нитевидными молекулами. Как полагают, в составе филамента эти фибриллярные полипептиды объединены в структуру типа каната, сходную с молекулой коллагена. Такое строение позволяет объяснить многие характерные свойства промежуточных филаментов, например высокое сопротивление растягивающим силам, которое может еще более увеличиваться при образовании ковалентных связей между субъединицами.

Если в построении филамента участвует лишь какая-то часть каждой молекулы фибриллярного белка, то структура остальной части может значительно варьировать, не оказывая влияния на организацию филамента в целом. Как мы увидим, промежуточные филаменты состоят из полипептидов, очень сильно различающихся по молекулярной массе (от 40 000 до 200 000 и более), причем разброс зависит как от типа клеток, так и от вида организма. Например, промежуточные филаменты аксонов млекопитающих (нейрофиламенты) содержат три различных полипептида с мол. массой 70 000, 140 000 и 210 000, тогда как нейрофиламенты кальмара состоят лишь из двух компонентов с мол. массой 60 000 и 200 000.

В противоположность этому актин и тубулин очень мало изменились за миллиарды лет эволюции. Скорее всего, эта консервативность объясняется тем, что сам процесс сборки полимера из глобулярных субъединиц накладывает жесткие ограничения на их изменчивость, – даже небольшие изменения размеров или формы субъединиц могут затруднить полимеризацию. Для фибриллярных белков промежуточных филаментов таких строгих ограничений не существует.



Рис. 10-74. Одна из моделей строения промежуточного филамента: основная структурная субъединица образована тремя фибриллярными полипептидами (По P. Steinert, J. Mol. Biol., 123, 49–70, 1978.)

Характер укладки отдельных полипептидов внутри филамента неизвестен; было высказано предположение, что они группируются по три, т.е. субъединицами являются тримеры. Как показали биохимические исследования, в каждом полипептиде имеются два длинных α -спиральных участка, и можно думать, что эти участки образующих тример полипептидов скручены в единую суперспираль (рис. 10-74). Другие участки полипептидных цепей, где меньше α -спиральных структур, возможно, служат для стабилизации филаментов и для связи с другими компонентами цитоплазмы. Вероятно, именно эти области молекул, не участвующие непосредственно в построении осевой нити, обуславливают гетерогенность полипептидов, образующих промежуточные филаменты.

10.6.2. Разрушение промежуточных филаментов может быть сопряжено с деградацией составляющих их полипептидов [36]

В условиях, характерных для цитоплазмы живой клетки, процесс сборки промежуточных филаментов, вероятно, необратим. В клетке мы не находим пула соответствующих свободных полипептидов (как в случае актина и тубулина), так что здесь нет динамического равновесия между растворимой и полимеризованной формами. Подобная стабильность филаментов заставляет задуматься о способах управления их сборкой в цитоплазме. Может ли клетка регулировать количество или длину промежуточных филаментов, и если да, то каким образом?

Частичный ответ на этот вопрос был получен в связи с открытием протеолитических ферментов, способных избирательно расщеплять промежуточные филаменты того или иного типа. Большинство этих ферментов *in vitro* активируется ионами Ca^{2+} , но условия, в которых они работают в живой клетке, остаются неизвестными. Тем не менее вполне вероятно, что единственный путь деполимеризации промежуточных филаментов в клетке – это ферментативное расщепление составляющих их полипептидов.

10.6.3. В клетках разного типа промежуточные филаменты различаются по своему составу [37]

Существует много различных типов промежуточных филаментов, для каждого из которых характерен определенный набор белковых субъединиц (табл. 10-6). Как правило, клетки каждого типа содержат лишь какой-то один вид промежуточных филаментов (рис. 10-75). В нейронах образуются **нейрофиламенты**, которые у позвоночных состоят из трех различных полипептидов, в эпителиальных клетках – **кератиновые филаменты** (называемые также **тонофиламентами**), в состав которых входит варьирующее число очень сходных между собой белков – кератинов. Большинство других клеток содержит промежуточные филаменты, состоящие из белка **виментина** с мол. массой 55 000, который может сополимеризоваться с другими специфичными для данного

Таблица 10-6. Промежуточные филаменты клеток позвоночных

Вид филаментов	Белки-компоненты (мол. масса)	Тип клеток
Кератиновые филаменты	Различные кератины (40 000–65 000)	Эпителиальные клетки
Нейрофиламенты	Белки, образующие триплеты (70 000, 140 000, 210 000)	Нейроны
Виментинсодержащие филаменты	Виментин (55 000)	Фибробласты и клетки многих других типов
	Виментин + глиальный фибриллярный кислый белок (50 000)	Некоторые глиальные клетки
	Виментин + десмин (51 000)	Мышечные клетки

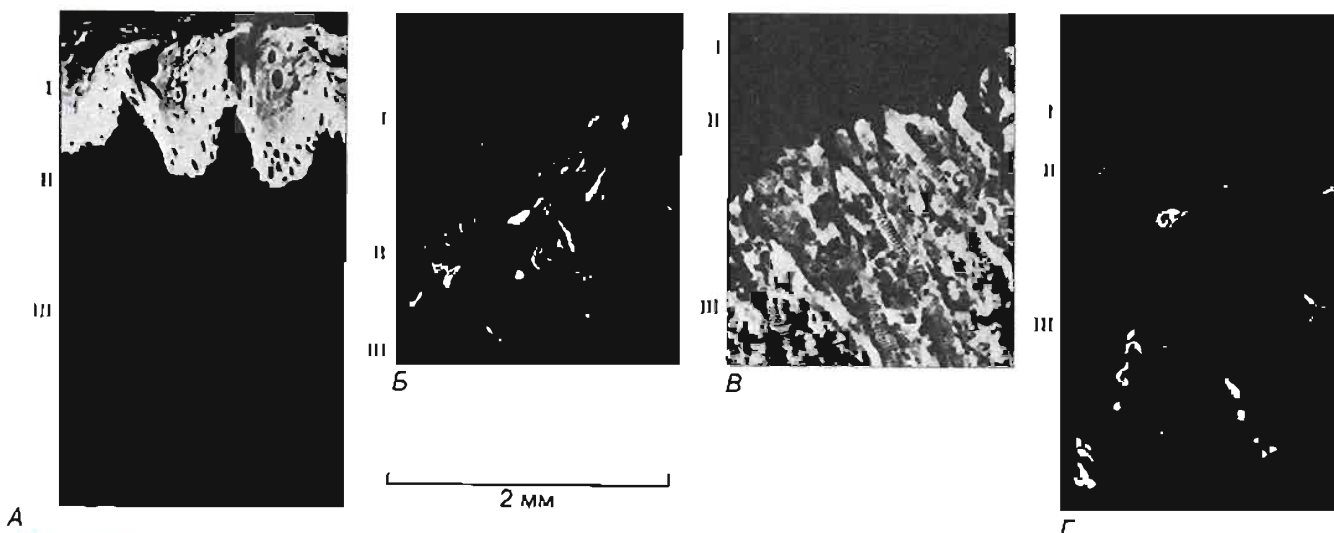


Рис. 10-75. Иммуофлуоресцентные микрофотографии замороженных срезов языка крысы после окраски антителами к различным промежуточным филаментам. **А.** Антикератиновые антитела окрашивают эпителиальные клетки в слое I. **Б.** Антитела к виментину окрашивают фибробласты и кровеносные сосуды, главным образом в слое II. **В.** Антитела к десмину окрашивают мышечные клетки в слое III. **Г.** Антитела к нейрофиламентам связываются отростками нервных клеток в слоях II и III. (M. Osborn et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 413–429, 1982.)

типа клеток субъединицами. Например, промежуточные филаменты мышечных клеток состоят из виментина и родственного ему белка десмина, в то время как в астроцитах (особый род глиальных клеток центральной нервной системы) собранные в большие пучки промежуточные филаменты (называемые *глиальными филаментами*) построены из виментина и полипептида с мол. массой 50 000, который называют *глиальным кислым фибриллярным белком*. Промежуточные филаменты фибробластов и многих других клеток состоят главным образом из виментина.

С чем связано такое многообразие белков, входящих в состав промежуточных филаментов? Вероятно, оно указывает на функциональную разнородность этих волокнистых структур – некоторую специфику их взаимодействий в клетках разного типа. Если актиновым филаментам и микротрубочкам специфические особенности придают различные вспомогательные белки, то у промежуточных филаментов эти особенности определяются их собственными полипептидами.

10.6.4. Кератиновые филаменты укрепляют эпителиальные слои [38]

В эпителиальных слоях соседние клетки соединены друг с другом при помощи прочных, напоминающих заклепки образований, называемых *десмосомами* (разд. 12.2.1). Их внутренняя сторона (обращенная к цитоплазме) служат местом прикрепления кератиновых филаментов, образующих нерегулярную сеть в каждой эпителиальной клетке (рис. 10-61, Г). Другие белковые филаменты тянутся через межклеточное пространство от клетки к клетке, соединяя половинки десмосом; таким образом, непрерывная разветвленная сеть белковых филаментов охватывает весь эпителиальный слой, придавая ему дополнительную прочность на разрыв.

Кератиновые филаменты имеются и во внешних покровах высших животных. Они образуются в цитоплазме зрелых эпителиальных клеток и затем начинают все больше связываться друг с другом и с ассоциированными белками, частично с помощью дисульфидных связей. Клетки в конце концов отмирают, но их кератиновые скелеты сохраняются и образуют на поверхности тела животного прочный защитный слой (разд. 16.4.2). Так же происходит формирование волос и ногтей.

Кератиновые филаменты можно сольюбилизовать, разрушив их дисульфидные связи и проведя экстракцию белков денатурирующими агентами, например раствором мочевины. Получаемые таким способом полипептиды поразительно многообразны; даже кератин, выделенный из одной ткани, например из покровов коровьей морды, состоит из шести или большего чис-

ла родственных белков. При этом кератины из разных участков тела, например из покровов морды и из копыт, имеют несколько различный состав и кодируются разными группами родственных кератиновых генов. Многообразие кератинов не вызывает удивления, так как эти белки выполняют важные и разносторонние функции: они не только служат главной защитой от потери воды и тепла, но и обеспечивают животное средствами маскировки, обороны и нападения.

10.6.5. Только ли структурные функции выполняют промежуточные филаменты? [39]

Весьма вероятно, что и некоторые другие виды промежуточных филаментов выполняют структурные функции. Например, в скелетных мышцах эти филаменты, по-видимому, удерживают в правильном положении миофибриллы, связывая друг с другом края Z-дисков (см. рис. 10-17). Нейрофиламенты, как полагают, служат для укрепления аксонов, достигающих в длину метра и более и обычно сохраняющихся на протяжении всей жизни животного.

Однако в других клетках функции промежуточных филаментов не столь очевидны. Например, в культивируемых фибробластах и лейкоцитах эти нити образуют неупорядоченную сеть (рис. 10-61). Если их единственная функция состоит в сопротивлении растягивающим силам, то чем объяснить такое разнообразие составляющих их полипептидов? И какую роль играют те участки полипептидных цепей, которые, казалось бы, не нужны для построения самих филаментов?

До недавнего времени функции промежуточных филаментов было очень трудно исследовать из-за отсутствия химических агентов, способных избирательно разрушать их в живой клетке, подобно тому как колхицин и цитохалазины разрушают микротрубочки и актиновые нити. Сейчас появилась, однако, возможность вводить в культивируемые клетки моноклональные антитела, специфически реагирующие с промежуточными филаментами. Инъекция таких антител в фибробласт вызывает агрегацию виментинсодержащих филаментов в плотный комок поблизости от ядра. Как это ни удивительно, такая обработка не влияет на рост и деление клетки, а также на ее форму и подвижность. Это позволяет предполагать, что функции промежуточных филаментов слишком деликатны, чтобы их можно было выявить, рассматривая культивируемую клетку в микроскоп.

Заключение

Промежуточные филаменты представляют собой полимеры фибриллярных полипептидов, напоминающие вшитой канат, которые в клетке выполняют главным образом структурные функции, например противодействуют растягивающим силам. Известно много тканеспецифичных форм этих филаментов, различающихся своим полипептидным составом. Это кератиновые филаменты эпителиальных клеток, нейрофиламенты нервных клеток, виментиновые нити фибробластов и многих других клеток. Полипептиды, входящие в состав промежуточных филаментов разного типа, различаются по аминокислотному составу и (часто довольно значительно) по молекулярной массе. Однако все они содержат гомологичные участки, из которых, по-видимому, строится собственно филамент. Другие области полипептидной цепи, не участвующие непосредственно в формировании филамента, вероятно, выполняют в клетке какие-то другие, пока не известные функции.

10.7. Организация цитоскелета [40]

До сих пор мы рассматривали микротрубочки, актиновые нити и промежуточные филаменты как независимые компоненты клетки. Очевидно, однако, что различные части цитоскелета должны быть взаимосвязаны, а их функции

скоординированы таким образом, чтобы обеспечить нужные изменения формы клетки и определенные виды движений. Например, когда фибробласт в культуре округляется, приготавливаясь к делению, в нем происходит реорганизация всего цитоскелета: напряженные нити и цитоплазматические микротрубочки распадаются, начинает формироваться митотическое веретено, а затем и сократимое кольцо. Это строго контролируемая последовательная цепь событий. К сожалению, мы еще мало что знаем о взаимодействии трех основных систем филаментов в животной клетке, и еще того меньше — о молекулярных механизмах, координирующих изменения в этих системах.

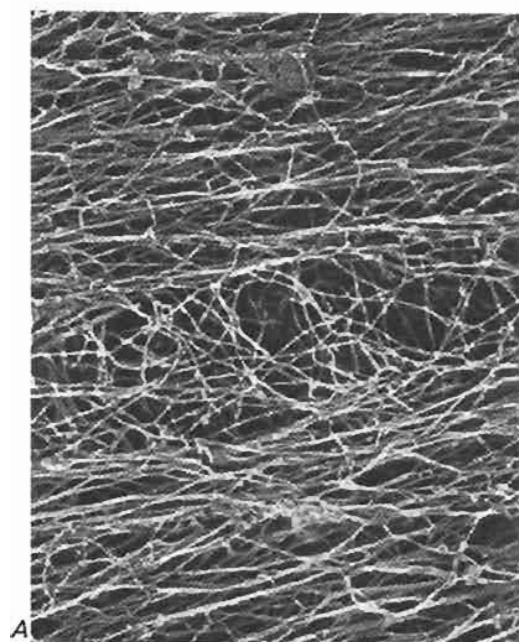
10.7.1. Методы электронной микроскопии позволяют воссоздать трехмерную картину цитоскелета [41]

Вопрос о структурной организации цитоплазмы уже очень давно вызывает споры среди цитологов. Ранние микроскопические наблюдения над живыми клетками показали, что цитоплазма — это вязкая жидкость, консистенция которой может изменяться от более жидкой до состояния, напоминающего пластичную твердую массу. В период между 1870 и 1885 гг. благодаря развитию методов фиксации и окрашивания клеток широко распространилось мнение, что цитоплазма содержит разветвленную трехмерную сеть белковых нитей. Эту точку зрения энергично оспаривали некоторые гистологи, утверждавшие, что наблюдаемая после фиксации сетчатая структура цитоплазмы есть не что иное, как артефакт — результат коагуляции белков в процессе приготовления препаратов. Сейчас, спустя почти 100 лет, все еще можно слышать подобные возражения, хотя речь идет уже о значительно более тонких нитях, увидеть которые можно только с помощью электронного микроскопа.

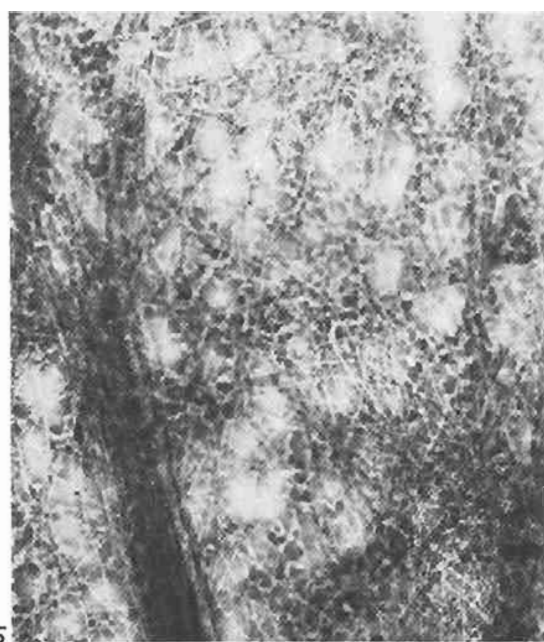
Обычная электронная микроскопия ультратонких срезов вряд ли подходит для изучения пространственной организации белковых фибрилл в цитоплазме. Эти срезы слишком тонки для того, чтобы можно было получить какое-либо представление об общей геометрии системы; очень трудно бывает сказать, связаны ли филаменты друг с другом, а во многих случаях не удается даже определить тип филамента. Однако существуют методы, позволяющие исследовать в электронном микроскопе и более толстые слои цитоплазмы. Типичные примеры получаемых при этом микрофотографий показаны на рис. 10-76 (увеличение здесь примерно одинаково).

Наилучшие изображения получают после экстракции клеток неионным детергентом — при этой процедуре вымываются фосфолипиды и растворимые белки. Обработанные таким способом, а затем быстро замороженные и подвергнутые глубокому травлению клетки дают поразительно четкую картину цитоскелета (рис. 10-76, А). Отдельные актиновые и промежуточные филаменты сохраняют свое первоначальное положение, а при особой методике удастся сохранить и микротрубочки. Различные типы белковых нитей можно распознать по их толщине, а в некоторых случаях — по расположению составляющих их субъединиц. Аналогичную картину можно получить, используя метод негативного контрастирования тяжелыми металлами после экстрагирования культуральных клеток детергентом; край клетки иногда бывает настолько тонким, что его можно исследовать в электронном микроскопе целиком, не делая срезов (рис. 10-76, Б). Относительно толстые слои цитоплазмы можно изучать с помощью высоковольтной электронной микроскопии (рис. 10-76, В). На таких препаратах белковые филаменты всех трех типов выглядят относительно независимыми; они связаны между собой (если вообще связаны) лишь редкими поперечными сшивками.

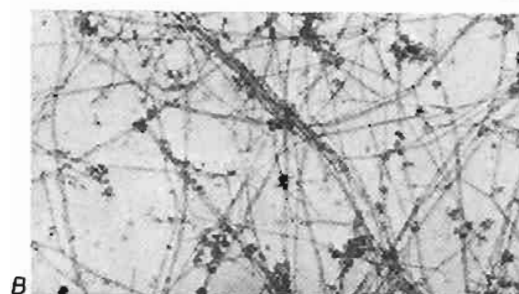
Однако структура цитоскелета представляется совершенно иной, если клетки не были обработаны детергентом. Такие препараты можно изучать или с помощью высоковольтной электронной микроскопии (рис. 10-76, Г), или методом быстрого замораживания и глубокого травления (рис. 10-76, Д). Главные волокна цитоскелета связаны здесь между собой тонкими нитями, образующими трехмерную сеть и состоящими, видимо, из белков, которые



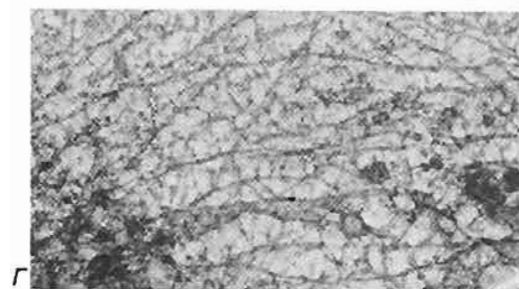
А



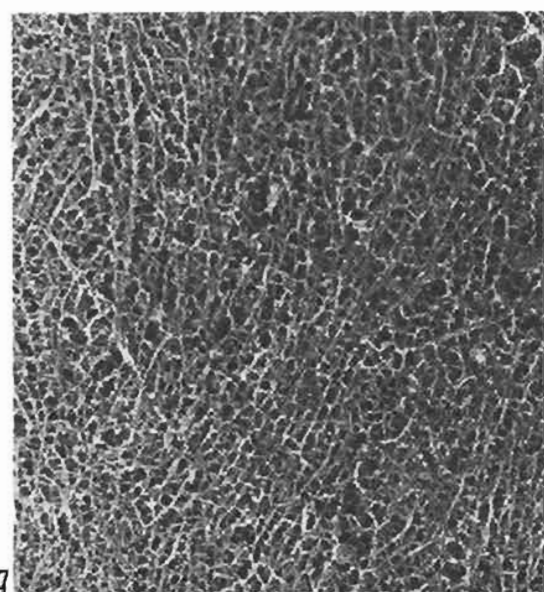
Б



В



Г



Д

Рис. 10-76. Электронные микрофотографии препаратов цитоплазмы, полученных различными методами. (Масштаб изображения во всех случаях одинаков).

А. Глубокое травление с предварительной экстракцией неионным детергентом. Цитоплазма фибробласта. Большая часть прямых волокон, образующих рыхлые пучки, которые на фото тянутся слева направо, — это актиновые филаменты. Густую сеть в середине препарата образуют главным образом промежуточные филаменты.

Б. Негативное контрастирование. Белковые филаменты в тонком участке цитоплазмы культивируемой глиальной клетки человека. Так как клетку фиксировали в присутствии неионного детергента, большинство растворимых белков из препарата удалено.

В. Культивируемый фибробласт, подвергнутый экстракции детергентом (высоковольтная электронная микроскопия). Видны актиновые филаменты с присоединенными к ним S1-фрагментами миозина.

Г. Фибробласт, не подвергавшийся экстракции детергентом (высоковольтная электронная микроскопия). Видна заполняющая всю цитоплазму трехмерная сеть из тонких белковых нитей — так называемая *микотрабекулярная сеть*.

Д. Глубокое травление без предварительной экстракции детергентом. Аксон крысы. Белковые нити связаны в густую сеть поперечными сшивками, распределение которых кое-где обнаруживает периодичность.

[С любезного разрешения John Heuser и Marc Kirschner (А), Anna-Sina Höglund и Roger Karlsson (Б), Manfred Schliwa (В и Г), S. Tsukita и H. Ishikawa (Д).]

удаляются из клетки при обработке детергентом. Эта сетчатая структура получила название *микротрабекулярной сети*. Пока еще не вполне ясно, составляет ли эта тонкая сеть часть цитоскелета живой клетки или же это результат агрегации растворимых макромолекул в процессе фиксации и обезвоживания препарата. Однако есть независимые свидетельства того, что различные системы филаментов взаимосвязаны и что многие клеточные компоненты, которые обычно считают растворимыми и свободно диффундирующими в цитоплазме, на самом деле связаны в живой клетке с цитоскелетом.

10.7.2. Органеллы и растворимые белки могут быть ассоциированы с цитоскелетом [42]

Концентрация актина в клетке чрезвычайно высока — в отдельных областях она превышает 50 мг/мл. Лишь по одной этой причине любой белок, имеющий пусть даже слабое сродство к актину, должен образовывать с ним (с его мономерной или полимеризованной формой) хотя бы временные ассоциаты.

И в самом деле, существует целый ряд указаний на то, что многие клеточные компоненты связаны *in vivo* с теми или иными частями цитоскелета. Органеллы, ограниченные мембраной, такие как митохондрии и лизосомы, нередко по отдельности перемещаются в цитоплазме весьма характерным образом. Это особое скачкообразное движение происходит как бы по прямым, но невидимым дорожкам и сопровождается внезапными остановками, часто с последующим возвратом по прежней траектории, а иногда с резким изменением направления. На электронных микрофотографиях можно различить тонкие нити, тянущиеся от этих органелл к близлежащим белковым филаментам. С белковыми филаментами часто бывают ассоциированы группы цитоплазматических рибосом, а после экстракции клеток неионными детергентами значительная часть белоксинтезирующего аппарата остается связанной с цитоскелетом. Даже отдельные растворимые белки, например некоторые ферменты гликолиза, оказываются связанными в миофибриллах с актиновыми филаментами, а в фибробластах — с напряженными нитями, и здесь их можно выявить с помощью иммунофлуоресценции.

На весьма вероятную связь белков с актином указывают также результаты изучения транспорта белков в аксонах нервных клеток. Эти клетки инкубировали короткое время с мечеными аминокислотами, а затем наблюдали перенос меченых новосинтезированных белков цитоскелета по аксону к его окончанию. Это медленное, но непрерывное передвижение со скоростью 1–5 мм в сутки называют *медленным аксональным транспортом*. В пределах указанного интервала скоростей были выделены два главных потока: самый медленный состоял почти исключительно из тубулина и белков нейрофиламентов, а более быстрый включал актин и большую группу других белков (рис. 10-77). Интересно, что среди белков, сопровождавших актин, были и такие, которые принято считать растворимыми, например ферменты креатинкиназа и енoлаза. Поскольку эти белки образуют дискретную зону радиоактивности на протяжении недель и даже месяцев, очевидно, что они не могут свободно диффундировать в цитоплазме. А поскольку эти белки передвигаются с той же скоростью, что и актин, есть основание предполагать, что они каким-то образом физически связаны с актиновыми филаментами.

Все эти наблюдения, взятые вместе, позволяют расширить наше представление о структурной организации живой клетки. По-видимому, не только ее нерастворимые компоненты, такие как белковые нити, тесно связаны друг с другом в единую систему, но с ними ассоциированы и многие компоненты цитозоля, которые раньше считали растворимыми и свободно диффундирующими элементами.

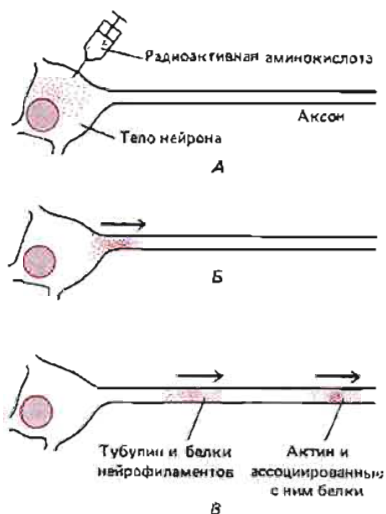
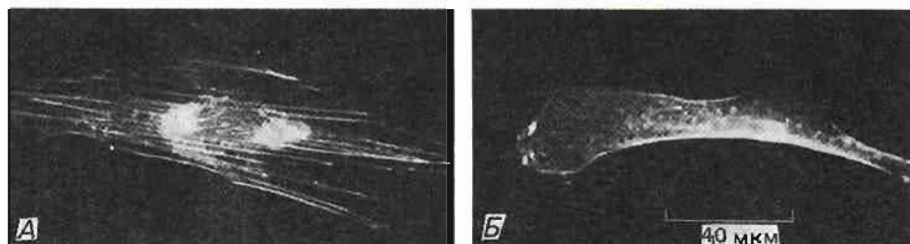


Рис. 10-77. Метод измерения скорости медленного транспорта белков в аксоне нервной клетки.

А. Белки в теле нейрона метят путем однократного введения меченой аминокислоты (импульсная метка). Б. Некоторые из радиоактивных белков перемещаются по аксону с постоянной скоростью от 1 до 5 мм в сутки. В. Через несколько дней выявляются два пика радиоактивности, содержащие различные компоненты цитоскелета. «Более быстрый» пик содержит актин, а также много других белков, в том числе такие, которые обычно считают растворимыми белками цитоплазмы.

Рис. 10-78. Иммуофлуоресцентные микрофотографии нормального фибробласта (А) и клетки, трансформированной опухолевым вирусом (Б). Оба препарата окрашены флуоресцирующим производным вещества, присоединяющегося к актину, — фаллоидина. В то время как нормальная клетка содержит множество хорошо видимых нитей, в трансформированной клетке их очень мало или вовсе нет. (M. Verderame et al., Proc. Natl. Sci. USA, 77, 6624–6628, 1980.)



10.7.3. Один-единственный ген трансформирующего вируса вызывает существенные изменения всего цитоскелета [43]

Различия в ростовых потенциях раковых и нормальных клеток в культуре *in vitro* часто бывают связаны с резким изменением цитоскелета у раковых клеток. Эти клетки лучше растут на средах с низким содержанием сыворотки и даже способны расти, будучи суспендированы в агаровом геле. Кроме того, в отличие от нормальных клеток они не прекращают роста, заполнив монослоем все дно культуральной чашки, а продолжают делиться, громоздясь друг на друга, пока не достигнут очень большой плотности (см. разд. 11.1.8). Перестройка цитоскелета, сопровождающая эти сдвиги в поведении клеток, внешне проявляется в том, что раковые клетки обычно имеют более округлую форму и значительно меньшее число напряженных нитей, — их даже может вовсе не быть (рис. 10-78).

Эти и другие изменения, характерные для неопластической трансформации, можно индуцировать в нормальной клетке, заразив ее опухолевым вирусом, например вирусом саркомы Рауса. Этот простой вирус, вызывающий рак у кур, имеет всего лишь четыре гена, один из которых (называемый геном *src*) и является единственной причиной трансформации: если он активен, то клетки претерпевают неопластическую трансформацию и в результате образуются злокачественные опухоли; если же этот ген находится в неактивном состоянии, клетки остаются внешне нормальными (разд. 11.2.2).

Не так давно белковый продукт гена *src* был идентифицирован как протеинкиназа с необычной специфичностью. Этот фермент катализирует фосфорилирование тирозиновых остатков в определенной группе белков, из которых наиболее интересен (в связи с изучением цитоскелета) *винкулин*. Как уже говорилось, этот белок, возможно, участвует в прикреплении пучков актиновых филаментов к плазматической мембране. В этом случае его модификация продуктом вирусного гена *src* могла быть непосредственной причиной тех изменений цитоскелета, которыми сопровождается трансформация клеток вирусом саркомы Рауса. И, что еще более важно, эти наблюдения наводят на мысль, что процессы роста и деления клеток в норме контролируются сигналами, получаемыми от упорядоченной системы цитоскелета.

10.7.4. Общими организаторами цитоскелета, возможно, служат микротрубочки [44]

Всем эукариотическим клеткам свойственна определенная геометрия, которая проявляется в расположении их органелл и форме поверхности. В то время как все другие компоненты цитоскелета лишь отражают эту геометрию, микротрубочки, по-видимому, часто играют уникальную роль в ее создании. Хорошо известно, например, что микротрубочки располагаются вдоль продольной оси клетки и что во многих случаях их присутствие необходимо для поддержания асимметричной формы клетки в целом. Обработка колхицином останавливает развитие длинных отростков у растущих нейронов и препятствует удлинению некоторых зародышевых эпителиальных клеток — по-видимому, в результате подавления полимеризации их микротрубочек. В то же

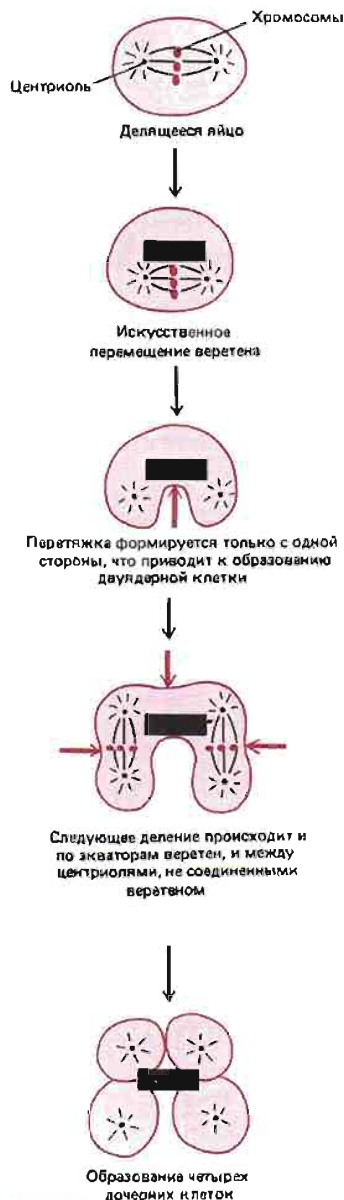


Рис. 10-79. Схема эксперимента, демонстрирующего влияние центриолей на плоскость деления клетки. Если веретено митотической клетки сместить из ее центра к периферии, цитоплазма разделится лишь частично: перетяжка образуется только на той стороне, куда было сдвинуто веретено. При последующем делении такой аномальной клетки перетяжки образуются не только в плоскости экватора двух веретен, но и между теми соседними центриолями, которые находятся в общей цитоплазме, но не связаны нитями веретена. Вероятно, сократимый пучок актиновых филаментов, создающий перетяжку, всегда формируется посредине между двумя центриолями.

время колхицина не оказывает влияния на форму некоторых зрелых удлиненных клеток, таких как мышечные волокна или клетки хрусталика. Это может означать, что форма клетки определяется микротрубочками на ранних стадиях ее развития, а позднее поддерживается другими элементами цитоскелета.

Микротрубочки заметно влияют на распределение промежуточных филаментов в большинстве клеток, растущих в культуре. Например, в культивируемых фибробластах промежуточные филаменты, так же как и цитоплазматические микротрубочки, располагаются радиально — тянутся от области ядра к периферии. Если обработать клетки колхицином, микротрубочки очень быстро (обычно менее чем за 10 мин) деполимеризуются, а в последующие несколько часов сеть промежуточных филаментов постепенно спадается и в конце концов образует плотный комок поблизости от ядра. Но если удалить из клетки колхицин, микротрубочки быстро снова полимеризуются и промежуточные филаменты мало-помалу восстанавливают свое прежнее расположение.

Есть указания на то, что микротрубочки влияют и на распределение в клетке актиновых филаментов. Пожалуй, наиболее четкий пример — это образование сократимого кольца, действие которого завершает процесс деления клетки. Сократимое кольцо всегда формируется в плоскости, перпендикулярной оси митотического веретена, так что после расхождения хромосом к полюсам веретена в каждой дочерней клетке оказывается по одному хромосомному набору (см. гл. 11). Ясно, что для этого совершенно необходима согласованная работа актиновых элементов сократимого кольца и микротрубочек митотического веретена. Если искусственно изменить положение формирующегося веретена, то соответственно изменится и место последующего образования сократимого кольца (рис. 10-79).

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что микротрубочки часто выполняют роль временных «шаблонов», определяющих расположение остальных компонентов цитоплазмы. Эта их функция особенно ясно выражена в растительных клетках (см. гл. 19). Так, например, *пренпрофазный лучок*, состоящий из кортикальных микротрубочек, определяет плоскость деления клетки, а другие микротрубочки — место закладки и ориентацию клеточной стенки (разд. 19.3.7 и 19.4.3). У млекопитающих спиральные витки микротрубочек окружают аксоному развивающегося спермия, а затем исчезают, оставив после себя спираль из митохондрий, снабжающих аксоному аденозинтрифосфатом (см. рис. 9-4). Наконец (самый поразительный пример!), у насекомых в период раннего развития летательных мышц микротрубочки образуют правильные ряды в области формирования тонких и толстых филаментов (рис. 10-80); позднее эти микротрубочки исчезают, а на их месте остается высокоорганизованная система филаментов, характерная для этих специализированных мышц.

У культивируемых клеток локальные процессы, связанные с функцией актина, — формирование ламеллоподий и микрошипов, фагоцитоз и т.п. — часто происходят в тех участках клеточной поверхности, около которых оканчиваются микротрубочки. Пространственная организация этих процессов заметно изменяется после обработки клеток колхицином: исчезает их согласованность, ламеллоподии образуются не только на верхней стороне клетки, но и по всей ее периферии, и сама клетка, вместо того чтобы двигаться по прямой, блуждает подобно кораблю, потерявшему управление.

Таким образом, цитоплазматические микротрубочки, по-видимому, определяют структурную полярность клетки и координируют деятельность различных частей цитоскелета, ответственных за сложные движения. Но, как уже говорилось (разд. 10.4.2), построение многих микротрубочек в свою очередь организуется клеточным центром, который, таким образом, можно рассматривать как «командный пункт» клетки. Эту концепцию подкрепляют наблюдения, показавшие, что в культурах *in vitro* клеточный центр мигрирующей клетки обычно находится с той же стороны от ядра, что и продвигающаяся

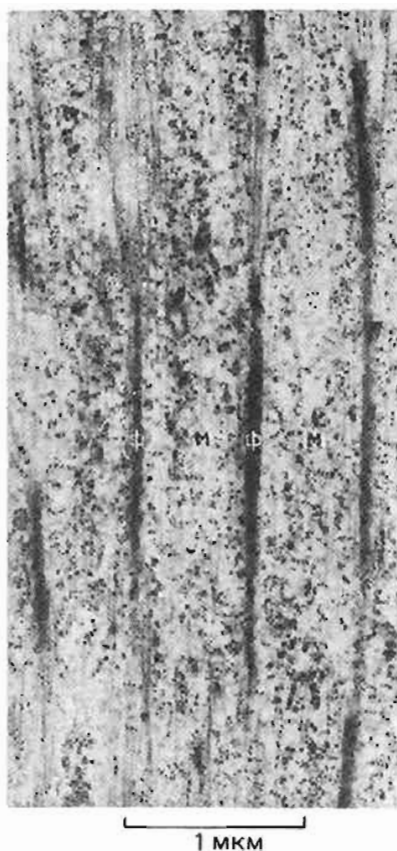


Рис. 10-80. Электронная микрофотография мышцы на ранней стадии развития. Формирующиеся агрегаты толстых и тонких филаментов (ф) расположены параллельно цитоплазматическим микротрубочкам (м). По мере объединения этих агрегатов в миофибриллы микротрубочки исчезают. Это позволяет предполагать, что они выполняют роль временных «лесов», обеспечивающих правильную укладку толстых филаментов. (J. Auber, J. de Microsc., 8, 197-232, 1969.)

вперед мембрана с ламеллоподиями; при этом одна из двух центриолей клеточного центра обычно располагается вдоль по направлению миграции, а другая — под прямым углом к субстрату.

10.7.5. Цитоскелет определяет способность клетки реагировать на физическую природу твердой поверхности [45]

Многие клетки синтезируют белки и делятся лишь в том случае, если они прикреплены к твердой поверхности. Как осуществляется такого рода контроль, не известно, однако есть основания предполагать, что определенную роль здесь играет цитоскелет (разд. 11.1.6). Цитоскелет и как следствие вся форма клетки радикальным образом изменяются при контакте клетки с твердой опорой. Важную роль здесь, видимо, играют два физических параметра поверхности: ее «липкость» (способность к адгезии) и геометрический профиль.

Искусственным путем, напыляя на стеклянную или пластиковую подложку очень тонкий слой металла, можно получить поверхность с плавно изменяющейся адгезионной способностью. При культивировании клеток на такой поверхности они явно предпочитают более «липкие» металлизированные участки. Было показано, что фибробласты мигрируют в сторону повышения адгезионных свойств поверхности; эти же свойства в аналогичном эксперименте определяют направление роста аксонов у культивируемых нервных клеток. Реакцию клеток на локальные различия в адгезионной способности субстрата можно объяснить сократительными свойствами цитоскелета. Образующие мигрирующей клеткой длинные тонкие микрошпили содержат рыхлый пучок актиновых филаментов и в некоторой мере способны сокращаться. Они, например, могут захватывать мельчайшие твердые частицы и доставлять их клетке. Поэтому кажется вероятным, что эти структуры могут оценивать адгезионные свойства среды, окружающей клетку, путем пробных сокращений, выполняя, таким образом, функции сенсорных образований (рис. 10-81).

Влияние профиля поверхности на движение клеток можно наблюдать на примере фибробластов, помещенных на одну из верхних граней стеклянной призмы. Клетки будут «переползать» на другую грань только в том случае, если угол между гранями достаточно тупой (рис. 10-82). Будучи помещены на поверхность стеклянного цилиндра, фибробласты располагаются вдоль его оси и передвигаются преимущественно в этом направлении (если только диаметр цилиндра не превышает 200 мкм). В обоих случаях клетки движутся по

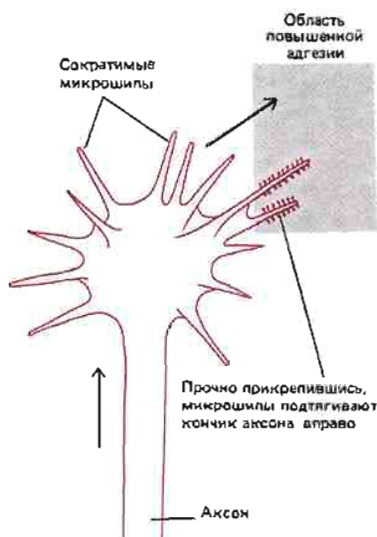


Рис. 10-81. Схематическое изображение кончика растущего аксона с многочисленными актинсодержащими микрошпилами (филоподиями). Эти микрошпили время от времени вытягиваются и затем втягиваются обратно. Те из них, которые соприкоснулись с более «липкой» поверхностью, втягиваются с большим трудом, в результате чего возникает сила, заставляющая клетку двигаться в данном направлении.



Рис. 10-82. Фибробласт не станет переползает на соседнюю грань стеклянной призмы, если угол между гранями слишком острый. Это, по-видимому, объясняется тем, что на переднем конце клетки тогда не может сформироваться прямой пучок актиновых филаментов (напряженная нить).



Рис. 10-83. Схематическое изображение ресничек на поверхности нормальной парамеции и парамеции с инвертированным участком, на котором биение ресничек направлено в противоположную сторону. Измененный тип ресничного покрова может сохраняться в поколениях данной («мутантной») парамеции неопределенно долго, хотя генетическая информация в ДНК не изменена.

траектории с наименьшей кривизной; один из возможных механизмов, обеспечивающих выбор такой траектории, основан на функционировании напряженных нитей, как это схематически показано на рис. 10-82.

10.7.6. Информация о структуре цитоскелета материнской клетки может передаваться непосредственно цитоскелету дочерних клеток [46]

Говоря коротко, организация и функционирование цитоскелета практически не зависят от клеточного ядра. Клетка, утратившая ядро, все еще способна прикрепляться к субстрату, изменять форму, мигрировать, захватывать пищевые частицы и т.д. Если отделить от фибробласта небольшие фрагменты, вокруг каждого из них замыкается плазматическая мембрана и эти фрагменты (которые могут составлять менее 1% объема клетки) сохраняют различные формы подвижности в течение нескольких часов. Некоторые из них образуют мембранные выпячивания или ламеллоподии, другие вытягивают и втягивают микрошиллы. Однако ни один из них не способен передвигаться, и это позволяет думать, что субструктуры цитоскелета сами по себе могут обеспечить только локальную подвижность, тогда как перемещение всей клетки требует некоторой согласованности различных двигательных процессов. За эту согласованность, возможно, ответственны микротрубочки, тянущиеся от клеточного центра.

Помимо всего прочего, цитоскелет обладает своеобразной «памятью». Так, например, при делении культивируемой клетки у двух дочерних клеток часто формируются сходные мембранные выпячивания, а также сходным образом располагаются напряженные нити. Кроме того, наблюдается сходство в траекториях миграции обеих дочерних клеток. Но наиболее четкое свидетельство существования цитоскелетной наследственности было получено в опытах с *Paramecium* – крупным одноклеточным организмом, поверхность которого покрыта рядами подвижных ресничек. В норме эти ряды расположены параллельно друг другу, что обеспечивает согласованное биение всех ресничек. В эксперименте можно нарушить этот строгий порядок и получать несколько инвертированных рядов ресничек, биение которых будет направлено в обратную сторону (рис. 10-83). Такая измененная организация передается и последующим поколениям данной клетки. Эта форма наследственности не имеет никакого отношения к ДНК: модифицированные клетки передают новый признак потомству непосредственно через цитоскелет.

Способность прямо наследовать определенную организацию цитоскелета может иметь далеко идущие последствия для морфогенетических процессов, ответственных за формирование взрослого организма. Это хорошо видно на примере развития улитки *Limnaea peregra*, у которой генетически детерминировано направление витков спиральной раковины – правое или левое. Это направление ясно видно уже на стадии восьмиклеточного зародыша благодаря асимметричной схеме деления клеток, известной как *спиральное дробление* (рис. 10-84). Асимметрия деления обусловлена небольшим смещением митотического веретена, которое в свою очередь зависит от генотипа матери (*материнская наследственность*). Генотип матери определяет форму яйца независимо от того, имеет ли она сама право- или левозакрученную раковину. Предполагают, что в процессе оогенеза в организме улитки вырабатывается некий фактор, влияющий на положение митотического веретена в зрелой яйцеклетке и таким образом определяющий будущее направление витков раковины независимо от собственного генотипа зародыша.

Подобные примеры показывают, что цитоскелет материнской клетки может передавать информацию об особенностях своей структурной организации непосредственно цитоскелету дочерних клеток и даже в некоторой степени определять морфологию всего организма. Как именно передается от клетки к клетке такая информация, до сих пор не известно.



Рис. 10-84. Схема спирального дробления оплодотворенного яйца улитки. Каждая стрелка связывает пару клеток, образовавшуюся в предыдущем цикле деления (следует представлять себе трехмерную картину так, чтобы стрелки были направлены в сторону наблюдателя). На стадиях 8- и 16-клеточного зародыша цветом выделяются клетки – потомки окрашенного бластомера 4-клеточной стадии.

10.7.7. Информация о структурной организации цитоскелета может передаваться за пределы клеточной мембраны

Цитоскелет данной клетки может влиять на цитоскелет не только дочерних клеток, но и соседних клеток той же ткани. Один из возможных механизмов такого влияния связан с образованием межклеточных соединений, которые служат точками прикрепления цитоплазматических белковых филаментов обеих смежных клеток. Из рис. 10-85, например, видно, что в эпителиальном слое, хотя он и состоит из отдельных клеток, промежуточные филаменты образуют непрерывную сеть, пронизывающую весь слой. Такая непрерывность структуры цитоскелета, видимо, объясняется тем, что промежуточные филаменты закреплены в соответствующих друг другу точках мембран соседних клеток.

Другой вероятный механизм основан на взаимодействии цитоскелета с внеклеточным веществом, секретируемым данной клеткой. Как мы узнаем из главы 12, клетки с поляризованным цитоскелетом нередко выделяют ориентированный внеклеточный материал, который в свою очередь оказывает влияние на ориентацию соседних клеток, соприкасающихся с этим материалом (см. рис. 12-71). Вполне вероятно, что именно благодаря двум описанным механизмам цитоскелеты отдельных клеток, составляющих данную ткань, во многих случаях организованы таким образом, что напоминают скорее составные части единой системы, чем независимые структурные единицы.

10.7.8. Как движутся клетки? [47]

Несмотря на то что за последние годы достигнуты большие успехи в изучении цитоскелета, до сих пор остаются невыясненными молекулярные механизмы таких важных процессов, как фагоцитоз, митоз, скачкообразное движение клеточных органелл и перемещение клетки в целом. Одна из причин такого положения дел – то, что соответствующие биохимические механизмы не связаны с какой-то одной клеточной структурой (вроде, скажем, реснички или микрофибриллы), а рассредоточены по всей клетке. Кроме того, это настолько лабильная и хрупкая система, что трудно выделить ее из клетки в активном состоянии.

Рассмотрим, например, фибробласт, ползущий по поверхности культурального сосуда (рис. 10-86). На его переднем крае непрерывно образуются ламеллоподии и микрошипы; некоторые из них прикрепляются к субстрату, а другие перемещаются назад по верхней стороне клетки, перенося в том же направлении различные частицы, прилипшие к клеточной поверхности. В то же время задние участки клетки остаются прикрепленными к субстрату и по

Рис. 10-85. Иммуофлуоресцентная микрофотография слоя эпителиальных клеток (в культуре ткани), окрашенных антителами к промежуточным филаментам. Кажется, что многие филаменты переходят без перерыва из одной клетки в другую, хотя клетки отделены друг от друга плазматическими мембранами и внеклеточным материалом. (С любезного разрешения Michael Klymkowski.)

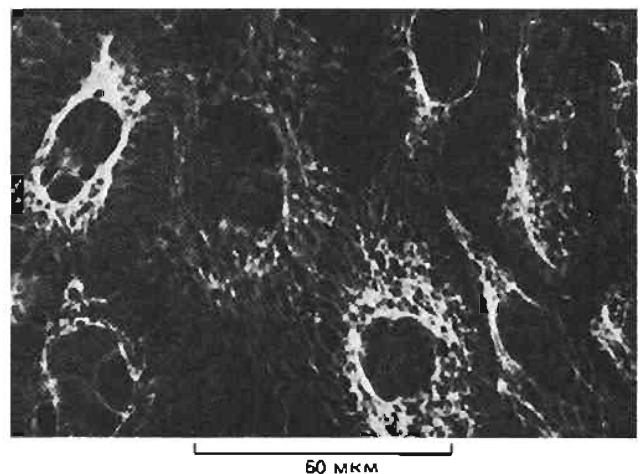


Рис. 10-86. Схематическое изображение фибробласта, движущегося по поверхности культуральной чашки (см. также рис. 10-67).

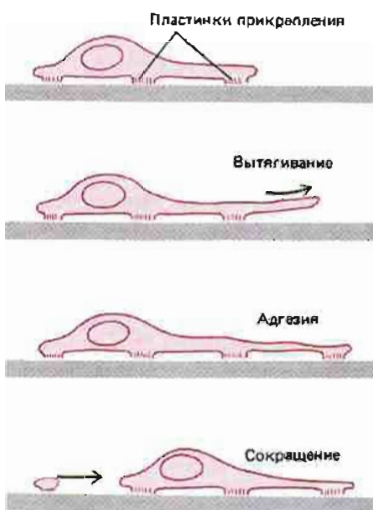
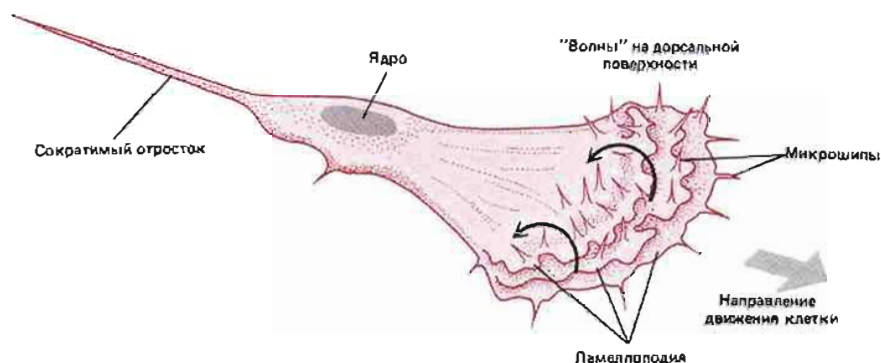


Рис. 10-87. Сильно упрощенная схема основных этапов передвижения фибробласта по поверхности субстрата. Цикл событий включает вытягивание, адагзию и сокращение (см. в тексте).

мере продвижения клетки вперед вытягиваются в длинные тонкие отростки. Эти отростки внезапно отрываются и втягиваются внутрь клетки, часто оставляя на месте своего прикрепления кусочки цитоплазмы и клеточной мембраны. Этот циклический процесс повторяется снова и снова, в результате чего клетка продвигается вперед со скоростью около 40 мкм в час.

Для того чтобы фибробласт мог перемещаться по твердой поверхности, нужны по меньшей мере три процесса: 1) его передний конец должен сначала вытянуться вдоль поверхности субстрата; 2) затем этот конец должен закрепиться на субстрате, и 3) прикрепленный передний конец должен подтянуть к себе всю клетку (рис. 10-87). Наиболее понятен третий пункт, поскольку мы знаем, что клетка содержит актиновые филаменты, которые способны сокращаться при взаимодействии с миозином. Однако детали структурной организации сократительных пучков и способы прикрепления филаментов к поверхности субстрата и к остальному цитоскелету нам неизвестны.

Еще труднее объяснить, каким образом вытягивается передний конец фибробласта. Можно представить себе несколько вероятных механизмов: например, сокращение актиновых филаментов кортикального слоя создает в цитоплазме направленный вперед поток, подобно тому как это происходит у амебы, или же контролируемая полимеризация актина заставляет передний конец клетки выпячиваться, как при образовании акросомального отростка у спермиев морских беспозвоночных. Необходимый прирост плазматической мембраны обеспечивается или путем ее перемещения вытягивающимся вперед цитоскелетом, или в результате ее преимущественного образования (за счет экзоцитоза) на переднем конце клетки. Предположение о том, что плазматическая мембрана непрерывно обновляется за счет экзоцитоза на переднем конце и эндоцитоза, происходящего где-нибудь в другом месте (гипотеза мембранного потока), обсуждалось в главе 6 в связи с механизмом «экпирования» клеток (разд. 6.2.13).

Однако самым загадочным аспектом клеточного движения остается его регуляция. Как координируются различные локальные формы подвижности (вытягивание и втягивание ламеллоподий и микрощипов и т.д.), приводящие к продвижению всей клетки вперед? Каким образом клетка может изменять свою двигательную активность в ответ на изменения, происходящие во внешней среде? Решение этих вопросов — одна из самых интересных и трудных задач сегодняшней клеточной биологии.

Заключение

Актиновые филаменты, микротрубочки, промежуточные филаменты и ассоциированные с ними белки, находясь под контролем неизвестных механизмов, обеспечивают изменения формы клетки и разнообразные виды клеточной подвижности. Кроме того, цитоскелет, по-видимому, играет роль структурного организатора цитоплазмы, связывая клеточные органеллы и растворимые белки. Микротрубочки, исходящие из клеточного центра, определяют характер

расположения промежуточных филаментов, а также, вероятно, и структурную полярность клетки. Развитие цитоскелета в соседних клетках не происходит независимо: имеет место взаимное влияние, которое опосредуется через межклеточные соединения или через внеклеточный материал. Информация об особенностях цитоскелета при делении клетки может передаваться непосредственно цитоскелету дочерних клеток. Несмотря на значительные успехи, достигнутые за последнее время в изучении различных компонентов цитоскелета, молекулярные механизмы, лежащие в основе большинства двигательных процессов клетки, остаются для нас загадкой.

Литература

Общая

- Goldman R., Pollard T., Rosenbaum J., eds. Cell Motility. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
 Inoué S., Stephens R.E. Molecules and Cell Movement, New York, Raven, 1975.
 Organization of the Cytoplasm, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 1982.
 Stebbings S., Hyams J.S. Cell Motility, Harlowe, Eng., Longman, 1979.

Цитированная

1. Offer G. The molecular basis of muscular contraction. In: Companion to Biochemistry (A.T. Bull, J.R. Lagnado, J.O. Thomas, D.R. Tipton, eds.), pp. 623–671, New York, Longman, 1974.
2. Squire J. The Structural Basis of Muscle Contraction, New York, Plenum, 1981.
3. Huxley A.F. Reflections on Muscle, Princeton, N.Y., Princeton University Press, 1980.
4. Huxley H.E. The mechanism of muscular contraction, Science, 164, 1356–1366, 1969.
5. Bessman S.P., Geiger P.J. Transport of energy in muscle: the phosphorylcreatine shuttle, Science, 211, 448–452, 1981.
6. Katz B. Nerve, Muscle and Synapse, New York, McGraw-Hill, 1966. [Имеется перевод: Катц Б. Нерв, мышца и синапс. – М.: Мир, 1969.]
7. Murray J.M., Weber A. The cooperative action of muscle proteins, Sci. Am., 230(2), 59–71, 1974.
8. Taylor K.A., Amos L.A. A new model for the geometry of the binding of myosin crossbridges to muscle thin filaments, J. Mol. Biol., 147, 297–324, 1981.
9. Adelstein R.S., Eisenberg E. Regulation and kinetics of the actin-myosin-ATP interaction, Annu. Rev. Biochem., 49, 921–956, 1980.
10. Hartshorne D.J. Phosphorylation of myosin and the regulation of smooth-muscle actomyosin. In: Cell and Muscle Motility II (R.M. Dowben, J.W. Shay, eds.), pp. 188–220. New York, Plenum, 1982.
11. Satir P. How cilia move, Sci. Am., 231(4), 44–63, 1974.
12. Dustin P. Microtubules, Sci. Am., 243(2), 66–76, 1980.
13. Dustin P. Microtubules, New York, Springer-Verlag, 1978.
14. Roberts K., Hyams J.S., eds. Microtubules, New York, Academic Press, 1979.
15. Summers K.E., Gibbons I.R. ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea-urchin sperm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 68, 3092–3096, 1971.
16. Warner F.D., Satir P. The structural basis of ciliary bend formation, J. Cell Biol., 63, 35–63, 1974.
17. Warner F.D., Mitchell D.R. Dynein, the mechanochemical coupling adenosine triphosphatase of microtubule-based sliding filament mechanisms, Int. Rev. Cytol., 66, 1–43, 1980.
18. Satir P., Wais-Steider J., Lebduška S., Nasr A., Avolio J. The mechanochemical cycle of the dynein arm, Cell Motility, 1, 303–327, 1981.
19. Afzelius B.A., Eliasson R. Flagellar mutants in man: on the heterogeneity of the immotile-cilia syndrome, J. Ultrastruct. Res., 69, 43–52, 1979.
20. Afzelius B.A. Genetic disorders of cilia. In: International Cell Biology, 1980–1981 (H.G. Schweiger, ed.), pp. 440–447, New York, Springer-Verlag, 1981.
21. Brokaw C.J., Luck D.J.L., Huang B. Analysis of the movement of *Chlamydomonas* flagella: the function of the radial-spoke system is revealed by comparison of wild-type and mutant flagella, J. Cell Biol., 92, 722–732, 1982.
22. Sugino K., Naitoh Y. Simulated cross-bridge patterns corresponding to ciliary beating in *Paramecium*, Nature, 295, 609–611, 1982.
23. Wilson L. Action of drugs on microtubules, Life Sci., 17, 303–310, 1975.

- Schliwa M., Euteneuer U., Bulinski J.C., Izant J.C. Calcium lability of cytoplasmic microtubules and its modulation by microtubule-associated proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1037-1041, 1981.
- Schiff P.B., Horwitz S.B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1561-1565, 1980.
- Inoué S., Sato H. Cell motility by labile association of molecules: the nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 259-292, 1967.
14. Tilney L.G., Hatano S., Ishikawa H., Mooseker M.S. The polymerization of actin: its role in the generation of the acrosomal process of certain echinoderm sperm, *J. Cell Biol.*, **59**, 109-126, 1973.
 Carlsson L., Nyström L.-E., Sundkvist I., Markey F., Lindberg U. Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells, *J. Mol. Biol.*, **115**, 465-483, 1977.
 15. Lin D.C., Tobin K.D., Grumet M., Lin S. Cytochalasins inhibit nuclei-induced actin polymerization by blocking filament elongation, *J. Cell Biol.*, **84**, 455-460, 1980.
 Wieland T. Modification of actins by phallotoxins, *Naturwissenschaften*, **64**, 303-309, 1977.
 Brenner S.L., Korn E.D. Substoichiometric concentrations of cytochalasin D inhibit actin polymerization, *J. Biol. Chem.*, **254**, 9982-9985, 1979.
 16. Weisenberg R.C. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations, *Science*, **177**, 1104-1105, 1972.
 Timasheff S.N. The in vitro assembly of microtubules from purified brain tubulin, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 61-65, 1979.
 Kirschner M.W. Microtubule assembly and nucleation, *Int. Rev. Cytol.*, **54**, 1-71, 1978.
 Pollard T.D., Craig S.W. Mechanism of actin polymerization, *Trends Biochem. Sci.*, **7**, 55-58, 1982.
 17. Woodrum D.T., Rich S.A., Pollard T.D. Evidence for biased bidirectional polymerization of actin filaments using heavy meromyosin prepared by an improved method, *J. Cell Biol.*, **67**, 231-237, 1975.
 Bergen L.G., Borisy G.G. Head to tail polymerization of microtubules in vitro: electron microscope analysis of seeded assembly, *J. Cell Biol.*, **84**, 141-150, 1980.
 18. Wegner A. Head to tail polymerization of actin, *J. Mol. Biol.*, **108**, 139-150, 1976.
 Kirschner M.W. Implications of treadmilling for the stability and polarity of actin and tubulin polymers in vivo, *J. Cell Biol.*, **86**, 330-334, 1980.
 Margolis R.L., Wilson L. Microtubule treadmills - possible molecular machinery, *Nature*, **293**, 705-711, 1981.
 19. Kim H., Binder L.I., Rosenbaum J.L. The periodic association of MAP-2 with brain microtubules in vitro, *J. Cell Biol.*, **80**, 266-276, 1979.
 Amos L.A. Arrangement of high molecular weight associated proteins on purified mammalian brain microtubules, *J. Cell Biol.*, **72**, 642-654, 1977.
 Connolly J.A., Kalnins V.I. The distribution of tau and HMW microtubule-associated proteins in different cell types, *Exp. Cell Res.*, **127**, 341-350, 1980.
 20. Weber K., Osborn M. Intracellular display of microtubular structures revealed by indirect immunofluorescence microscopy. In: *Microtubules* (K. Roberts, J.S. Hyams, eds.), pp. 279-313. New York, Academic Press, 1979.
 21. Heidemann S.R., Kirschner M.W. Aster formation in eggs of *Xenopus laevis*: induction by isolated basal bodies, *J. Cell Biol.*, **67**, 105-117, 1975.
 22. Kuriyama R., Borisy G.G. Centriole cycle in Chinese hamster ovary cells as determined by whole-mount electron microscopy, *J. Cell Biol.*, **91**, 814-821, 1982.
 Sorokin S.P. Reconstructions of centriole formation and ciliogenesis in mammalian lungs, *J. Cell Sci.*, **3**, 207-230, 1968.
 Wheatley D.N. *The Centriole: A Central Enigma of Cell Biology*, New York, Elsevier, 1982.
 23. Schliwa M. Proteins associated with cytoplasmic actin, *Cell*, **25**, 587-590, 1981.
 Korn E.D. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells, *Physiol. Rev.*, **62**, 672-737, 1982.
 Weeds A. Actin-binding proteins - regulators of cell architecture and motility, *Nature*, **296**, 811-816, 1982.
 24. Hirokawa N., Heuser J.E. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells, *J. Cell Biol.*, **91**, 399-409, 1981.
- Mooseker M.S., Tilney L.G. Organization of an actin-filament-membrane complex:

- filament polarity and membrane attachment in the microvilli of intestinal epithelial cells, *J. Cell Biol.*, **67**, 725-743, 1975.
- Matsudaira P. T., Burgess D. R. Organization of the cross-filaments in intestinal microvilli, *J. Cell Biol.*, **92**, 657-664, 1982.
25. DeRosier D. J., Tilney L. G., Egelman E. Actin in the inner ear: the remarkable structure of the stereocilium, *Nature*, **287**, 291-296, 1980.
 26. Albrecht-Buehler G., Goldman R. D. Microspike-mediated particle transport towards the cell body during early spreading of 3T3 cells, *Exp. Cell Res.*, **97**, 329-339, 1976.
 - Albrecht-Buehler G. Filopodia of spreading 3T3 cells: do they have a substrate-exploring function? *J. Cell Biol.*, **69**, 275-286, 1976.
 - Burgess D. R., Schroeder T. E. Polarized bundles of actin filaments within microvilli of fertilized sea urchin eggs, *J. Cell Biol.*, **74**, 1032-1037, 1977.
 27. Lazarides E., Weber K. Actin antibody: the specific visualization of actin filaments in non-muscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2268-2272, 1974.
 - Sanger J. M., Sanger J. W. Banding and polarity of actin filaments in interphase and cleaving cells, *J. Cell Biol.*, **86**, 568-575, 1980.
 28. Scholey J. M., Taylor K. A., Kendrick-Jones J. Regulation of non-muscle myosin assembly by calmodulin-dependent light chain kinase, *Nature*, **287**, 233-235, 1980.
 - Adelstein R. S. Calmodulin and the regulation of the actin-myosin interaction in smooth muscle and nonmuscle cells, *Cell*, **30**, 349-350, 1982.
 29. Heath J. P., Dunn G. A. Cell to substratum contacts of chick fibroblasts and their relation to the microfilament system. A correlated interference-reflexion and high-voltage electron-microscope study, *J. Cell Sci.*, **29**, 197-212, 1978.
 - Geiger B., Tokuyasu K. T., Dutton A. H., Singer S. J. Vinculin, an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4127-4131, 1980.
 30. Wehland J., Osborn M., Weber K. Phalloidin-induced actin polymerization in the cytoplasm of cultured cells interferes with cell locomotion and growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5613-5617.
 31. Taylor D. L., Condeelis J. S. Cytoplasmic structure and contractility in amoeboid cells, *Int. Rev. Cytol.*, **56**, 57-144, 1979.
 32. Wand K. Filamin, a new high-molecular weight protein found in smooth muscle and nonmuscle cells. Purification and properties of chicken gizzard filamin, *Biochemistry*, **16**, 1857-1865, 1977.
 33. Yin H. L., Stossel T. P. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin—a calcium-dependent regulatory protein, *Nature*, **281**, 583-586, 1979.
 34. Stossel T. P., Hartwig J. H. Interactions of actin, myosin, and a new actin-binding protein of rabbit pulmonary macrophages: role in cytoplasmic movement and phagocytosis, *J. Cell Biol.*, **68**, 602-619, 1976.
 35. Lazarides E. Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular space, *Nature*, **283**, 249-256, 1980.
 - Steinert P. M. Structure of the three-chain unit of the bovine epidermal keratin filament, *J. Mol. Biol.*, **123**, 49-70, 1978.
 - Anderton B. H. Intermediate filaments: a family of homologous structures, *J. Muscle Res. Cell Motility*, **2**, 141-166, 1981.
 36. Nelson W. J., Traub P. Properties of a Ca^{2+} -activated protease specific for the intermediate-sized filament protein vimentin in Ehrlich Ascites tumour cells, *Eur. J. Biochem.*, **116**, 51-57, 1981.
 37. Lasek R. J., Krishnan N., Kaiserman-Abramof I. R. Identification of the subunit proteins of 10nm neurofilaments isolated from axoplasm of squid and *Myxicola* giant axons, *J. Cell Biol.*, **82**, 336-346, 1979.
 - Franke W. W., Schmid E., Osborn M., Weber K. Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 5034-5038, 1978.
 - Franke W. W., Schmid E., Winter S., Osborn M., Weber K. Widespread occurrence of intermediate-sized filaments of the vimentin-type in cultured cells from diverse vertebrates, *Exp. Cell Res.*, **123**, 25-46, 1979.
 38. Sun T.-T., Shih C., Green H. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 2813-2817, 1979.
 39. Klymkowsky M. W. Intermediate filaments in 3T3 cells collapse after intracellular injection of a monoclonal anti-intermediate filament antibody, *Nature*, **291**, 249-251, 1981.
 40. Cohen C. Cell architecture and morphogenesis. I. The cytoskeletal proteins, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 73-77, 1979.

- Cohen C. Cell architecture and morphogenesis. II. Examples in embryology, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 97-101, 1979.
- Oliver J.M., Berlin R.D. Mechanisms that regulate the structural and functional architecture of cell surfaces, *Int. Rev. Cytol.*, **74**, 55-94, 1982.
41. Heuser J., Kirschner M.W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons, *J. Cell Biol.*, **86**, 212-234, 1980.
- Wolosewick J.J., Porter K.R. Microtrabecular lattice of the cytoplasmic ground substance: artifact or reality, *J. Cell Biol.*, **82**, 114-139, 1979.
- Small J.V. Organization of actin in the leading edge of cultured cells: influence of osmium tetroxide and dehydration on the ultrastructure of actin meshworks, *J. Cell Biol.*, **91**, 695-705, 1981.
- Schliwa M., van Blerkom J. Structural interaction of cytoskeletal components, *J. Cell Biol.*, **90**, 222-235, 1981.
42. Lasek R.J. The dynamic ordering of neuronal cytoskeletons. In: *Cytoskeletons and the Architecture of Nervous Systems*, *Neurosci. Res. Program Bull.*, **19**, 7-32, 1981.
- Masters C.J. Interactions between soluble enzymes and subcellular structure, *Trends Biochem. Sci.*, **3**, 206-208, 1978.
- Fulton A.B. How crowded is the cytoplasm? *Cell*, **30**, 345-347, 1982.
43. Hunter T. Proteins phosphorylated by the RSV transforming function, *Cell*, **22**, 647-648, 1980.
- Bishop J.M. Oncogenes, *Sci. Am.*, **246**(3), 68-78, 1982.
44. Byers B., Porter K.R. Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after induction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **52**, 1091-1099, 1964.
- Vasiliev J.M. et al. Effect of colcemid on the locomotory behaviour of fibroblasts, *J. Embryol. Exp. Morphol.*, **24**, 625-640, 1970.
- Albrecht-Buehler G., Bushnell A. The orientation of centrioles in migrating 3T3 cells, *Exp. Cell Res.*, **120**, 111-118, 1979.
- Gottlieb A.I., May L.M., Subrahmanyam L., Kalnins V.I. Distribution of microtubule organizing centers in migrating sheets of endothelial cells, *J. Cell Biol.*, **91**, 589-594, 1981.
45. Carter S.B. Principles of cell motility: the direction of cell movement and cancer invasion, *Nature*, **208**, 1183-1187, 1965.
- Dunn G.A., Heath J.P. A new hypothesis of contact guidance in tissue cells, *Exp. Cell Res.*, **101**, 1-14, 1976.
- Benecke B.-J., Ben-Ze'ev A., Penman S. The control of mRNA production, translation and turnover in suspended and reattached anchorage-dependent fibroblasts, *Cell*, **14**, 931-939, 1978.
46. Albrecht-Buehler G. Daughter 3T3 cells. Are they mirror images of each other? *J. Cell Biol.*, **72**, 595-603, 1977.
- Aufderheide K.J., Frankel J., Williams N.E. Formation and positioning of surface-related structures in protozoa, *Microbiol. Rev.*, **44**, 252-302, 1977.
- Freeman G. The multiple roles which cell division can play in the localization of developmental potential. In: *Determinants of Spatial Organization* (S. Subtelny, ed.), pp. 53-76. New York, Academic Press, 1979.
47. Bellairs R., Curris A., Dunn G., eds. *Cell Behavior*, Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1982.

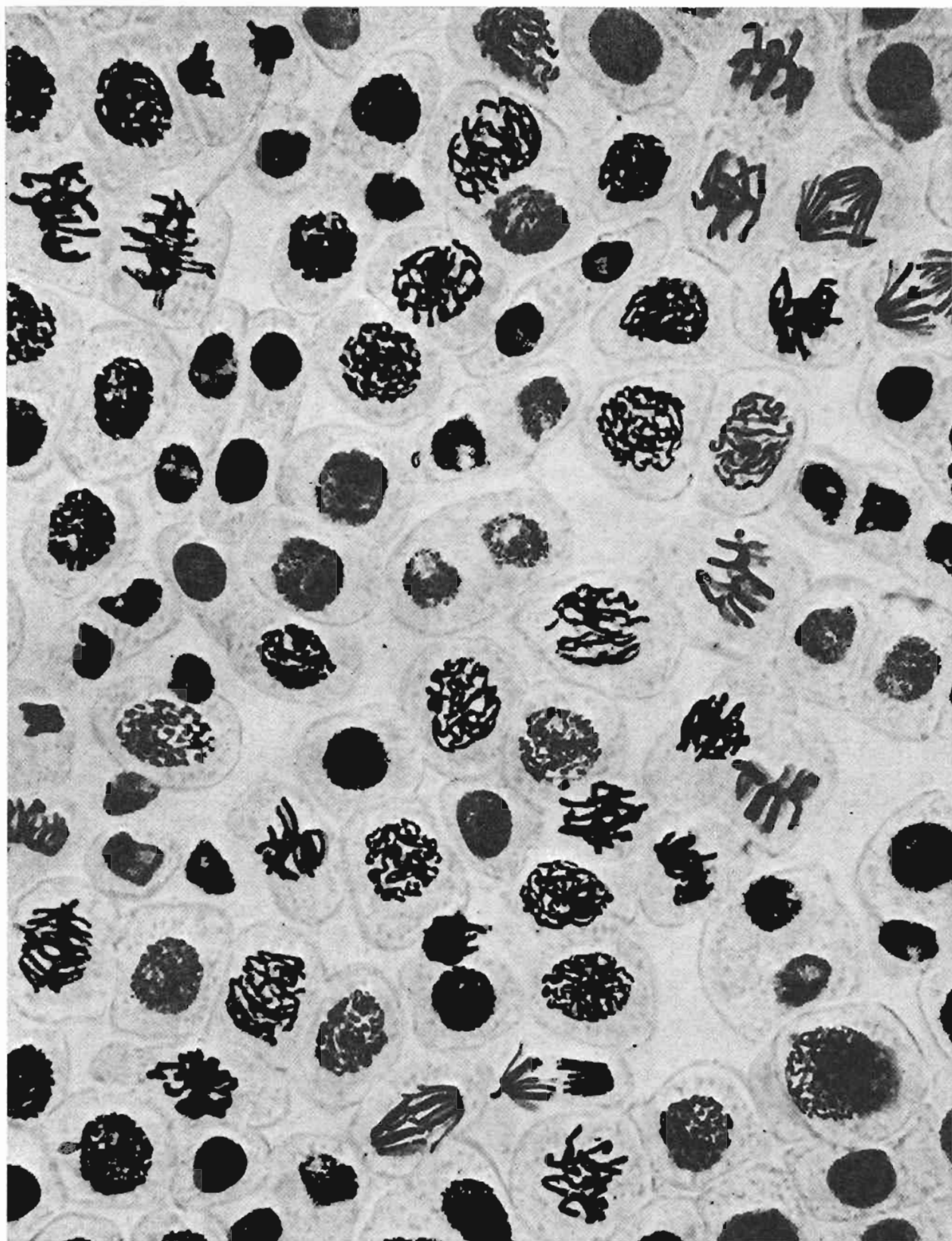
Будучи высокоорганизованными единицами в стремящейся к беспорядку Вселенной, клетки подвергаются различным вредным воздействиям, изнашиваются и стареют. Поэтому каждая отдельная клетка рано или поздно должна погибнуть. Чтобы организм в целом продолжал жить, он должен производить новые клетки с той же скоростью, с какой гибнут старые. Поэтому деление клеток – это вопрос жизни для всех организмов. У взрослого человека, например, миллионы клеток должны делиться каждую секунду только для того, чтобы поддерживать *status quo*.

Сам процесс клеточного деления очень легко наблюдать в микроскоп; он включает две последовательные стадии – деление ядра (митоз) и деление цитоплазмы (цитокinesis). Однако, прежде чем клетка сможет разделиться, она должна удвоить свою массу и редуцировать все свои компоненты. Только в этом случае обе дочерние клетки будут иметь все необходимое для того, чтобы начать свой собственный цикл развития, который закончится делением. Большая часть работы по подготовке к делению совершается незаметно для глаза во время фазы роста, получившей весьма неудачное название **интерфазы**.

Хотя клетки проводят большую часть своей жизни в интерфазе и только изредка находятся в фазе деления, большинство ранних работ по клеточному циклу было посвящено анализу именно этих коротких периодов клеточного деления (митоза и цитокinesis) – в основном потому, что они доступны для прямого микроскопического исследования. Относительно недавно благодаря использованию более тонких непрямых методов мы сравнительно многое узнали и об интерфазном периоде. В этой главе мы опишем некоторые методы, применяемые в настоящее время для исследования клеточного цикла, рассмотрим регуляцию этого цикла и познакомимся с важнейшими событиями, происходящими в каждой из его фаз. Хотя наши знания о молекулярных основах клеточного цикла довольно фрагментарны, там, где это возможно, мы постараемся обсудить и вероятные механизмы интересующих нас процессов.

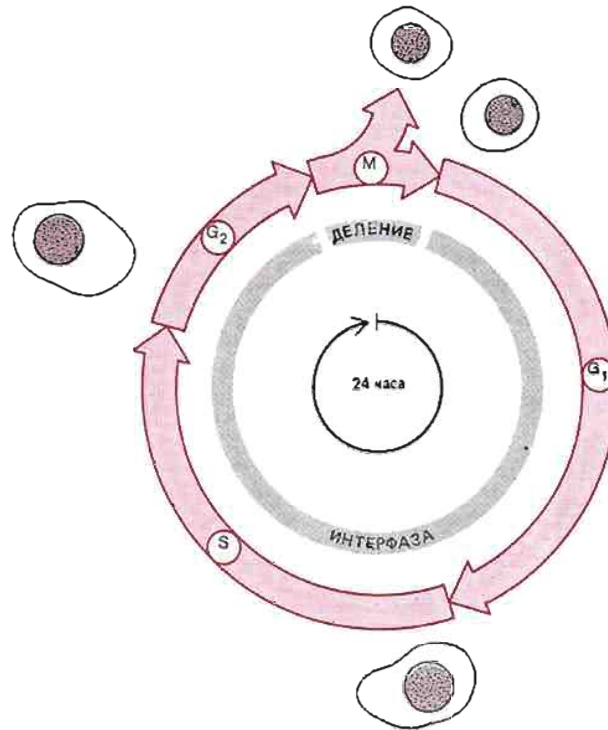
11.1. Контроль клеточного деления [1, 2]

Большая часть компонентов клетки синтезируется на протяжении всего интерфазного периода между последовательными митозами. Это затрудняет выделение различных стадий в интерфазе растущих клеток. Исключение составляет лишь синтез ДНК, поскольку ДНК клеточного ядра реплицируется в определенный период, составляющий лишь часть интерфазы. Этот период был назван **фазой S** (от слова *synthesis*) клеточного цикла. Вторая четко выраженная стадия цикла – это, конечно, фаза клеточного деления, включающая деление ядра (митоз), а затем и цитоплазмы (цитокinesis); фазу клеточного деления называли **фазой M** (от слова *mitosis*). Период между фазой M и началом синтеза ДНК обозначают как фазу G_1 (от англ. *gap* – промежуток), а период между завершением синтеза ДНК и последующей фазой M – как фазу G_2 . Таким образом, интерфаза включает фазы G_1 , S и G_2 . Она обычно занимает не менее 90% времени всего клеточного цикла. Например, у быстро делящихся



Клетки в кончике корня растения на различных стадиях митоза.
(С любезного разрешения John McLeisch.)

Рис. 11-1. Четыре последовательные фазы клеточного цикла. После фазы М, которая состоит в делении ядра (митоз) и цитоплазмы (цитокinesis), дочерние клетки вступают в интерфазу нового цикла. Интерфаза начинается с фазы G_1 , во время которой возобновляются интенсивные биосинтетические процессы, резко замедленные во время митоза. Фаза S — это период синтеза ДНК; она заканчивается, когда содержание ДНК в ядре удвоится и хромосомы полностью реплицируются (теперь каждая хромосома состоит из двух идентичных сестринских хроматид). Затем клетки вступают в фазу G_2 , которая кончается с началом митоза. Фаза М начинается с митоза (отсюда ее название) и заканчивается цитокinesisом. В начале фазы М удвоенные хромосомы, находившиеся ранее в диспергированном интерфазном состоянии, конденсируются и становятся хорошо видимыми в световой микроскоп. Ядерная оболочка разрушается, и происходят координированные перемещения хромосом, приводящие к разделению пар сестринских хроматид. После окончания деления ядра образуются две новые ядерные оболочки, а затем делится цитоплазма, в результате чего получаются две дочерние клетки, имеющие по одному ядру. Процесс цитокinesis завершает фазу М, и начинается интерфаза следующего клеточного цикла. Хотя на рисунке представлен типичный 24-часовой цикл, длительность клеточного цикла у высших эукариот сильно варьирует, причем большая часть различий обусловлена разной продолжительностью фазы G_1 (см. текст).

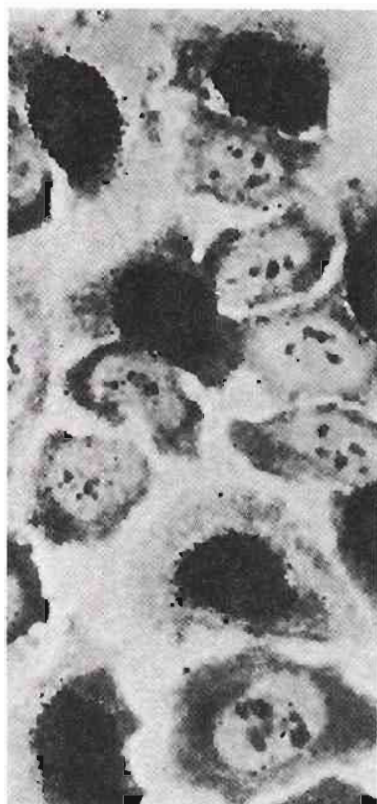


клеток высших эукариот последовательные митозы, прерывающие интерфазу, происходят один раз в 16–24 ч, а каждая М-фаза длится всего лишь 1–2 ч. Типичная картина клеточного цикла с его четырьмя фазами показана на рис. 11-1, а наиболее важные события цикла указаны в подписи к рисунку.

11.1.1. В многоклеточном организме разные клетки делятся с весьма различными скоростями [3]

В случае одноклеточных организмов, например бактерий и простейших, существует сильное селективное давление, заставляющее каждую отдельную клетку расти и делиться как можно быстрее. Поэтому темп клеточного деления лимитируется обычно лишь скоростью поступления в клетку питательных веществ и скоростью их использования. Совершенно иначе обстоит дело у многоклеточных организмов. Различные типы клеток по-разному (часто в очень небольшой мере) используют свои возможности быстрого деления, в результате чего количество клеток каждого типа остается на уровне, оптимальном для организма в целом. Это понятно: в данном случае важно выживание всего организма, а не отдельных клеток. В результате все 10^{13} клеток человеческого тела делятся с разной скоростью. Некоторые клетки, такие как нейроны, эритроциты и скелетные мышечные волокна, в зрелом состоянии не делятся вовсе. Другие клетки, например выстилающие поверхность тела и внутренние полости (эпителиальные клетки кишечника, легких, кожи), делятся быстро и непрерывно на протяжении всей жизни организма. Некоторые из этих клеток проходят полный цикл деления всего за 8 ч. Однако большинство животных клеток занимают промежуточное положение — они могут делиться, но делают это редко. Наблюдаемая длительность клеточного цикла (время генерации) составляет для разных клеток от 8 ч до 100 дней и более.

Эти различия в скорости деления клеток в разных тканях, а также продолжительность клеточного цикла можно оценивать количественно с помощью метода радиоавтографии. С этой целью специфически метят только те клетки, в которых синтезируется ДНК. Животному несколько раз вводят ме-



20 мкм

Рис. 11-2. Радиоавтограф, полученный после кратковременной инкубации клеток *in vitro* с ^3H -тимидином. Образование гранул серебра над клеточными ядрами (черные участки) свидетельствует о том, что клетки включали радиоактивный тимидин в ДНК и, следовательно, находились в фазе S. (С любезного разрешения James Clever.)

ченный тритием тимидин – предшественник вещества, используемого клеткой исключительно для синтеза ДНК. Через некоторое время исследуемую ткань извлекают, отмывают от невключившегося тимидина и фиксируют для микроскопии, после чего делают срезы толщиной примерно в одну клетку. Срезы покрывают тонким слоем фотоэмульсии и экспонируют несколько дней или недель, а затем проявляют как обычную фотопленку. Клетки, которые в период введения метки синтезировали ДНК (и, следовательно, находились в фазе S), можно идентифицировать по зернам серебра, появляющимся над клеточными ядрами (рис. 11-2). Зависимость доли меченых клеток от длительности введения радиоактивного тимидина позволяет судить об интервале между двумя последовательными S-фазами. Такие эксперименты показывают, что продолжительность клеточного цикла может сильно варьировать даже у клеток одной и той же ткани. На рис. 11-3 показаны различия в темпе деления клеток кишечного эпителия в зависимости от их положения в эпителиальном слое.

11.1.2. Различия в длительности клеточного цикла определяются в основном длиной фазы G_1 [1, 4]

Основное различие между быстро и медленно делящимися клетками состоит в продолжительности времени, которое они проводят в фазе G_1 клеточного цикла. Некоторые клетки делятся очень медленно, оставаясь в G_1 многие дни или даже годы. Напротив, время от начала фазы S до окончания митоза удивительно постоянно и не коррелирует с темпом деления.

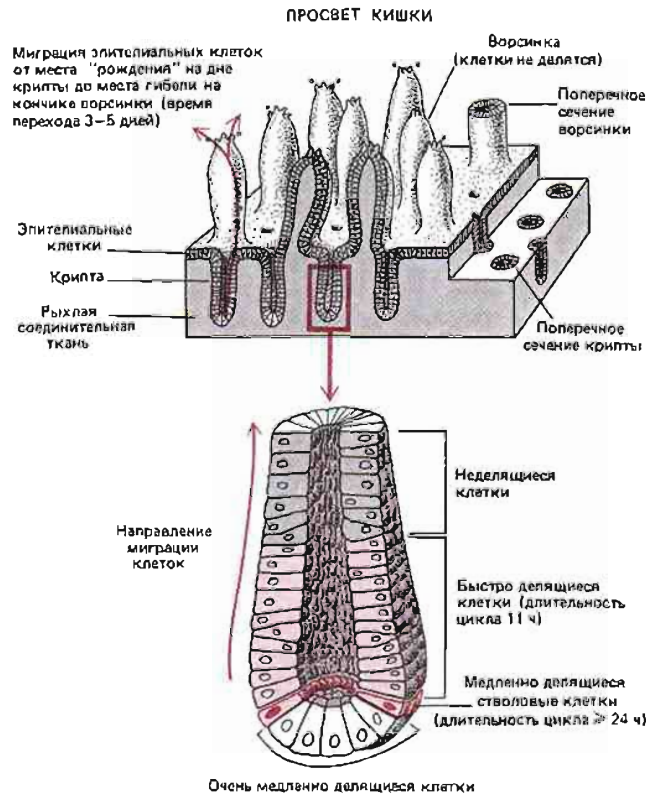
Гораздо точнее можно измерять параметры клеточного цикла у клеток, растущих в культуре, где легко контролировать и изменять условия среды. Деление клеток в культуре можно замедлить или остановить, ограничивая поступление необходимых питательных веществ или белковых факторов роста, добавляя небольшие количества ингибиторов белкового синтеза или увеличивая плотность культуры. Во всех этих случаях клеточный цикл останавливается в фазе G_1 по-видимому, если клетка прошла эту фазу, она уже не может не пройти также и фазы S, G_2 и M. Как показали эксперименты, в конце фазы G_1 есть определенный момент, после которого возврат в G_1 невозможен. Этот момент получил название **точки рестрикции** (точка R). После того как клетки минуют ее, они неизбежно завершают цикл, проходя его с обычной скоростью, независимо от внешних условий (рис. 11-4).

11.1.3. Определение длины фаз клеточного цикла [5, 6]

Как определить длину каждой фазы клеточного цикла? Прежде всего нужно измерить продолжительность всего цикла. Это легко сделать в гомогенной популяции культивируемых клеток – нужно лишь периодически подсчитывать число клеток под микроскопом и определить время, необходимое для удвоения общего числа клеток (вместо подсчета клеток можно учитывать их общую массу). Для определения продолжительности фазы S в культуральную среду, где растут клетки, добавляют меченый тритием тимидин на время, гораздо более короткое, чем длительность S-фазы (обычно не более чем на полчаса). Затем клетки исследуют методом радиоавтографии и по наличию зерен серебра определяют долю клеток, включивших радиоактивный изотоп в ДНК (см. рис. 11-2). Как показано на рис. 11-5, эта доля примерно равна средней доле фазы S во всем цикле (в данной популяции).

Длительность фазы M можно определить аналогичным образом. Под микроскопом подсчитывают долю клеток, содержащих в данный момент конденсированные хромосомы (полученная величина называется **митотическим индексом**). Во всех подобных вычислениях обычно используют небольшие поправки, поскольку в непрерывно растущей популяции всегда больше «молодых» клеток, чем «старых» (их возраст отсчитывают от последнего клеточного деления). Поскольку одна старая клетка, разделившись, превращается

Рис. 11-3. Деление и миграция клеток в эпителиальной выстилке тонкой кишки мыши (схема). Деление клеток происходит только в нижней части бокаловидных впячиваний эпителия, называемых криптами. Новообразованные клетки движутся вверх и образуют эпителий кишечных ворсинок, играющих важную роль в пищеварении и всасывании питательных веществ из просвета кишки. Большая часть эпителиальных клеток имеет короткий период жизни и слущивается с кончика ворсинки не позднее чем через пять дней после выхода из крипты. Однако кольцо примерно из 20 медленно делящихся «бессмертных» клеток (их ядра выделены красным цветом) остается связанным с основанием крипты. Эти так называемые стволовые клетки дают при делении две дочерные клетки: одна из них остается на месте и далее снова функционирует как недифференцированная стволовая клетка, а другая мигрирует наверх, где дифференцируется и входит в состав эпителия ворсинки. Иногда, однако, при делении стволовой клетки образуются две дифференцированные клетки. В этом случае дефицит стволовых клеток, как полагают, покрывается за счет деления одной или нескольких стволовых клеток на дне крипты; эти клетки, по-видимому, делятся еще медленнее, чем их соседи и при делении образуют две стволовые клетки. Судя по результатам опытов, в которых нарушали нормальную организацию кишечного эпителия, различия в продолжительности клеточного цикла у различных клеток определяются частично положением клеток в эпителии, а частично их предисторией. (По С.С. Potten et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 560, 281–299, 1979.)

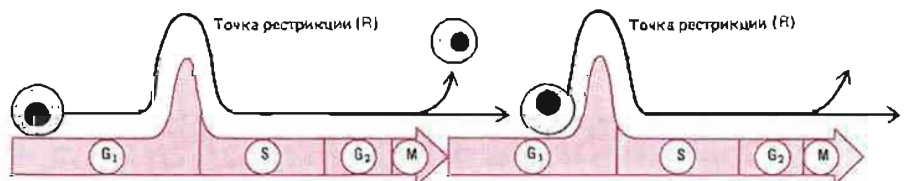


в две молодые, в ранней фазе G_1 находится вдвое больше клеток, чем в поздней фазе M .

Определение длительности фаз G_1 и G_2 — задача более сложная, так как нет способа избирательно метить клетки, находящиеся в этих фазах. Решить эту проблему можно, синхронизируя рост клеток в культуре и определяя промежутки времени между фазами, доступными для выявления. Простейший способ получить синхронно растущую популяцию клеток млекопитающих основан на том, что в фазе M у клеток происходят изменения цитоскелета, приводящие к их «округлению». Поэтому при росте на поверхности культуральной чашки клетки, находящиеся в фазе M , прикреплены настолько слабо, что их нетрудно снять с поверхности путем легкого встряхивания (рис. 11-6).

Митотические клетки, только что собранные с поверхности культуральной чашки, представляют собой синхронную популяцию, которая почти сразу же вступает в фазу G_1 . Время между сбором клеток и началом массового включения меченого тимидина в ДНК — это и есть продолжительность фазы G_1 . Продолжая наблюдать за той же клеточной популяцией, можно было бы в принципе определить и длительность фазы G_2 , однако с течением времени такая культура десинхронизируется. Более точно можно определить продол-

Рис. 11-4. Клетки обычно перестают делиться, дойдя до точки рестрикции (R) в поздней фазе G_1 , если только они не получают сигнала, побуждающего их вступить в следующий цикл.



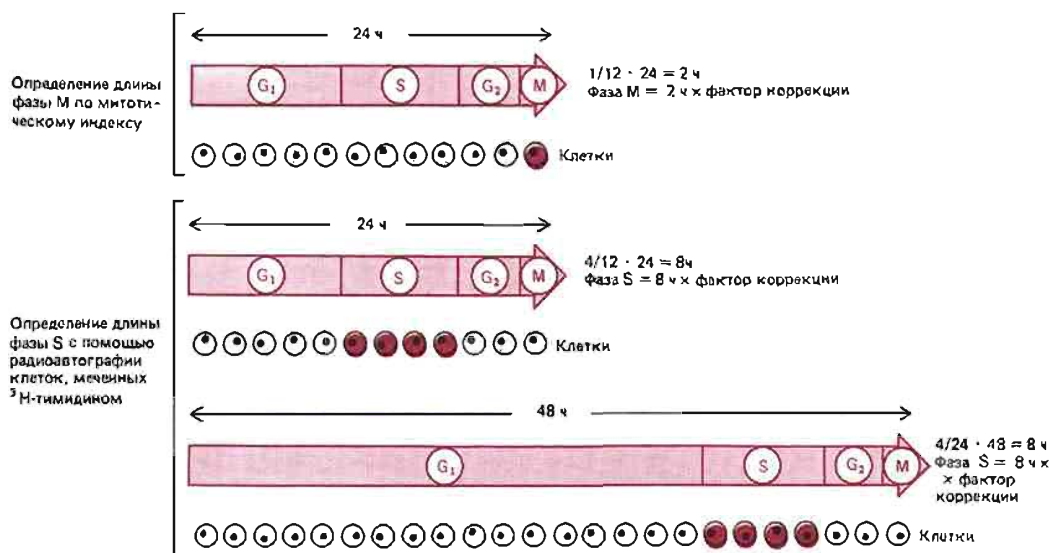


Рис. 11-5. Иллюстрация общего положения, согласно которому длина каждой фазы клеточного цикла примерно равна доле клеток, находящихся в этой фазе в каждый данный момент, умноженной на общую продолжительность цикла (предполагается, что все клетки в популяции растут с одной и той же скоростью). Указанный в формулах «фактор коррекции» изменяется от 0,7 для ранней фазы G_1 до 1,4 для фазы М. В фазе S фактор коррекции имеет промежуточное значение. Этот фактор необходим потому, что в непрерывно растущей популяции всегда больше молодых клеток, чем старых. Точное распределение клеток по возрастам дает уравнение $y = 2^{(1-x)}$, где y (изменяющийся от 2 до 1) представляет собой относительное число клеток в возрасте x , причем x меняется от 0 в начале G_1 до 1 в конце митоза.

жительность G_2 непрямым методом, показанным на рис. 11-7 (с использованием асинхронно растущих клеток). Кроме того, продолжительность фазы G_2 можно узнать, вычтя длины фаз S, G_1 и М из независимо определенного времени клеточного цикла.

Анализ клеточного цикла в последние годы значительно упростился благодаря использованию дегида современной электроники — флуоресцентного анализатора клеток. В этом сложном приборе клеточную суспензию пропускают через узкое отверстие со скоростью нескольких тысяч клеток в секунду, и оптические измерения производятся для каждой отдельной клетки, проходящей мимо маленького окошечка (см. разд. 4.3.1). При анализе асинхронной клеточной популяции клетки обрабатывают фиксатором, что приводит к остановке деления и делает клеточные мембраны проницаемыми. Затем клетки обрабатывают красителем, который может флуоресцировать лишь будучи связанным с ДНК. Интенсивность флуоресценции окрашенных таким

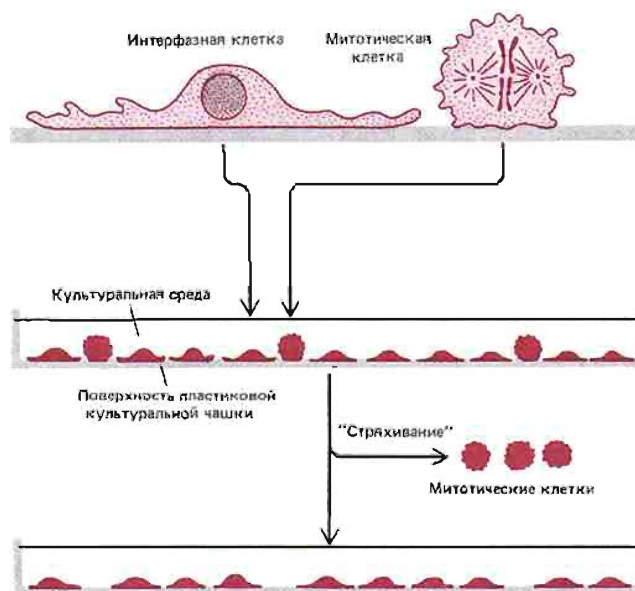


Рис. 11-6. Обычный метод получения синхронно растущей популяции животных клеток в культуре. Митотические клетки отбирают, стряхивая их с поверхности чашки, в которой они растут. После перенесения в новую чашку эти клетки проходят последующие циклы синхронно.

Рис. 11-7. Метод, обычно используемый для измерения продолжительности фазы G_2 . Асинхронно растущую клеточную популяцию короткое время выдерживают в присутствии ^3H -тимидина. После отмывки клеток от невключившегося меченого тимидина митотические клетки стряхивают через различные промежутки времени и находят минимальное время, когда радиоактивная ДНК уже появляется в делящихся клетках. Это «время задержки» равно продолжительности фазы G_2 . Вместо этого можно с помощью радиоавтографии определить время появления меченых тимидином ядер, которые содержат также конденсированные хромосомы. Если клетки находятся в ткани, применим только радиоавтографический метод.

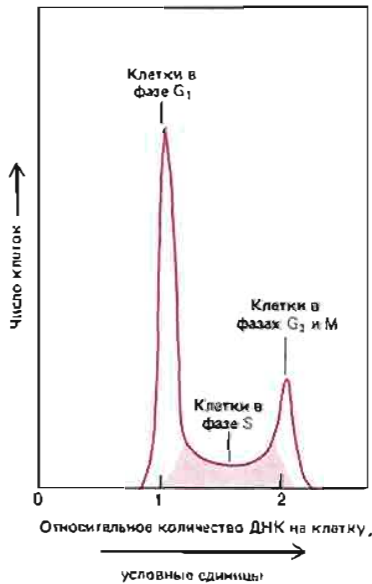
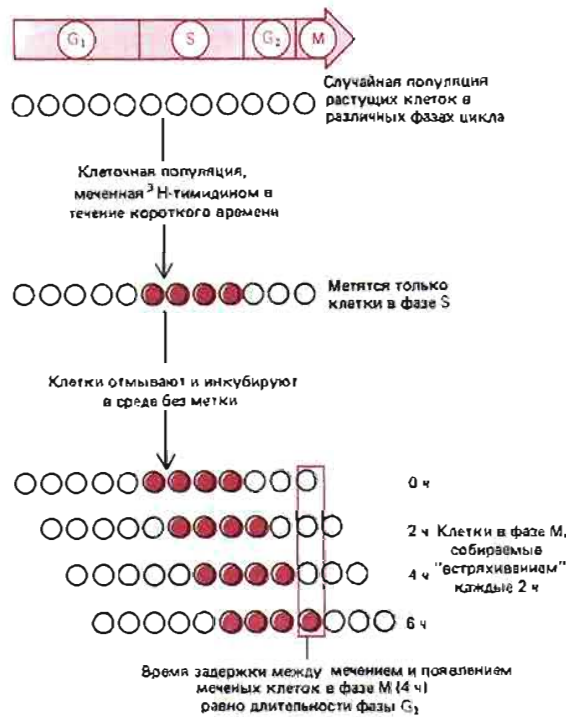


Рис. 11-8. Типичные данные, получаемые при анализе содержания ДНК в отдельных клетках растущей популяции с помощью флуоресцентного анализатора. Количество ДНК выражают в условных единицах и определяют по количеству связанного флуоресцентного красителя. Тот факт, что число клеток в фазе G_1 существенно больше, чем в G_2 и M, означает, что в данной популяции фаза G_1 длиннее, чем G_2 (см. рис. 11-5).

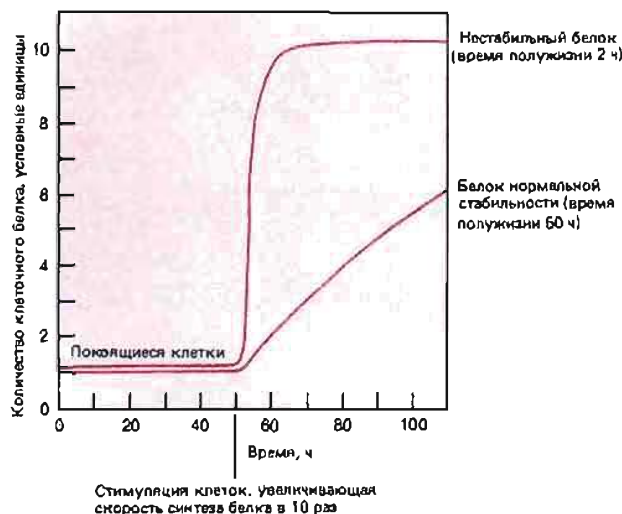
образом клеток прямо пропорциональна содержанию в них ДНК. Пропуская клетки через анализатор, можно быстро определять относительную яркость флуоресценции большого количества клеток, а тем самым и относительное содержание в них ДНК. Клетки с наименьшим количеством ДНК находятся в фазе G_1 , клетки в фазах G_2 и M содержат вдвое больше ДНК, а в фазе S — промежуточное количество (заштрихованная область на рис. 11-8). Длительности фаз G_1 , $G_2 + M$ и S легко вычислить по доле клеток, попадающих в каждую из этих трех групп (см. рис. 11-5).

11.1.4. Возможно, что деление клеток контролируется особым «триггерным» белком [1, 7]

Пока не известно, от чего зависит, пройдет ли клетка млекопитающего через точку рестрикции (R) в фазе G_1 и вступит ли в новый цикл. Согласно одной из гипотез, для того чтобы клетка прошла точку R, начала синтезировать ДНК и стала готовиться к делению, в ней должно накопиться пороговое количество какого-то нестабильного «триггерного» белка (называемого также U-белком, от слова unstable). Поскольку этот гипотетический белок нестабилен, его концентрация может стать достаточной для запуска клеточного деления только в том случае, если он будет синтезироваться сравнительно быстро. В фазе M, когда синтез белков очень незначителен, концентрация U-белка резко падает и вновь достигает порогового уровня лишь в фазе G_1 .

Такая модель с участием триггерного белка, возможно, слишком упрощает действительную картину, но она полезна для интерпретации наблюдаемого поведения клеток. Например, согласно этой модели, любые условия, снижающие общую интенсивность белкового синтеза, должны отдалять накопление пороговой концентрации U-белка, удлинять фазу G_1 и замедлять темп деления клеток. Действительно, когда клетки растут *in vitro* в присутствии различных концентраций ингибиторов белкового синтеза, клеточный цикл сильно растягивается, тогда как время, необходимое для прохождения фаз S, G_2 и M, существенно не изменяется. Наблюдаемое удлинение фазы G_1 хоро-

Рис. 11-9. Иллюстрация принципа, согласно которому при стимуляции синтеза всех клеточных белков относительное количество нестабильных белков увеличивается (см. также разд. 13.4.8). Поскольку темп роста и деления клеток будет соответствовать *среднему* увеличению количества клеточных белков (нижняя кривая), нестабильный белок в растущих клетках будет содержаться в большем относительном количестве (а значит, и в большей концентрации), чем в нерастущих клетках.



шо согласуется с предсказаниями, вытекающими из данной модели, если предположить, что каждая молекула U-белка остается активной в клетке лишь несколько часов. Эта модель позволяет также объяснить торможение роста клеток при увеличении их плотности или при голодании; как известно, оба этих фактора снижают синтез белка и останавливают клеточный цикл в наиболее чувствительной точке фазы G_1 — точке R.

Как можно на основе этой модели объяснить действие специфических факторов роста, которые индуцируют деление лишь определенных, чувствительных к ним клеток? Прежде всего важно отметить, что клетки, остановленные в точке R, перестают не только синтезировать ДНК и делиться, но также и расти. Однако это не значит, что у них полностью прекращаются биосинтетические процессы. В частности, нормальный распад (или «оборот») белков в клетках млекопитающих (см. разд. 7.2.9) настолько интенсивен, что скорость синтеза белка в покоящихся клетках должна составлять не менее $1/5$ от его скорости у растущих клеток просто для того, чтобы поддерживать status quo.

Было высказано предположение, что механизмы, контролирующие рост клеток в ткани, воздействуют непосредственно на общую интенсивность белкового синтеза в клетках; согласно этой гипотезе, в отсутствие специфических стимулирующих факторов (и/или при наличии ингибирующих факторов) клетки будут синтезировать белки лишь на некотором низком «поддерживающем» уровне. При этом количество белков со средней скоростью обновления будет поддерживаться на том же уровне, что и в растущих клетках, а концентрация очень нестабильных белков (включая гипотетический U-белок) будет уменьшаться пропорционально уменьшению скорости их синтеза. С другой стороны, при условиях, способствующих ускорению общего белкового синтеза, количество U-белка превысит пороговый уровень, что позволит клеткам пройти точку рестрикции (R) и приступить к делению (рис. 11-9).

Культивируемые клетки, цикл которых остановлен в точке R, долгое время остаются жизнеспособными и здоровыми, даже если им не хватает многих питательных веществ. Между тем клетки, обреченные на голодание в другие моменты цикла, обычно гибнут. Это позволяет предположить, что механизм регуляции роста, включающий специфическую точку рестрикции, мог возникнуть, в частности, потому, что клеткам, которым из-за условий существования или взаимодействия с другими клетками необходимо перестать делиться, нужна «безопасная точка» для остановки (R). Клетки, остановленные в этом стабильном покоящемся состоянии, часто говорят, что они вступили в «фазу G_0 » клеточного цикла.



Рис. 11-10. График, показывающий разброс по длительности клеточного цикла, обычно наблюдаемый при росте однородной популяции клеток в культуре. Эти данные получены путем наблюдения за отдельными клетками в микроскоп и прямого измерения времени между их последовательными митозами.



Рис. 11-11. Одно из объяснений классического опыта, в котором клетки в культуре перестают делиться при образовании сплошного монослоя: если в таком монослое сделать «рану», удалив часть клеток, то на ее краях клетки начинают делиться.

Основной альтернативой модели с триггерным белком является так называемая модель «вероятностного перехода». Она была предложена для объяснения наблюдений, сделанных с помощью дейтроферной киносъемки клеточных клонов, растущих в однотипных условиях в культуре. Хотя такие клетки генетически идентичны, они сильно отличаются друг от друга по продолжительности клеточного цикла. Типичное распределение по этому параметру (рис. 11-10) имело такой вид, как будто время клеточного цикла регулировалось каким-то вероятностным или стохастическим событием. Иными словами, для каждой клетки существует некоторая постоянная вероятность пройти точку рестрикции R, не зависящая от того, сколько времени прошло с момента последнего деления. Переход клетки в фазу S является в этой модели случайным процессом, аналогичным радиоактивному распаду нестабильных атомов. Стоит отметить, однако, что значительный разброс по длительности клеточного цикла (рис. 11-10) не противоречит и биологически более обоснованной модели с триггерным белком, так как даже генетически идентичные клетки, находящиеся в фазе G_1 , могут сильно различаться между собой по скорости белкового синтеза.

11.1.5. Клеточное деление регулируется рядом механизмов, действующих по принципу обратной связи

Клеточное деление в тканях контролируется неизвестными механизмами, которые позволяют клеткам делиться в том, и только в том, случае, если необходимы новые клетки. Например, обычно находящиеся в покое клетки печени начинают быстро делиться после удаления части этого органа. Они перестают делиться, как только масса печени вновь достигает нормы (разд. 16.3.2). Такого же рода ограниченное деление клеток наблюдается в коже после ранения. Без регуляции клеточного деления по принципу обратной связи многоклеточное животное быстро погибло бы либо вследствие избыточного деления клеток (как это бывает при раке), либо из-за неспособности к надлежащему замещению клеток в тканях, в которых они непрерывно отмирают (как, например, в эпителиях). Аналогичные регуляторные механизмы важны также для упорядоченного развития клеток и тканей в эмбриогенезе (см. гл. 15 и 16).

11.1.6. Нормальные клетки млекопитающих, растущие в культуре, перестают делиться, когда им не хватает свободного места [8]

Когда фибробласты высевают на чашки с культуральной средой, они прикрепляются к поверхности, расправляются на ней и начинают делиться. Обычно этот процесс продолжается до тех пор, пока не образуется сплошной слой толщиной в одну клетку. В этот момент, когда уже не остается свободного места, нормальные клетки перестают делиться. Описанное явление получило название *контактного торможения*. Если сплошной монослой «поранить» иглой таким образом, чтобы на чашке образовалась свободная от клеток зона, клетки на краях этой зоны начинают продвигаться на свободное место и делиться (рис. 11-11).

Однако термин «контактное торможение», возможно, не отражает сути дела. В других экспериментах степень расправливания клеток контролировали, изменяя адгезионные свойства поверхности, на которой росли клетки, а не плотность культуры. Полученные результаты позволяют предполагать, что существенным фактором, от которого зависит деление клеток в культуре, является не контакт клеток друг с другом, а степень их расправливания. Даже в отсутствие клеточных контактов чем меньше распластана клетка, тем больше времени занимает ее клеточный цикл.

Округление клеток сопровождается также снижением общей интенсивности белкового синтеза. Поэтому эксперимент, схематически представленный на рис. 11-11, можно интерпретировать и на основе гипотезы триггерного

белка. А именно, когда клетки контактируют между собой, это ограничивает для них возможность расплываться на субстрате, что ведет к уменьшению скорости синтеза белков, включая и U-белок. В результате концентрация U-белка в клетке падает и происходит остановка клеток в точке R фазы G_1 . Клетки же на краю «раны» освобождаются от подобного ингибирования, так как по мере их расплывания синтез белков в них усиливается, что приводит к повышению концентрации U-белка до порогового уровня.

Почему же изменение формы клеток ведет к изменению синтеза белка? Причиной этого мог бы быть рост отношения поверхности клетки к ее объему, происходящий при расплывании; возможно также, что синтез белка ускоряют существенные перестройки цитоскелета, которые всегда происходят при уплощении клетки.

Если выводы из наблюдений над клетками в культуре приложимы и к клеткам в тканях, то одним из факторов, контролирующих деление клеток в организме, может быть наличие контакта между соседними клетками, ограничивающего для них возможность расплываться. Напротив, наличие пустого пространства, возникшего при ранении или при естественной утрате клеток, стимулирует деление благодаря тому, что соседние клетки расплываются на этом пространстве. Но, как мы увидим, это не позволяет полностью объяснить регуляцию клеточного роста в тканях.

11.1.7. Деление клеток регулируется также позиционными сигналами [9]

Как правило, клетки в тканях делятся только в том случае, когда они находятся в подходящем окружении, даже если имеется свободное пространство для их роста. Например, в многослойном эпидермисе кожи деление обычно происходит лишь в одном базальном слое клеток, находящемся на базальной мембране, которая отделяет их от дермы (разд. 16.4.2). Эти делящиеся клетки дают начало дочерним клеткам, которые вытесняются с базальной мембраны по направлению к поверхности эпидермиса. По мере того как клетки мигрируют в этом направлении, они перестают делиться и начинают образовывать большое количество кератиновых филаментов, которые накапливаются в цитоплазме, образуя плотный защитный слой. Если базальные клетки инъектировать в расположенную глубже дерму или, наоборот, «поднять», чтобы они утратили контакт с базальной мембраной, они перестанут делиться. Вероятно, эпидермальные клетки делятся только при стимуляции каким-то неизвестным фактором, имеющимся на границе между дермой и эпидермисом. Этим фактором может быть диффундирующая молекула или же компонент базальной мембраны.

Хотя о позиционных факторах, необходимых для клеточного деления, мало что известно, они могут, вероятно, иметь широкое распространение. Например, в эмбриональной поджелудочной железе млекопитающего для нормального деления и дифференцировки эпителиальных клеток нужен специфический белковый фактор, выделяемый подстилающими клетками мезенхимы этой железы. Изящные опыты с трансплантацией тканей были проведены на развивающемся эпителии придатков тела насекомых. Эти опыты выявили сложную картину межклеточных взаимодействий, контролирующих деление клеток с использованием принципов, которые, вероятно, являются общими для многих развивающихся тканей животных. Например, если пересадить кусочек эпителия в гомологичное место, то он приживляется без заметного деления клеток. Если же эпителий пересадить на другое, негомологичное, место, то и клетки трансплантата, и соседние клетки хозяина начинают пролиферировать, а затем дифференцируются в клетки такого типа, какие в норме лежат между областью, откуда взят трансплантат, и областью, куда он пересажен (разд. 15.6.10).

Многим культивируемым животным клеткам для того, чтобы делиться и/или выжить, требуются ничтожные количества (порядка 10^{-10} моль/л) специфических факторов роста, причем клеткам разного типа нужны разные фак-

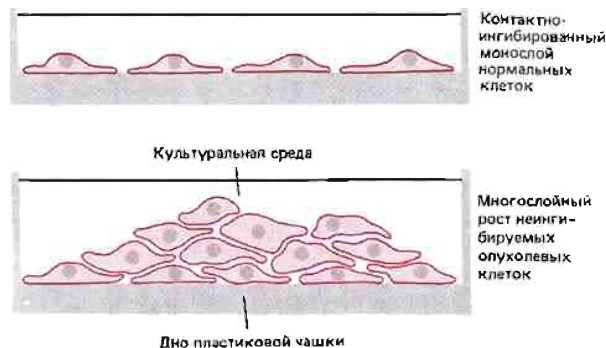
торы или их смесь. Факторами роста могут быть белки или небольшие молекулы вроде пептидов или стероидов. Среди ростовых факторов имеются гормоны, циркулирующие в крови, и вещества, действующие на коротком расстоянии («локальные химические медиаторы», см. разд. 13.1.5). Возможно, что в ряде случаев именно такие медиаторы ответственны за позиционный контроль клеточного деления в тканях.

11.1.8. Опухолевые клетки утрачивают нормальный механизм регуляции роста [10]

В последние годы немало работ в области клеточной биологии было посвящено поискам причин рака и способов его лечения. Опухолевые клетки проявляют ряд свойств, опасных для организма-хозяина, таких как способность прорастать в другие ткани, а также стимулировать рост капилляров (что обеспечивает пролиферирующим опухолевым клеткам хорошее кровоснабжение). Но одно из определяющих свойств опухолевых клеток — это аномальная реакция на сигналы, контролирующие деление нормальных клеток. Опухолевые клетки делятся сравнительно бесконтрольно до тех пор, пока не убивают хозяина. Это фатальное отсутствие сдерживающего фактора явилось стимулом для интенсивного исследования регуляции клеточного деления. Одним из результатов было появление множества широко разрекламированных «успехов» в этой области, многие из которых, казалось, позволяли уже понять, каким образом контролируется деление клеток и что в нем нарушено при раке. В недалеком прошлом фундаментальное отличие раковых клеток от нормальных видели в изменениях содержания циклических нуклеотидов, текучести мембраны, секретируемых белков, цитоскелета, ионной проводимости и многого другого... Хотя истинные молекулярные механизмы трансформации пока неясны, очевидно, что деление опухолевых клеток как в культуре *in vitro*, так и в тканях гораздо менее подвержено регуляции по принципу обратной связи, чем деление нормальных клеток. Например, раковые клетки в культуре обычно продолжают делиться, когда нормальные уже не делятся из-за контактного торможения. В результате они наползают друг на друга, когда не имеют больше возможности расплываться по поверхности культуральной чашки (рис. 11-12). Кроме того, опухолевым клеткам для роста требуется меньше ростовых факторов, чем нормальным клеткам (иногда это, возможно, объясняется способностью опухолевых клеток вырабатывать собственные факторы роста).

Другой фундаментальной особенностью раковых клеток является то, что они, как популяция, способны делиться неограниченно долго. Напротив, почти все нормальные клетки млекопитающих, видимо, погибают после ограниченного числа делений. Например, нормальные фибробласты млекопитающих, растущие в культуре, делятся в среднем 20–50 раз в зависимости от вида животного. По мере того как такая культура стареет, клеткам требуется все больше времени для прохождения цикла, и в конце концов вся популяция

Рис. 11-12. Схема, иллюстрирующая характер роста многих опухолевых клеток в культуре. В отличие от большинства нормальных клеток они обычно продолжают расти и наползают друг на друга, после того как образуют плотный монослой.



перестает делиться и гибнет. Как правило, клетки, взятые от старых животных, делятся меньшее число раз, чем клетки молодых особей; это говорит о том, что клетки старых животных уже использовали большую часть своего митотического потенциала, еще находясь в организме.

Такие наблюдения привели к представлению о том, что в процессе своей дифференцировки клетки программируются на гибель после определенного числа делений. Эта запрограммированная гибель клеток, возможно, полезна организму как дополнительная страховка от неконтролируемого роста какой-нибудь клетки. Поэтому большинство клеток, выпавших из-под нормального контроля клеточного деления, даст начало лишь небольшим клонам потомков, после чего вся аномальная популяция погибнет. В главе 16 мы увидим, однако, что опухолевое перерождение означает нечто большее, чем просто нарушение пролиферации, и что не только контроль митотической активности и запрограммированное старение клеток делают рак относительно редким событием.

Заключение

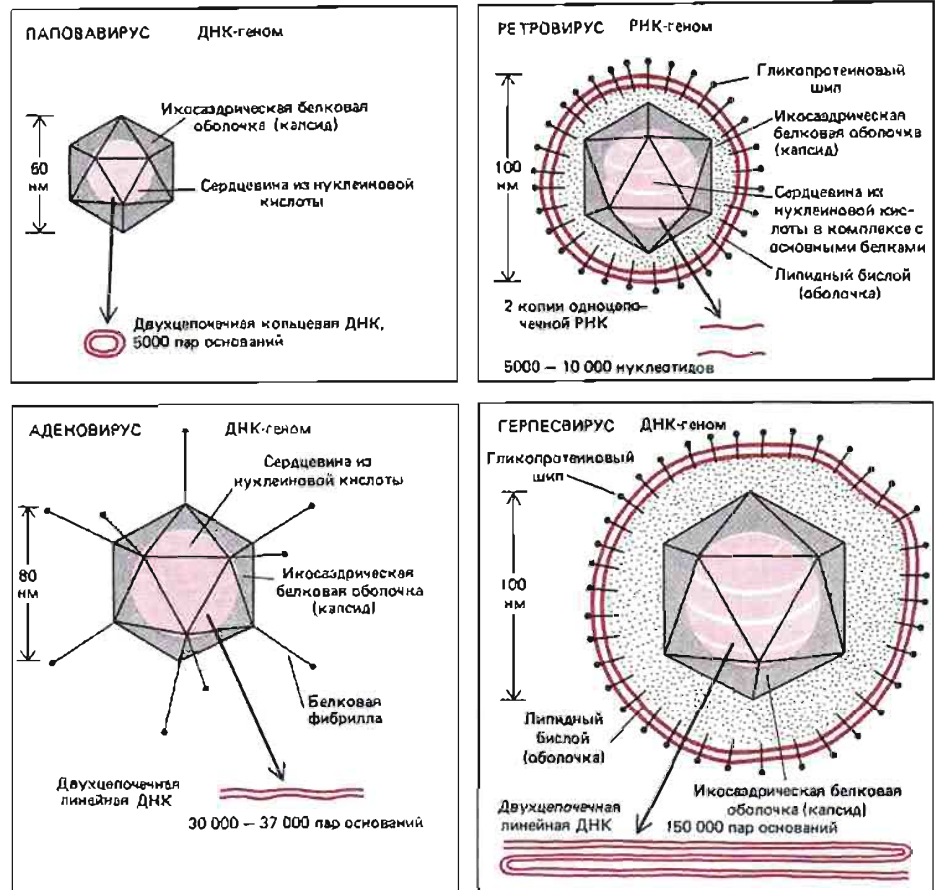
Целостность тканей может поддерживаться только в том случае, если рост и деление каждой индивидуальной клетки многоклеточного организма запрограммированы и скоординированы с делением соседних клеток. В результате различные клетки делятся с весьма разными скоростями в зависимости от их пространственного расположения. Если клетки активно не пролиферируют, то синтез белка в них понижен, а клеточный цикл остановлен в фазе G_1 . Если же клетка встала на путь, ведущий к делению (после прохождения особой «точки рестрикции» R в поздней фазе G_1), то в ней начинается синтез ДНК (фаза S), а затем она проходит фазы G_2 и M и вступает в фазу G_1 следующего цикла. У млекопитающих рост и деление клеток контролируются различными внешними факторами по принципу обратной связи. К таким факторам относятся, в частности, наличие свободного пространства, на котором клетки могут расплываться, и секреция окружающими клетками стимулирующих и ингибирующих агентов. Опухолевые клетки выходят из-под контроля многих регуляторных факторов, и это делает их опасными для организма-хозяина.

11.2. Опухолеродные вирусы как инструмент для изучения регуляции клеточного цикла [11]

Многие вирусы (рис. 11-13) вызывают опухоли у целого ряда позвоночных животных — от рептилий до обезьян. Поэтому кажется вероятным, что причиной некоторых опухолей человека тоже окажутся специфические вирусы. Естественно, что на попытки выделить онкогенные (опухолеродные) вирусы из опухолей человека уже затрачены большие средства. До сих пор, однако, решение этой проблемы наталкивается на такие трудности, что большинство ученых начинает сомневаться, что вирусы — главная причина опухолей человека. Несмотря на это, исследование онкогенных вирусов привело к значительным успехам в изучении контроля роста и деления клеток. Одним из важнейших результатов этих исследований явилась разработка клеточных культур, в которых легко наблюдать опухолевую (неопластическую) трансформацию, вызываемую онкогенными вирусами, изучение которой *in vivo* связано с почти непреодолимыми трудностями. В настоящее время существуют разнообразные линии клеток, которые при заражении опухолеродными вирусами претерпевают трансформацию. Трансформированные клетки можно легко узнать по изменениям в морфологии и в условиях, необходимых для роста. Некоторые важные различия между нормальными и опухолевыми клетками приведены в табл. 11-1.

Из онкогенных вирусов первым был открыт вирус куриной саркомы Рауса, генетическим материалом которого служит РНК длиной около 9000 ну-

Рис. 11-13. Четыре основных типа вирусов, вызывающих опухоли у животных. Как показано на рисунке, капсиды ретровирусов и герпесвирусов окружены мембраной из двойного слоя липидов.

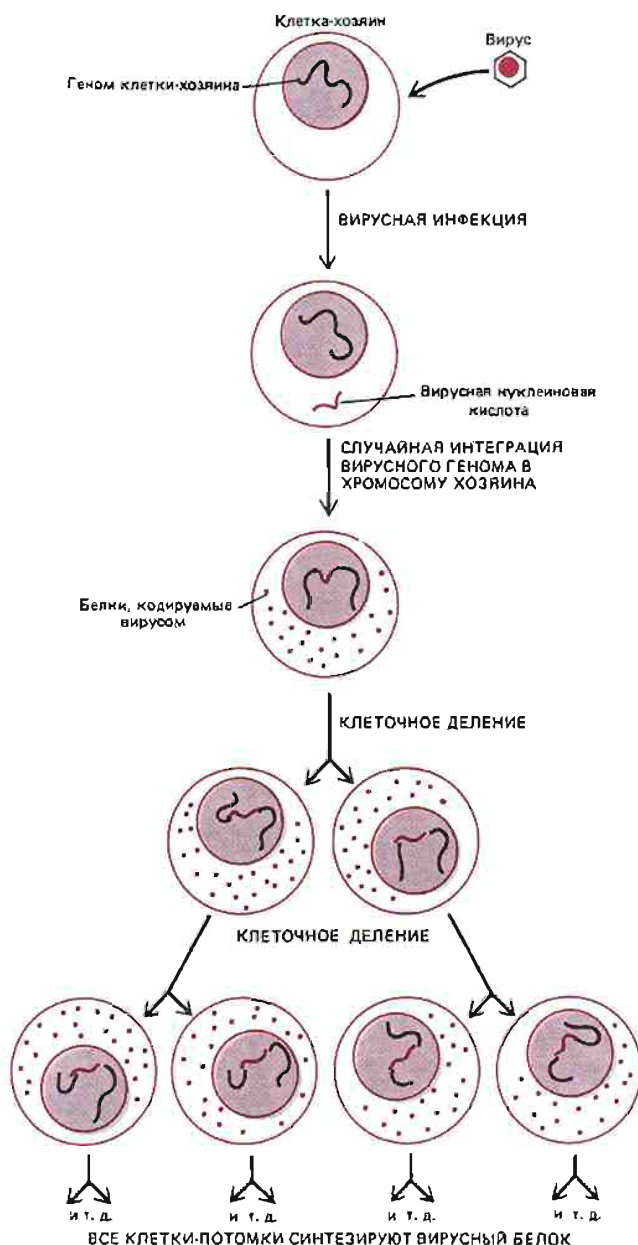


клеотидов. Изучение механизма трансформирующего действия этого вируса показало, что его РНК транскрибируется в ДНК, которая затем встраивается в хромосомную ДНК хозяина (разд. 5.4.8). Сейчас известно много РНК-содержащих онкогенных вирусов (ретровирусов), и это дает исследователю возможность трансформировать разнообразные нормальные клетки в их опухолевые аналоги. Так же хорошо изучены ДНК-содержащие онкогенные вирусы, к которым относится ряд мелких паповавирусов, в частности обезьяний вирус

Таблица 11-1. Некоторые изменения, часто наблюдаемые при трансформации нормальных культивируемых клеток опухолевыми вирусами

1. Аномалии, связанные с изменениями плазматической мембраны
 - А. Усиление транспорта метаболитов
 - Б. Усиленная выработка активатора плазминогена увеличивает внеклеточную протеолитическую активность
 - В. Усиленное образование пузырей на плазматической мембране
2. Аномалии прикрепления
 - А. Уменьшение адгезии к твердым поверхностям; как следствие – сохранение округленной формы
 - Б. Неспособность актиновых филаментов к образованию больших пучков
 - В. Слабое отложение фибронектина во внеклеточном матриксе
3. Аномалии роста и деления
 - А. Рост до необычайно высокой плотности
 - Б. Пониженная потребность в факторах роста, содержащихся в сыворотке
 - В. Меньшая зависимость от прикрепления (т.е. способность расти без расщепления на твердом субстрате).
 - Г. Клетки вызывают опухоли при инъекции восприимчивым животным

Рис. 11-14. Эта схема показывает, как случайная интеграция нуклеиновой кислоты вируса в хромосому клетки-хозяина может привести к постоянному присутствию вирусного белка в клетках-потомках. У ретровирусов есть фермент, называемый *обратной транскриптазой*; он синтезирует ДНК-копию геномной РНК вируса, и в хромосому клетки-хозяина встраивается именно эта ДНК (см. рис. 5-52).



SV40 и мышьяный вирус полиомы. Оба они содержат в своем геноме всего лишь около 5000 пар оснований. Многие известно также о значительно более крупных аденовирусах и о вирусе Эпштейна – Барр (EBV) – герпесоподобном вирусе, возможно вызывающем лимфому Бёркитта у человека. Так же как и ретровирусы, онкогенные ДНК-содержащие вирусы трансформируют клетки путем включения своего генетического материала в хромосомную ДНК хозяина. Таким образом, вирусные гены становятся частью генома клетки, воспроизводятся вместе с хромосомами и, следовательно, экспрессируются не только в исходной клетке, но и во всем ее потомстве (*клоне*) (рис. 11-14). Этот неискоренимый генетический вклад определяет опухолевую природу инфицированного клона.

Каким образом вирусы нарушают регуляцию роста и деления клеток? Нам сейчас известны два основных механизма:

1. Включение вирусной ДНК в клеточный геном может само по себе из-

менять структуру или уровень активности близлежащих генов клетки-хозяина. Этот процесс получил название *инсерционного мутагенеза*, поскольку такие изменения наследуются как мутации, вызванные более обычными причинами. Несколько примеров подобного мутагенеза недавно были подробно изучены. Оказалось, что в ряде случаев высокоактивный вирусный промотор РНК-полимеразы П встраивается рядом с важным клеточным геном, избыточная экспрессия которого приводит к появлению опухолевого фенотипа. Поскольку цепи мРНК начинают синтезироваться на вирусном промоторе, включенном в кодирующую последовательность соседнего гена, в клетке образуется ненормально большое количество соответствующего белка.

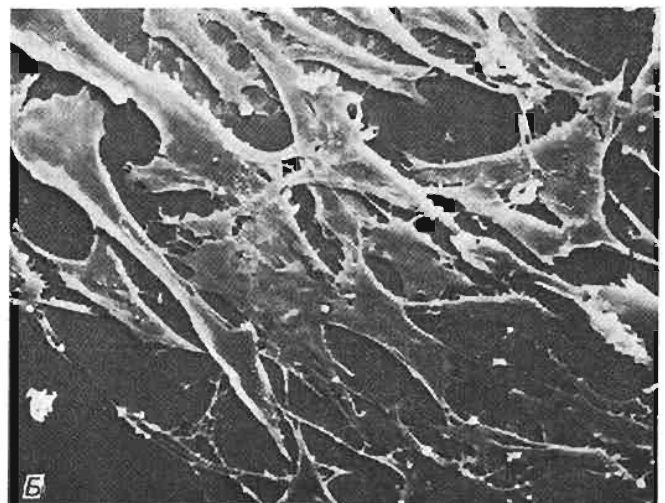
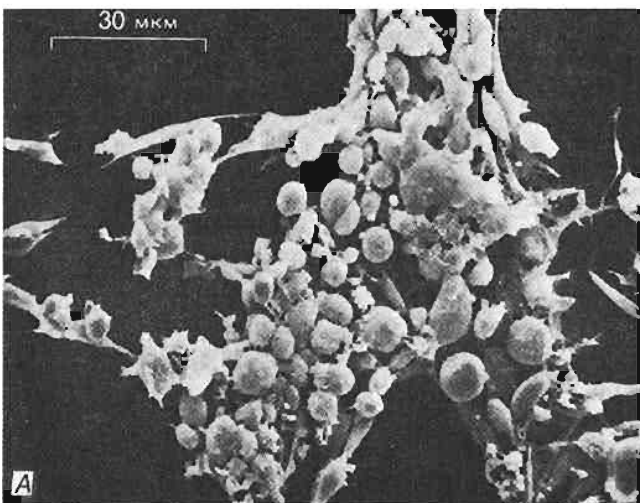
2. Многие опухолеродные вирусы содержат один или несколько локусов (онкогенов), которые сами способны вызвать опухолевую трансформацию клетки-хозяина; в этом случае нет надобности в изменении генов клетки. Таких вирусных онкогенов сейчас известно очень много, они активны в отношении клеток многих видов животных. Широкая распространенность и особые свойства этих необычных генов позволяют использовать опухолеродные вирусы как удобный инструмент в экспериментальной работе.

11.2.1. Онкогены идентифицируют методами молекулярной генетики [12]

Для идентификации вирусных онкогенов используются различные методики. Удобным генетическим подходом является получение мутаций в онкогене, ведущих к его инактивации при повышенной температуре. У таких *температурочувствительных мутантов* можно включать или выключать данный ген, просто повышая или понижая температуру. При более низкой температуре (34°C) чувствительные клетки, содержащие вирусный онкоген, будут обладать опухолевым фенотипом и, например, расти в отсутствие некоторых факторов, в которых они нуждались ранее (табл. 11-1). Если затем экспрессию онкогена подавить, повысив температуру до 39°C, то клетки быстро (обычно через несколько часов) вернутся к нормальному фенотипу (рис. 11-15). Подобный цикл изменений фенотипа можно повторять многократно. Эти изменения доказывают, что температурочувствительный ген вируса — это и есть ген, ответственный за неопластическую трансформацию клеток, и, следовательно, его можно считать онкогеном.

Для идентификации вирусных онкогенов используется также метод *трансфекции*. Фрагмент ДНК, содержащий только один вирусный ген, вводят в клетку, растущую в культуре, где этот ген может иногда встроиться в геном

Рис. 11-15. Клетки, трансформированные *in vitro* ретровирусом, несущим температурочувствительную мутацию в онкогене. Микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. А. Округлая форма трансформированных клеток, наблюдаемая при более низкой температуре (34°C). Б. Те же клетки приобретают нормальную морфологию, когда продукт онкогена инактивируется повышением температуры до 39°C. (С любезного разрешения G. Steven Martin.)



и начать экспрессироваться. Некоторые из таких фрагментов ДНК превращают потомство клетки-реципиента в трансформированные клетки, дающие опухоли при имплантации их животным. Таким способом в вирусном геноме можно идентифицировать онкоген и показать, что он целиком ответствен за весь процесс опухолевой трансформации зараженных вирусом клеток, приводящий к тому, что эти клетки вызывают опухоли у животных.

11.2.2. Лучше всего изучены онкогены РНК-содержащих опухолеродных вирусов (ретровирусов) [13]

Онкогенные участки генома ДНК-содержащих вирусов всегда расположены в районах, которые работают на ранних стадиях жизненного цикла вируса. Эти гены лучше всего изучены у вирусов полиомы и SV40. Анализ функций этих генов осложняется, однако, тем, что эти онкогены входят в группу перекрывающихся генов, один из которых (кодирующий большой Т-антиген, см. разд. 8.1.6) необходим для репликации вирусной ДНК. Еще не вполне ясно, сколько продуктов, кодируемых перекрывающимися генами, участвует в опухолевой трансформации. Известно лишь, что для трансформации нужен «средний Т-антиген» вируса полиомы; в частности, молекулы этого белка обнаружены на внутренней поверхности плазматической мембраны, где они, возможно, связаны с протеинкиназами, фосфорилирующими тирозин (см. ниже). У более крупных ДНК-содержащих вирусов, например аденовирусов, геном гораздо более сложен; по-видимому, он кодирует несколько различных онкогенных белков, и для полной трансформации необходимо определенное их сочетание.

Проще всего изучать онкогены ретровирусов, так как кодирующие их последовательности не перекрываются с другими вирусными генами. В результате онкоген часто утрачивается без ущерба для размножения вируса. Необязательность присутствия онкогена была впервые обнаружена при исследовании мутантных частиц вируса саркомы Рауса, который хорошо размножался, но не вызывал опухолевой трансформации клеток. Оказалось, что многие из таких мутантов имеют геном с делециями большого внутреннего сегмента, кодирующего белок с мол. массой 60 000. Именно присутствие продукта этого гена, называемого *геном src*, превращает нормальные клетки кур в раковые.

Когда было установлено, что ген *src* не играет никакой роли в размножении вируса, стало ясно, что для репродукции ретровирусов необходимы лишь три класса вирус-специфических полипептидов: белки наружной оболочки (*env*), белки внутреннего капсида (*gag*) и обратная транскриптаза (*pol*).

У многих ретровирусов часть вирусных последовательностей *gag*, *pol* или *env* заменена большим функционирующим онкогенным фрагментом. Такие ретровирусы являются дефектными — они не могут размножаться сами по себе и нуждаются в присутствии неонкогенного «вируса-помощника», доставляющего продукт утраченного гена. Недефектные онкогенные ретровирусы вроде вируса саркомы Рауса встречаются даже реже, чем многочисленные дефектные (как, например, вирус саркомы Харви или вирус Абельсона), у которых нет сегмента *gag* или *env*. Онкогенные белки таких дефектных вирусов часто представляют собой продукты слияния: N-концевая часть у них содержит последовательность *gag*, а карбоксильный конец — последовательность онкогена.

Каждый из известных онкобелков ретровирусов действует на многие структуры и процессы в клетках. Как единственный вирусный ген может вызывать столь разносторонние эффекты? Было предложено два возможных объяснения. Согласно первому из них, белок, кодируемый онкогеном, изменяет лишь какой-то один компонент клетки, который в свою очередь влияет на разнообразные клеточные функции, что и приводит к появлению опухолевого фенотипа. Другая возможность состоит в том, что сам продукт онкогена изменяет множество различных компонентов клетки. Многие исследователи

считают более вероятным второе объяснение – отчасти потому, что у вируса саркомы Рауса встречаются такие мутации онкогена *src*, при которых исчезают только некоторые из его эффектов.

Хотя белковые продукты многих онкогенов действуют на большое число различных клеточных функций, возможно, что лишь часть этих эффектов необходима для трансформации. Если в основе развития опухолевого фенотипа лежит бесконтрольное деление, то фундаментальное изменение опухолевой клетки могло бы состоять в неспособности ее останавливаться в точке рестрикции (R) клеточного цикла при условиях, когда нормальные клетки там задерживаются. Из трансформированных клеток, растущих в культуре, разбе только очень немногие задерживаются в точке R; при недостатке питания или при воздействии токсических веществ они останавливаются в различных других точках цикла. Каким образом действие онкогена (или иных канцерогенных факторов) приводит к столь глубоким изменениям, не известно.

Возможно, онкогены нарушают нормальный механизм регуляции роста тем, что препятствуют нормальной дифференцировке клеток, приводящей к ограничению их ростовых потенций. Действительно, многие опухолевые клетки дифференцированы в меньшей степени, чем их нормальные аналоги. Это особенно характерно для лейкозных клеток человека; отсюда представление о лейкозах как результате того, что на каком-то этапе блокировано созревание определенных клеток-предшественников. Поскольку такие клетки способны непрерывно делиться, появляется постоянно растущая популяция – опухоль. В пользу этого предположения говорит и анализ эффектов, вызываемых вирусными онкогенами. Например, один из ретровирусов вызывает трансформацию предшественников эритроцитов. Если вирусный онкоген инактивируется в результате мутации, незрелые клетки начинают дифференцироваться и теряют опухолевые свойства.

Как уже упоминалось, опухолевые клетки могут быть бессмертными: в отличие от нормальных они способны расти в культуре неопределенно долго. Многие опухолеродные вирусы с помощью своих онкогенов могут наделять таким бессмертием клетку-хозяина. У аденовирусов удалось идентифицировать ту часть вирусного генома, которая придает клеткам бессмертия, не вызывая при этом других признаков опухолевой трансформации. Подобные результаты указывают на то, что вирусные гены полезны при изучении не только неопластической трансформации, но и молекулярных механизмов старения клеток.

11.2.3. Онкогены часто кодируют протеинкиназы [14]

В 1978 г. было сделано очень важное открытие: было показано, что продукт гена *src* является *протеинкиназой* – ферментом, катализирующим перенос фосфата с какого-либо нуклеозидтрифосфата на определенные аминокислотные остатки некоторых белков (разд. 13.4.1). Вскоре выяснилось, что и ряд других онкогенных белков – протеинкиназы. Каждая из вирус-специфических киназ фосфорилирует несколько белков; это объясняет множественные эффекты соответствующих онкогенов. Многие киназы ретровирусов отличаются от обычных протеинкиназ тем, что фосфорилируют боковые цепи *тирозина*, а не *серина* и *треонина*, как подавляющее большинство протеинкиназ. Поскольку фосфорилирование тирозина – процесс редкий, в белках клеток, зараженных онкогенными вирусами, может быть в 5–10 раз больше фосфотирозина, чем в белках нормальных клеток. Идентификация этих фосфорилированных белков и выяснение их функций имеют огромное значение для понимания механизмов вирусного канцерогенеза. Обнаружено пока лишь несколько таких белков; один из них – актив-связывающий белок *винкулин* (разд. 10.5.6 и 10.7.4). Однако еще нет доказательств того, что какой-либо из этих белков участвует в индукции или поддержании трансформированного фенотипа.

Поскольку эффекты вирусных онкогенов столь многочисленны, было бы естественно ожидать, что их продукты будут найдены во многих частях клет-



Рис. 11-16. На этой электронной микрофотографии видно, что протеинкиназа, кодируемая онкогеном вируса саркомы Рауса, прикреплена к внутренней поверхности плазматической мембраны трансформированных клеток. Для выявления киназы использовали специфические антитела, с которыми были связаны электроплотные частицы ферритина. (С любезного разрешения Ira Pastan; из M. C. Willingham et al., Cell, 18, 125–134, 1979.)

ки, особенно в ядре, где, по-видимому, начинаются многие события, связанные с митозом. Тем не менее для многих изученных до сих пор продуктов онкогенов это не подтвердилось. Большинство этих белков (продуктов онкогенных вирусов весьма различного типа) связано с плазматической мембраной клеток (рис. 11-16). В некоторых случаях белок встроен в липидный бислой, в других характер связи его с мембраной неясен. Эти наблюдения подкрепляют старую гипотезу, согласно которой внешние факторы, регулирующие деление клеток, действуют на уровне клеточной поверхности. Возможно, что большинство субстратов для вирусных протеинкиназ тоже тесно связано с плазматической мембраной.

Фосфорилирование тирозина играет также роль и в механизмах, контролирующем поведение нормальных клеток. Например, связывание белкового гормона — фактора роста эпидермиса (ФРЭ) — с рецептором на поверхности клетки индуцирует фосфорилирование тирозина в самом рецепторе и в некоторых других клеточных белках. Это фосфорилирование, как полагают, служит сигналом, опосредующим внутриклеточные эффекты ФРЭ. Оно приводит к тому, что клетка, ранее находившаяся в покое, начинает делиться. Интересно, что некоторые белки, в которых тирозин фосфорилируется в присутствии ФРЭ, — те же самые, в которых это происходит при воздействии продуктов ряда вирусных онкогенов. Это позволяет думать, что один и тот же процесс (фосфорилирование остатков тирозина) участвует как в нормальной, так и в аномальной стимуляции клеточного деления.

11.2.4. Увеличение количества нормального клеточного белка может нарушать регуляцию роста клеток [15]

Вначале казалось очень странным, что природа так широко распространила онкогены среди вирусов. Теперь мы понимаем, однако, что онкогены ретровирусов — это просто нормальные клеточные гены в другом обличье. По-видимому, гены из генома позвоночных животных с помощью какого-то неясного пока механизма более или менее случайным образом включались в геномы ретровирусов; это происходило довольно редко, но немногие вирусы, включившие онкоген, отбирались в процессе эволюции из остальной популяции, поскольку они поддерживали клетки хозяина в состоянии пролиферации и тем самым обеспечивали наилучшие условия для своей репродукции (рис. 11-17).

Хотя некоторые клеточные гены, включенные в состав вирусного генома, стали онкогенами, ни их структура, ни их функции в результате такого перемещения существенно не изменились. Например, онкоген вируса саркомы Рауса и его ген-предшественник в нормальной клетке кодируют сходные «тирозинные» протеинкиназы, связанные с плазматической мембраной. В случае некоторых онкогенов методом клонирования ДНК был выделен клеточный ген-предшественник. Если такой ген ввести обратно в клетку при условиях, благоприятных для его экспрессии, то нормальная клетка превращается в опухолевую!

Таким образом, появился новый взгляд на вирусный онкогенез. Опухолеобразный вирус может просто перегружать клетку-хозяина продуктом нормального клеточного гена, участвующего в контроле клеточного деления. Этот продукт, по-видимому, вызывает неограниченную пролиферацию трансформированных клеток только потому, что он присутствует в избыточном количестве. Возможно, что и химический канцероген или спонтанная мутация лишь индуцируют чрезмерную экспрессию такого контролирующего гена и тем самым толкают клетку на путь малигнизации (рис. 11-18).

Сейчас уже идентифицировано более 15 различных ретровирусных онкогенов, и все они происходят от разных нормальных генов-предшественников из генома позвоночных. У продуктов примерно половины этих онкогенов обнаружена протеинкиназная активность. Все вместе эти гены, вероятно, составляют разнородную группу, членом которой объединяет их близкое отноше-

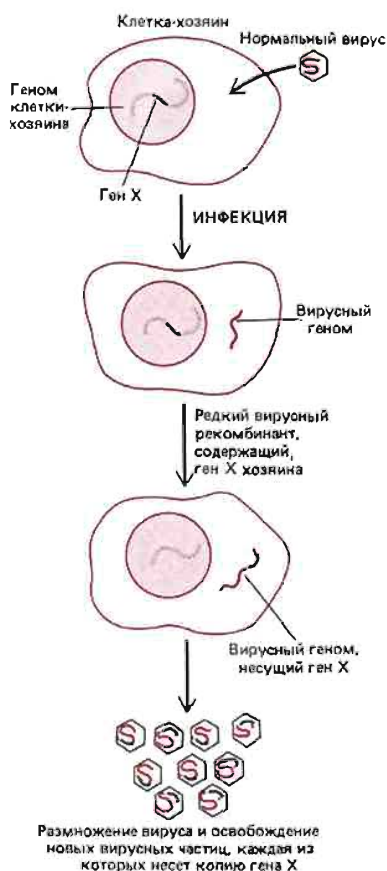
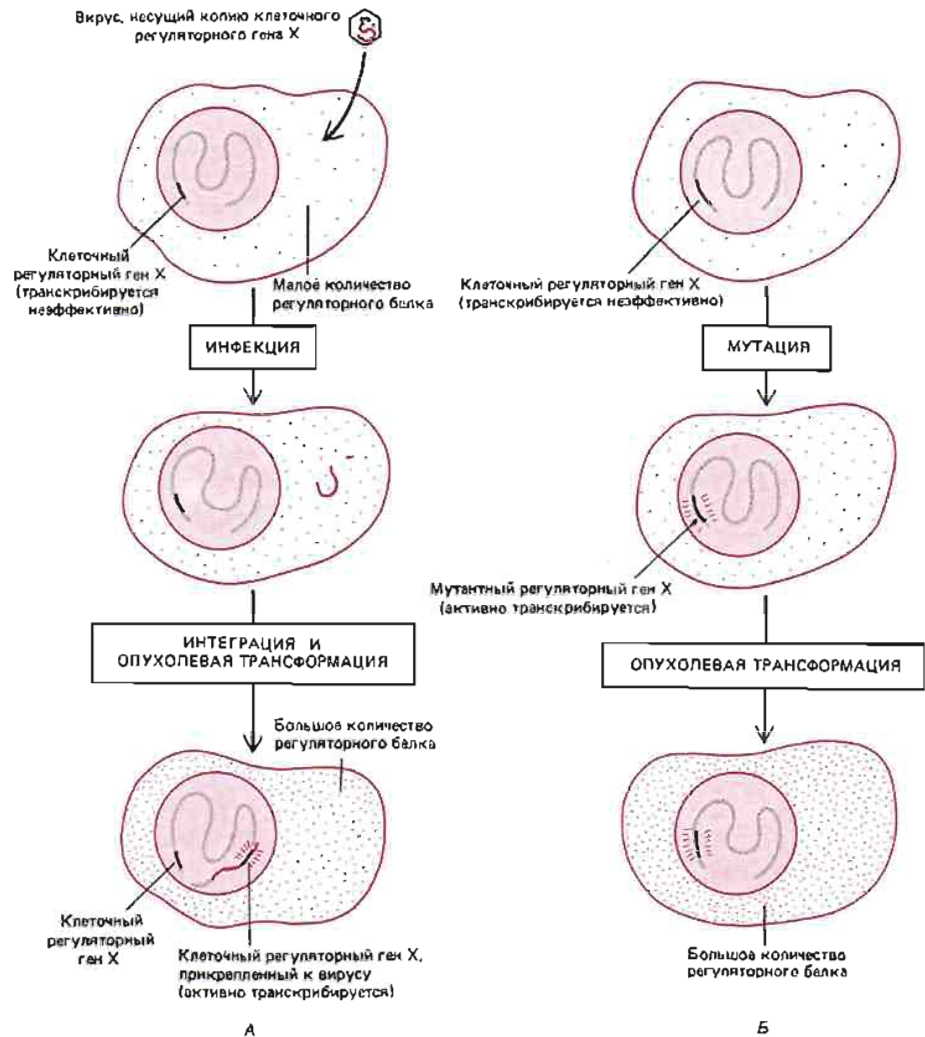


Рис. 11-17. Как показано на схеме, в редких случаях ретровирус может включить в свой геном нуклеотидную последовательность, соответствующую некоторым генам клетки-хозяина. По-видимому, таким способом произошли ретровирусы, содержащие онкогены (см. текст).

Рис. 11-18. Схема возможного общего механизма возникновения спонтанных опухолей и опухолей, индуцированных вирусом. В обоих показанных здесь случаях неконтролируемый рост объясняется избыточной продукцией нормального регуляторного клеточного белка. Однако известно, что в других случаях клеточный регуляторный белок может отличаться от нормального аминокислотной заменой, а не вырабатываться в избытке. А. Ретровирус может вызывать гиперпродукцию белка, включая копию нормального клеточного гена в собственный геном. Соответствующая мРНК транскрибируется с интегрированной ДНК-копии вирусного генома в необычайно больших количествах, поскольку уровень экспрессии контролируется вирусным промотором. Б. Спонтанная или вызванная канцерогеном мутация может привести к гиперпродукции того же регуляторного клеточного белка, непосредственно увеличив скорость транскрипции соответствующего гена. Исследования, проведенные на дрожжевых клетках, позволяют предполагать, что такие сильные изменения в уровне экспрессии эукариотических генов могут быть вызваны скорее небольшими делециями или вставками отрезков ДНК, чем заменой одной пары оснований.



ние к регуляции нормального клеточного деления и развития позвоночных. Если все это так, то биологам-экспериментаторам очень повезло – ретровирусы, вычленив жизненно важные регуляторные гены из генома позвоночных, сделали эти гены легко доступными для изучения.

11.2.5. Активные онкогены были выделены непосредственно из опухолей человека [16]

Недавно удалось выделить активные онкогены из некоторых опухолей человека и животных, не используя вирус. ДНК, экстрагированная из клеток ряда опухолей (из опухолей легких, мочевого пузыря, прямой кишки, а также нейробластомы, лимфомы, лейкозных клеток), переносит способность к неопластическому росту, будучи введена в нормальные клетки в культуре. С помощью технологии рекомбинантных ДНК (разд. 4.5) были идентифицированы последовательности ДНК, соответствующие некоторым из этих активных онкогенов; затем они были выделены в чистом виде путем клонирования в бактериальной плазмиде. Онкогены, выделенные из различных опухолей человека, часто оказываются одинаковыми (из желудка и из легких), а два из них (из опухолей мочевого пузыря и легких) представляют собой клеточные гомологи ранее идентифицированных ретровирусных онкогенов, найденных соответственно в вирусе саркомы Харви и в вирусе саркомы Кир-

стена. Эти так называемые гены *gas* кодируют белки с мол. массой 21 000, связывающие GTP и GDP. Такие белки содержатся в нормальных клетках в очень малых количествах, и их функциональное значение пока абсолютно неясно.

Клеточные гены, действующие как онкогены, претерпели какое-то изменение, которое привело к повышению уровня их активности или к изменению функции их продуктов,—детали этих процессов еще не выяснены. Кажется весьма вероятным, что относительно небольшая группа генов участвует в возникновении многих форм рака.

Заключение

ДНК- и РНК-содержащие онкогенные вирусы часто вызывают опухолевую трансформацию клеток в культуре. Когда появилась возможность манипулировать геномами таких вирусов, были получены сведения фундаментальной важности о природе рака. Онкогенные (вызывающие опухоли) гены РНК-содержащих опухолеродных вирусов (ретровирусов)—это нормальные клеточные компоненты, случайно включенные в геном ретровирусов в исходном или слегка измененном виде. Некоторые онкогены ретровирусов кодируют протеинкиназы, связанные с клеточной мембраной и фосфорилирующие остатки тирозина в определенных клеточных белках. Вероятно, избыточное образование таких белков при вирусной инфекции ослабляет нормальные регуляторные механизмы, определяющие рост и деление клеток. Совсем недавно было показано, что клетки ряда опухолей человека содержат некоторые из тех измененных клеточных генов, которые ранее были выявлены при анализе онкогенных ретровирусов.

11.3. События, происходящие в фазе S [17, 18, 19]

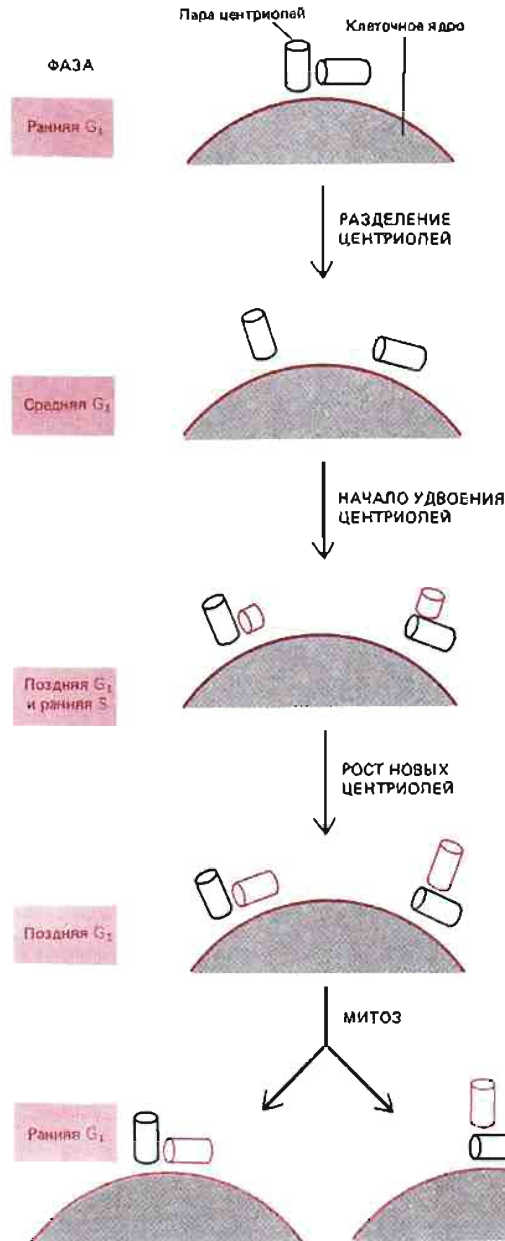
Исследования на мутантных дрожжевых клетках показали, что для начала синтеза ДНК необходимо удвоение структуры, находящейся на ядерной оболочке,—полярного тельца веретена. Аналогом этой структуры в животной клетке является центриоль, которая действует и как часть важного центра организации микротрубочек, тесно связанного с интерфазным ядром (*клеточный центр*, см. разд. 10.4.2), и как компонент каждого из полюсов веретена во время митоза. Центриоль удваивается, по-видимому, путем матричного процесса один раз за клеточный цикл (см. рис. 11-19 и разд. 10.4.4). Возможно, что достижение определенной стадии в процессе ее удвоения (так же как и в случае полярного тельца веретена у дрожжей) представляет собой критический момент в цепи событий, инициирующих репликацию ДНК. К сожалению, пока нет возможности блокировать удвоение центриоли и проверить таким образом это предположение.

В самом деле, не известно, что именно служит пусковым сигналом для синтеза ДНК и как начинается репликация ДНК в фазе S—одновременно во многих точках генома или же более постепенно, в ограниченном числе точек. Возможно даже, что синтез инициируется в одном определенном участке хромосомы, запуская каскад последовательных процессов инициации по всему геному. Так или иначе, пусковой механизм явно работает по принципу «все или ничего», поскольку начавшаяся в S-фазе репликация ДНК продолжается до полного завершения этого процесса.

11.3.1. Во время фазы S кластеры репликационных вилок активируются одновременно во всех хромосомах [19]

Как уже говорилось в главе 5, ДНК начинает синтезироваться после специального инициирующего события, происходящего в определенном месте,—образования *репликационной вилки*. Эта Y-образная структура асимме-

Рис. 11-19. Схема редупликации центриолей, согласованной с клеточным циклом. Электронная микроскопия показывает, что каждая дочерняя центриоль по мере роста подвергается ряду морфологических изменений; это позволяет думать, что редупликация центриолей – более сложный процесс, чем показано на данном рисунке. Быть может, для вступления клетки в фазу S необходимо не только достижение одной из ранних стадий образования дочерних центриолей, но и расхождение получившихся пар. (См. P. Sherline, R. N. Mascarido, J. Cell Biol., 93, 507–511, 1982.)



трична, так как способ синтеза ДНК на «ведущей» и «отстающей» цепях различен (рис. 11-20). У бактерий геном столь мал, что вся ДНК может полностью реплицироваться с помощью всего лишь двух репликационных вилок. В хромосомах млекопитающих цепи ДНК в 50 раз длиннее, поэтому для ее полной репликации за разумное время нужно, чтобы одновременно действовало много репликационных вилок. В среднем в каждой S-фазе в каждой хромосоме функционирует около 100 вилок. Как они расположены вдоль хромосомы и что гарантирует полноту репликации ДНК в каждом цикле?

Метод, впервые использованный для того, чтобы выяснить, как реплицируются хромосомы эукариот, был разработан в начале 60-х годов. Клетки, растущие в культуре, инкубируют короткое время в присутствии ^3H -тимидина с таким расчетом, чтобы ДНК, синтезированная за этот период, оказалась высокорadioактивной. Затем клетки осторожно лизируют и их ДНК наносят на поверхность стекла, по возможности растягивая ее молекулы.

Рис. 11-20. Асимметричная структура репликационной вилки ДНК. Как подробно говорилось ранее (разд. 5.3.2), фермент ДНК-полимераза может синтезировать цепь ДНК только в направлении от 5'-конца к 3'-концу. Поскольку две цепи двойной спирали ДНК имеют противоположную полярность, одна из цепей родительской матричной ДНК должна копироваться небольшими кусочками в обратном направлении. Поэтому синтез ДНК на этой цепи (матрице для «отстающей» цепи) по механизму принципиально отличается от синтеза на другой цепи (матрице для «ведущей» цепи). Таким образом, репликационная вилка асимметрична.

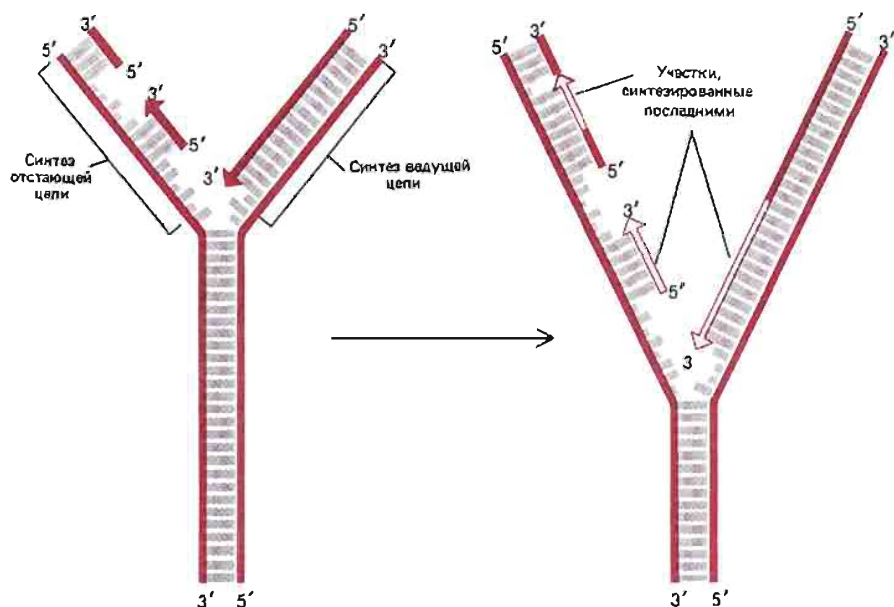


Рис. 11-21. Схема экспериментов, выявляющих способ движения репликационной вилки во время фазы S. ДНК, синтезируемую в клетках человека *in vitro*, метили путем кратковременной инкубации клеток с высокорadioактивным тимидином. В одном варианте опыта (А) клетки лизировали и ДНК адсорбировали на стекле, которое затем покрывали фотоэмульсией. После экспозиции, продолжавшейся несколько месяцев, эмульсию проявляли и наблюдали линию из зерен серебра над радиоактивной ДНК. В другом варианте (Б) после такой же инкубации с меченым тимидином клетки инкубировали без метки, и тогда происходил синтез ДНК со значительно меньшей удельной активностью. Далее препарат обрабатывали так же, как в первом варианте. Тот факт, что следы из зерен серебра были расположены парами, причем два следа каждой пары ослабевали в противоположных направлениях, впервые навед на мысль о движении двух репликационных вилок в разные стороны от общей начальной точки (см. рис. 11-12). Цветные цепи ДНК изображены на схеме только для того, чтобы легче было разобраться в данных радиоавтографии; немеченая ДНК в таких опытах не видна.

Стекло покрывают фотоэмульсией и синтез ДНК выявляют методом радиоавтографии. Поскольку время инкубации с меченым тимидином выбирают так, чтобы репликационная вилка успела продвинуться вдоль ДНК на несколько микрометров, реплицированные участки ДНК видны под микроскопом как линии из зерен серебра, хотя сама ДНК остается невидимой (диаметр спирали ДНК 2 нм, а разрешающая способность светового микроскопа 200 нм). Результаты такого опыта представлены на рис. 11-21, А: темные следы реплицированной ДНК, длина которых увеличивается с удлинением периода включения ^3H -тимидина, показывают, что в хромосомах эукариот репликационные вилки движутся со скоростью около 50 нуклеотидов в секунду. Эта скорость в 10 раз меньше, чем у бактерий, что, возможно, связано с большей трудностью репликации ДНК, упакованной в хроматин.

Каждая хромосома человека, по-видимому, состоит из одной молекулы ДНК, содержащей около 150 млн. нуклеотидов, поэтому для полной репликации такой молекулы с помощью одной репликационной вилки потребовалось бы $0,02 \cdot 150 \cdot 10^6 = 3 \cdot 10^6$ секунд, т.е. около 800 часов! В действительности фаза S продолжается 8–10 часов. Не удивительно, что метод радиоавтографии

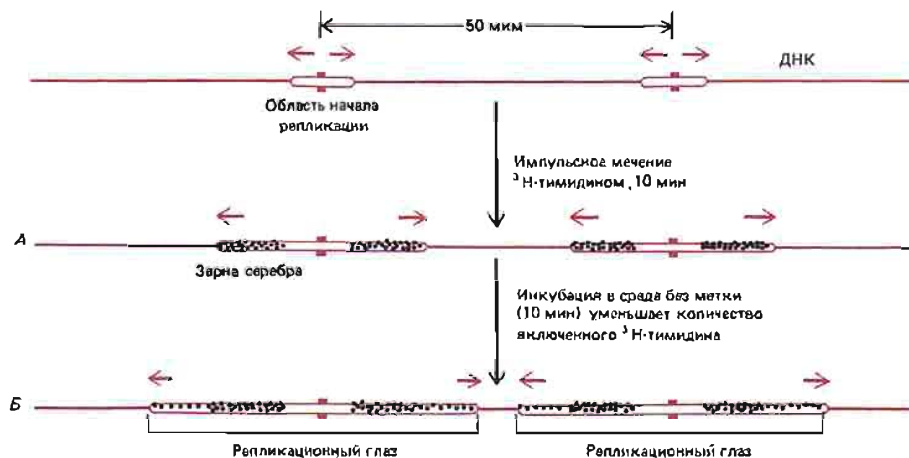
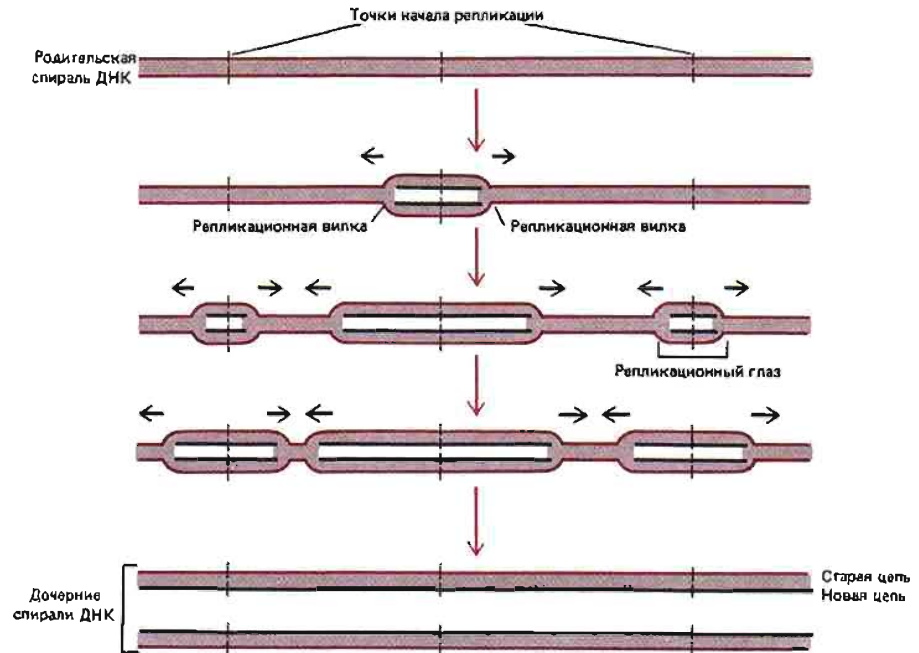


Рис. 11-22. Способ репликации ДНК в хромосомах эукариот (см. также рис. 11-21). Точки начала репликации расположены в большинстве клеток на расстоянии от 30 000 до 300 000 пар оснований друг от друга. Как полагают, репликационная вилка останавливается только тогда, когда она встречает репликационную вилку, движущуюся в противоположном направлении; это обеспечивает полноту репликации ДНК.



выявил существование многих независимо продвигающихся репликационных вилок в каждой эукариотической хромосоме. Удивительно другое: часто бывает, что несколько вилок расположено поблизости друг от друга в одном участке ДНК, в то время как другие области той же хромосомы их вовсе не содержат. Изучая скорость перемещения репликационных вилок и их пространственное расположение с помощью несколько видоизмененного метода (рис. 11-21, Б), можно определять и направление их движения. Такого рода опыты показали следующее:

1. Места образования репликационных вилок расположены группами (которые называют **репликативными единицами**), в каждую из которых входит от 20 до 80 точек начала репликации. Внутри такой группы точки начала репликации отстоят друг от друга на 30 000–300 000 пар оснований.

2. На протяжении всей фазы S активируются новые репликативные единицы, пока не будет реплицирована вся ДНК.

3. Большинство репликационных вилок расположено парами: две вилки одной пары движутся в противоположных направлениях от общей точки начала репликации, образуя структуру, называемую **репликационным пузырем** или «глазом».

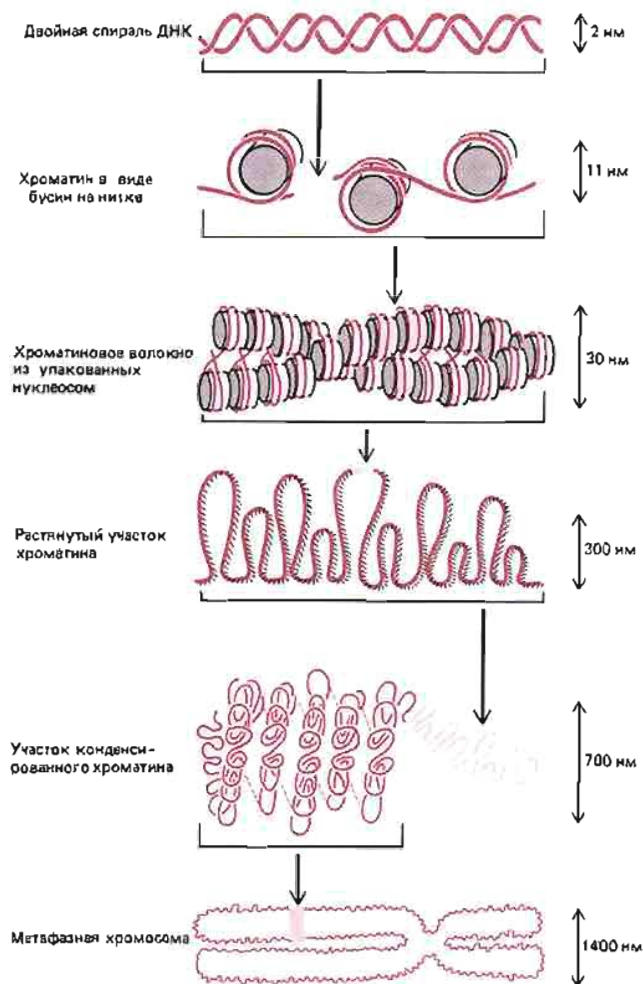
4. Репликационные вилки в единице репликации прекращают движение, когда встречают соседнюю вилку, движущуюся в противоположном направлении. Таким образом, ДНК в данной области хромосомы реплицируется, образуя две полные дочерние спирали (рис. 11-22).

5. Репликационные вилки передвигаются на протяжении всей фазы S примерно с одинаковой скоростью.

11.3.2. По мере репликации ДНК в состав хроматина включаются новые гистоны [20]

На рис. 11-23 схематически представлена иерархическая структура хроматина эукариот. Как подробно описано в главе 8, по две молекулы каждого из четырех нуклеосомных гистонов (H2A, H2B, H3 и H4) соединяются, образуя дисковидный октамерный белковый кор, вокруг которого обвивается участок двуспиральной молекулы ДНК длиной около 200 пар нуклеотидов. Такую

Рис. 11-23. Общая схема строения хроматина. Показаны (сверху вниз): двойная спираль ДНК; нить, включающая три нуклеосомы; участок хроматинового волокна толщиной 30 нм; ряд из десяти смежных петель, образованных таким волокном; модель участка метафазной хромосомы; и наконец, вся метафазная хромосома. При обсуждении репликации ДНК наиболее важные структуры – это сами нуклеосомы. По-видимому, они остаются связанными с ДНК постоянно, даже при ее репликации. Существенны при репликации ДНК также и петельные домены, которые, как полагают, служат функциональными единицами при экспрессии генов и, вероятно, содержат только одну точку начала репликации.

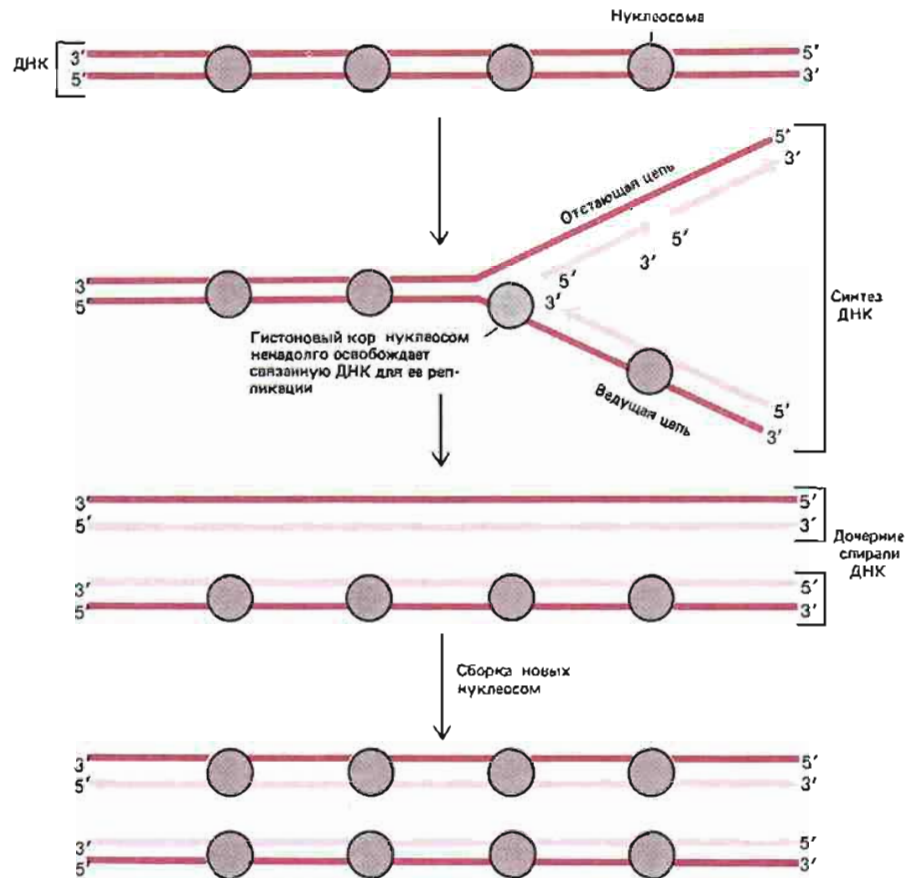


структуру называют **нуклеосомой**. Последовательные нуклеосомы упакованы в виде цепи – хроматинового волокна толщиной около 30 нм, тонкое строение которого неизвестно. Как полагают, такие волокна в свою очередь уложены в виде больших петель, каждая из которых содержит отрезок хроматина, соответствующий десяткам тысяч пар оснований ДНК. Данные, полученные при изучении специализированных полигенных хромосом и хромосом типа ламповых щеток, позволяют думать, что эти петли служат функциональными единицами в процессе транскрипции – петля целиком деконденсируется или конденсируется при включении и выключении соответствующих генов (разд. 8.4.14). В интерфазе эти «петельные домены» неизвестным способом сконденсированы, а в процессе митоза они подвергаются дальнейшей конденсации, образуя метафазные хромосомы (рис. 11-23).

Для построения нового хроматина требуется большое количество новых гистонов – по массе примерно столько же, сколько синтезировано новой ДНК. Если бы каждый гистон кодировался лишь одним геном, синтез гистонов сильно отставал бы от синтеза ДНК. Этого не происходит благодаря тому, что существуют множественные копии генов для каждого гистона. Клетки позвоночных содержат около 40 повторяющихся наборов таких генов, и в каждый набор входят гены для всех пяти гистонов. По-видимому, эти гены собраны вместе в одном участке хромосомы.

В отличие от большинства белков, которые непрерывно синтезируются на протяжении всей интерфазы (разд. 11.4.1), гистоны образуются главным обра-

Рис. 11-24. Предполагаемый механизм переноса гистоновых октамеров старой спирали ДНК на дочернюю спираль, которая синтезируется на матрице ведущей цепи репликационной вилки. Хотя механизм репликации ДНК, остающейся связанной с гистонами в составе нуклеосом, неизвестен, есть данные о том, что старые октамеры гистонов оказываются только на одной из двух дочерних спиралей, образующихся на репликационной вилке.



зом в фазе S. Скорее всего, синтез гистонов регулируется как на уровне транскрипции, так и на уровне деградации мРНК. Можно показать, что гистоновые мРНК становятся чрезвычайно нестабильными, когда прекращается синтез ДНК (например, в конце фазы S или при добавлении специфических ингибиторов). В отсутствие синтеза ДНК гистоновые мРНК расщепляются за несколько минут. Напротив, сами гистоны – необычайно стабильные белки, их молекулы могут сохраняться в течение всей жизни клетки. По-видимому, корреляцию между синтезом ДНК и синтезом гистонов обеспечивает какой-то механизм типа обратной связи, который чувствителен к концентрации свободных гистонов и поддерживает соответствие синтеза новых гистонов количеству вновь синтезируемой ДНК.

Включившись в состав нуклеосом, гистоны, скорее всего, никогда не покидают ДНК, с которой они связаны. Поэтому репликационная вилка при своем продвижении должна каким-то образом проходить через нуклеосомы родительской цепи хроматина. Как это происходит, неизвестно, но результаты одного эксперимента позволяют предполагать, что старые гистоновые октамеры непосредственно переходят на дочернюю спираль ДНК, образующуюся на «ведущей» стороне репликационной вилки (рис. 11-24). Если это предположение верно, то все новые гистоновые октамеры (состоящие из новых гистонов H2A, H2B, H3 и H4) должны присоединяться к свободной от гистонов дочерней спирали ДНК, которая строится на «отстающей» стороне вилки.

Эти новые гистоны обычно связываются с ДНК уже через несколько минут после прохождения репликационной вилки. Поэтому, когда реплицирующийся хроматин исследуют с помощью электронного микроскопа, нуклео-



Рис. 11-25. Электронная микрофотография растянутого хроматина (с любезного разрешения Harold Weintraub). Показано образование ДНК, свободной от нуклеосом, происходящее при ингибировании синтеза гистонов циклогексимидом. На отдельных участках видно, что ДНК, лишенная гистонов, выходит лишь с одной стороны репликационной вилки – в соответствии со схемой, представленной на рис. 11-24.

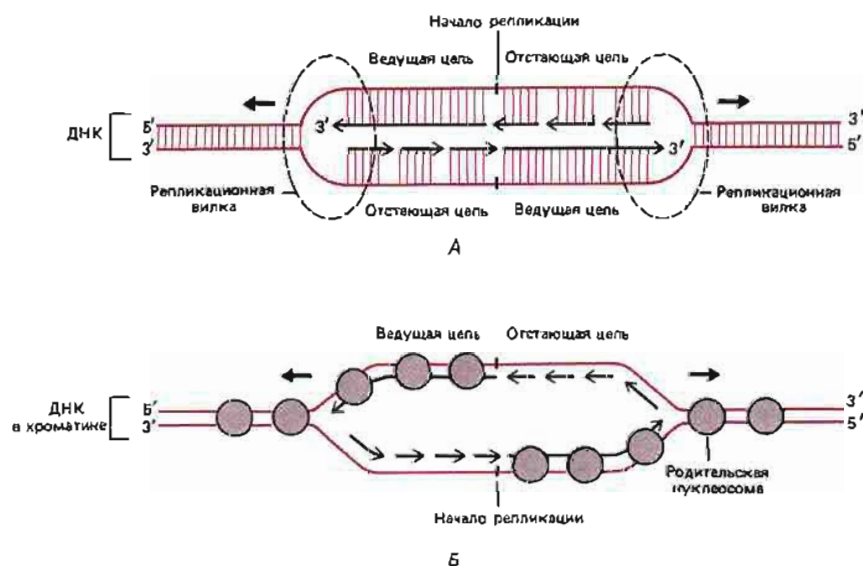
сомы можно бывает видеть на обеих ветвях Y-образных репликационных вилков. Но если синтез белков (в том числе гистонов) блокировать циклогексимидом, то синтез ДНК будет продолжаться еще около получаса, и на электронных микрофотографиях такого хроматина видны длинные тяжи свободной от гистонов ДНК, выходящей с одной стороны репликационной вилки (рис. 11-25). После удаления циклогексимида синтез гистонов возобновляется и вся накопившаяся «голая» ДНК упаковывается в нуклеосомы. Тот факт, что клетки в фазе S выдерживают кратковременную обработку циклогексимидом, показывает, что для выживания клетки не требуется немедленной упаковки вновь синтезированной ДНК в нуклеосомы.

11.3.3. Положение участков начала репликации в генах может иметь важное биологическое значение [20, 21]

Тот факт, что у ряда вирусов животных репликация начинается в определенных участках генома, позволяет предположить, что места начала репликации представляют собой специализированные последовательности в хромосомной ДНК. Это значит, что репликационные глазки, схематически изображенные на рис. 11-22, образуются на ДНК только в строго фиксированных точках. Кроме того, среднее расстояние между местами начала репликации сравнимо со средним расстоянием между соседними петлями хроматина. Таким образом, возможно, что в каждой петле имеется лишь один участок начала репликации.

Из сказанного в предыдущем разделе следует, что при расхождении двух репликационных вилков от одной точки начала репликации по разные стороны от этой точки родительские нуклеосомы будут попадать в разные дочерние спирали ДНК (см. рис. 11-26 и подпись к нему). В этом случае от точного расположения места начала репликации в транскрипционной единице (гене) будет зависеть распределение предсуществующих родительских гистонов между двумя дочерними генами. Не все нуклеосомы абсолютно одинаковы – в разных областях генетического материала структура хроматина различна (разд. 8.1.14). Точное положение места начала репликации в гене могло бы поэтому иметь важное биологическое значение, так как определяло бы структуру хроматина этого гена в следующем поколении клеток (см. подпись к рис. 11-27).

Рис. 11-26. Ожидаемая передача старых гистонов дочерним спиралью ДНК по обе стороны от точки начала репликации, согласно модели, представленной на рис. 11-24. Из схемы А видно, что если две репликационные вилки движутся в разные стороны от начальной точки, то при этом ведущими будут разные цепи родительской ДНК (так как обе цепи должны копироваться от 5'-конца к 3'-концу, а расположены они антипараллельно). На схеме Б показано, как распределяются старые гистоны при сдвиге ДНК на этих вилках. Новые гистоны, прикрепляющиеся к отстающей цепи, для большей ясности картины не изображены.



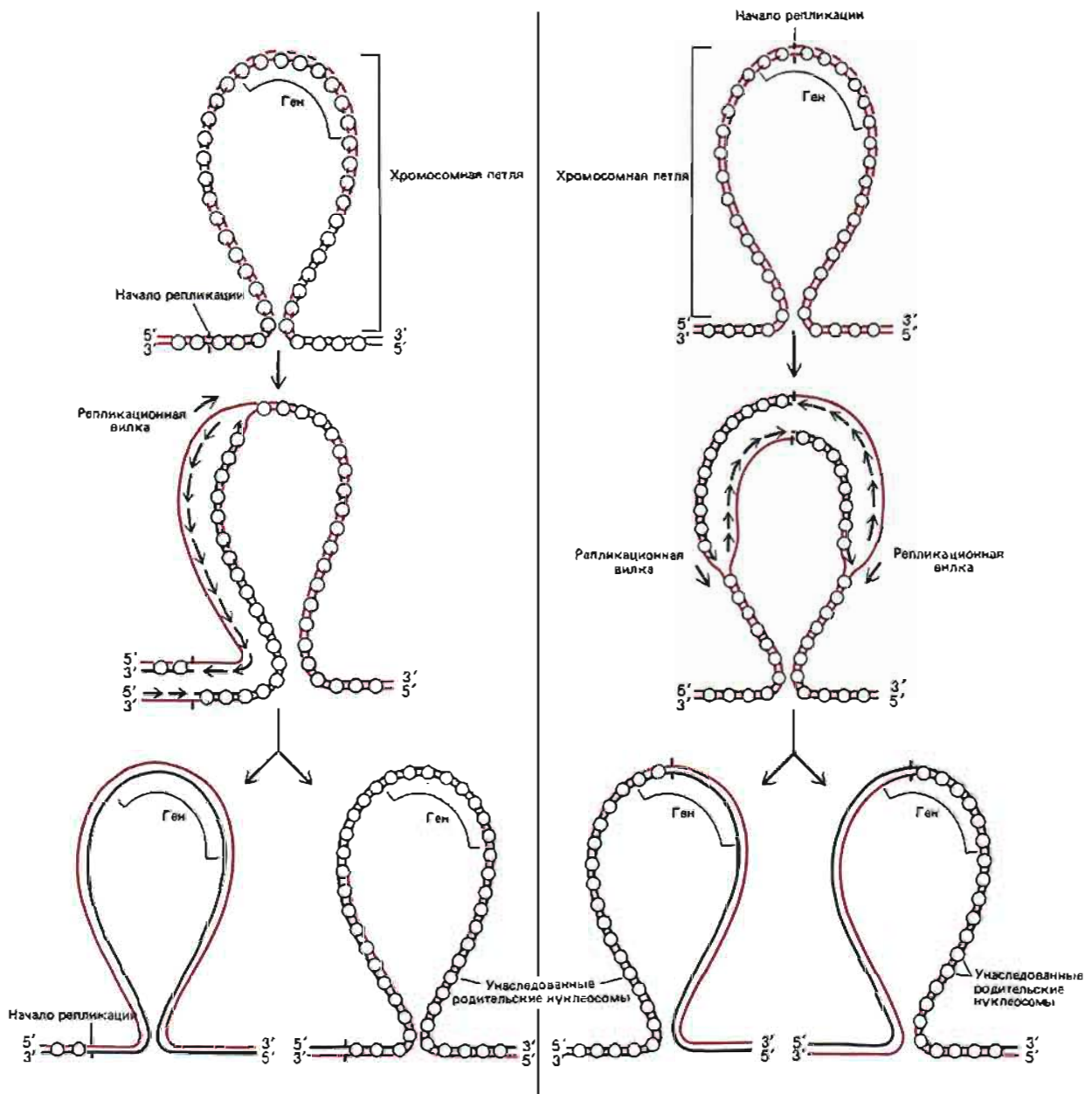


Рис. 11-27. Если старые октамеры гистонов располагаются только на одной из двух дочерних спиралей ДНК, образующихся в репликационной вилке, то способ наследования родительских гистонов в данном генетическом районе будет зависеть от положения ближайшей точки начала репликации.

А. Если точка начала репликации лежит вблизи одного из концов хромосомной петли, так что вся ДНК в этой петле реплицируется одной репликационной вилкой, движу-

щейся вдоль нее, то все октамеры, имевшиеся на исходной петле, перейдут только на одну из двух дочерних петель.

Б. Если точка начала репликации находится точно в середине петли, то на каждую из дочерних хромосом перейдет одинаковое количество исходных октамеров. Различие между двумя крайними вариантами наследования нуклеосом, показанными на схемах А и Б, могло бы иметь важные биологические последствия (см. разд. 8.5.4).

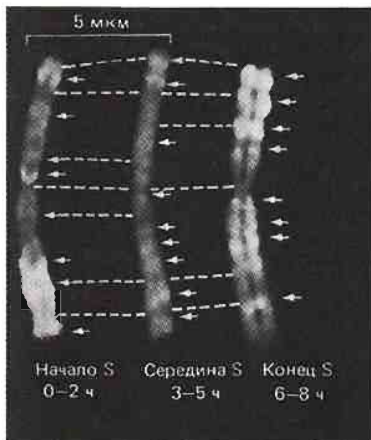


Рис. 11-28. Световые микрофотографии (негативы) окрашенных митотических хромосом, в которых реплицирующаяся ДНК избирательно метилась в различные отрезки предыдущей фазы S. В данном опыте клетки выращивали *in vitro* в присутствии синтетического нуклеотида 5-бромдезоксимуридина, а затем короткое время (2 ч) инкубировали с тимидином в начале, в середине или в конце фазы S. Так как ДНК, синтезируемая в период инкубации с тимидином, представляет собой двойную спираль, в которой одна цепь содержит тимидин, а другая – 5-бромдезоксимуридин, она окрашивается темнее, чем остальная ДНК (содержащая 5-бромдезоксимуридин в обеих цепях). Такая ДНК видна на негативах в виде светлых полос (указаны стрелками). Соответствующие друг другу участки трех хромосом соединены пунктирными линиями. (С любезного разрешения Elton Stubblefield.)

11.3.4. Различные генетические участки в одной и той же хромосоме реплицируются в фазе S в разное время [22]

Исходя из скорости движения репликационной вилки и типичного расстояния между двумя точками начала репликации, можно вычислить, что для репликации участка ДНК между двумя такими точками требуется, как правило, менее 30 мин. Между тем фаза S у клеток млекопитающих длится обычно около 8 ч. Это значит, что в каждой *репликативной единице* (в которой имеется 20–30 начальных точек) репликация должна занимать лишь небольшую долю всей фазы S.

Активируются ли репликативные единицы случайным образом или в какой-то определенной последовательности? Наиболее ясный ответ на этот вопрос был получен при использовании аналога тимидина – 5-бромдезоксимуридина (BrdU), которым в разные периоды фазы S в течение 1 ч метили синхронизированную популяцию клеток. Те участки митотических хромосом, в которые включился BrdU, слабее окрашиваются некоторыми красителями. Это позволяет, исследуя конденсированные хромосомы в митозе, определять, какие участки реплицировались в тот или иной период предшествовавшей фазы S. Типичный результат такого эксперимента представлен на рис. 11-28, где изображена одна произвольно выбранная метафазная хромосома. Детальный анализ хромосом после подобной обработки показывает, что одновременно происходит репликация больших участков хромосом (как и можно было ожидать исходя из распределения репликационных вилок на радиоавтографах ДНК); при этом различные участки хромосомы в каждой фазе S реплицируются в одной и той же последовательности. Используемый метод позволяет выявить в большинстве хромосом по меньшей мере три временных группы репликативных единиц.

11.3.5. Временная организация репликативных процессов в фазе S определяется структурой интерфазного хроматина [23]

В большинстве клеток высших эукариот некоторые участки ДНК конденсированы гораздо сильнее, чем остальные. Эти участки, называемые *гетерохроматином*, остаются относительно плотными даже в интерфазе, когда хромосомы переходят в более рыхлое состояние, в котором они активно синтезируют РНК. Так как ДНК гетерохроматина не транскрибируется в РНК, полагают, что она неактивна. Косвенные данные указывают на то, что повышенная степень конденсации такого хроматина препятствует экспрессии его генов.

Важное значение для понимания временной организации репликативных процессов имеет тот факт, что блоки конденсированного гетерохроматина, в том числе участки вблизи центромеры, остающиеся конденсированными на протяжении всей интерфазы, реплицируются на поздних этапах фазы S. Таким образом, поздняя репликация, по-видимому, связана с особенностями упаковки данной ДНК в хроматин. Важным примером может служить неактивная X-хромосома у самок млекопитающих. Вся эта хромосома реплицируется только в конце фазы S, тогда как репликация ее активного гомолога происходит на протяжении всей этой фазы. Хотя обе эти хромосомы содержат идентичные последовательности ДНК, только неактивная X-хромосома конденсирована в гетерохроматин (разд. 8.5.3). Таким образом, порядок, в котором активируются точки начала репликации, должен определяться (по крайней мере отчасти) структурой хроматина в этих участках. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что первыми реплицируются те области генома, где хроматин в интерфазе наименее конденсирован и, следовательно, наиболее доступен для репликационного аппарата.

Это согласуется с тем фактом, что многие репликативные единицы, видимые в метафазных хромосомах на рис. 11-28, соответствуют отдельным полосам, выявляемым при различных процедурах фиксации и окраски, используемых для кариотипирования. В гаплоидном наборе хромосом млекопитающих

таких можно выявить до 2000 полос, и каждая такая полоса, возможно, представляет собой продукт конденсации (при митозе) ряда смежных участков ДНК со сходной структурой хроматина (разд. 8.1.11). Тот факт, что эти смежные участки активируются для репликации в фазе S как единое целое, означает, что хроматин в отдельной полосе сохраняет свое структурное единство даже во время интерфазы.

Являются ли соседние участки хроматина, образующие полосы во время митоза, также и функциональными единицами экспрессии генов? Если да, то можно ожидать, что ДНК таких полос в тех клетках, в которых она экспрессируется, должна быть упакована в менее конденсированные хроматиновые структуры, чем в клетках, где такой экспрессии не происходит. Действительно, есть сообщения о различном времени репликации определенных хромосомных полос в клетках из разных тканей. Если такие сообщения подтвердятся, это будет означать, что процесс дифференцировки клеток у многоклеточного животного сопровождается тонкими изменениями структуры отдельных хромосомных полос. Эти изменения могли бы в свою очередь играть важнейшую роль в эмбриогенезе, помогая определять, какой набор генов будет экспрессироваться в клетках каждого типа при дифференцировке.

11.3.6. Как контролируется последовательность событий при репликации ДНК? [19, 24]

Хотя механизм репликации ДНК в репликационной вилке хорошо изучен на молекулярном уровне, до сих пор не ясно, как формируются репликационные глазки и каким образом регулируется последовательность событий при репликации. Как, например, происходит в фазе S одновременная активация всех многочисленных точек начала репликации в каждой репликативной единице (или хромосомной полосе)? Репликативная единица, вероятно, содержит в среднем полсотни смежных петель (каждая из которых может иметь свою точку начала репликации); эти петли сконденсированы вместе даже в интерфазном хроматине. Таким образом, репликация могла бы контролироваться по меньшей мере двумя различными способами: 1) некая общая система может специфически узнавать каждую хромосомную полосу, деконденсировать ее и тем самым делать все 50 точек начала репликации одновременно доступными для белков, ответственных за образование репликационных глазков; 2) репликативные белки могут узнавать лишь несколько точек начала репликации из данного набора, после чего начавшаяся локальная репликация будет изменять структуру остального хроматина репликативной единицы таким образом, что станет возможной репликация во всех других начальных точках. Каждая из этих моделей позволяла бы объяснить репликацию по типу «всё или ничего» в различных хромосомных полосах.

Мы пока не знаем также, чем определяется фиксированная последовательность репликации полос. Для того чтобы объяснить такую последовательность, были предложены две гипотезы. Согласно одной из них, различные репликативные белки, каждый из которых специфичен в отношении полос определенного типа, синтезируются в фазе S в разное время. Согласно другой гипотезе, которая кажется сейчас более правдоподобной, репликативные белки просто действуют на те участки ДНК, которые для них более доступны; например, в течение фазы S может происходить непрерывная деконденсация хромосом, и хромосомные полосы одна за другой становятся доступными для репликативных белков.

11.3.7. Связанные с хроматином факторы ответственны за то, что каждый участок ДНК реплицируется в фазе S лишь один раз [24]

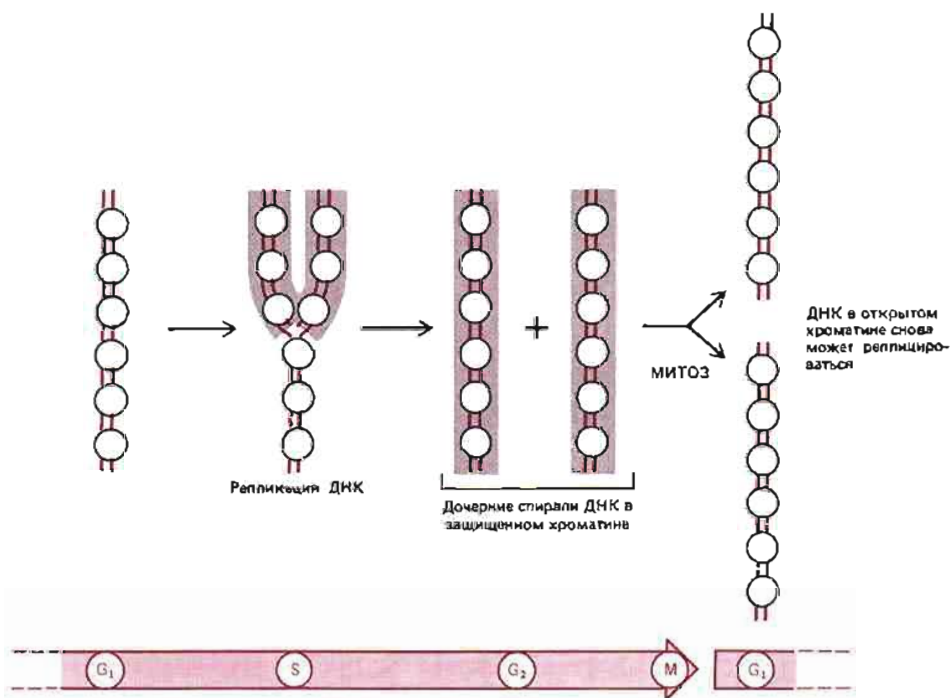
По мере прохождения клетками фазы S активируются всё новые точки начала репликации. Так как соседние точки в каждой репликативной единице разде-

лены расстояниями от 30 000 до 300 000 пар оснований, время, необходимое для завершения синтеза, начатого в любой из точек, составляет от 5 до 50 мин. Поскольку обычно S-фаза продолжается 8 ч, уже где-то в середине этой фазы возникает сложная «бухгалтерская» задача. Она связана с тем, что некоторые точки начала репликации к этому времени будут полностью редулированы и, по-видимому, идентичны (по крайней мере в отношении последовательностей ДНК) другим точкам начала репликации, которые еще не использовались. Тем не менее каждая такая точка должна быть использована в фазе S один, и только один, раз. Как это достигается?

Хотя молекулярный механизм, обеспечивающий лишь однократное воспроизведение ДНК, неизвестен, общий принцип решения такого рода задачи был раскрыт в экспериментах по слиянию клеток. Когда клетки в фазе S сливаются с клетками в фазе G_1 , в ядре, находящемся в фазе G_1 , начинается синтез ДНК. Это позволяет предположить, что переход из G_1 в S обусловлен воздействием какого-то диффундирующего инициатора синтеза ДНК. В то же время слияние клеток в фазе G_2 с клетками в фазе S не приводит к инициации синтеза ДНК в ядре, находящемся в фазе G_2 , хотя ядро, находящееся в S-фазе, продолжает синтезировать ДНК. Это означает, что хроматин в фазе G_2 не может реплицироваться, поскольку с ним прочно связан какой-то ингибирующий фактор, неспособный к диффузии.

Существование такого ингибитора легко позволило бы объяснить однократность репликации. Подобный ингибитор мог бы модифицировать хроматин с ДНК, претерпевшей удвоение, и таким образом препятствовать ее повторной репликации в той же фазе S. Так как весь хроматин ядра, находящегося в фазе G_2 , блокирован ингибитором, его ДНК не способна к дальнейшей репликации даже в присутствии цитоплазмы клеток, находящихся в фазе S. С другой стороны, ингибитор, видимо, удаляется во время митоза или вскоре после него, так как ДНК ядер, находящихся в фазе G_1 , способна реплицироваться под действием цитоплазмы клеток в фазе S (рис. 11-29).

Рис. 11-29. Схема возможной защиты реплицированной ДНК от повторной репликации в том же клеточном цикле. Такая защита должна иметь решающее значение для правильной репликации ДНК, во ее молекулярный механизм неизвестен.



Заключение

В точке начала репликации ДНК при движении двух репликационных вилок в противоположных направлениях образуется репликационный глаз. После прохождения репликационной вилки происходит быстрое восстановление структуры хроматина. По-видимому, старые гистоны при этом остаются в составе нуклеосом на одной из дочерних спиралей ДНК, тогда как новые гистоны объединяются в нуклеосомы на другой спирали. Таким образом, имеет место прямое наследование родительских гистонов.

Группы из многих смежных точек начала репликации, разделенных расстояниями примерно в одну петлю хроматина, активируются в фазе S более или менее одновременно, как единое целое. Так как репликационная вилка движется со скоростью около 50 нуклеотидов в секунду, для завершения синтеза ДНК в каждой такой группе (репликационной единице) требуется меньше часа. В течение типичной 8-часовой фазы S различные репликационные единицы активируются в последовательности, отчасти определяемой строением их хроматина; при этом области с наибольшей конденсацией хроматина реплицируются последними. Наличие соответствия между репликационными единицами и полосами на хромосомах позволяет предположить, что они представляют собой как структурные, так и функциональные единицы хроматина.

11.4. Логика клеточного цикла

11.4.1. Большинство белков синтезируется на протяжении всей интерфазы

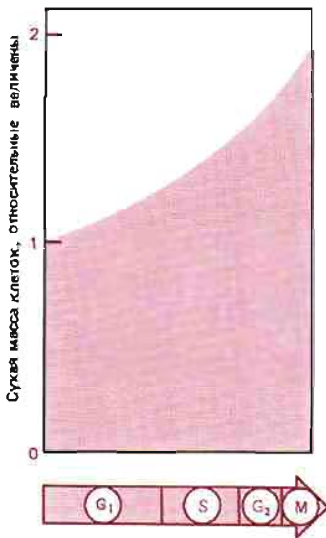


Рис. 11-30. График наблюдаемой зависимости массы клеток от длительности клеточного цикла. Большая часть клеточных компонентов образуется на протяжении всей интерфазы непрерывно, причем скорость их синтеза обычно возрастает с увеличением клеток. Обратите внимание на то, что для поддержания постоянной скорости роста необходимо точное удвоение всех клеточных компонентов за время одного цикла.

За время клеточного цикла должны быть реплицированы не только ДНК и связанные с ней белки. Клетка должна между двумя последовательными делениями удвоить все свои компоненты, а значит, и свою массу. Не удивительно поэтому, что в отличие от ДНК подавляющее большинство клеточных белков и молекул РНК синтезируется в клетке на протяжении всей интерфазы. На рис. 11-30 показана типичная кривая, характеризующая в равной мере прирост массы, суммарного клеточного белка или суммарной РНК за время клеточного цикла. Поскольку биосинтетический потенциал клетки увеличивается по мере ее роста, скорость синтеза различных компонентов возрастает в период от G_1 до G_2 . Методом двумерного гель-электрофореза белков, синтезируемых в синхронных культурах клеток млекопитающих, было показано, что из более чем тысячи выявленных белков лишь очень немногие синтезируются в определенное время цикла (рис. 11-31).

11.4.2. Клеточный цикл включает строго детерминированный ряд последовательных процессов [18, 25]

Природа клеточного цикла проявилась в результате изучения мутантных клеток, растущих и делящихся при низких температурах (34°C для клеток млекопитающих, 23°C для клеток дрожжей), но не растущих при высоких температурах (39 и 36°C соответственно). У таких «температурочувствительных» мутантов обычно имеется лишь один измененный белок, который функционирует только при низкой температуре. У большинства таких мутантов рост нарушается вскоре после повышения температуры. Однако некоторые редкие мутанты перестают расти лишь тогда, когда клетка достигает определенной стадии цикла, например начала синтеза ДНК, деления ядра или цитокинеза (рис. 11-32).

Такие мутанты по клеточному циклу лучше всего изучены у пекарских дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*): у них выделены мутанты по более чем 35 различным генам цикла клеточного деления (cell division cycle, *cdc*). На этих мутантах исследовали взаимосвязь между функциями определенных белков и клеточным циклом.

Молекулярная масса полипептидов
150,000
100,000
55,000
40,000

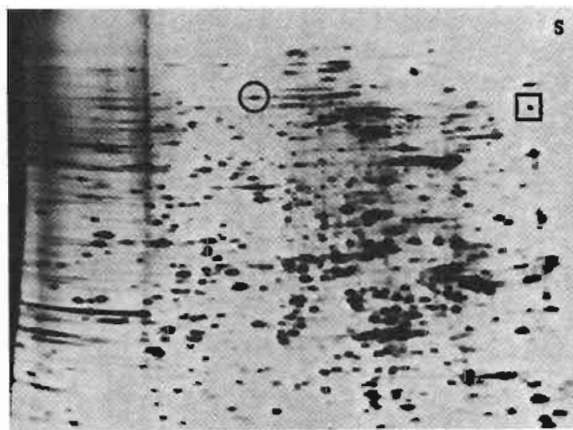
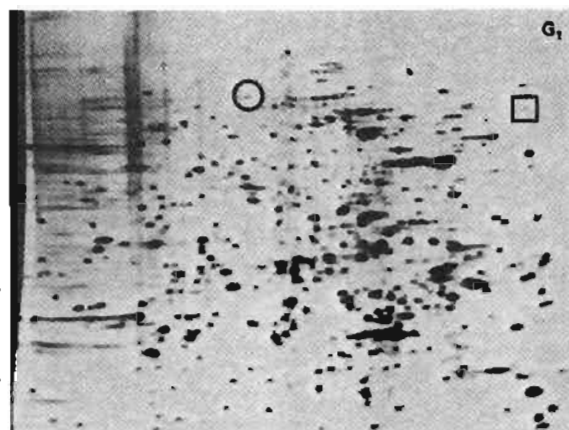
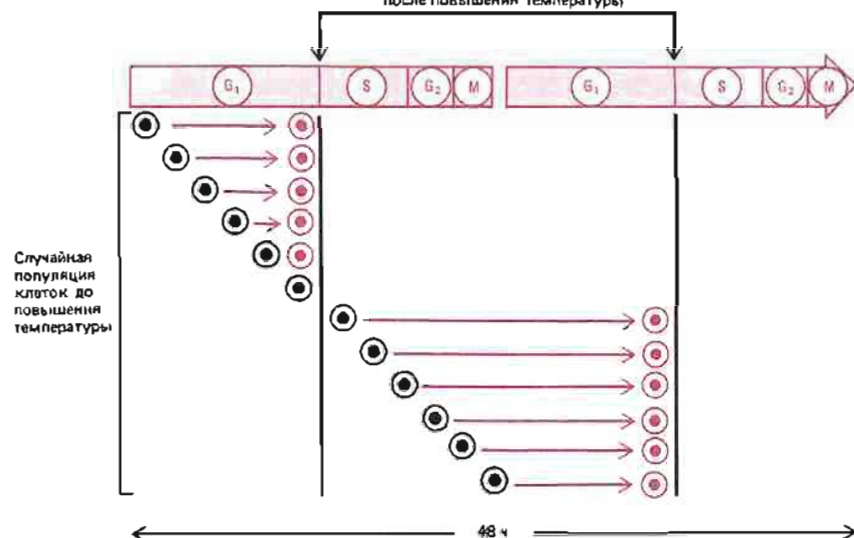


Рис. 11-31. Анализ белков, синтезируемых во время фаз G_1 и S , с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Синхронизированные клетки мышиной лимфомы в течение короткого времени в начале фазы G_1 или в конце фазы S метили смесью радиоактивных аминокислот. На приведенных радиоавтографах было выявлено около 1000 вновь образовавшихся белков, но лишь два из них (выделены кружком и квадратом) синтезировались в двух исследованных фазах цикла с существенно различной скоростью. Гистоны из-за своего сильного положительного заряда при электрофорезе мигрировали за пределы геля и на радиоавтографах не представлены. (P. Coffino, V.E. Groppi, Adv. Cyclic Nucleotide Res., 14, 399-410, 1981.)

ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МУТАНТЫ ПО КЛЕТОЧНОМУ ЦИКЛУ (*cdc*)

Моменты остановки роста после повышения температуры



ДРУГИЕ ТЕМПЕРАТУРОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ МУТАНТЫ

Остановка в случайных точках при повышении температуры

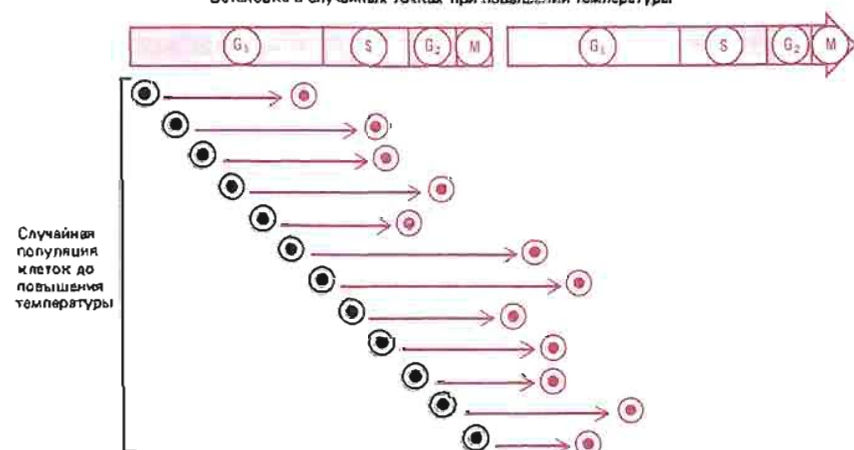


Рис. 11-32. Эта схема показывает, как можно отличить температурочувствительного мутанта по клеточному циклу (*cdc*) от других температурочувствительных мутантов. Большая часть мутантных клеток, неспособных расти при высоких температурах, будет иметь дефекты в тех или иных процессах, важных для общей жизнеспособности (например, в выработке АТФ). Как показано на схеме, при высокой температуре рост этих мутантных клеток спустя определенное время остановится в каких-то случайных точках клеточного цикла. В отличие от этого мутанты *cdc* останавливаются лишь в определенных точках цикла, специфичных для каждого из таких мутантов (в приведенном примере – в начале фазы S).

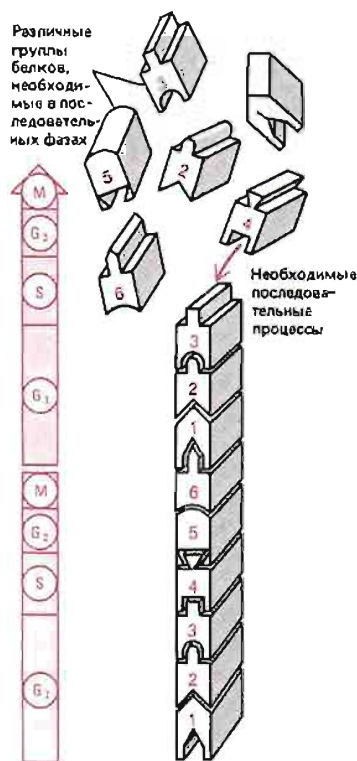


Рис. 11-33. Схема прохождения клеткой различных стадий клеточного цикла. Согласно представленной точке зрения, «двигателем» цикла служит ряд биосинтетических процессов, каждый из которых должен быть завершен до начала следующего. Эти процессы представляют собой специфические для соответствующих стадий цикла биосинтетические реакции, катализируемые белками *cdc*. Судя по генетическим данным, полученным на дрожжах, в таких реакциях участвует около 10% клеточных белков и подавляющее большинство этих белков присутствует в клетках на протяжении всего цикла, хотя они функционируют лишь в одной его точке.

Один из главных выводов, к которому привели такого рода исследования, состоит в том, что у дрожжей имеется много различных белков, участвующих в том или ином событии, связанном с клеточным циклом. Эти белки не обязательно должны синтезироваться только на той стадии цикла, на которой они работают, поскольку после инъекции нормальной цитоплазмы большинство мутантных клеток способно пройти несколько нормальных делений при высокой температуре. Это означает, что у дрожжей на протяжении всего цикла необходимых белков намного больше, чем нужно для одного цикла. По аналогии можно полагать, что и в клетках *млекопитающих* многие белки, синтезируемые все время с постоянной скоростью, могут функционировать лишь на определенных стадиях цикла (см. рис. 11-31).

При исследовании мутантных дрожжей были также получены важные сведения о биохимических процессах, связанных с клеточным циклом. Возник, например, вопрос, в скольких различных точках цикла действуют белки, идентифицированные с помощью мутаций *cdc*. Много разнообразных белков требуется, в частности, для репликации ДНК. Большое число различных продуктов, кодируемых генами *cdc*, должно работать одновременно для завершения фазы S; так оно и оказалось в действительности. Аналогичным образом было показано, что белки у дрожжей распадаются по крайней мере на семь групп, каждая из которых участвует в одном из семи биохимических событий, необходимых для завершения цикла. Удалось определить последовательность, в которой действуют эти семь групп, и был поставлен вопрос: необходимо ли завершение одного биохимического события из данной серии, для того чтобы мог начать работать какой-либо белок из следующего набора?

Рассмотрим пока лишь события, происходящие в ядре. Здесь мы находим строгую последовательность реакций, специфичных для определенных стадий клеточного цикла (рис. 11-33). У дрожжей эта последовательность организована подобно линейной головоломке, в которой каждый предыдущий фрагмент должен занять свое место, прежде чем можно будет уложить последующий. В результате все события происходят в строгом циклическом порядке. Например, репликация ДНК может начаться только после удвоения полярного тельца веретена; деление ядра — только после репликации ДНК; следующая дупликация полярного тельца — только после разделения ядра. В принципе ход организованного таким образом цикла может контролироваться просто скоростью добавления преобразованных «кусочков головоломки», а синтез белков, специфичных для данной стадии цикла, может в этот момент и не требоваться.

Судя по имеющимся ограниченным данным о *cdc*-мутантах клеток *млекопитающих*, а также по результатам опытов со специфическими ингибиторами метаболизма, выводы из экспериментов с дрожжами приложимы и к клеткам *млекопитающих*. Например, у *млекопитающих*, так же как и у дрожжей, цитокinesis обычно зависит от деления ядра, которое в свою очередь зависит от завершения репликации ДНК. С другой стороны, в обеих системах начало второго ядерного цикла, включающего репликацию ДНК и деление ядра, не зависит от завершения цитокинеза в предшествующем цикле: если цитокinesis заблокировать, получится клетка с двумя ядрами. Это важное исключение из общего «правила линейной упорядоченности», описанного выше.

11.4.3. Массу клетки, вступающей в митоз, в основном определяют факторы, действующие на ранних этапах цикла [7, 26]

Чтобы понять, каким образом регулируется масса клеток, вступающих в митоз, этот параметр измеряли в разнообразных клеточных культурах. Даже если клетки были генетически идентичны, масса их во время митоза довольно сильно варьировала. Тем не менее, когда сравнивали родственные тетраплоидные, диплоидные и гаплоидные клетки, то их средняя относительная масса в митозе составляла 4, 2 и 1 соответственно. По-видимому, существует механизм регулирования массы клеток в зависимости от содержания ДНК

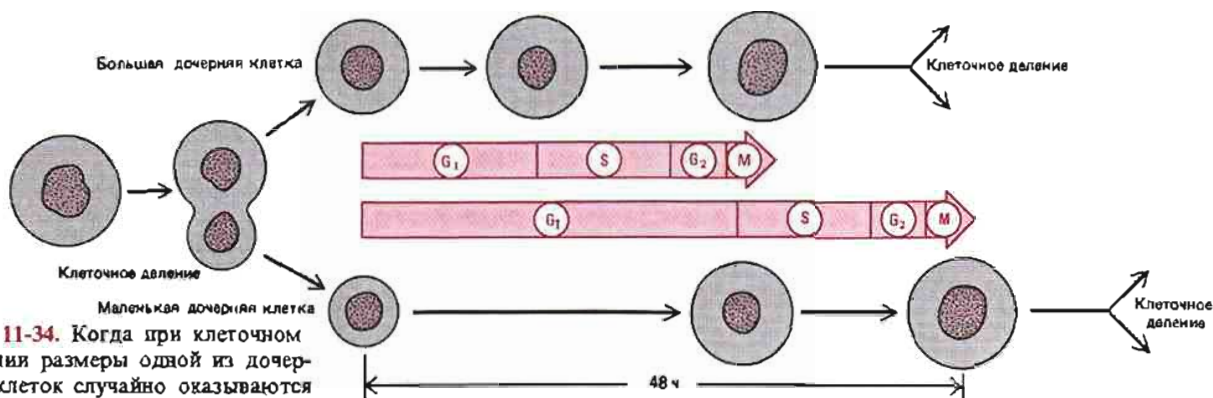


Рис. 11-34. Когда при клеточном делении размеры одной из дочерних клеток случайно оказываются меньше обычных, фаза G_1 у этой клетки удлиняется. Так как маленькая клетка синтезирует белки с меньшей скоростью, чем большая, такое поведение хорошо согласуется с теорией триггерного белка.

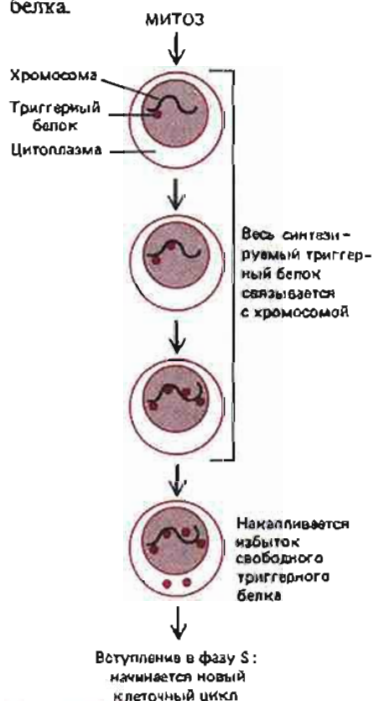


Рис. 11-35. Возможная схема регуляторного механизма, при котором для начала каждого нового клеточного цикла в клетке должно накопиться определенное пороговое количество триггерного белка. Согласно этой гипотетической схеме, активен только свободный триггерный белок. Хромосомы (или какие-то иные ядерные структуры) очень прочно связывают триггерный белок и таким образом служат ингибиторами, препятствующими действию его подпороговых количеств.

в ядре, но этот механизм на уровне отдельной клетки работает с большими допусками.

Размеры вновь образованных дочерних клеток вначале варьируют гораздо сильнее, чем на более поздней стадии, когда эти клетки снова вступают в митоз. К началу фазы S большие различия в размерах дочерних клеток сглаживаются, так как меньшие клетки остаются в фазе G_1 , пока не достигнут примерно той же величины, что и более крупные клетки (рис. 11-34). С этого момента дальнейшие фазы цикла у тех и других протекают с одинаковой скоростью. Точно так же у клеток, у которых синтез белка был снижен в два раза специфическим ингибитором, фаза G_1 продолжалась в среднем втрое дольше, тогда как длительность фаз S и G_2 не изменилась. Таким образом, к тому моменту, когда клетка начинает синтезировать ДНК, ее окончательные размеры в митозе уже определены.

Эти наблюдения указывают на то, что существует специальная система, контролирующая клеточный цикл в точке рестрикции в фазе G_1 . Такая система предназначена, по-видимому, для задержки перехода в фазу синтеза ДНК до тех пор, пока в клетке не будет достаточного запаса компонентов для завершения всех последовательных биосинтезов, необходимых для протекания фаз S, G_2 и M. Исходя из схемы клеточного цикла, представленной на рис. 11-33, можно заключить, что клетки останавливались бы в точке рестрикции в фазе G_1 , если бы стадия 3 представляла собой биосинтетическую реакцию, намного более чувствительную к ингибированию общего синтеза белка, чем любые другие реакции, специфичные для отдельных фаз цикла.

Каков молекулярный механизм, регулирующий величину клетки к началу фазы M? Было высказано предположение, что для прохождения точки рестрикции концентрация какого-то триггерного белка должна превысить некоторый пороговый уровень (разд. 11.1.4). Как клетка могла бы определять этот уровень? Некоторые общие способы приватия клетками решений типа «всё или ничего» будут рассмотрены позже, при обсуждении принципов внутриклеточной сигнализации (разд. 13.4.9).

Однако наблюдаемая прямая пропорциональность между числом наборов хромосом (плоидностью) и размерами клеток позволяет выдвинуть другое предположение: может быть, триггерный белок связывается с определенными участками хромосом, а для перехода клетки в фазу S (и, следовательно, для вступления в новый цикл) необходимо какое-то избыточное количество этого белка сверх того, которое связано с хромосомами. В этом случае хромосомы служили бы своего рода ингибиторами действия триггерного белка и в то же время измерителями его общего количества (рис. 11-35). Кроме того, поскольку для деления тетраплоидной клетки требовалось бы в 4 раза больше триггерного белка, чем для деления гаплоидной клетки, то тетраплоидная клетка перед вступлением в фазу S должна была бы синтезировать этот белок в 4 раза быстрее гаплоидной и, значит, иметь соответственно большие размеры.



Рис. 11-36. Схема эксперимента, в котором митотические клетки сливаются с интерфазными. Как показано на рисунке, такое слияние вызывает преждевременную конденсацию хромосом в интерфазной клетке (см. рис. 11-37).

Интересно, что модель сходного типа была предложена и для объяснения регуляции клеточного цикла у более примитивных организмов. Однако у некоторых из них, например у *Schizosaccharomyces pombe* (дрожжи), амёбы (простейшие) и *Physarum* (миксомицеты), фаза G_1 вообще отсутствует, и после митоза клетки прямо вступают в фазу S . У этих клеток точка рестрикции, по-видимому, контролирующая клеточное деление, находится в начале фазы M .

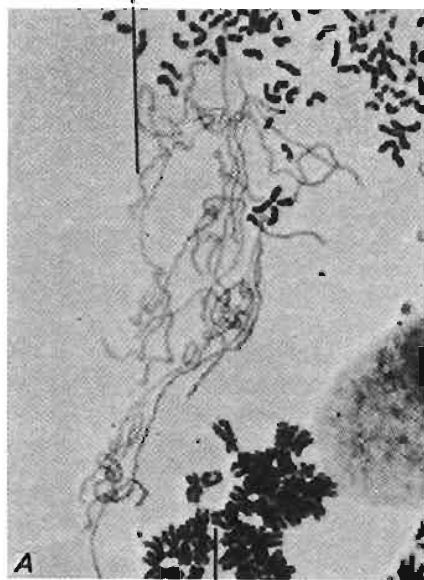
11.4.4. Фаза G_2 нужна для подготовки клеток к митозу [27]

Клетки не вступают в митоз, если подавить в них синтез белков — даже в конце фазы G_2 ; это свидетельствует о том, что какие-то белки, синтезируемые в этот период, необходимы для клеточного деления. Некоторые данные о возможной природе этих белков были получены в экспериментах, в которых митотические клетки сливали с интерфазными. В гибридных клетках хромосомы интерфазных ядер быстро конденсируются, а окружающая их ядерная мембрана разрушается (рис. 11-36 и 11-37). Это позволяет предположить, что в поздней фазе G_2 появляются какие-то растворимые факторы, отсутствующие в интерфазных клетках и необходимые для митоза.

Была выдвинута гипотеза о том, что незадолго до конца фазы G_2 активируется растворимая протеинкиназа (фермент, катализирующий фосфорилиро-

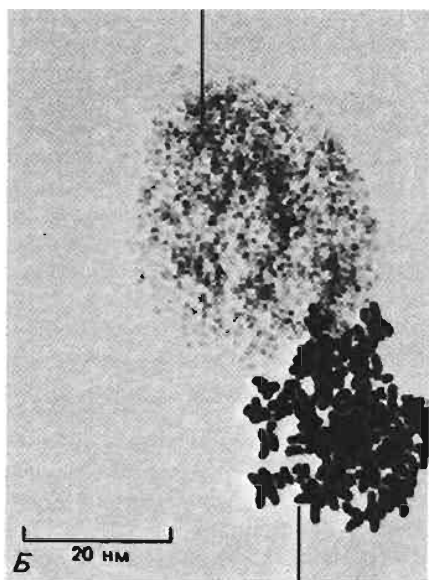
Рис. 11-37. Преждевременная конденсация интерфазных хромосом при слиянии интерфазных клеток РТК сумчатой крысы с митотическими клетками HeLa человека. **А.** Клетка РТК перед слиянием находилась в фазе G_1 , поэтому ее преждевременно конденсированные хромосомы представлены одичочными хроматидами. **Б.** Клетка РТК находилась в фазе S , и ее хроматин имеет «распыленный» вид. **В.** Клетка РТК находилась в фазе G_2 , поэтому ее хромосомы содержат по две хроматиды, хотя по сравнению с нормальными метафазными хромосомами они значительно более растянуты. (К. Sperling, P. Rao, Humangenetik, 23, 235–258, 1974.)

Индукцированная конденсация хромосом в G_1



Метафазные хромосомы человека

Индукцированная конденсация хромосом в S



Метафазные хромосомы человека

Индукцированная конденсация хромосом в G_2



Метафазные хромосомы человека



Рис. 11-38. Электронная микрофотография растянутого хроматина из раннего эмбриона *Drosophila melanogaster*. Видны тесно расположенные группы репликационных пузырей. Между последовательными делениями ядер у таких эмбрионов проходит всего лишь около 10 мин. (С любезного разрешения Victoria Foe.)

вание белков), и это ведет к переходу клеток из G_2 в митоз. Эта киназа может быть ответственна за фосфорилирование белков ядерной ламины, что в свою очередь могло бы быть причиной распада ядерной мембраны, происходящего в фазе М (разд. 11.5.11). Кроме того, киназа, возможно, обеспечивает усиленное фосфорилирование молекул гистона H1 (до 6 остатков фосфата на молекулу), характерное для митотических хромосом. Поскольку гистон H1, присутствующий в количестве одной молекулы на нуклеосому, участвует во взаимной укладке нуклеосом, интенсивное фосфорилирование его перед самым митозом может быть причиной конденсации хромосом. Такое объяснение, хотя оно и гипотетично, может служить иллюстрацией того, в какие детали приходится углубляться, чтобы понять клеточный цикл в целом.

Между тем, несмотря на конденсацию хромосом, при слиянии митотической клетки с интерфазной новой веретено не образуется. Это означает, что существенные части сложного молекулярного механизма митотического веретена (см. ниже) формируются в поздней фазе G_2 .

Фаза G_2 , заканчиваясь, переходит в профазу митоза. Профаза — это тот момент цикла, когда впервые становятся видимыми конденсированные хромосомы (см. разд. 11.5.3). Поскольку степень конденсации хромосом во время поздней фазы G_2 возрастает постепенно, момент начала фазы М определяется достаточно произвольно.

11.4.5. Продолжительность клеточного цикла может резко сокращаться, если ее не лимитирует скорость биосинтетических процессов [28]

У некоторых организмов большая часть макромолекул (исключая ДНК), необходимых для образования первых 10^3 – 10^4 клеток эмбриона, имеется уже в неоплодотворенном яйце, масса которого в момент оплодотворения достаточно велика (см. гл. 14). Поэтому, например, в яйце лягушки после первого деления следующие двенадцать происходят с 30-минутными интервалами (этот процесс называется *дроблением*). В результате дробления на стадии средней бластулы образуется 8000 (2^{13}) клеток. С каждым делением клетки становятся все мельче, пока не достигают размера клеток взрослого животного. Получасовой цикл у таких клеток состоит лишь из чередующихся фаз S и М.

Краткость фазы S, характерная для многих клеток раннего эмбриона, становится возможной благодаря очень большому числу точек начала репликации (рис. 11-38); расстояния между этими точками составляют лишь несколько тысяч пар оснований (на более поздних стадиях развития они увеличиваются до десятков тысяч пар оснований). Любая ДНК, инъектированная в яйцо лягушки, способна к репликации; это относится даже к мелким фрагментам бактериальной ДНК, в которых, казалось бы, не должно быть участков, используемых обычно для инициации удвоения ДНК. Видимо, в эмбриональных клетках (в отличие от клеток взрослого организма) много различных последовательностей ДНК могут служить точками начала репликации. Однако главное, что обеспечивает высокую скорость деления, — это присутствие в яйце всех (кроме ДНК) компонентов, необходимых для создания новых клеток, в том числе компонентов веретена, гистонов, рибосом, митохондрий и ферментов.

Из того факта, что в эмбриональных клетках цикл деления протекает очень быстро, следует важный общий вывод: в самом процессе клеточного деления нет ничего такого, что занимало бы много времени. Например, хромосомы могут конденсироваться для митоза за считанные минуты, тогда как обычно этот процесс в фазе G_2 растягивается на несколько часов. Большую часть времени между последовательными митозами занимает биосинтез различных клеточных компонентов, которые (помимо ДНК) нужны для образования двух клеток из одной.

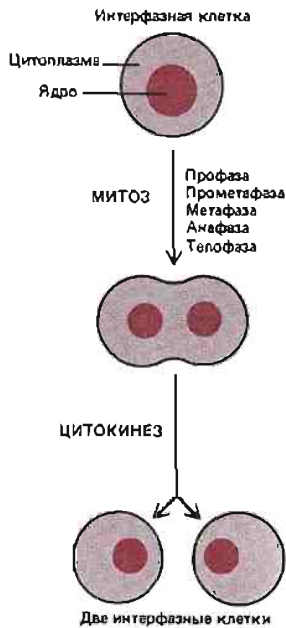


Рис. 11-39. Фаза М (фаза клеточного деления) состоит из пяти стадий митоза и следующего за митозом цитокинеза.

Закключение

Очень быстрое деление клеток после оплодотворения крупного яйца свидетельствует о том, что последовательная цепь событий клеточного цикла может занять всего лишь 30 мин или даже меньше, если все компоненты, необходимые для образования новых клеток, имеются в большом избытке. Обычно, однако, клетки перед делением должны удвоить свою массу, и этот процесс занимает у клеток млекопитающих 10–20 и более часов; все это время происходит непрерывный синтез большей части клеточных белков.

Генетические исследования на мутантах дрожжей показали, что, хотя растущие клетки удваивают свое содержимое в целом независимо от фаз цикла, в процессе их роста осуществляется также ряд последовательных процессов, специфически связанных с определенными фазами клеточного цикла. Многие из этих процессов, по-видимому, включают построение надмолекулярных структур из предсуществующих молекул. Завершение сборки этих структур делает возможной следующую стадию сборки. Промежуток между последовательными митозами определяется суммарным временем, необходимым для осуществления всех звеньев такой цепи событий. Одна из реакций в этом каскаде может служить специальным регулятором, обеспечивающим нормальные размеры клеток. В клетках млекопитающих подобная регуляторная система препятствует прохождению точки рестрикции в фазе G_1 (а значит, и началу синтеза ДНК) до тех пор, пока не будут синтезированы все компоненты, необходимые для завершения всех последовательных процессов сборки в предстоящих фазах S , G_1 и M .

11.5. Клеточное деление [29]

Фаза М в цикле эукариотической клетки включает сложнейшие механические процессы. Для того чтобы клетка разделилась, должно произойти два отдельных ряда событий. Во-первых, хромосомы, удвоившиеся во время фазы S , должны выстроиться в одной плоскости, отделиться друг от друга и разойтись к противоположным концам клетки. Во-вторых, должна разделиться цитоплазма, причем таким образом, чтобы каждая из дочерних клеток не только получила полный набор хромосом, но и была обеспечена необходимыми компонентами цитоплазмы и органеллами. Хотя эти два процесса – деление ядра (митоз) и деление цитоплазмы (цитокинез) – экспериментально можно разделить, обычно они тесно связаны между собой, так что цитокинез начинается перед самым окончанием митоза (рис. 11-39).

Необходимость в сложном механизме митоза возникла в процессе эволюции тогда, когда появились клетки с резко увеличенным количеством ДНК, упакованной в отдельные хромосомы: особую важность приобрела задача точно распределить удвоившиеся хромосомы между двумя дочерними клетками. Механизм, осуществляющий это разделение, называется **митотическим аппаратом**. Точность, с которой работает митотический аппарат, была определена на дрожжевых клетках, и оказалось, что ошибка при расхождении хромосом происходит один раз на 10^5 делений.

Хотя имеются детальные описания структуры и функционирования митотического аппарата в самых разнообразных клетках, сведения о молекулярных механизмах митоза еще очень фрагментарны. Тем не менее мы попытаемся подойти к анализу клеточного деления на молекулярном уровне, так как только этот путь может привести к проникновению в тайны функционирования клетки. Если мы узнаем, как микротрубочки митотического веретена выстраивают хромосомы и тянут их к полюсам клетки и как актиновые филаменты делят цитоплазму пополам, это поможет нам лучше понять также и функцию этих структур в других процессах.

Прежде чем обсуждать механизмы клеточного деления, необходимо дать самое общее представление о различных стадиях митоза и цитокинеза в типичной клетке высшего организма.

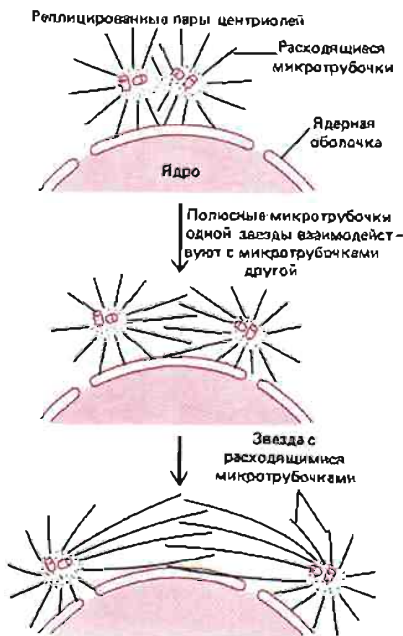
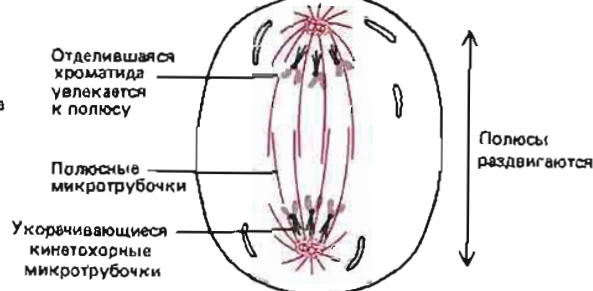


Рис. 11-40. Образование биполярного веретена из двух митотических центров в цитоплазме на стадии профазы.

ПРОФАЗА



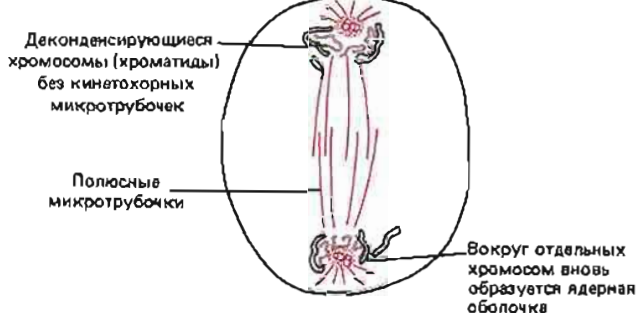
АНАФАЗА



ПРОМЕТАФАЗА



ТЕЛОФАЗА



МЕТАФАЗА



ЦИТОКИНЕЗ

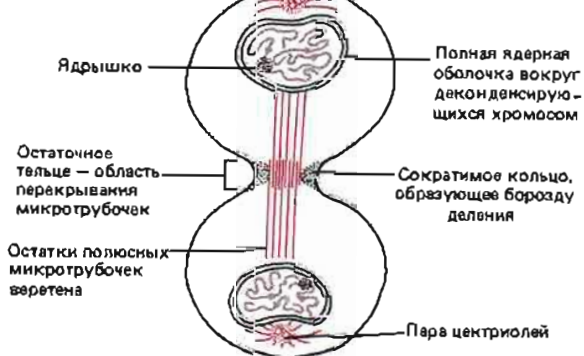


Рис. 11-41 Шесть фаз клеточного деления.

ПРОФАЗА

Переход из фазы G_2 в фазу М клеточного цикла совершается постепенно. Хроматин, который в интерфазе выглядит диффузным, медленно конденсируется в отчетливо видимые хромосомы. Для каждого вида характерно совершенно определенное число хромосом. Каждая хромосома во время предшествующей фазы S редуцировалась и состоит теперь из двух сестринских хроматид, соединенных между собой в области *центромеры*. По мере конденсации хромосом ядрышко начинает разрушаться и постепенно исчезает.

В начале профазы многочисленные цитоплазматические микротрубочки, входящие в состав цитоскелета, распадаются; при этом образуется большой пул свободных молекул тубулина. По-видимому, эти молекулы вновь используются для построения главного компонента митотического аппарата — *митотического веретена*. Веретено представляет собой биполярную волокнистую структуру, состоящую в основном из микротрубочек. Сборка этих микротрубочек вначале происходит вне ядра. В большинстве животных клеток область, где впервые образуется веретено, содержит центриоли. В самом конце фазы G_2 исходная пара центриол начинает реплицироваться, и в результате репликации из одной пары центриол образуются две. Каждая пара центриол в митозе становится частью *митотического центра*, от которого лучами расходятся микротрубочки (фигура *звезды*). Вначале обе звезды лежат рядом около ядерной мембраны. В поздней профазе пучки *полюсных микротрубочек*, взаимодействующие друг с другом (я видимые в световой микроскоп как *полюсные нити*), удлиняются и как будто расталкивают два митотических центра друг от друга вдоль наружной поверхности ядра. Таким способом образуется биполярное митотическое веретено (см. рис. 11-40).

ПРОМЕТАФАЗА

Прометафаза начинается с быстрого распада ядерной оболочки на мелкие фрагменты, неотличимые от фрагментов эндоплазматического ретикулума. Эти фрагменты остаются видимыми около веретена. Веретено, которое было расположено вне ядра, может теперь проникнуть в ядерную область. В хромосомах с каждой стороны центромеры в прометафазе образуются особые структуры, называемые *кинетохорами*. Они прикрепляются к специальной группе микротрубочек, называемых *кинетохорными нитями* или *кинетохорными микротрубочками*. Эти нити отходят от обеих сторон каждой хромосомы, идут в противоположных направлениях и взаимодействуют с нитями биполярного веретена. При этом хромосомы начинают интенсивно двигаться, что объясняется взаимодействием их кинетохорных нитей с другими компонентами веретена.

МЕТАФАЗА

После ряда отклонений в ту и другую сторону, происходящих в прометафазе, все хромосомы располагаются таким образом, что их центромеры лежат в одной плоскости. За ориентацию хромосом перпендикулярно оси веретена и расположение их на равном расстоянии от обоих полюсов веретена, скорее всего, ответственны кинетохорные нити. Каждая хромосома удерживается в метафазной пластинке парой кинетохоров и двумя пучками связанных с ними нитей, идущих к противоположным полюсам веретена.

АНАФАЗА

Часто метафаза продолжается длительное время. Она резко оканчивается, как будто по специальному сигналу, разделением двух кинетохоров каждой хромосомы, и каждая хроматида начинает медленно двигаться к полюсу веретена. Все хроматиды движутся к соответствующим полюсам с одинаковой скоростью (порядка 1 мкм/мин). Во время этого анафазного движения кинетохорные нити укорачиваются, по мере того как хромосомы приближаются к полюсам. Примерно в это же время происходит удлинение нитей веретена и два полюса веретена расходятся еще дальше. Анафаза обычно продолжается всего лишь несколько минут.

ТЕЛОФАЗА

Когда разделенные дочерние хроматиды подходят к полюсам, кинетохорные нити исчезают. Полюсные нити продолжают удлиняться, после чего вокруг каждой группы дочерних хроматид образуется новая ядерная оболочка. Конденсированный хроматин начинает разрыхляться, появляются ядрышки, и митоз заканчивается.

ЦИТОКИНЕЗ

Этот процесс начинается обычно в поздней анафазе или в телофазе. Мембрана в средней части клетки (между двумя дочерними ядрами) начинает втягиваться внутрь в плоскости, перпендикулярной к длинной оси веретена; образуется *борозда деления*, которая постепенно углубляется, пока не дойдет до узкого остатка митотического веретена, расположенного между двумя дочерними ядрами. Этот мостик, называемый *остаточным тельцем*, может существовать некоторое время, после чего сужается, а затем и полностью разрушается; в результате образуются две полностью разделенные дочерние клетки.

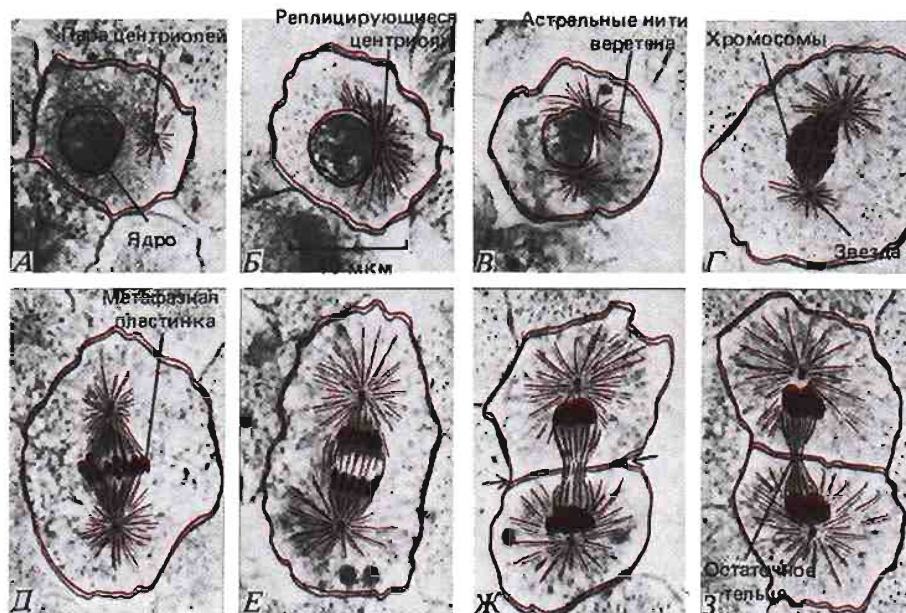


Рис. 11-42. Ход митоза в типичной клетке животного (сига). **А.** Интерфаза: клеточный центр, содержащий центриоль, как правило, имеет малые размеры и несколько удален от ядра. **Б.** Ранняя профаза: клеточный центр удвоился и приблизился к ядру; число отходящих от него микротрубочек увеличилось. **В.** Середина профазы: две звезды расходятся около поверхности ядра. **Г.** Прометафаза: ядерная оболочка разрушилась, и нити веретена уже взаимодействуют с хромосомами. **Д.** Метафаза: ясно видна биполярная структура веретена, все хромосомы распо-

ложились в его экваториальной плоскости. **Е.** Анафаза: хроматиды одновременно расходятся к полюсам, увлекаемые полюсными нитями. **Ж.** Ранняя телофаза: хроматиды собрались у полюсов, а борозда деления (указана стрелками) сжимает остатки веретена между хроматидами. **З.** Телофаза: завершено образование дочерних ядер, хотя они еще остаются компактными; почти закончен цитокинез; между дочерними ядрами сохраняется остаточное тельце. (С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps.)

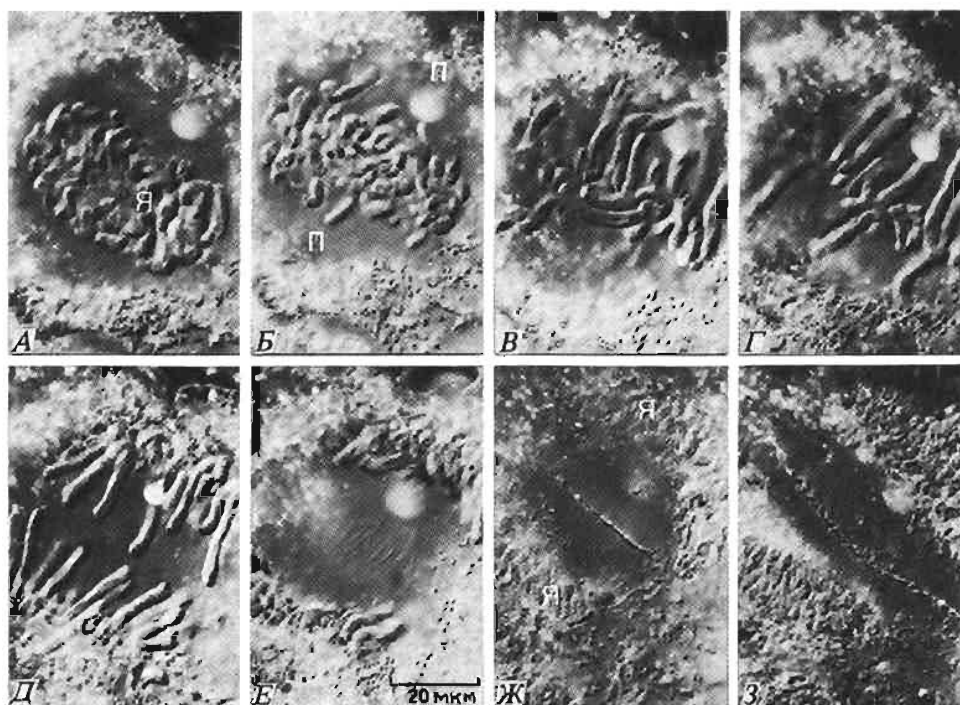


Рис. 11-43. Ход митоза в типичной растительной клетке. Микрофотографии живой клетки *Haemaphysalis*, полученные с помощью метода дифференциального интерференционного контраста. **Я**—центр ядра; **П**—полюсы веретена. Время от начала митоза в микнутах: **А**—0; **Б**—15; **В**—17; **Г**—54;

Д—83; **Е**—124; **Ж**—169; **З**—199 (стрелка показывает направление роста новой клеточной пластинки, которая видна и на предыдущем фото). (С любезного разрешения Andrew Bajer.)

11.5.1. В делении клетки традиционно выделяют шесть стадий [30]

Первые пять стадий деления составляют митоз, а шестой является цитокинез. *In vivo* эти шесть стадий образуют непрерывную динамическую последовательность, сложность и красоту которой трудно оценить по описанию или по серии статических изображений. Описание клеточного деления базируется на данных световой микроскопии живых клеток (часто в сочетании с микрокиносъемкой) и на результатах световой и электронной микроскопии фиксированных и окрашенных клеток. На рис. 11-40 и 11-41 представлены схемы различных фаз клеточного деления, а на рис. 11-42 и 11-43 — микрофотографии картин деления типичных животных и растительных клеток.

На рис. 11-41 ход деления показан крайне схематично. И в животном, и в растительном царстве могут наблюдаться бесчисленные отклонения во всех фазах митоза. Мы упомянем о некоторых из этих отклонений, когда будем подробнее обсуждать механизмы клеточного деления, так как это поможет нам понять роль отдельных частей митотического аппарата у млекопитающих.

11.5.2. Только часть событий в митозе связана с функционированием митотического веретена [31]

В видимой картине сложных событий, происходящих при делении ядра, центральное место занимает образование и работа митотического веретена, появляющегося в цитоплазме на стадии профазы (рис. 11-40). Однако не для всех этих событий требуется присутствие веретена. Как и можно было ожидать, колхицин (вещество, разрушающее все микротрубочки в клетке) подавляет зависимое от микротрубочек выстраивание хромосом и расхождение их к противоположным полюсам. И все же в некоторых клетках, например в клетках морского ежа, поведение хроматина и ядерной оболочки после обработки колхицином не изменяется: конденсация и последующая деконденсация хроматина, внезапное разделение двух хроматид в области центромеры, растворение старой ядерной оболочки и образование новой — все эти события и в отсутствие веретена проходят нормально. (Напротив, в клетках млекопитающих в присутствии колхицина могут происходить лишь ранние события митоза, и каждая хромосома остается в виде пары конденсированных сестринских хроматид.)

Как уже упоминалось, опыты по слиянию клеток тоже позволяют думать, что изменения хроматина и ядерной оболочки, ведущие к метафазе, контролируются растворимыми факторами, не связанными с митотическим веретеном: в результате слияния метафазных и интерфазных клеток происходит конденсация хромосом и разрушение ядерной мембраны интерфазного ядра, а нового веретена не образуется.

11.5.3. Веретено содержит организованные ансамбли микротрубочек, находящихся в динамическом равновесии между сборкой и разборкой [32]

Митотическое веретено представляет собой систему волокон, состоящих из микротрубочек и белков, ассоциированных с микротрубочками. Нити веретена подразделяются на две группы в зависимости от их прикрепления к другим клеточным структурам: **полюсные нити**, в большинстве веретен наиболее многочисленные, отходят от обоих полюсов веретена и идут по направлению к экватору, а **кинетохорные нити** прикреплены к центромере каждой хроматиды и идут к полюсам клетки (рис. 11-44). В среднем веретено содержит около 10^8 молекул тубулина, организованных в микротрубочки. Однако не весь тубулин клетки входит в состав веретена: можно показать, что функционирование веретена в митозе зависит от динамического равновесия между микротрубочками веретена и пулом растворимых молекул тубулина. Такое

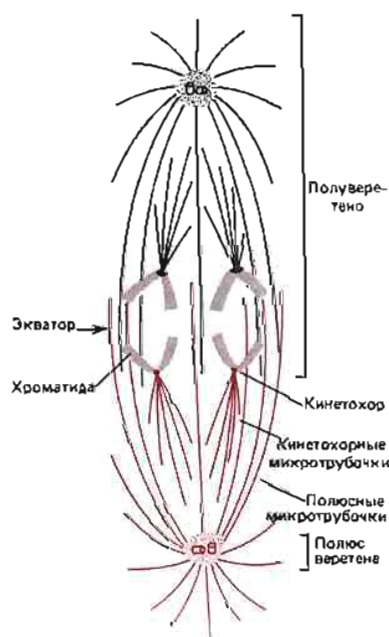


Рис. 11-44. Веретено в ранней анафазе. Видно, что оно построено из двух полуверетен (показанных черным и красным цветом), причем в каждом полуверетене имеются кинетохорные и полюсные микротрубочки. Для простоты на схеме изображены сестринские хроматиды только двух хромосом, а большая часть полюсных микротрубочек не представлена.

Рис. 11-45. Изолированное метафазное веретено. Используются три различных метода световой микроскопии: дифференциальный и интерференционный контраст (А), фазовый контраст (Б) и микроскопия в поляризованном свете (В). (E. Salmon, R. R. Segall, J. Cell Biol., 86, 355–365, 1980.)

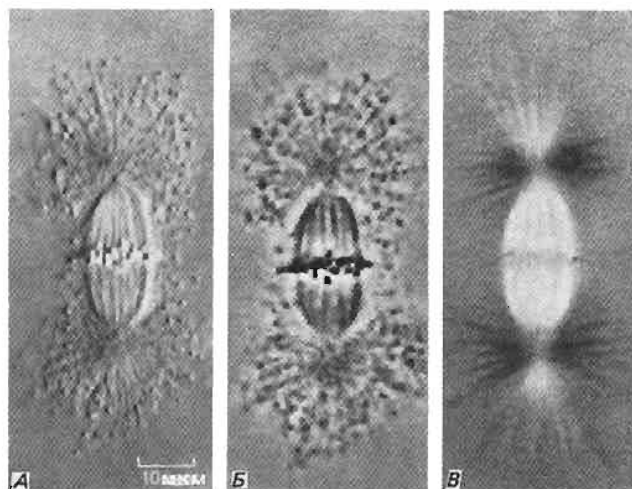
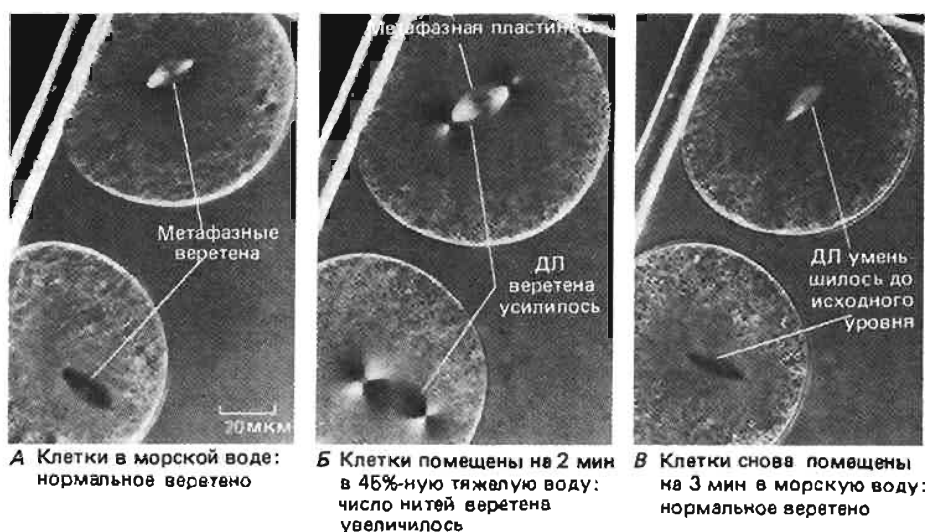


Рис. 11-46. Влияние тяжелой воды (D_2O) на веретено ооцита *Pectinaria*, наблюдаемое в живой клетке с помощью поляризационной микроскопии. Как именно проявляется двойное лучепреломление (в виде позитивного или негативного контраста), зависит от ориентации структур веретена по отношению к плоскости поляризации света; так как одно веретено лежит под прямым углом к другому, получается противоположный контраст. При данном способе микроскопического исследования хромосомы не видны. ДЛ – двойное лучепреломление. (S. Inoué, H. Sato, J. Gen. Physiol., 50, 259–292, 1967.)



динамическое равновесие можно продемонстрировать на митотических клетках в условиях, вызывающих обратимый сдвиг равновесия между полимеризацией и деполимеризацией тубулина [поведение волокон веретена можно наблюдать непосредственно в живых клетках при освещении поляризованным светом, так как эти волокна обладают двойным лучепреломлением (рис. 11-45 и 11-46)]. Если митотические клетки обработать тяжелой водой (D_2O) или таксолом – агентами, подавляющими разборку микротрубочек, то нити веретена удлиняются (рис. 11-46). Такое стабилизированное веретено не может тянуть хромосомы, и митоз останавливается. С другой стороны, митоз блокируется и в том случае, если нити веретена обратимо разрушить одним из трех воздействий, подавляющих сборку тубулина в микротрубочки, – воздействием колхицина, низкой температуры или высокого гидростатического давления. Тот факт, что ни стабилизированные, ни деполимеризованные микротрубочки веретена не способны перемещать хромосомы, говорит о том, что для правильного функционирования структур веретена необходимо тонкое равновесие между сборкой и разборкой. Прежде чем рассматривать механизм митотических движений более подробно, мы опишем организацию веретена и расположение хромосом в митозе.

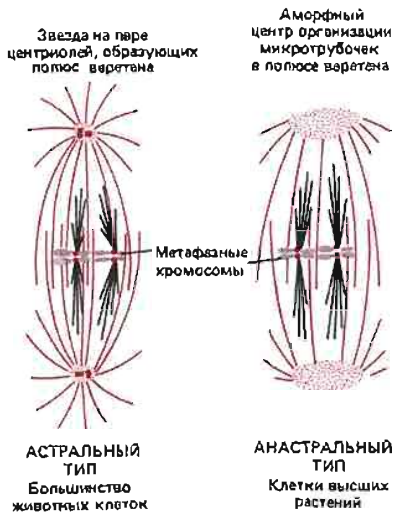


Рис. 11-47. Организация метафазного веретена в клетках с астральным и анастральным типами веретена.

11.5.4. Образование веретена в профазе в основном контролируется митотическими центрами, которые определяют положение полюсов [33, 34]

В главе 10 уже говорилось, что сборка систем микротрубочек контролируется особыми областями, известными как *центры организации микротрубочек*. В делящихся клетках эту функцию выполняют два митотических центра, которые в конечном счете образуют полюсы веретена.

В животных клетках митотические центры обычно ассоциированы с *центриолями*, и долгое время считалось, что именно центриоли служат центрами организации веретена. Между тем у многих организмов, в том числе у всех высших растений, функционально полноценное веретено образуется при полном отсутствии центриолей. У таких веретен нет звезд, поэтому их называют *анастральными*; микротрубочки в них сходятся к более обширным полярным областям (рис. 11-47). Кроме того, если у животной клетки разрушить центриоли (лазерным микроручком), то митотическое веретено продолжает нормально функционировать. Значит, они, по-видимому, не являются структурами, необходимыми для сборки микротрубочек веретена; но если центриоли в клетке есть, то они, вероятно, играют роль фокусов, в которых сходятся микротрубочки.

Если не центриоль, то что же служит центром организации микротрубочек веретена? Сейчас стало ясно, что на самом деле таким центром является плохо отграниченная область слабо окрашивающегося материала, видимого в электронный микроскоп на полюсах как астральных (содержащих центриоли), так и анастральных (не содержащих центриолей) веретен. Если выделить митотические центры из животной клетки и использовать их в качестве «затравки» для сборки микротрубочек *in vitro*, то полярные микротрубочки звезды будут расти не из самих центриолей, а из окружающего их аморфного материала.

Таким образом, расположение редуплицированных центриолей в полюсах не обусловлено их ролью в организации митотического веретена, а, возможно, возникло в эволюции для того, чтобы эти структуры, столь важные для подвижности и определения полярности животных клеток, передавались обеим дочерним клеткам при делении.

11.5.5. Каждая хромосома в митозе состоит из двух хроматид и содержит пару кинетохоров, связанных с концами микротрубочек [35]

Реплицированные хромосомы прикреплены к митотическому веретену с помощью специальных структур, называемых *кинетохорами*. Каждая такая хромосома состоит из двух сестринских хроматид, соединенных между собой довольно жестким участком — *центромерой* (рис. 11-48). В поздней профазе на двух противоположных сторонах центромеры образуются два кинетохора (по одному на каждой из сестринских хроматид), ориентированные в противоположных направлениях. На электронных микрофотографиях кинетохор выглядит как многослойная структура (рис. 11-49). Состав кинетохора практически неизвестен.

В начале прометафазы, когда распадается ядерная оболочка, к каждой хроматиде присоединяется отдельная группа нитей веретена. Эти нити, состоящие из микротрубочек, расходятся от кинетохоров каждой хромосомы в противоположных направлениях (рис. 11-48). Они служат для ориентирования хромосом относительно веретена в метафазе, а позднее, в анафазе — для передачи сил, заставляющих хроматиды двигаться к противоположным полюсам. Число микротрубочек, ассоциированных с каждым кинетохором, у разных видов весьма различно: у некоторых грибов с кинетохором связана лишь одна микротрубочка, а в клетках человека — от 20 до 40.

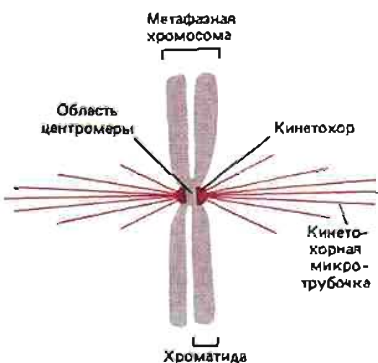
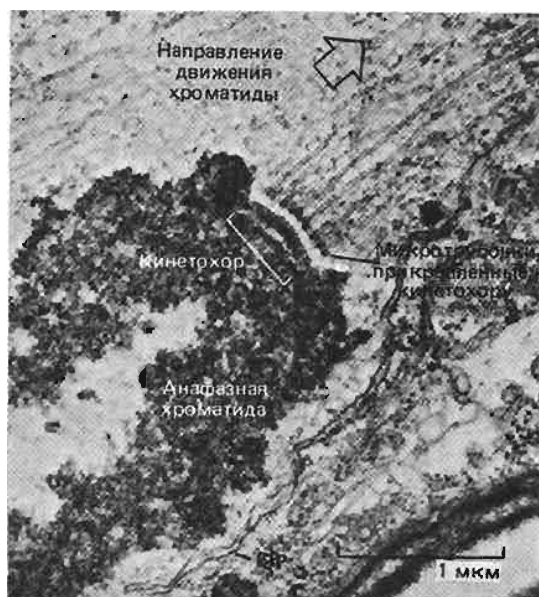


Рис. 11-48. Схематическое изображение метафазной хромосомы с кинетохорными микротрубочками.

Рис. 11-49. Кинетохор с микро-
трубочками в анафазной хромати-
де зеленой водоросли *Oedogonium*.
Большая часть кинетохоров имеет
трехслойную структуру, но у это-
го кинетохора структура отли-
чается необычайной сложностью
и наличием дополнительных
слоев. ЭР—эндоплазматический
ретикулум. (J. D. Picken-Hears,
L. C. Fowke, J. Biol. Sci., 23, 71-92,
1970.)



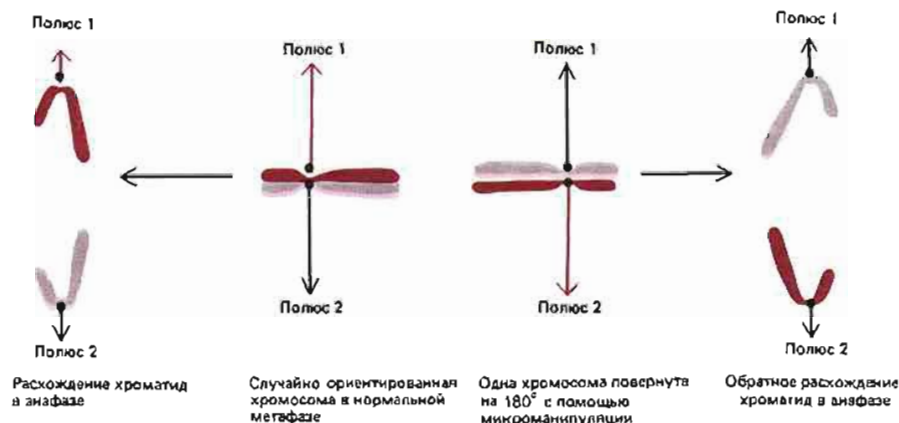
11.5.6. Упорядоченное расположение хромосом в метафазе— результат взаимодействия кинетохорных и полюсных нитей ве- ретена [34, 36]

Распад ядерной оболочки, с которого начинается прометафаза, позволяет хромосомам подключиться к механизму веретена. Благодаря работе этого механизма в конечном счете достигается их полное разделение, и точно по одной хроматиде из каждой хромосомы попадает в каждое из дочерних ядер. Кто-то сказал, что хромосомы в митозе подобны покойнику на похоронах: они являются непосредственной причиной событий, но активного участия в них не принимают. С машиной митотического веретена хромосомы связаны только через кинетохоры, поэтому все движения хромосом в митозе обусловлены взаимодействием кинетохоров с веретеном. Это взаимодействие приводит к двум результатам: 1) хромосома ориентируется по отношению к оси веретена таким образом, что каждый кинетохор обращен к одному из полюсов клетки; 2) все хромосомы оказываются в экваториальной плоскости веретена и располагаются под прямым углом к его оси, образуя так называемую *метафазную пластинку*. В клетках млекопитающих этот процесс занимает 10–20 минут и называется *прометафазой*.

Для прометафазы характерна чрезвычайно высокая активность веретена, которое как бы стремится захватить все хромосомы и построить из них метафазную пластинку. При этом отдельные хромосомы энергично вращаются и движутся туда и сюда между полюсами, так как их кинетохорные нити случайным образом взаимодействуют с полюсными нитями веретена. В конце концов группы полюсных фибрилл одна за другой окончательно улавливают кинетохоры; второй кинетохор «шойманной» хромосомы вскоре связывается с нитями, идущими от противоположного полюса.

Сведения о ходе этих важных событий были получены в результате изящных экспериментов, в которых тончайшие стеклянные иглы использовались для того, чтобы толкать или тянуть хромосомы в живой митотической клетке. Таким способом было показано, что кинетохоры не должны быть обязательно направлены к определенному полюсу подобно концам магнитной стрелки: если с помощью микроманипулятора перевернуть хромосому, то кинетохор может установить связь и с противоположным полюсом. Более того, в прометафазе можно путем микроманипуляции заставить обе группы кинетохорных нитей какой-либо хромосомы связаться с одним и тем же полюсом

Рис. 11-50. Распределение хроматид между дочерними клетками обычно бывает случайным и зависит только от ориентации хромосомы в метафазе. Как ориентацию, так и последующее расхождение хроматид можно изменить с помощью микроманипуляций.

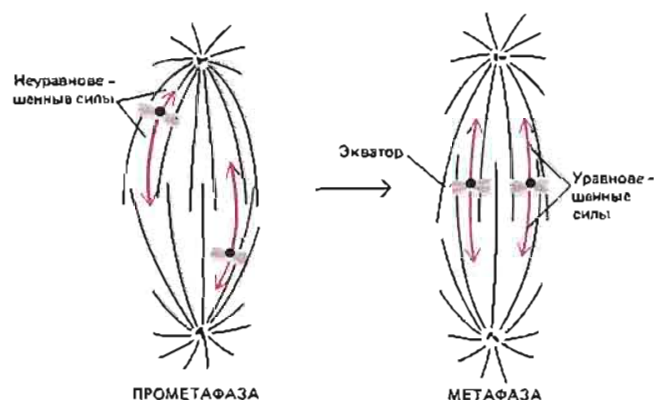


веретена. Если хромосома сохраняет такую аномальную связь, то вся она (как пара соединенных сестринских хроматид) движется в сторону соответствующего полюса. (Следует, однако, заметить, что такая связь нестабильна – кинетохорные нити склонны вновь ориентироваться так, что в конце концов две их группы связываются с противоположными полюсами.) Из этих опытов ясно, что к каждой кинетохорной нити, как только она вступает в связь с веретеном, прилагается постоянная тянущая сила, направленная к полюсу. Обычно у каждой хромосомы оказывается по одной кинетохорной нити, связанной с каждым из полюсов. В результате этого возникают две противоположно направленные силы, которые в конце концов и приводят хромосому в экваториальную плоскость (см. ниже). Таким образом, беспорядочные прометафазные движения хромосом и их случайная окончательная ориентация обеспечивают случайную сегрегацию хроматид между дочерними клетками, столь важную в мейозе (рис. 11-50).

11.5.7. Метафазные хромосомы удерживаются в обманчиво статичном состоянии сбалансированными полярными силами [34]

В метафазе веретено и хромосомы, выстроенные в метафазную пластинку, выглядят совершенно статично. Это видимое спокойствие обманчиво, так как любая цитоплазматическая частица, оказавшаяся в той или другой половине метафазного веретена, будет передвигаться к соответствующему полюсу. Такие частицы движутся с постоянной скоростью около 1 мкм в минуту, что примерно соответствует скорости перемещения хромосом в анафазе. Это говорит о том, что во время метафазы в веретене постоянно действуют силы, направленные к полюсам. Хромосомы, однако, остаются неподвижными, поскольку к ним приложены две равные силы, направленные в противополо-

Рис. 11-51. Хромосомы случайным образом попадают в веретено во время прометафазы, после чего выстраиваются в экваториальной плоскости веретена, так как сила, действующая на каждый кинетохор, тем меньше, чем он ближе к полюсу; хромосомы, оказавшиеся на экваторе, удерживаются там под действием уравновешенных сил притяжения к двум полюсам.



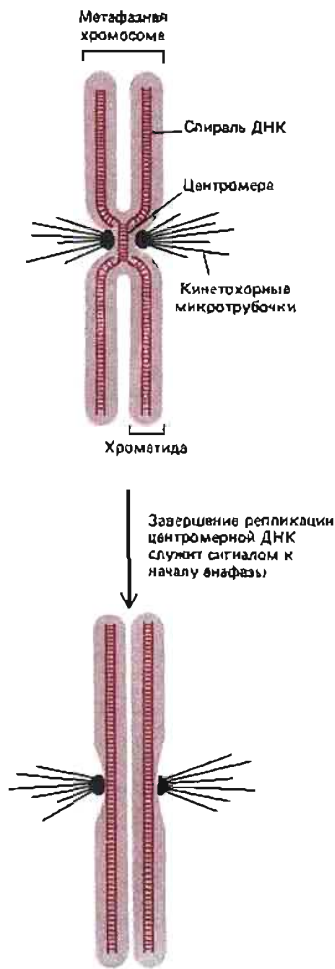


Рис. 11-52. Одна из многих возможных схем, объясняющих прочную связь сестринских хроматид в метафазе и их внезапное разделение в анафазе. Каков бы ни был истинный механизм этого явления, центромерная ДНК должна обладать двумя особыми свойствами: 1) быть способной организовать кинетохор и 2) оставаться спаренной со своим гомологом в сестринской хроматиде до начала анафазы. Недавно с помощью метода, использующего рекомбинантные ДНК, из различных центромер дрожжей были выделены молекулы ДНК. Оказалось, что свойства центромеры определяются последовательностью ДНК длиной менее 1000 пар оснований.

ложные стороны. Не удивительно поэтому, что как только в анафазе два кинетохора на каждой хромосоме разделяются, две хроматиды начинают двигаться к противоположным полюсам.

Почему все хромосомы выстраиваются в метафазной пластинке на одинаковом расстоянии от обоих полюсов веретена? Вероятно, такое расположение обусловлено просто способом создания тянущей силы в митотическом веретене: этот способ таков, что сила, действующая на кинетохорную нить, тем слабее, чем ближе к полюсу находится данный кинетохор (рис. 11-51).

11.5.8. В анафазе сестринские хроматиды внезапно расходятся

Анафаза начинается внезапным расщеплением каждой хромосомы, которое обусловлено разделением сестринских хроматид в точке их соединения в центромере. Это расщепление, разделяющее кинетохоры, не зависит от других событий митоза и происходит даже в хромосомах, не прикрепленных к митотическому веретену; оно позволяет полярным силам веретена, действующим на метафазную пластинку, начать медленное, неторопливое перемещение каждой хроматиды к тому или другому полюсу.

Что удерживает хроматиды вместе до начала анафазы? Это пока не известно, но есть предположение, что последовательность ДНК, определяющая центромеру, должна кодировать специальный сигнал, блокирующий ее собственную репликацию в фазе S. В таком случае нереплицированная ДНК центромеры не позволяла бы хроматидам расходиться, а запуск ее репликации приводил бы в конце концов к разделению хроматид в анафазе (рис. 11-52).

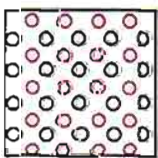
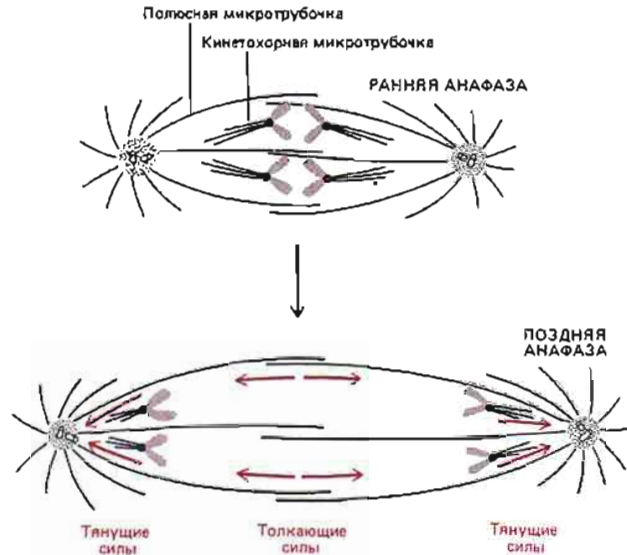
11.5.9. В анафазе хромосомы подтягиваются к двум полюсам, а полюсы расходятся в результате расталкивания [37]

Важнейший процесс — расхождение хроматид в анафазе — это результат двух независимых процессов, происходящих в веретене: 1) перемещения кинетохорных фибрилл, *тянущих* связанные с ними хроматиды к полюсам, и 2) происходящего чуть позже удлинения и скольжения полюсных фибрилл в каждом полуверетене, *расталкивающего* полюсы в противоположных направлениях (рис. 11-53). Эти два процесса различаются по чувствительности их к ряду веществ. Например, малые дозы хлоралгидрата предотвращают удлинение и движение полюсных ятей, но не влияют на кинетохорные нити и на движение хроматид к полюсам. Кроме того, у разных организмов относительная роль каждого из этих двух процессов в конечном разделении двух наборов хромосом может сильно различаться. В некоторых клетках расстояние между полюсами на протяжении всей анафазы остается почти неизменным, а в других веретено настолько удлиняется, что расстояние между полюсами увеличивается в 15 раз.

Путем кропотливой реконструкции трехмерной структуры веретена по электронным микрофотографиям сотен серийных ультратонких срезов было показано, что полюсные микротрубочки обоих полуверетен частично перекрываются в области экватора (рис. 11-54). В период анафазы эти две группы антипараллельных микротрубочек скользят в противоположные стороны в области перекрывания и, вероятно, удлиняются за счет присоединения новых субъединиц к их свободным концам (рис. 11-55 и 11-56). Полюсы, по-видимому, «расталкиваются» именно благодаря этим двум процессам — скольжению и росту микротрубочек.

В главе 10 мы уже объясняли, что микротрубочки обладают отчетливо выраженной полярностью и с одного конца (+) растут быстрее, чем с другого (—). Как и следовало ожидать, нити веретена, связанные с полюсом, обладают той же полярностью, что и микротрубочки, организуемые клеточным центром в интерфазе: все полюсные микротрубочки прикреплены своими минус-концами к полюсам, где они, по-видимому, закреплены и защищены от деполимеризации (разд. 10.3.6). Это означает, что свободные плюс-концы по-

Рис. 11-53. В анафазе для разделения сестринских хроматид используются как тянущие, так и толкающие силы. Удлинение и скольжение полюсных микротрубочек расталкивает два полюса, в то время как каждую хроматиду тянет к соответствующему полюсу сила, приложенная к кинетохорным нитям.



Микротрубочки, идущие от одного полюса [O], входят в промежутки между микротрубочками, идущими от другого полюса [o]

Рис. 11-54. Поперечный срез через веретено диатомовой водоросли *Melosira* в профазе, непосредственно перед распадом ядерной мембраны. Срез проходит через среднюю часть веретена, где перекрываются полюсные микротрубочки обоих полуверетен. Эта водоросль отличается необычайно правильной упаковкой микротрубочек, выходящих из противоположных полюсов. Взаимодействие микротрубочек в веретене высших эукариот бывает не таким регулярным, хотя подчиняется тем же общим принципам. (D. H. Tirri et al., *Cytobiologie*, 12, 52-73, 1975.)

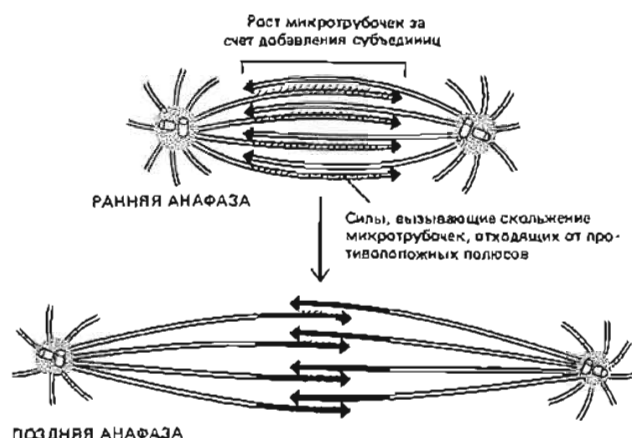
Полюсных микротрубочек находятся в области перекрывания у экватора веретена, и, как полагают, именно на этом быстро растущем конце происходит удлинение микротрубочек в анафазе путем присоединения молекул тубулина. Как было недавно показано, у кинетохорных микротрубочек плюс-концы присоединены к кинетохорам, а минус-концы находятся ближе к полюсам веретена. Таким образом, микротрубочки кинетохоров обладают такой же полярностью, что и полюсные микротрубочки соответствующего полуверетена. Возможно, что кинетохорные микротрубочки защищены от деполимеризации с *обоих* концов: это позволило бы объяснить гораздо большую стабильность их в различных экспериментальных условиях по сравнению с микротрубочками, связанными с полюсом.

Откуда берутся силы, подтягивающие кинетохорные фибриллы к полюсам и раздвигающие полюсные фибриллы двух полуверетен в зоне их перекрывания? Как мы видели ранее, для функционирования веретена существенны процессы сборки и разборки микротрубочек. Тем не менее вряд ли эти процессы, хотя они и могут быть источником силы, служат единственным «мотором», приводящим в движение хромосомы, поскольку веретено содержит и другие белки, способные генерировать силу.

11.5.10. По-видимому, сила, раздвигающая полюсы, генерируется динеиноподобной АТРАЗой, а хромосомы движутся к полюсу с помощью другого механизма [38]

Для того чтобы изучать молекулярные механизмы движения хромосом в анафазе, лучше всего было бы иметь высокоочищенный препарат митотических веретен, нормально функционирующих *in vitro*. Получить такой препарат пока не удалось, однако разработана другая модельная система, которая более доступна для исследования, чем нормальная живая клетка. Для создания такой системы митотическую клетку обрабатывают разбавленным раствором детергента, в результате чего ее плазматическая мембрана становится проницаемой для макромолекул. При использовании буферов, стабилизирующих микротрубочки, в таких клетках можно индуцировать и останавливать анафазные движения хромосом. Кроме того, поскольку в этих условиях к митотическому веретену имеют свободный доступ различные макромолекулы (в том числе специфические антитела), можно исследовать их влияние на движение веретена.

Рис. 11-55. Вероятные факторы, играющие роль в увеличении расстояния между полюсами веретена в митозе. Хромосомы и кинетохорные микротрубочки для простоты не показаны.



Именно таким образом было показано, что ингибиторы, присоединяющиеся к актину или миозину (например, антитела к миозину), подавляют цитокinesis, но не влияют на движение хромосом в анафазе. Это говорит о том, что система, генерирующая силы в митозе, в отличие от мышц вряд ли содержит актин и миозин. Другой возможный источник сил — это *динеин*, белок, связанный с микротрубочками ресничек и жгутиков и генерирующий силу за счет гидролиза АТФ (разд. 10.2.6). Существует ряд ингибиторов динейновой АТФазы, подавляющих биение ресничек и жгутиков. Эти же вещества блоки-

Рис. 11-56. Эти электронные микрофотографии показывают, как удлиняется веретено и уменьшается степень перекрывания полюсных микротрубочек при митозе у диатомовой водоросли. А. Метафаза. Б. Поздняя анафаза. (С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps.)

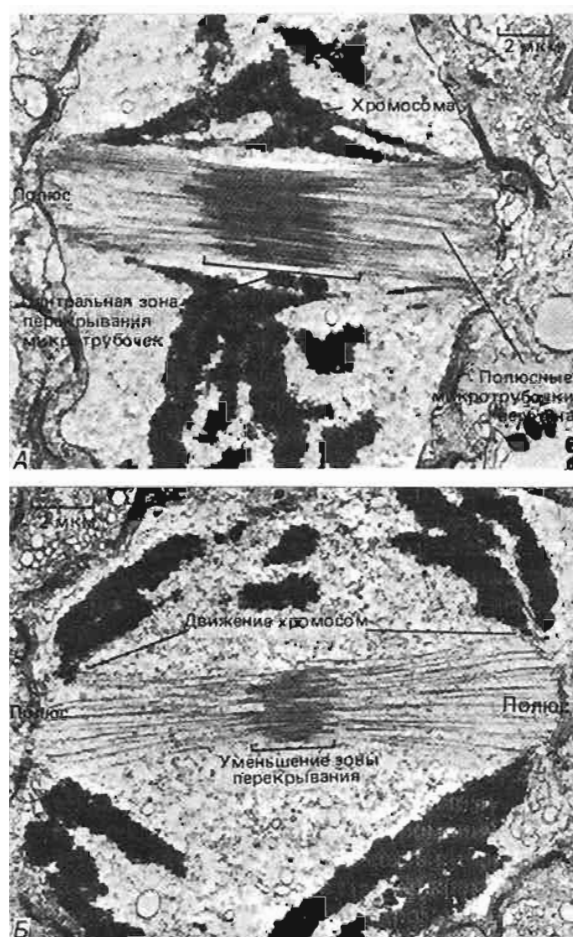
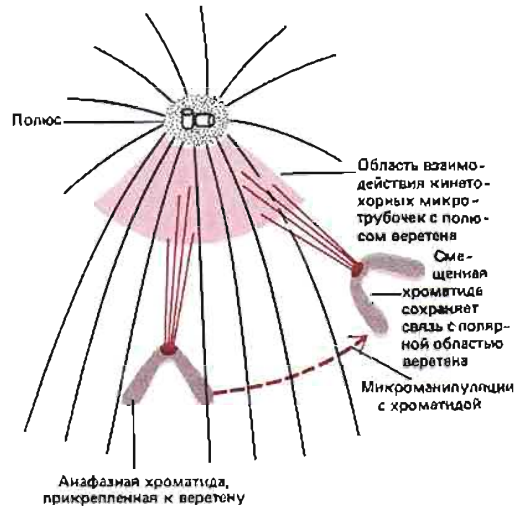


Рис. 11-57. Опыты с микроманипуляцией, показывающие, что хроматиды прикреплены к веретену главным образом в результате взаимодействия кинетохорных микротрубочек с веретеном вблизи полюсов. Показано полуверетено клетки в анафазе.



руют расхождение полюсов в анафазе в неочищенных препаратах митотического веретена. Кроме того, в некоторых веретенах обнаружены мостики между соседними микротрубочками, подобные динеиновым мостикам между микротрубочками периферийных дублетов в ресничках (см. рис. 10-32). Поэтому кажется вероятным, что какая-то молекула типа динеина, используя энергию гидролиза АТФ, вызывает скользящие движения полюсных микротрубочек, перекрывающихся в зоне веретена, и таким образом обеспечивает расхождение полюсов в анафазе.

Динеин веретена, по-видимому, отличается от того динеина, который вызывает движение ресничек. Во-первых, взаимодействующие микротрубочки в ресничках расположены параллельно друг другу и обладают одинаковой полярностью, тогда как микротрубочки, отходящие от разных полюсов веретена, обладают противоположной полярностью (рис. 11-55). Кроме того, антитела, связывающиеся с динеином ресничек, не окрашивают митотическое веретено.

Механизм, обеспечивающий движение хромосом к полюсам, пока не ясен. Опыты с микроманипуляцией показали, что каждая хроматида связана с веретеном при помощи кинетохорных нитей, которые особенно прочно присоединены к веретену вблизи полюсов (рис. 11-57). По мере приближения хромосом к полюсам кинетохорные нити становятся все короче и короче и, наконец, в телофазе исчезают. Значит, в то время как полюсные микротрубочки удливаются на свободных плюс-концах вблизи экватора, минус-концы кинетохорных микротрубочек деполимеризуются около полюсов веретена. По-видимому, эта деполимеризация играет существенную роль в движении хромосом к полюсам. Если заблокировать ее с помощью D_2O или таксола, прекратится и движение хромосом; и наоборот, их движение ускорится, если увеличить скорость деполимеризации микротрубочек очень малыми дозами колхицина. Если же к клеткам, обработанным детергентами, добавить ингибиторы динеина, перемещение хромосом к полюсам (в отличие от расхождения полюсов) существенно не замедлится. Таким образом, два разных вида анафазных движений обеспечиваются, видимо, двумя различными системами. Согласно одному из распространенных взглядов, «мотор», движущий хромосомы к полюсам, достаточно сложен, а скорость их движения лимитируется скоростью разборки кинетохорных микротрубочек после достижения ими полюсов.

Анализ механизмов анафазных движений, без сомнения, необычайно затрудняют очень малые величины действующих сил. Подсчитано, что если способ перемещения хромосом достаточно эффективен, то для передвигания одной хроматиды в анафазе требуется всего лишь 20 молекул АТФ.

11.5.11. В телофазе ядерная оболочка образуется сначала вокруг отдельных хромосом [39]

К концу анафазы хромосомы полностью разделяются на две идентичные группы, по одной у каждого полюса веретена. В последней стадии митоза – телофазе – вокруг каждой группы хромосом вновь образуется ядерная оболочка, так что получаются два дочерних интерфазных ядра. В связи с распадом и восстановлением ядерной оболочки нужно рассмотреть по меньшей мере три компонента:

1) наружную и внутреннюю ядерные мембраны, являющиеся продолжением мембран эндоплазматического ретикулума (разд. 8.3.1);

2) лежащую под ними ядерную ламину – слой, состоящий из трех главных белков, который взаимодействует с внутренней ядерной мембраной, хроматином и ядерными порами (разд. 8.3.2);

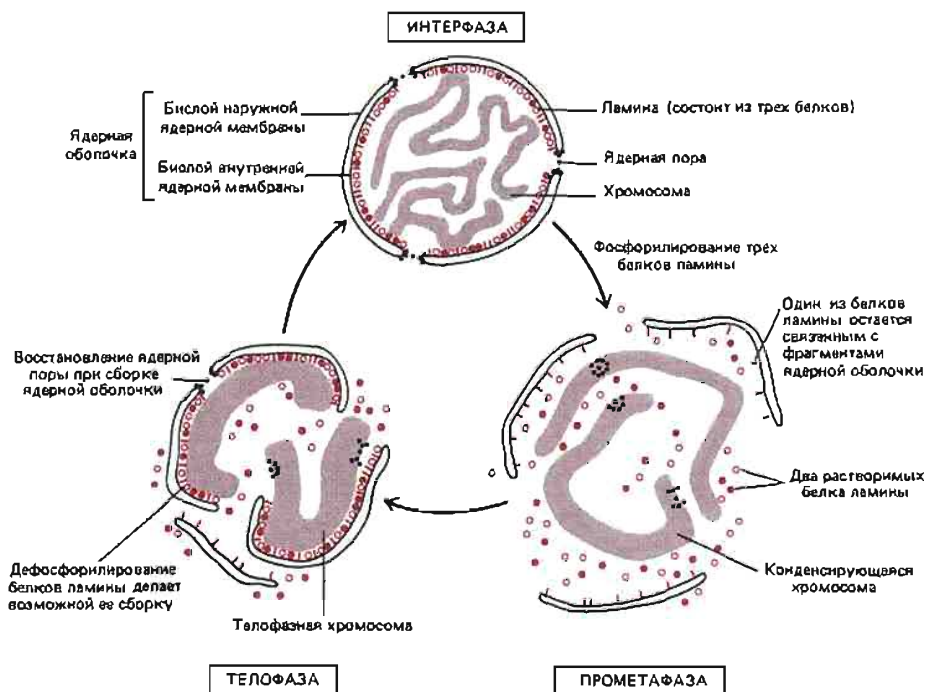
3) ядерные поры, образованные крупными комплексами из нескольких плохо охарактеризованных белков (разд. 8.3.3).

В профазе три белка ламины сильно фосфорилируются. Именно это, как полагают, приводит к распаду ядерной ламины. Видимо, в результате этого распадается и вся ядерная оболочка. Образующиеся из нее небольшие замкнутые пузырьки (морфологически неотличимые от элементов эндоплазматического ретикулума) видны во время митоза вокруг митотического аппарата. Высказано предположение, что часть комплексов ядерных пор во время митоза остается связанной с хромосомами, но это достоверно не установлено.

В телофазе фрагменты ядерной мембраны связываются с поверхностью отдельных хромосом, частично окружают каждую из них и только после этого сливаются, образуя полную ядерную оболочку (рис. 11-58); одновременно восстанавливаются и ядерные поры, а дефосфорилированные белки ламины вновь агрегируют с образованием интактной структуры. Возможно, что процесс восстановления ядерной оболочки регулируется реполимеризацией белков ламины, тем более что один из них после профазы остается связанным с фрагментами ядерной мембраны и может, таким образом, метить эти фрагменты для использования при построении дочерних ядер.

Лamina взаимодействует не только с внутренней ядерной мембраной, но

Рис. 11-58. Схема циклических изменений ядерной оболочки в связи с митозом – распад в прометафазе и сборка в телофазе. Между прометафазой и телофазой ядерная оболочка разрушена, и в это время совершаются все перемещения, в результате которых два набора хромосом расходятся к противоположным полюсам. Поскольку, как показано на рисунке, новая ядерная оболочка образуется из мембранных фрагментов непосредственно вокруг группирующихся индивидуальных хромосом, большая часть цитоплазматических компонентов не попадает в ядро.



также с хроматином и с ядерными порами; поэтому цикл фосфорилирования и дефосфорилирования белков ламинны во время митоза вполне мог бы инициировать соответственно распад старой и образование новой ядерной оболочки.

После восстановления ядерной оболочки возобновляется синтез РНК, что ведет к появлению ядрышка, а хроматин деконденсируется и переходит в дисперсное состояние, характерное для интерфазы.

Интересно, что у некоторых более примитивных эукариот ядерная оболочка во время митоза не распадается; принято говорить, что эти организмы обладают не «открытым», а «закрытым» веретеном. Таким образом, распад ядерной оболочки не является абсолютно необходимым для успешного протекания фазы М.

11.5.12. Митотическое веретено определяет место, где происходит разделение цитоплазмы при цитокинезе [40]

Хотя митоз и цитокинез, как правило, взаимосвязаны, это все же отдельные события. Действительно, за делением ядра не всегда следует цитокинез. Например, у некоторых грибов и водорослей может происходить много циклов

Рис. 11-59. Начало дробления яйца лягушки. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Образование борозды объясняется активностью сократимого кольца, находящегося под клеточной мембраной. А. Вид клеточной поверхности при малом увеличении. Б. Поверхность борозды при большом увеличении. (Н. W. Beams, R. G. Kessel, *Am. Sci.*, 64, 279–290, 1976.)

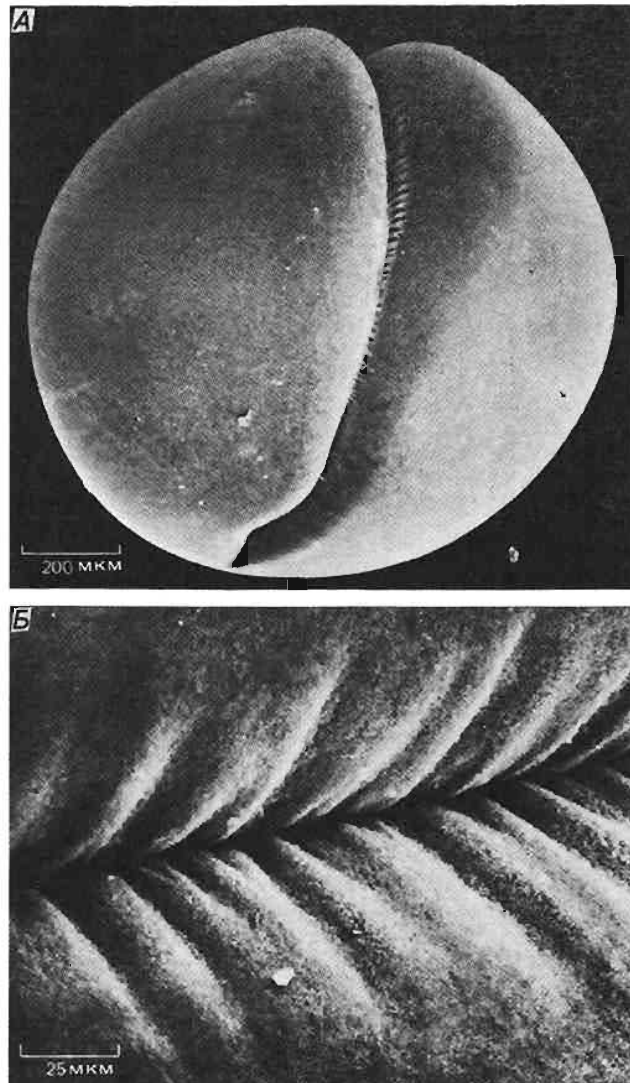
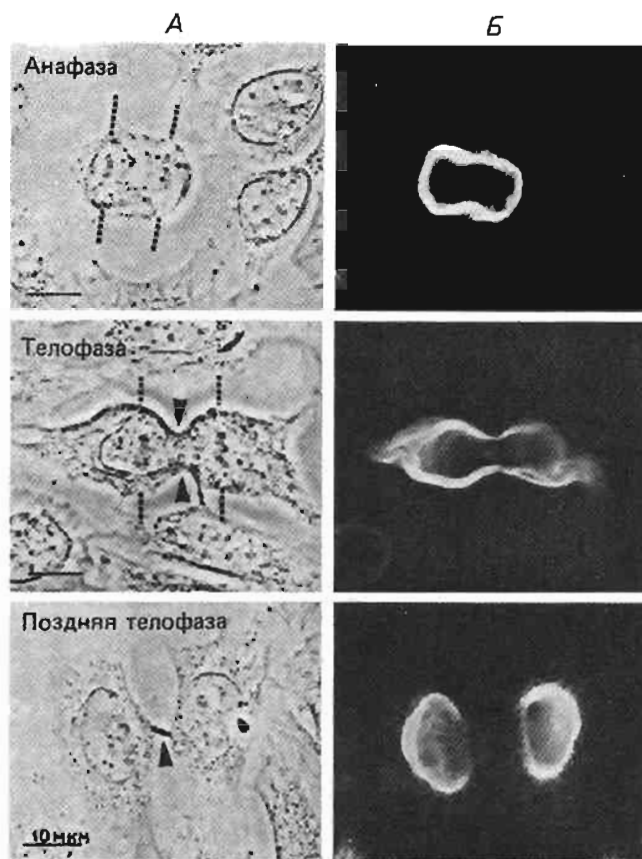


Рис. 11-60. Зону ядра во время митоза окружает пучок промежуточных филаментов, возможно, помогающий организовать митотический процесс в клетке. Приведенные микрофотографии получены после окрашивания пермеабелизованных клеток флуоресцентными антителами, которые связываются с промежуточными филаментами. **А.** Фазовый контраст. Пунктирными линиями указано положение хромосом, а стрелками — положение сократимого кольца (в телофазе) и остаточного тельца (в поздней телофазе). **Б.** Флуоресцентная микроскопия. (S. H. Blose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3372–3376, 1979.)



деления ядер, не сопровождающихся делением цитоплазмы, так что получаются гигантские многоядерные клетки длиной иногда до метра! Позднее в результате деления цитоплазмы вокруг ядер образуются одноядерные клетки.

Хотя за митозом не всегда следует цитокинез, митотическое веретено играет важную роль в определении времени и пространственной ориентации последнего процесса. Цитокинез обычно начинается в анафазе, а продолжается во время телофазы и в начале следующей интерфазы. Его первым видимым признаком в животных клетках бывает образование небольшой складки плазматической мембраны, появляющейся в анафазе и называемой *бороздой деления* (рис. 11-59). Эта борозда всегда образуется в плоскости метафазной пластинки под прямым углом к длинной оси митотического веретена. Если с помощью микроманипулятора веретено достаточно быстро после его образования передвинуть, то наметившаяся борозда исчезает, а появляется новая в соответствии с новым положением веретена. Позднее, когда процесс зашел уже достаточно далеко, цитокинез будет продолжаться, даже если веретено удалить из клетки микропипеткой или разрушить колхицином.

Во время митоза микротрубочки и пучки актиновых микрофиламентов, составляющие цитоскелет, распадаются на субъединицы, которые, вероятно, используются для построения «машин» митоза и цитокинеза соответственно. Остающиеся в клетках *промежуточные филаменты* не используются для клеточного деления и не распадаются. Вместо этого в большинстве клеток сеть промежуточных филаментов, окружающих интерфазное ядро, в митозе удлиняется, чтобы охватить оба дочерних ядра, после чего перетяжка делит ее на две части (рис. 11-60).

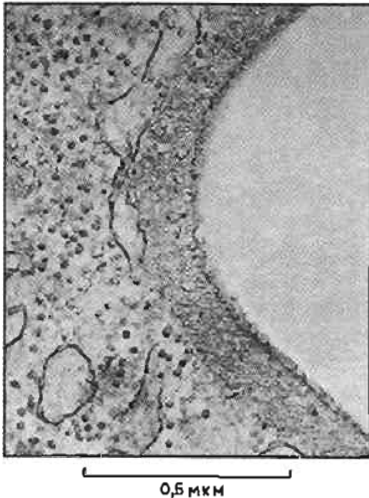


Рис. 11-61. Электронная микрофотография дна борозды, образующейся при делении животной клетки. (H. W. Beams, R. G. Kessel, *Am. Sci.*, 64, 279–290, 1976.)

11.5.13. Актин и миозин создают силу, необходимую для цитокинеза [41]

Разделение цитоплазмы происходит под действием кольца, состоящего главным образом из актиновых филаментов и затягивающегося, подобно петле, вокруг средней части клетки. Этот пучок филаментов, называемый **сократимым кольцом**, должен быть как-то прикреплен к внутренней стороне плазматической мембраны (рис. 11-61). Сократимое кольцо спонтанно образуется неизвестным способом в начале анафазы; сформировавшееся кольцо можно преждевременно активировать путем электростимуляции; значит, оно готово к действию раньше, чем будет действительно использовано.

Сила, создаваемая сократимым кольцом при цитокинезе, достаточна для того, чтобы согнуть тонкую стеклянную иглу, введенную в клетку. Таким способом можно измерить величину этой силы. Нет сомнения в том, что источником силы сокращения здесь, так же как и в мышцах, служит взаимное скольжение актиновых и миозиновых филаментов. Если, например, к митотическим клеткам, обработанным детергентами, добавить инактивированные субфрагменты миозина, блокирующие миозин-связывающие участки актина, то разделение цитоплазмы прекратится. Точно так же введение антител к миозину в яйца морского ежа вызывает сглаживание борозды дробления, но на деление ядра не влияет.

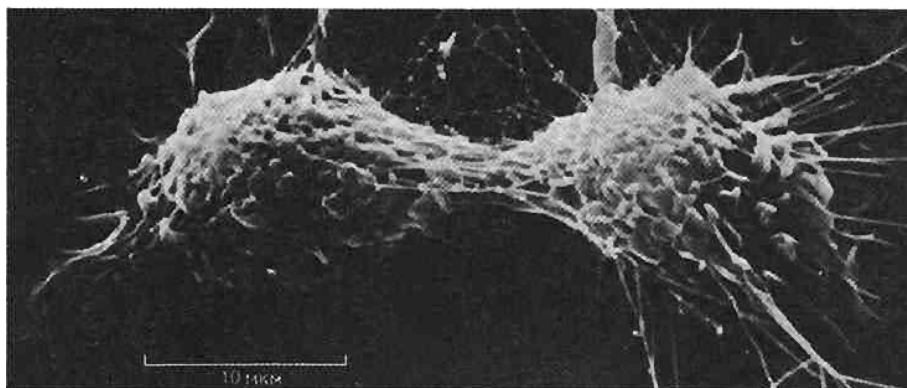
Сократимое кольцо во время сокращения сохраняет постоянную толщину. Это позволяет предполагать, что оно постепенно уменьшается в объеме за счет потери части филаментов. После завершения цитокинеза сократимое кольцо полностью распадается, а плазматическая мембрана в области борозды стягивается, окружая так называемое **остаточное тельце**, которое как бы связывает две дочерние клетки. Остаточное тельце состоит из фрагментов двух групп полюсных микротрубочек, тесно упакованных вместе с плотным матриксом (рис. 11-62). Поскольку оно сохраняется после митоза в течение нескольких часов, возможно, что оно предназначено для того, чтобы между дочерними клетками перед их окончательным разделением оставалась некоторая связь; быть может, оно играет также активную роль в самом завершении этого процесса разделения (рис. 11-63).

В большинстве делящихся клеток борозда деления проходит более или менее симметрично, так что дочерние клетки получаются одинаковыми по размеру. Правда, в некоторых особых случаях сократимое кольцо образуется в таком месте, что получаются дочерние клетки разной величины. Такое асимметричное деление играет очень важную роль в оогенезе (гл. 14) и часто наблюдается на ранних этапах развития некоторых эмбрионов, когда неоднородная цитоплазма яйца должна быть точно распределена между разными

Рис. 11-62. Электронная микрофотография остаточного тельца делящейся животной клетки. Деление практически полностью завершено, во клетки остались связанными тонким цитоплазматическим мостиком (см. также рис. 11-40). (С любезного разрешения J. M. Mullins.)



Рис. 11-63. Животная клетка в культуре непосредственно после деления. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения Guenter Albrecht-Buehler.)



группами клеток, из которых впоследствии образуются различные части эмбриона. Механизмы, контролирующие в таких случаях ориентацию и расположение сократимого кольца, остаются неизвестными.

Цитокинез, при котором из одной клетки образуются две, сильно увеличивает общую поверхность клеток. Поэтому двум дочерним клеткам требуется больше материала плазматической мембраны, чем одной исходной. В животных клетках биосинтез вещества мембран непосредственно перед делением увеличивается. Новая мембрана, по-видимому, хранится на поверхности делящихся клеток в виде пузырей.

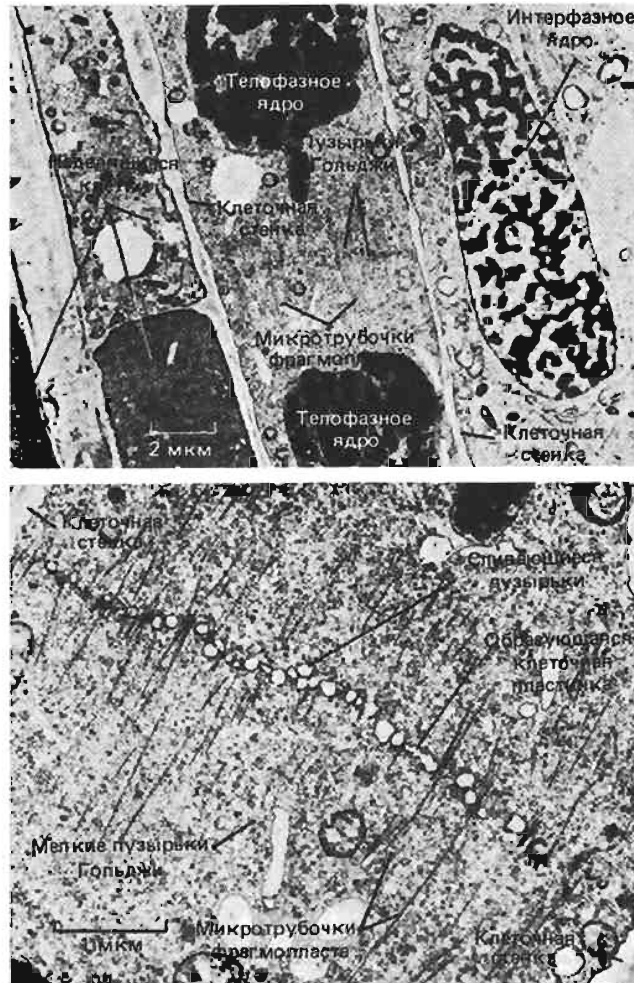
11.5.14. В растительных клетках, имеющих клеточные стенки, цитоплазма делится совершенно иным способом [42]

Большинство клеток высших растений окружено жесткой *клеточной стенкой* и потому неподвижно. Процесс цитокинеза у них существенно отличается от описанного у животных. По окончании митоза цитоплазма разделяется благодаря образованию новой клеточной стенки между двумя дочерними клетками, а не в результате перетягивания исходной клетки сократимым кольцом. Образующаяся перегородка точно определяет места, которые будут занимать обе дочерние клетки в растении. Очевидное следствие этого — то, что именно плоскости деления клеток (вместе с увеличением их размеров) определяют форму растения (см. гл. 19).

Так же как и у животных, цитокинез у растений происходит отдельно от событий митоза. Так, например, в эндосперме семян митозы следуют один за другим без деления цитоплазмы, и в результате получаются гигантские многоядерные клетки. Много позднее между отдельными ядрами строятся новые клеточные стенки, так что образуются новые клетки. В этом процессе не участвуют давно распавшиеся остатки митотических веретен. Факторы, определяющие точность построения клеточных стенок, неизвестны, но ход событий подробно описан.

Новая поперечная стенка, или *клеточная пластинка*, обычно строится в ассоциации с остаточными полюсными микротрубочками веретена, параллельные ряды которых образуют открытую полую цилиндрическую структуру — так называемый *фрагмопласт* (рис. 11-64). Как показано на рис. 11-65, мелкие ограниченные мембраной пузырьки, происходящие в основном из аппарата Гольджи и наполненные предшественниками клеточной стенки, приходят в соприкосновение с микротрубочками фрагмопласта и транспортируются вдоль них к экваториальной области клетки. Здесь они сливаются, образуя дисковидную окруженную мембраной структуру — *раннюю клеточную пластинку*. Предшественники полисахаридов, высвобождаемые пузырьками, связываются между собой в ранней клеточной пластинке, образуя пектин, гемицеллюлозу и другие компоненты первичной клеточной стенки. Теперь этот

Рис. 11-64. Электронные микрофотографии срезов растительных клеток; видны фрагмопласт и ассоциированные с ним пузырьки. Эти пузырьки, сливаясь, образуют новую клеточную пластинку. (J.D. Pickett-Heaps, Dev. Biol., 15, 206-236, 1967.)

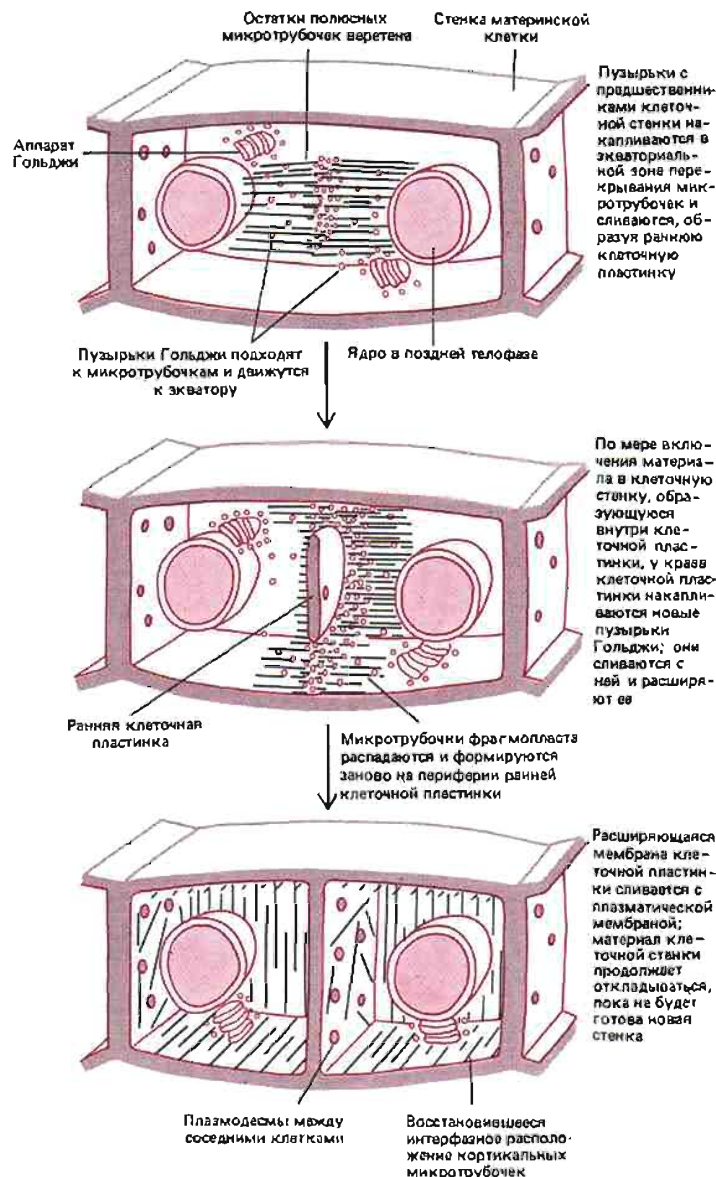


диск должен расширяться, пока его края не дойдут до исходной клеточной стенки. Для этого микротрубочки раннего фрагмопласта распадаются и вновь собираются на периферии ранней клеточной пластинки; здесь они транспортируют вторую порцию пузырьков к экватору. Пузырьки вновь сливаются, расширяя пластинку. Этот процесс повторяется до тех пор, пока клеточная пластинка не достигнет своим краем плазматической мембраны и не отделит друг от друга полностью две новые клетки. После этого в клеточной пластинке откладываются микрофибриллы целлюлозы, завершая построение новой клеточной стенки (рис. 11-65 и 11-66).

По-видимому, сборка микротрубочек фрагмопласта инициируется электроплотным материалом в области экватора. Именно этот плотный материал — предполагаемый центр организации микротрубочек — вероятно, ответствен за удивительную перестройку фрагмопласта при формировании клеточной пластинки.

С пузырьками образующейся клеточной пластинки связаны элементы эндоплазматического ретикулума, которые часто оказываются включенными в эту пластинку. Впоследствии они превращаются в плазмодесмы — сложно устроенные поры, пронизывающие зрелую клеточную стенку и соединяющие цитоплазму всех клеток растения (разд. 19.2.1).

Рис. 11-65. Здесь схематически представлен ход цитокинеза в клетках высших растений, имеющих жесткую клеточную стенку.



11.5.15. Цитокинез должен обеспечить передачу цитоплазматических органелл обеим дочерним клеткам

Ядро — это только одна из многих клеточных органелл, для образования которых необходимы предсуществующие копии. Например, очевидно, что для построения рибосом нужны другие рибосомы, так как для этого процесса требуется синтез белка. Точно так же новые хлоропласты и митохондрии возникают лишь в результате роста и деления таких же предсуществующих органелл (разд. 9.5.2). В других случаях это менее очевидно, но все же механизм роста ряда других органелл позволяет думать, что образование *de novo* аппарата Гольджи, плазматической мембраны или лизосом невозможно без наличия хотя бы фрагментов этих структур (см. гл. 7). Обычно все эти органеллы (за исключением ядра) достаточно многочисленны или имеют большую величину, поэтому маловероятно, чтобы при цитокинезе какая-то их часть не до-



Рис. 11-66. Цитокинез в растительной клетке. Микрофотографии, сделанные с помощью светового микроскопа. А, Б и В – последовательные стадии образования клеточной пластинки (ее края указаны стрелками). (С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps.)

сталась обоим дочерним клеткам. Хотя клетка вряд ли выживет, не получив в наследство, например, элементов аппарата Гольджи, тем не менее вполне возможно, что для надежной передачи их обоим клеткам-потомкам не требуется никакого специального механизма. Конечно, такие органеллы, как рибосомы, присутствующие в клетках в очень большом количестве, будут всегда успешно наследоваться, если в среднем их число будет удваиваться на протяжении каждой генерации.

Косвенным свидетельством того, что органеллы не могут образовываться без предсуществующих копий, служат особенности клеточного деления у некоторых водорослей, имеющих только один хлоропласт или только один аппарат Гольджи. Органелла, присутствующая в единственном экземпляре, перед цитокинезом расщепляется у них пополам, и по одной половинке старой органеллы попадает затем в каждую дочернюю клетку (см. рис. 9-63). Сходный механизм действует при дупликации и сегрегации центриолей в животных клетках (см. рис. 11-19). По-видимому, при надобности может найтись способ упорядоченного наследования любого клеточного компонента.

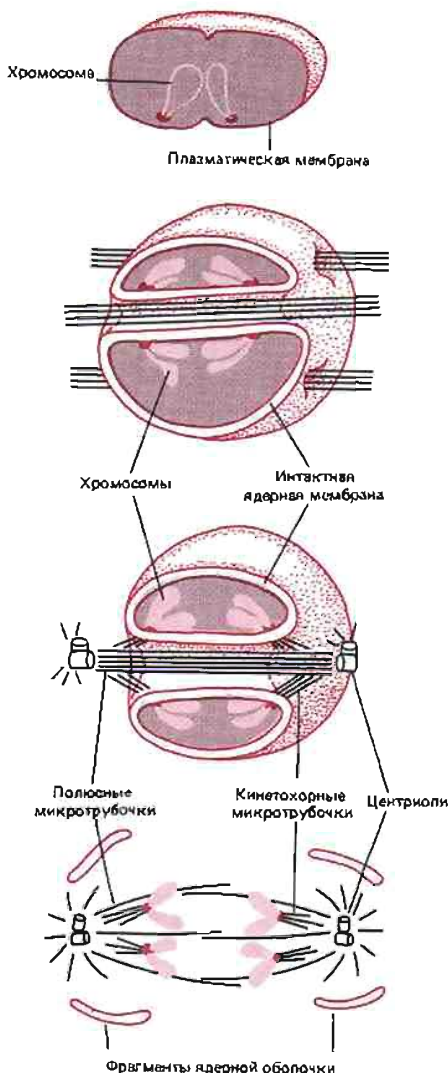
11.5.16. Сложный митотический процесс высших организмов – это результат постепенного совершенствования механизма деления прокариот [43]

В прокариотических клетках разделение ДНК и цитоплазмы между двумя дочерними клетками представляет собой единый процесс. Во время репликации ДНК две копии хромосомы прикреплены к особым участкам клеточной мембраны, которые постепенно раздвигаются в результате роста мембраны между ними. Деление происходит между двумя точками прикрепления ДНК таким образом, что каждая дочерняя клетка получает по одной хромосоме (рис. 11-67). С появлением эукариот генетический аппарат стал более сложным, число и размеры хромосом возросли. Возникла необходимость в создании более сложного механизма распределения хромосом между дочерними клетками. Ясно, что митотический аппарат эволюционировал постепенно. У многих примитивных эукариот митоз остался процессом, ассоциированным с мембраной, и ядерная мембрана в этом случае взяла на себя роль плазматической мембраны прокариот. Один из самых ясных примеров такого механизма промежуточного типа мы находим у дивофлагелляты *Cryptothecodinium cohnii* – крупного одноклеточного организма. Промежуточное положение этого организма проявляется также в биохимии его хромосом, содержащих, подобно прокариотическим хромосомам, сравнительно мало ассоциированных белков.

Ядерная мембрана у *C. cohnii* сохраняется на протяжении всего митоза, а микротрубочки веретена лежат вне ядра. Там, где микротрубочки надавливают на ядерную оболочку, она впячивается внутрь и образует ряд параллельных каналов (рис. 11-67). Хромосомы прикрепляются к внутренней мембране ядерной оболочки в области этих каналов, и разделение хромосом от начала до конца происходит на внутренней поверхности мембраны. Таким образом, внеядерное «веретено» (представляющее собой жесткий стержень без каких-либо динамических свойств) используется просто для реорганизации ядерной мембраны и определения плоскости деления.

Несколько более развитое, но все еще внеядерное веретено свойственно гипермастиготам. Эти крупные простейшие из кишечника насекомых особенно ясно иллюстрируют независимость удлинения веретена и движения хромосом, приводящего к разделению хроматид, поскольку сестринские кинетохоры перед прикреплением к веретену сначала расходятся в стороны в результате роста ядерной мембраны, к которой они прикреплены. Только тогда, когда кинетохоры оказываются вблизи полюсов веретена, у них появляется возможность с помощью кинетохорных нитей прикрепиться к полюсным витам веретена. Поскольку нити веретена остаются отделенными от хромосом ядерной оболочкой, кинетохорные нити, образующиеся вне ядра,

Рис. 11-67. Схема, иллюстрирующая некоторые стадии эволюции митотического веретена. Эти стадии были выявлены при исследовании механизма расхождения хромосом у ряда примитивных организмов.



БАКТЕРИИ

Дочерние хромосомы, прикрепленные к плазматической мембране, разделяются в результате роста мембраны между ними

ПРИМИТИВНЫЕ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТЫ

Несколько пучков микротрубочек проходят через каналы в интактной ядерной оболочке и устанавливают полярность деления; хромосомы расходятся, сохраняя связь с внутренней ядерной мембраной, но не прикрепляясь к пучкам микротрубочек

ЭВОЛЮЦИОННО БОЛЕЕ ПРОДВИНУТЫЕ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТЫ И НЕКОТОРЫЕ ДРУГИЕ ПРОСТЕЙШИЕ

Единое центральное веретено образуется между центриоплями и проходит через канал в интактной ядерной оболочке; хромосомы прикреплены своими кинетохорами к внутренней ядерной мембране и непрямым образом взаимодействуют с веретеном через кинетохорные микротрубочки, которые оканчиваются на наружной ядерной мембране

ВЫСШИЕ ОРГАНИЗМЫ

Ядерная оболочка разрушается, и хромосомы прикрепляются прямо к кинетохорным микротрубочкам, которые в свою очередь взаимодействуют с полюсными микротрубочками веретена

должны каким-то образом прикрепиться к хромосомам через ядерную мембрану. После этого кинетохоры движутся к полюсам обычным способом (рис. 11-67).

Возможно, что современная функция кинетохорных нитей складывалась одновременно с переходом к растворению ядерной мембраны при митозе; на этой стадии эволюции последние остатки прокариотического механизма исчезают и становится возможным более тесное взаимодействие между митотическим веретеном и хромосомами.

Заклучение

Процесс клеточного деления состоит из деления ядра (митоз) и следующего за ним деления цитоплазмы (цитокинез). Митоз характеризуется образованием высокоупорядоченного биполярного веретена, состоящего из микротрубочек и связанных с ними белков; микротрубочки организуются двумя митотическими центрами на противоположных полюсах веретена. Хромосомы конденсируются во время профазы. Затем появляются кинетохорные нити; они начинают взаимодействовать с полюсными нитями веретена, после того как ядерная оболочка растворяется в прометафазе. В метафазе в результате действия сил, тянущих кинетохорные нити к полюсам, хромосомы выстраи-

ваются на экваторе клетки. В анафазе натяжение внезапно ослабевает, так как сестринские хроматиды отделяются друг от друга и расходятся к противоположным полюсам. Во время телофазы—последней фазы митоза—вокруг каждой из двух групп хромосом вновь формируется ядерная оболочка. Клеточное деление заканчивается делением цитоплазмы, т. е. цитокинезом; затем хромосомы деконденсируются и возобновляется синтез РНК.

Литература

Общая

- Inoue S. Cell division and the mitotic spindle, *J. Cell Biol.*, **91**, 132s–147s, 1981. (A review).
 John P. C. L., ed. *The Cell Cycle*. Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1981.
 Lewin B. *Gene Expression*, Vol. 2, *Eucaryotic Chromosomes*, 2nd ed. New York, Wiley, 1980. (Chapters 4, 7, and 20 on mitosis, the cell division cycle, and DNA replication, respectively.)
 Mitchison J. M. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1971.
 Prescott D. M. *Reproduction of Eucaryotic Cells*, New York, Academic Press, 1976.
 Zimmerman A. M., Forer A., eds. *Mitosis/Cytokinesis*. New York, Academic Press, 1981. (A collection of reviews.)

Цитированная

1. Pardee A. B., Dubrow R., Hamlin J. L., Kleizen R. F. Animal cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 715–750, 1978.
2. Yanishevsky R. M., Stein G. H. Regulation of the cell cycle in eukaryotic cells. *Int. Rev. Cytol.*, **69**, 223–259, 1981.
 Lloyd D., Poole P. K., Edwards S. W. *The Cell Division Cycle*. New York, Academic Press, 1982.
3. Cheng H., LeBlond C. P. Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine, *Am. J. Anat.*, **141**, 461–480, 1974.
 Potten C. S., Schofield R., Lajtha L. G. A comparison of cell replacement in bone marrow, testis, and three regions of surface epithelium, *Biochim. Biophys. Acta*, **560**, 281–299, 1979.
4. Pardee A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 1286–1290, 1974.
 Smith J. A., Martin L. Do cells cycle? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 1263–1267, 1973.
5. Mitchison J. M. *The Biology of the Cell Cycle*. Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1971.
6. Van Dilla M. A., Trujillo T. T., Mullaney P. F., Coulter J. R. Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. *Science*, **163**, 1213–1214, 1969.
7. Rossow P. W., Riddle V. G. H., Pardee A. B. Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G₁ controls animal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4446–4450, 1979.
 Tyson J., Garcia-Herdugo G., Sachsenmaier W. Control of nuclear division in *Physarum polycephalum*: comparison of cycloheximide pulse treatment, UV irradiation and heat shock, *Exp. Cell Res.*, **119**, 87–98, 1979.
8. Folkman J., Moscona A. Role of cell shape in growth control. *Nature*, **273**, 345–349, 1978.
9. Rutter W. J., Pictet R. L., Morris P. W. Toward molecular mechanisms of developmental processes, *Annu. Rev. Biochem.*, **42**, 601–646, 1973.
 French V., Bryant P. J., Bryant S. V. Pattern regulation in epimorphic fields, *Science*, **193**, 969–982, 1976.
 Bryant P. J., Bryant S. V., French V. Biological regeneration and pattern formation, *Sci. Am.*, **237**(1), 67–81, 1977.
 Sato G., ed. *Hormones and Cell Culture*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.
10. Pierce G. B., Shikes R., Fink L. M. *Cancer: A Problem of Developmental Biology*. Englewood Cliffs, N. J., Prentice-Hall, 1978.
 Cairns J. *Cancer: Science and Society*. San Francisco, Freeman, 1978.
 Medrano E. E., Pardee A. B. Prevalent deficiency in tumor cells of cycloheximide-induced cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4123–4126, 1980.
11. Tooze J., ed. *DNA Tumor Viruses*, 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1980.
 Weiss R., Teich N., Varmus H., Coffin J., eds. *RNA Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

12. Eckhardt W. Properties of temperature-sensitive mutants of polyoma virus. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **39**, 37–40, 1975.
Hassell J. A., Topp W. C., Rifkin D. B., Moreau P. E. Transformation of rat embryo fibroblasts by cloned polyoma virus DNA fragments containing only part of the early region, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 3978–3982, 1980.
Houweling A., Van Den Elsen P. J., Van Der Eb A. J. Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus 5 DNA, Virology, **105**, 537–550, 1980.
13. Smith A. E., Smith R., Paucha E. Characterization of different tumor antigens present in cells transformed by simian virus 40, Cell, **18**, 335–346, 1979.
Duesberg P. H., Vogt P. K. Differences between the ribonucleic acids of transforming and nontransforming avian tumor viruses, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **67**, 1673–1680, 1970.
Purchio A. F., Erikson E., Brugge J. S., Erikson R. L. Identification of a polypeptide encoded by the avian sarcoma virus *src* gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 1567–1571, 1978.
14. Collett M. S., Erikson R. L. Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus *src* gene product. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **75**, 2021–2024, 1978.
Levinson A. D., Oppermann H., Levintow L., Varmus H. E., Bishop M. J. Evidence that the transforming gene of avian sarcoma virus encodes a protein kinase associated with a phosphoprotein. Cell, **15**, 561–572, 1978.
Hunter T., Safton B. M. Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 1311–1315, 1980.
Ushiro H., Cohen S. Identification of phosphotyrosine as a product of epidermal growth factor-activated protein kinase in A-431 cell membranes, J. Biol. Chem., **255**, 8363–8365, 1980.
15. Bishop J. M. Enemies within: the genesis of retrovirus oncogenes, Cell, **23**, 5–6, 1981.
Oskarsson M., McClements W. L., Blair D. G., Malzel J. V., Vande Woude G. F. Properties of a normal mouse cell DNA sequence (*sar*) homologues to the *src* sequence of Moloney sarcoma virus, Science, **207**, 1222–1224, 1980.
16. Shih C., Padhy L. C., Murray M., Weinberg R. A. Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts, Nature, **290**, 261–264, 1981.
Krontiris T. C., Cooper G. M. Transforming activity of human tumor DNAs, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 1181–1184, 1981.
Perucho M., et al. Human-tumor-derived cell lines contain common and different transforming genes, Cell, **27**, 467–476, 1981.
Cooper G. M. Cellular transforming genes, Science, **217**, 801–806, 1982.
Parada L. F., Tabin C. J., Shih C., Weinberg R. A. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus *ras* gene, Nature, **297**, 474–478, 1982.
Chang E. H., Furth M. E., Scolnick E. M., Lowy D. R. Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologues to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus, Nature, **297**, 479–483, 1982.
17. Robbins E., Jentzsch G., Micali A. The centriole cycle in synchronized HeLa cells, J. Cell Biol., **36**, 329–339, 1968.
Vorobjev I. A., Chentsov Y. S. Centrioles in the cell cycle: epithelial cells. J. Cell Biol., **98**, 938–949, 1982.
18. Hartwell L. Cell division from a genetic perspective. J. Cell Biol., **77**, 627–637, 1978.
Byers B. Cytology of the yeast life cycle. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Broach, eds.), pp. 59–96. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.
19. Huberman J. A., Riggs A. D. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes, J. Mol. Biol., **32**, 327–341, 1968.
Hand R. Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication, Cell, **15**, 317–325, 1978.
20. Riley D., Weintraub H. Conservative segregation of parental histones during replication in the presence of cycloheximide, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 328–332, 1979.
Hereford L. M., Osley M. A., Ludwig J. R., McLaughlin C. S. Cell-cycle regulation of yeast histone mRNA, Cell, **24**, 367–376, 1981.
Gallwitz D. Kinetics of inactivation of histone mRNA in the cytoplasm after inhibition of DNA replication in synchronised HeLa cells, Nature, **257**, 247–248, 1975.
21. Russev G., Hancock R. Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 3143–3147, 1982.
22. Stubblefield E. Analysis of the replication pattern of Chinese hamster chromosomes using

- 5-bromodeoxyuridine suppression of 33258 Hoechst fluorescence. *Chromosoma*, **53**, 209–221, 1975.
23. *Lewin B.* Gene Expression, Vol. 2, Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 428–447. New York, Wiley, 1980.
 - Brown S. W.* Heterochromatin, *Science*, **151**, 417–425, 1966.
 24. *Harland R.* Initiation of DNA replication in eukaryotic chromosomes, *Trends Biochem. Sci.*, **6**, 71–74, 1981.
 - Rao P. N., Johnson R. T.* Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis, *Nature*, **225**, 159–164, 1970.
 25. *Pringle J. R., Hartwell L. H.* The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (J. N. Strathern, E. N. Jones, J. R. Broach, eds.), pp. 97–142. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.
 - Simchen G.* Cell cycle mutants. *Annu. Rev. Genet.*, **12**, 161–191, 1978.
 26. *Prescott D. M.* Reproduction of Eucaryotic Cells. New York, Academic Press, 1976.
 - Mitchison J. M.* The Biology of the Cell Cycle. Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1971.
 27. *Johnson R. T., Rao P. N.* Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei, *Nature*, **226**, 717–722, 1970.
 - Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R.* Control of cell division by very lysine rich histone (F1) phosphorylation, *Nature*, **247**, 257–261, 1974.
 - Isenberg I.* Histones. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 159–191, 1979.
 28. *Kreigstein H. J., Hogness D. S.* Mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 135–139, 1974.
 - Callan H. G.* DNA replication in the chromosomes of eukaryotes, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **38**, 195–203, 1974.
 29. *Wolfe S. L.* Biology of the Cell, 2nd ed., pp. 398–431. Belmont, Ca., Wadsworth, 1981.
 - Mazia D.* Mitosis and the physiology of cell division. In: *The Cell*, Vol. 3 (J. Brachet, A. E. Mirsky, eds.), pp. 77–412. London, Academic Press, 1961.
 - Inoué S.* Cell division and the mitotic spindle, *J. Cell Biol.*, **91**, 131s–147s, 1981.
 - Dustin P.* Microtubules, pp. 340–397. New York, Springer-Verlag, 1978.
 30. *Nicklas R. B.* Mitosis. In: *Advances in Cell Biology*, Vol. 2 (D. M. Prescott, L. Goldstein, E. H. McConkey, eds.), pp. 225–298. New York, Appleton-Century-Crofts, 1971.
 31. *Matsui S. I., Yoshida H., Weinfeld H., Sandberg A. A.* Induction of prophase in interphase nuclei by fusion with metaphase cells, *J. Cell Biol.*, **54**, 120–132, 1972.
 32. *Inoué S., Sato H.* Cell motility by labile association of molecules: the nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement, *J. Gen. Physiol.*, **50**, 259–292, 1967.
 - Bajer A. S., Molé-Bajer J.* Spindle dynamics and chromosome movements, *Int. Rev. Cytol. (Suppl.)*, **3**, 1–271, 1972.
 - Salmon E. D.* Pressure-induced depolymerization of spindle microtubules. I. Changes in birefringence and spindle length, *J. Cell Biol.*, **65**, 603–614, 1975.
 33. *Roos U.-P.* Light and electron microscopy of rat kangaroo cells in mitosis. III. Patterns of chromosome behavior during prometaphase, *Chromosoma*, **54**, 363–385, 1976.
 34. *Nicklas R. B.* Chromosome movement: current models and experiments on living cells. In: *Molecules and Cell Movement* (S. Inoué, R. E. Stephens, eds.), pp. 97–118. New York, Raven Press, 1975.
 35. *Moens P. B.* Kinetochore microtubule numbers of different-sized chromosomes, *J. Cell Biol.*, **83**, 556–561, 1979.
 36. *Begg D. A., Ellis G. W.* Micromanipulation studies of chromosome movement, *J. Cell Biol.*, **82**, 528–541, 1979.
 - McIntosh J. R.* Cell division. In: *Microtubules* (K. Roberts, J. S. Hyams, eds.), pp. 381–441. New York, Academic Press, 1979.
 37. *Ris H.* The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of grasshoppers, *Biol. Bull. (Woods Hole)*, **96**, 90–106, 1949.
 - Kuriyama R., Borisy G. G.* Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle, *J. Cell Biol.*, **91**, 822–826, 1981.
 - Euteneuer U., McIntosh J. R.* Structural polarity of kinetochore microtubules in PtK₁ cells, *J. Cell Biol.*, **89**, 338–345, 1981.
 - Pickett-Heaps J. D., Tippit D. H.* The diatom spindle in perspective, *Cell*, **14**, 455–467, 1978.
 38. *Cande W. Z., Wolniak S. M.* Chromosome movement in lysed mitotic cells is inhibited by vanadate, *J. Cell Biol.*, **79**, 573–580, 1978.

- Pratt M.M., Otter T., Salmon E.D. Dynein-like Mg^{2+} -ATPase in mitotic spindles isolated from sea urchin embryos (*Strongylocentrotus droebachiensis*). J. Cell Biol., 86, 738–745, 1980.
- Hyams J. Dynein in the spindle? Nature, 295, 648–649, 1982.
39. Mazia D. How cells divide, Sci. Am., 205(3), 101–120, 1961.
- Gerace L., Blobel G. The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis, Cell, 19, 277–287, 1980.
40. Beams H.W., Kessel R.G. Cytokinesis: a comparative study of cytoplasmic division in animal cells, Am. Sci., 64, 279–290, 1976.
- Blose S.H. Ten-nanometer filaments and mitosis: maintenance of structural continuity in dividing endothelial cells, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3372–3376, 1979.
41. Mabuchi I., Okuno M. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres, J. Cell Biol., 74, 251–263, 1977.
- Schroeder T.E. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1688–1692, 1973.
- Meeusen R.L., Cande W.Z. N-Ethylmaleimide-modified heavy meromyosin, J. Cell Biol., 82, 57–65, 1979.
- Pasternak C.A. Surface membranes during the cell cycle, Trends Biochem. Sci., 1, 148–151, 1976.
42. Bajer A. Fine structure studies on phragmoplast and cell plate formation, Chromosoma, 24, 383–417, 1968.
- Pickett-Heaps J.D., Northcote D.H. Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems, J. Cell Sci., 1, 109–120, 1966.
- Hepler P.K., Newcomb E.H. Fine structure of cell plate formation in the apical meristem of *Phaseolus* roots. J. Ultrastruct. Res., 19, 498–513, 1967.
43. Kubai D.F. The evolution of the mitotic spindle. Int. Rev. Cytol., 43, 167–227, 1975.

Межклеточная адгезия и внеклеточный матрикс

Одно из очень важных преимуществ многоклеточности – это то, что клетки могут приобретать специализацию, несовместимую с одиночным существованием, но выгодную для организма в целом. Подобная специализация может даже в норме приводить к гибели специализированных клеток; например, эпителиальные клетки кожи накапливают кератин, а затем отмирают, и их остовы образуют прочный защитный слой на поверхности тела. Специализированные клетки многоклеточных животных обычно кооперируются между собой, образуя *ткани*, а различные ткани в свою очередь объединяются в функциональные единицы более высокого порядка, называемые *органами* (рис. 12-1).

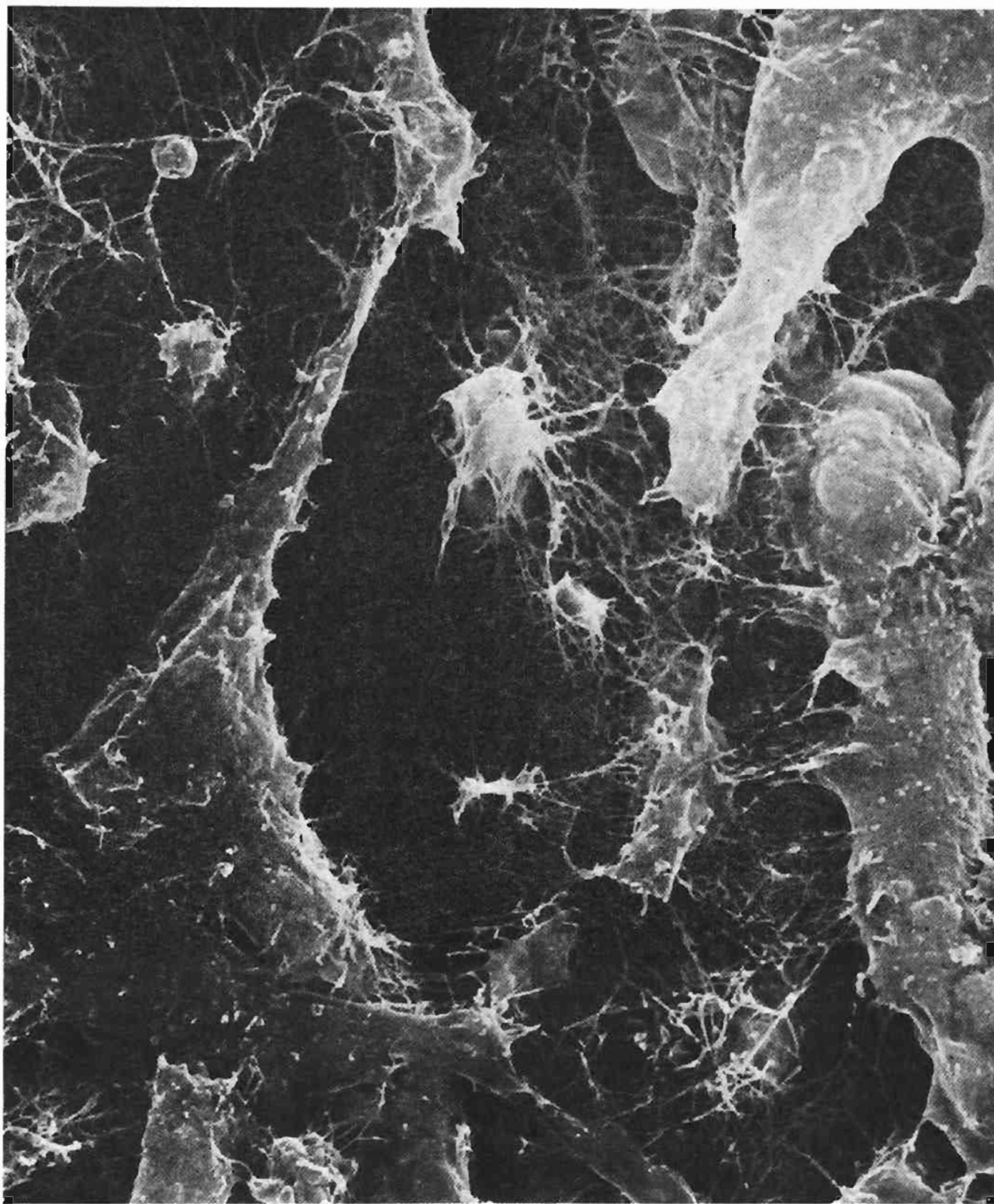
Все клетки в тканях находятся в контакте со сложной сетью внеклеточных макромолекул, называемой *внеклеточным матриксом*. Внеклеточный матрикс участвует в поддержании целостности тканей и образует упорядоченный пространственный остов, внутри которого клетки могут перемещаться и взаимодействовать друг с другом. Клетки, непосредственно соприкасающиеся с соседними клетками, часто бывают связаны с ними не только внеклеточным матриксом, но и специализированными участками плазматической мембраны, называемыми *межклеточными контактами*. Некоторые из таких контактов служат в основном для физического скрепления клеток, в то время как другие позволяют малым молекулам переходить из клетки в клетку, что может облегчать координацию деятельности клеток, образующих ткань.

В этой главе мы вначале рассмотрим то, что известно о взаимном узнавании клеток в процессе построения тканей и органов, а затем познакомимся со структурой и организацией межклеточных контактов и внеклеточного матрикса.

12.1. Клеточное узнавание и клеточная адгезия

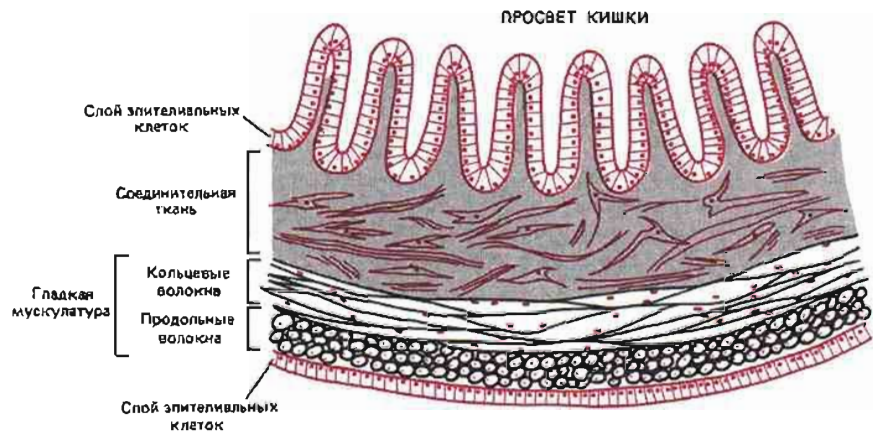
Существуют два совершенно разных способа объединения клеток в ткань. При более простом из них ткань образуется из потомства одной или многих «клеток-основательниц», а макромолекулы внеклеточного матрикса или специализированные клеточные контакты препятствуют расхождению клеток-потомков (рис. 12-2). Так поддерживаются слои эпителиальных клеток; построение таких слоев, их сворачивание и дифференцировка играют важную роль в индивидуальном развитии животных.

Другая, значительно более сложная, стратегия образования ткани связана с миграцией отдельных клеток на некоторое расстояние и их последующим объединением с другими клетками – местного происхождения или тоже пришедшими извне. Например, в эмбрионах позвоночных клетки нервного гребня мигрируют во множество различных участков, где они дифференцируются и объединяются в разнообразные ткани, включая ткани периферической нервной системы (рис. 12-3). Для этого необходим какой-то механизм, направляющий клетки к конечному месту назначения; это может быть, например, секреция вещества, привлекающего подвижные клетки (путем *хемотаксиса*), или



Клетки нервного гребня, мигрирующие во внеклеточном матриксе — сложной сети белковых волокон, заключенных в гидратированный полисахаридный гель. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения Jan Löflberg.)

Рис. 12-1. Как видно из этого схематизированного поперечного разреза, кишечная стенка состоит из эпителиальной, соединительной и мышечной тканей. Каждая ткань представляет собой организованную систему клеток, объединенных межклеточными контактами и/или внеклеточным матриксом.



разметка во внеклеточном матриксе определенного пути, направляющего эти клетки (*контактная ориентировка*).

Независимо от стратегии образования ткани группы клеток должны узнавать друг друга, для того чтобы держаться вместе и не смешиваться с клетками окружающих тканей. Образующиеся при этом ткани организуются в органы тоже не случайным образом. Как же клетки узнают друг друга и каким образом разные группы клеток объединяются в более сложные упорядоченные структуры – органы? До сих пор мы очень мало что знаем о механизмах этих процессов. Но относительно примитивное групповое поведение некоторых одноклеточных организмов может указать нам пути решения этого вопроса.

12.1.1. Миксобактерии используют выгоды «общественного» поведения [1]

Миксобактерии принадлежат к немногим «общественным» прокариотам. Это почвенные палочковидные организмы, питающиеся нерастворимыми макромолекулами, которые они расщепляют, секретируя гидролитические ферменты. Для большей эффективности питания они образуют рыхлые многоклеточные скопления – «рои», позволяющие им объединить свои пищеварительные ферменты («эффект волчьей стаи»). Своей способностью передвигаться и питаться группами миксобактерии напоминают клетки многоклеточных организмов. Простота генетики и строения миксобактерий делает их привлекательными объектами для изучения молекулярной основы примитивных межклеточных взаимодействий.

Благодаря необычному механизму скольжения, в котором не участвуют жгутики или другие видимые локомоторные структуры, отдельные миксобактерии способны независимо передвигаться внутри скопления; и все-таки рой, в котором могут быть тысячи клеток, остается единым медленно перемещающимся образованием. Какие сигнальные механизмы удерживают бактерий внутри скопления? Один из таких механизмов – примитивная форма контактной ориентировки. Двигающаяся бактерия оставляет след из слизи (примитивный внеклеточный матрикс), вдоль которого движутся другие миксобактерии. Хотя передвигающиеся клетки иногда и пересекают слизистый путь, обычно они начинают по нему следовать. Другой механизм был продемонстрирован в опытах с мутантными формами. Оказалось, что для контроля подвижности у миксобактерий существуют две различные системы – одна для одиночных клеток, другая для движения в группах. При групповом движении, для которого нужны продукты по меньшей мере девяти генов, отдельные клетки могут двигаться только в том случае, если их стимулирует контакт с другими клетками. Видимо, некоторые продукты упомянутых генов подают соседним клеткам при контакте сигнал к движению, а другие служат рецепто-



Рис. 12-2. Простейший механизм образования ткани из клеток. Потомки «клеток-основательниц» удерживаются на своих местах в эпителиальном слое с помощью базальной мембраны и межклеточных контактов.

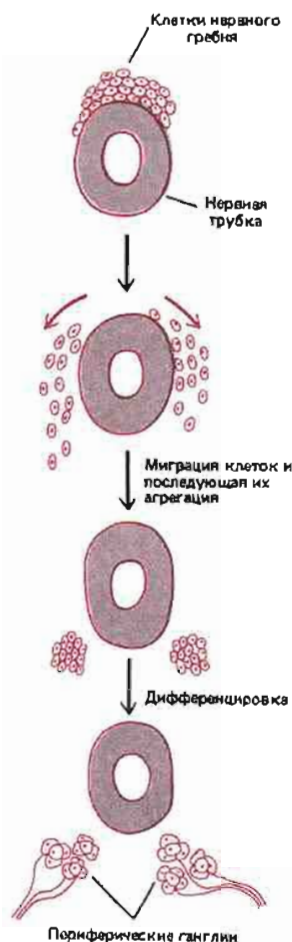


Рис. 12-3. Пример более сложного механизма построения ткани из клеток. Клетки нервного гребня мигрируют с верхней поверхности нервной трубки в различные участки эмбриона, где образуются группы клеток и ткани различного типа. Здесь показано, как эти клетки объединяются и дифференцируются в два скопления нейронов периферической нервной системы. Такие скопления называют ганглиями. Другие клетки нервного гребня становятся опорными (сателлитными) клетками, окружающими нейроны.

рами таких сигналов (рис. 12-4). Такая «эстафетная» система поддерживает совместное движение клеток роя.

Наиболее впечатляющее «многоклеточное» поведение миксобактерии демонстрируют при нехватке питательных веществ. В таких условиях клетки роя объединяются в плотные скопления и, громоздясь друг на друга, образуют многоклеточное плодовое тело (рис. 12-5 и 12-6). В плодовом теле бактериальные клетки дифференцируются в споры, которые удерживает вместе оболочка из внеклеточного матрикса. Споры способны сохраняться долгое время даже в крайне неблагоприятных условиях. Когда же условия улучшаются, споры прорастают с образованием нормальных бактерий. Большое плодовое тело с высокой концентрацией спор обеспечивает формирование плотного роя, а не малого числа изолированных клеток, неспособных эффективно питаться (рис. 12-5).

Как же клетки координируют свое поведение при построении плодового тела? Анализ мутантов с нарушенным образованием плодового тела показал, что клетки агрегируют под действием по меньшей мере четырех различных сигнальных веществ, которые они сами и выделяют. Механизм формирования плодового тела с помощью такой сигнализации лучше всего изучен у другого организма — слизевика (миксомицета) *Dictyostelium discoideum*, чей жизненный цикл очень похож на жизненный цикл миксобактерий. Это эукариотический организм, геном которого всего лишь вчетверо больше генома миксобактерий (и в 100 раз меньше, чем геном человека).

12.1.2. За объединение амёб слизевика в многоклеточное скопление ответственны хемотаксис и специфическая клеточная адгезия [2]

Амебы миксомицета *Dictyostelium discoideum* живут в лесах на уровне земли, питаются бактериями и дрожжами и делятся каждые несколько часов (в лабораторных условиях можно поддерживать их рост в синтетической жидкой среде без других микроорганизмов). При истощении запасов пищи амебы перестают делиться и привлекаемые секретом, который сами и выделяют, собираются в нескольких местах, называемых центрами агрегации. В каждом центре агрегации клетки слипаются благодаря специфическим молекулам, находящимся на их поверхности, и образуют маленькую (1–2 мм) вертикальную

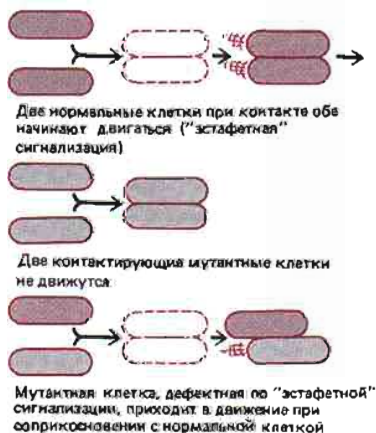
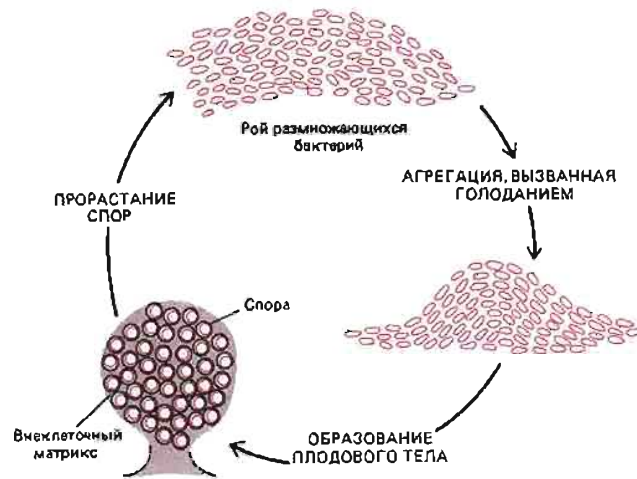


Рис. 12-4. Схема эксперимента с нормальными и мутантными миксобактериями, выявляющего особую систему группового движения по «эстафетному» принципу: клетки перемещаются только после стимулирующего взаимодействия с другими клетками. В представленном примере мутант дефектен по подаче сигнала, но способен реагировать на сигнал от нормальной клетки. Другие (здесь не показанные) мутанты могут подавать сигнал, но не реагируют на него из-за дефекта в рецепторе или в «моторе», приводящем их в движение; такие мутанты не способны двигаться при контакте с нормальными клетками.

Рис. 12-5. Жизненный цикл миксобактерий. Голодание приводит к агрегации клеток и к дифференцировке их с образованием плодового тела. Когда условия снова становятся благоприятными, споры плодового тела прорастают.



червеобразную структуру, которая затем падает набок и в виде блестящего «слизняка» (плазмодия) ползет, оставляя за собой след из слизи (рис. 12-7).

У многоклеточного миксомицета есть различные формы поведения, не свойственные свободноживущим амебам. Он, например, крайне чувствителен к теплу и свету и будет двигаться даже к столь слабому источнику света, как часы со светящимися цифрами. По мере передвижения слизевика клетки его начинают дифференцироваться — запускается процесс, который примерно через 30 ч после начала агрегации закончится образованием плодового тела (рис. 12-8). На рис. 12-9 показаны сложные миграции клеток, происходящие при образовании ножки и плодового тела. Клетки передней части слизевика образуют впоследствии ножку, находящиеся за ними клетки дифференци-

Рис. 12-6. Последовательные этапы «роения» миксобактерий и образования плодового тела при голодании. Микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Цифрами указано время в часах. (С любезного разрешения Jetty Kueg.)

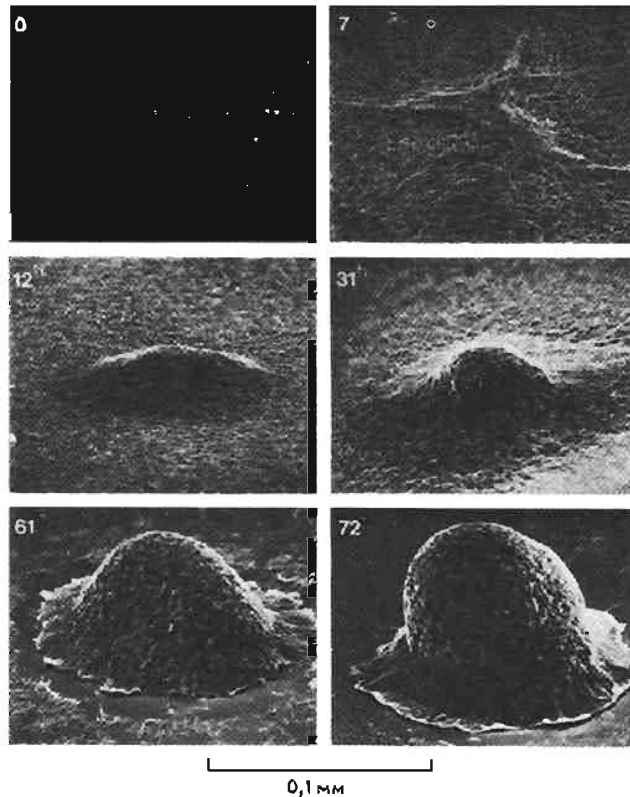




Рис. 12-7. Световая микрофотография ползущего плазмодия *Dictyostelium discoideum*. (С любезного разрешения David Francis.)

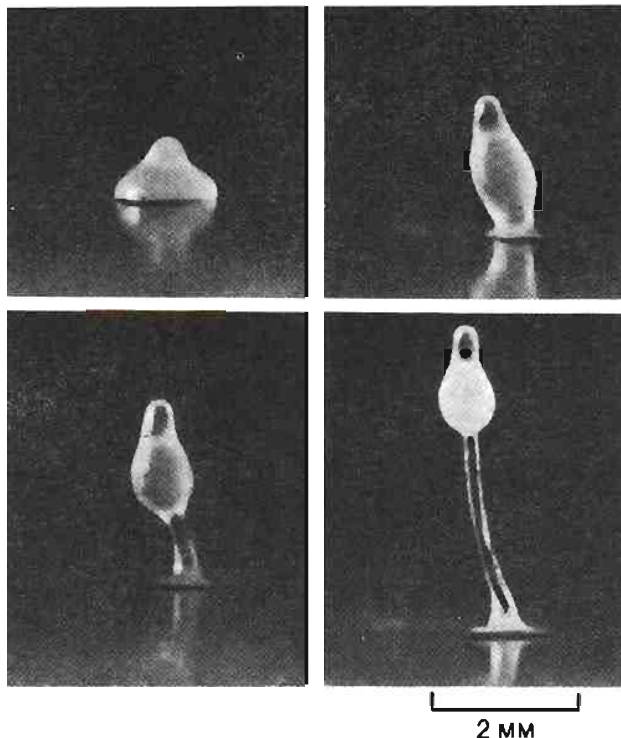


Рис. 12-8. Разные стадии образования плодового тела *Dictyostelium discoideum*. (Световые микрофотографии; с любезного разрешения John Bonner.)

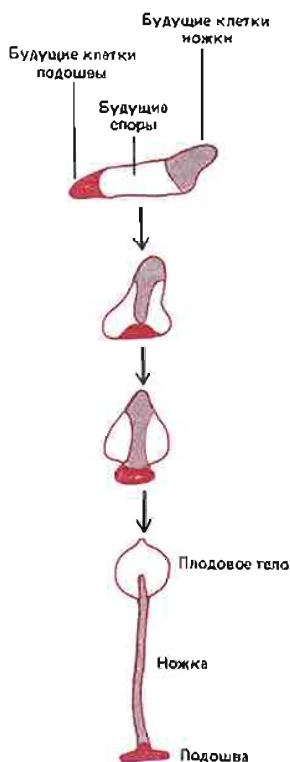


Рис. 12-9. Схема клеточных миграций при образовании плодового тела *Dictyostelium discoideum*. Клетки передней части слизевика перемещаются вниз и образуют ножку, а клетки средней части мигрируют вверх и дифференцируются в споры, образующие плодовое тело.

руются в споры, а клетки самой задней области образуют подошву. И споры, и клетки, составляющие ножку, покрываются внеклеточным матриксом (в виде стенок из целлюлозы), и в конце концов все клетки, за исключением спор, отмирают. Споры прорастают только в благоприятных условиях; при этом образуются одноклеточные амёбы, и начинается новый цикл (рис. 12-10).

Химическая сигнализация у *Dictyostelium* представляет собой наиболее изученный пример хемотаксиса у эукариотических клеток. В ответ на хватку пищи амёбы начинают синтезировать и выделять последовательными импульсами циклический АМР (сАМР). По неизвестным причинам некоторые клетки становятся центрами агрегации. Секретируемый ими сАМР связывается специфическими рецепторами на поверхности других голодающих амёб и ориентирует их перемещение в сторону источника сАМР. Такое поведение можно прямо продемонстрировать, нанеся с помощью микропипетки очень малое количество сАМР на любой участок поверхности голодающей амёбы. Ответом на это воздействие будет немедленное образование псевдоподия, растущей по направлению к микропипетке (рис. 12-11). В обычных условиях псевдоподия прикрепилась бы к поверхности, на которой находится клетка, и потянула клетку за собой в том же направлении.

Зона влияния каждого центра агрегации увеличивается за счет того, что исходящий из центра импульсами сигнал (циклический АМР) передается от клетки к клетке. Каждый импульс сАМР заставляет окружающие клетки двигаться к его источнику и одновременно испускать новый импульс. Этот новый, возникающий с небольшой задержкой импульс в свою очередь ориентирует движение и индуцирует выброс сАМР у клеток, находящихся еще дальше от центра, и т. д. Таким образом, из каждого центра агрегации распространяются регулярные волны сАМР, заставляющие амёб на периферии двигаться к центру пульсирующими концентрическими или спиральными волнами, которые можно регистрировать с помощью центрифужной кинесъемки (рис. 12-12). Преимущество такой системы передачи сигнала состоит в том, что сигнал движется от центра с постоянной скоростью (пройденное расстояние пропорционально времени) и может охватить большую площадь. В отли-

Рис. 12-10. Жизненный цикл *Dictyostelium discoideum*. При голодании свободноживущие амёбы агрегируют и дифференцируются с образованием подвижного плазмодия, который затем образует плодовое тело. При благоприятных условиях освобождающиеся из плодового тела споры прорастают и вновь превращаются в амёб.

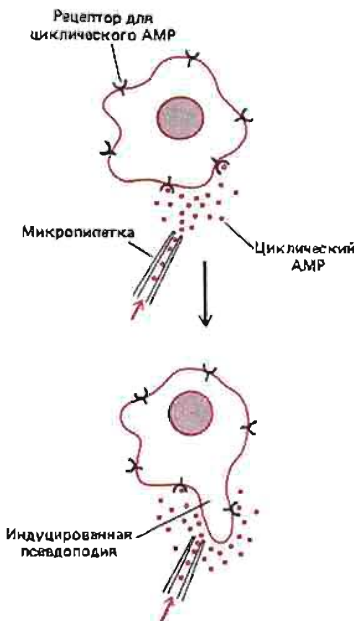
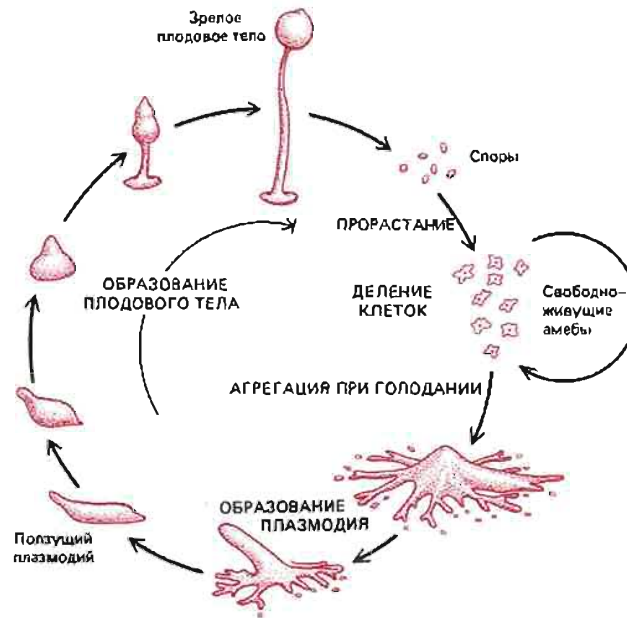


Рис. 12-11. Навесение небольшого количества циклического AMP (сAMP) на любую точку поверхности голодающей клетки (амёбы) *Dictyostelium* тотчас же вызывает образование псевдоподии в этой точке. Такой механизм позволяет амёбе двигаться по направлению к источнику сAMP. Чтобы воздействовать на клетку, сAMP должен связываться с рецепторами на ее поверхности.

чие от этого волна сигнала, распространяющегося путем простой диффузии, постепенно замедляется (расстояние пропорционально квадратному корню из времени). Разницу можно оценить, если сравнить процесс агрегации у *Dictyostelium discoideum* и у *D. minutum*–вида, у которого нет релейной системы передачи сигнала. У последнего организма диапазон действия сигнала каждого центра агрегации намного меньше и образующиеся слизевики и плодовые тела очень малы.

Голодающие амёбы *Dictyostelium* не только начинают выделять порции циклического AMP и реагировать на них соответствующей ориентацией движений – у них еще активируются тысячи новых генов, и они начинают синтезировать множество новых молекул, в том числе те, которые участвуют в межклеточной адгезии. В результате по мере образования потоков амёб, движущихся к центрам агрегации, клетки плотно слипаются в цепочки. Еще позже, на стадии плазмодия, они слипаются уже большей частью своей поверхности. В клеточной адгезии участвуют несколько различных молекул, синтезируемых только голодающими амёбами. Оказалось, например, что начальное слипание концами осуществляется с помощью поверхностного гликопротеина, так как антитела к нему подавляют агрегацию. Однако молекулярные основы клеточной адгезии лучше изучены у другого простого организма – губки.

12.1.3. У губок в видоспецифической агрегации клеток участвует макромолекулярный внеклеточный фактор агрегации [3]

Одно из преимуществ использования «общественных» микроорганизмов, подобных миксобактериям и слизевикам, для изучения агрегации клеток состоит в том, что процесс протекает совершенно нормально в культуральной чашке, где его легко наблюдать. К сожалению, иначе обстоит дело с клеточным узнаванием, происходящим в процессе индивидуального развития многоклеточных животных. Обычно приходится диссоциировать формирующиеся ткани на отдельные клетки, которые затем могут снова объединяться *in vitro*. Поскольку из диссоциированных клеток часто формируются структуры, напоминающие исходные ткани, есть надежда, что изучение реассоциации прольет свет на процессы нормального тканеобразования у животных. Такого рода опыты были впервые проведены в 1907 г. с клетками губки.



Рис. 12-12. «Волны» голодающих амёб *Dictyostelium*, собирающихся к центру агрегации. При таком малом увеличении отдельные амёбы не видны. (Световая микрофотография; с любезного разрешения Gunter Gerisch.)

Губки – наиболее примитивные из многоклеточных животных. Они состоят из клеток всего пяти или шести типов. Губку можно диссоциировать на отдельные клетки, осторожно продавив взрослый организм через мелкое сито. Диссоциированные клетки быстро снова агрегируют, и в конце концов такой агрегат реорганизуется в нормальную губку. В классическом опыте такого рода смешивали диссоциированные клетки двух видов губок разного цвета. Клетки слипались видоспецифическим образом, образуя отдельные агрегаты одного или другого цвета (рис. 12-13). Хотя этот результат можно получить не со всеми видами губок, он показывает, что некоторые клетки взрослой губки способны отличать клетки своего вида от чужих.

Такая видоспецифическая агрегация происходит при участии макромолекулярного внеклеточного фактора агрегации – как полагают, комплекса молекул протеогликана и/или гликопротеина. Взрослые губки самопроизвольно диссоциируют на отдельные клетки при инкубации в морской воде, лишенной ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} . При диссоциации освобождается фактор агрегации. Если диссоциированные клетки отмыть от этого фактора и поместить в обычную морскую воду, они не будут агрегировать, если фактор не добавить снова. Агрегация при добавлении фактора происходит быстро, она видоспецифична и требует присутствия ионов Ca^{2+} .

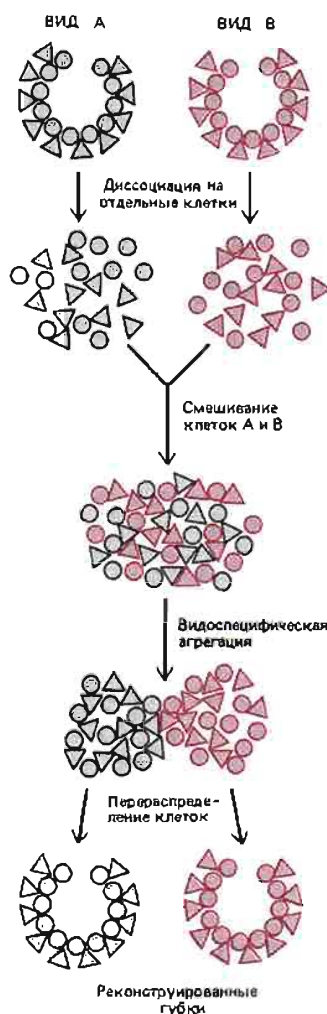
Фактор агрегации губок – гигантская частица величиной примерно 100 нм с мол. массой около 20 млн; в присутствии Ca^{2+} этот фактор дополнительно полимеризуется. Он связывается со специфическими белковыми рецепторами (базальными пластинками) на поверхности клеток губки того же, но не другого вида. По-видимому, частицы фактора сначала связываются с базальными пластинками клеточной поверхности, а затем друг с другом, «сшивая» таким образом клетки. Ионы Ca^{2+} необходимы именно для связывания частиц друг с другом (рис. 12-14). Если, например, ковалентно связать с фактором агрегации гранулы агара, то в присутствии ионов кальция произойдет агрегация гранул. С другой стороны, если с агаром связать не фактор, а белок базальной пластинки, то для агрегации гранул потребуются и ионы Ca^{2+} , и фактор агрегации (рис. 12-15).

Вкратце можно сказать, что механизм клеточного узнавания у губок основан на том, что поливалентная связующая молекула узнаёт один и тот же белок на поверхности двух различных клеток и таким образом соединяет их.

12.1.4. Диссоциированные эмбриональные клетки позвоночных предпочитают ассоциировать с клетками той же ткани [4]

Подход, первоначально использованный для изучения агрегации клеток губок, позднее широко применяли для исследования процессов клеточного узнавания и клеточной адгезии у эмбрионов позвоночных. Ткань взрослой особи очень трудно разделить на отдельные клетки, эмбриональные же ткани легко диссоциируют под действием низких концентраций протеолитического фермента трипсина. Клетки двух разных эмбриональных тканей при смешении сначала образуют совместные агрегаты, а затем разделяются и группи-

Рис. 12-13. Видоспецифическая агрегация клеток губок. Если смешать диссоциированные клетки двух видов губок разного цвета, образуются видоспецифические агрегаты, из которых в конце концов вновь образуются целые особи. Губки состоят из клеток приблизительно 5–6 типов, но здесь для простоты показаны только два типа.



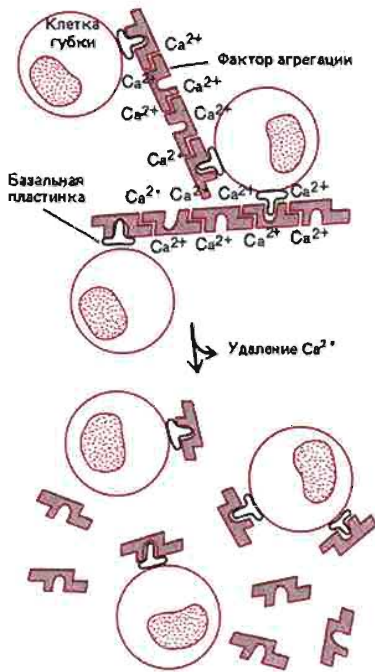


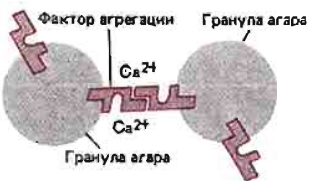
Рис. 12-14. Схема соединения клеток губки с помощью очень крупных молекул фактора агрегации, которые в присутствии ионов Ca^{2+} связываются сначала со специфическими поверхностными белками-рецепторами (базальными пластинками), а затем друг с другом. Если теперь клеточные агрегаты отмыть раствором без кальция, все молекулы фактора агрегации, не связавшиеся с базальными пластинками, останутся в надосадочной жидкости. В этой жидкости клетки не смогут агрегировать, даже если добавить ионы кальция, так как концентрация оставшегося фактора столь низка, что он не будет в достаточной мере связываться с базальными пластинками.

руются в исходные ткани. Клетки двух разных видов при смешении обычно игнорируют видовые различия и собираются в тканеспецифические агрегаты, состоящие из клеток обоих видов.

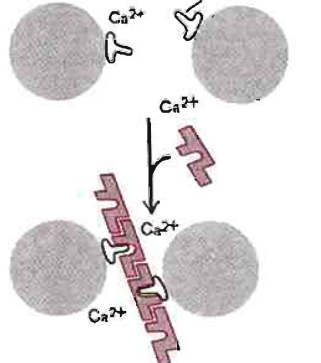
Аналогичный результат получается при изучении слипания клеток совершенно другим методом. Ткань разделяют на клетки и позволяют им собраться в агрегаты, а затем эти агрегаты смешивают с мечеными клетками различных других тканей и определяют суммарное количество радиоактивных клеток, связавшихся с агрегатами за различные промежутки времени. В таких опытах радиоактивные клетки всегда быстрее связываются с агрегатами клеток той же ткани, чем с агрегатами клеток других тканей (рис. 12-16).

Таким образом, два разных теста — определение степени сродства клеток в опытах с длительной инкубацией (эксперименты с «самосортировкой») и измерение скорости слипания клеток (опыты по связыванию радиоактивных клеток) — дают аналогичные результаты, хотя механизмы обоих явлений могут быть разными. К сожалению, до сих пор не ясно, что именно обеспечивает процессы тканеспецифического узнавания — внеклеточные факторы агрегации, комплементарные молекулы клеточных поверхностей или какие-то иные механизмы.

12.1.5. Клетки разных тканей можно расположить в ряд по способности к адгезии [5]



**А. ФАКТОР АГРЕГАЦИИ
КОВАЛЕНТНО СВЯЗАН С ГРАНУЛОЙ**



**Б. БАЗАЛЬНАЯ ПЛАСТИНКА
КОВАЛЕНТНО СВЯЗАНА С
ГРАНУЛОЙ**

При самосортировке смеси диссоциированных клеток двух разных тканей *in vitro* клетки одной ткани в конце концов обычно оказываются внутри агрегата, а клетки другой ткани их окружают. Согласно гипотезе дифференциальной адгезивности, такая разница в поведении обусловлена тем, что различные ткани образуют иерархический ряд по способности к адгезии. Предполагается, что клетки внутри смешанных агрегатов столь сильно слипаются между собой, что в конце концов вытесняют из центральной части менее адгезивные клетки. Следовательно, если в опыте с попарным смешением клеток разных тканей — А, В и С — клетки А всегда оказываются «внутренними» по отношению к клеткам В, а В — «внутренними» по отношению к С, то при смешении клеток А и С внутри агрегата должны оказаться клетки А. Именно такой результат всегда и наблюдается (рис. 12-17).

Гипотеза дифференциальной адгезивности достаточно хорошо объясняет одно поразительное наблюдение, сделанное много лет назад. Если смешать разделенные клетки (или кусочки ткани) трех зародышевых листов эмбриона

Рис. 12-15. В пользу схемы, представленной на рис. 12-14, говорит эксперимент с ковалентным присоединением фактора агрегации или белка базальной пластинки к гранулам агара. Гранулы, связанные с фактором, агрегируют в присутствии Ca^{2+} (А), а гранулы, связанные с базальными пластинками, агрегируют только в том случае, если добавить еще и фактор агрегации (Б).

Рис. 12-16. Тканеспецифическая адгезивность диссоциированных эмбриональных клеток позвоночных по данным теста со связыванием радиоактивных клеток. Определив число меченых клеток, связавшихся с клеточными агрегатами за разные промежутки времени, можно измерить скорость слипания клеток. Она всегда выше при взаимодействии клеток одного типа.

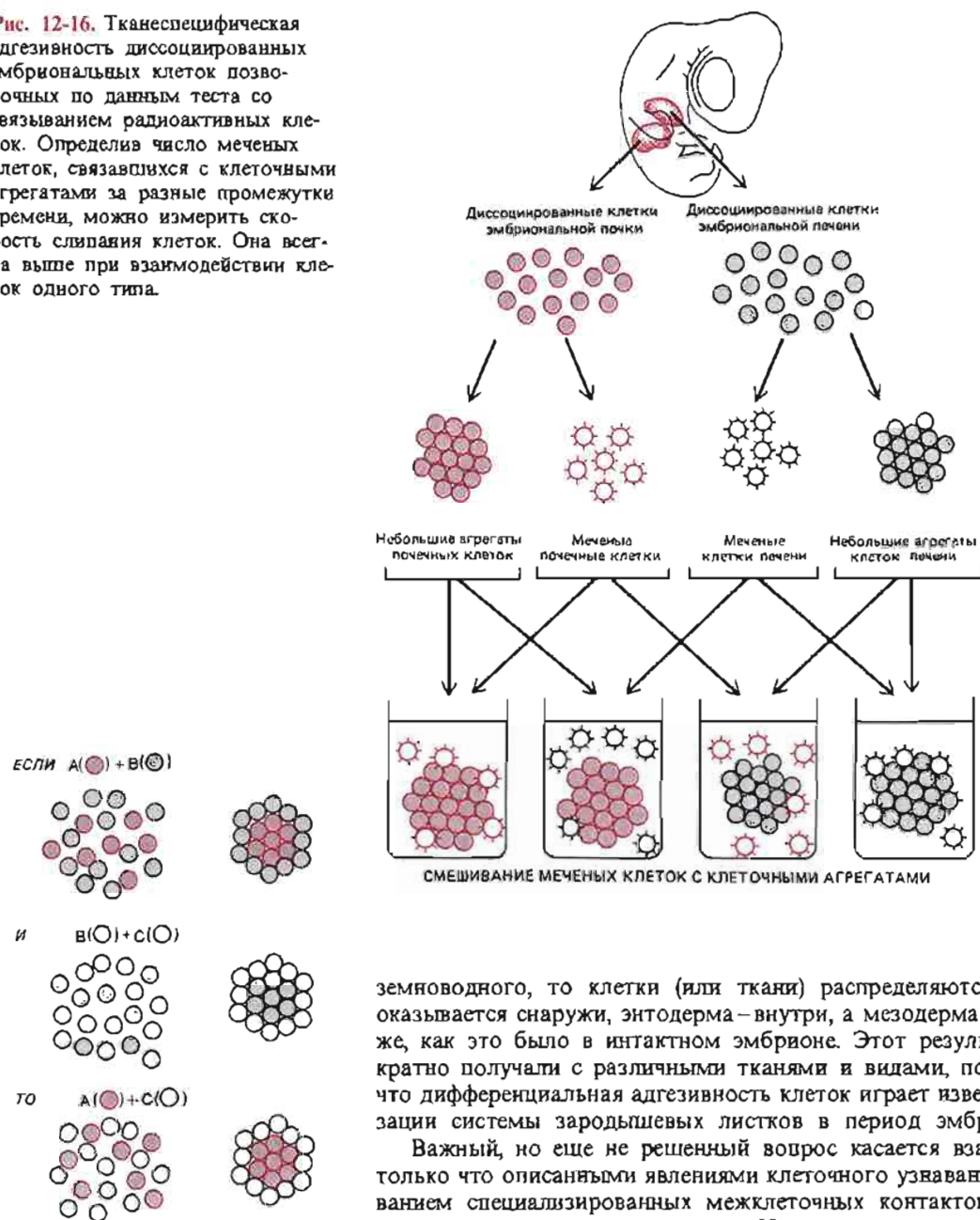


Рис. 12-17. Гипотеза дифференциальной адгезивности предсказывает, что если в опытах с самосортировкой клетки А оказываются «внутренними» по отношению к клеткам В, а клетки В — «внутренними» по отношению к клеткам С, то при смешении клеток А и С в аналогичном опыте клетки А должны оказаться «внутренними» по отношению к клеткам С. Как показано на схеме, именно это всегда и происходит.

земноводного, то клетки (или ткани) распределяются так, что эктодерма оказывается снаружи, энтодерма — внутри, а мезодерма — между ними, т.е. так же, как это было в интактном эмбрионе. Этот результат, который неоднократно получали с различными тканями и видами, позволяет предполагать, что дифференциальная адгезивность клеток играет известную роль в стабилизации системы зародышевых листков в период эмбрионального развития.

Важный, но еще не решенный вопрос касается взаимоотношений между только что описанными явлениями клеточного узнавания и адгезии и образованием специализированных межклеточных контактов, которые будут рассмотрены в следующем разделе. На то, что такие контакты могут играть роль в описанных выше опытах по клеточной адгезии, указывают два наблюдения. Во-первых, при слипании диссоциированных клеток губки происходит быстрое образование проводящих контактов, которые позволяют небольшим ионам переходить из одной клетки в другую, хотя образования типичных щелевых контактов при этом не наблюдали. Такого рода ионная коммуникация не создается в смешанных агрегатах клеток от губок разных видов. Во-вторых, при самосортировке *in vitro* диссоциированных клеток различных эмбриональных тканей позвоночного наиболее адгезивные клетки, которые собираются во внутренней части агрегата, обычно образуют больше всего адгезионных контактов, называемых десмосомами.

В следующем разделе мы рассмотрим типы специализированных контактов, возникающих между клетками в тканях.

Закключение

Из-за трудности изучения молекулярных механизмов, лежащих в основе организации клеток высших животных в сложные ткани, много исследований было проведено на более простых системах. Некоторые одноклеточные организмы, в частности миксобактерии и миксомицет *Dictyostelium discoideum*, при голодании агрегируют с образованием многоклеточного плодового тела. В обоих случаях агрегация голодающих клеток является ответом на продуцируемый самими клетками химический сигнал; у *Dictyostelium* таким сигнальным фактором служит циклический АМР. Клетки некоторых губок прикрепляются к клеткам своего вида с помощью секретируемых ими макромолекулярных видоспецифических «факторов агрегации». Диссоциированные клетки различных эмбриональных тканей позвоночных при смешивании объединяются предпочтительно с клетками той же ткани; молекулярные основы такого тканеспецифического узнавания неизвестны.

Таблица 12-1. Межклеточные контакты

- | |
|--|
| 1. Адгезионные контакты: |
| а) опоясывающая десмосома |
| б) десмосома |
| в) полудесмосома |
| 2. Замыкающие контакты: |
| а) плотный контакт |
| б) септированный контакт (только у беспозвоночных) |
| 3. Проводящие контакты: |
| а) щелевой контакт |
| б) химический синапс |



Рис. 12-18. Проводящие клеточные контакты двух типов. Через щелевой контакт малые молекулы могут непосредственно переходить из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой. В химическом синапсе пресинаптическая нервная клетка выделяет сигнальное вещество (нейромедиатор), которое диффундирует через синаптическую щель и воздействует на поверхность постсинаптической клетки.

12.2. Межклеточные контакты

Межклеточные контакты обычно слишком малы для того, чтобы их можно было увидеть в световой микроскоп, но их легко изучать с помощью электронной микроскопии тонких срезов или же препаратов, полученных методом замораживания-скальвания. На тех и других препаратах видно, что в этих участках взаимодействующие плазматические мембраны (а нередко и подстилающие их участки цитоплазмы и межклеточное пространство) имеют высокоспециализированную структуру. Такие контакты по традиции разбивают на три функциональные категории: 1) адгезионные контакты, которые механически скрепляют клетки; 2) замыкающие контакты, которые не только механически связывают клетки, но и делают невозможным прохождение между ними молекул; 3) проводящие контакты, которые пропускают малые молекулы из одной клетки в другую.

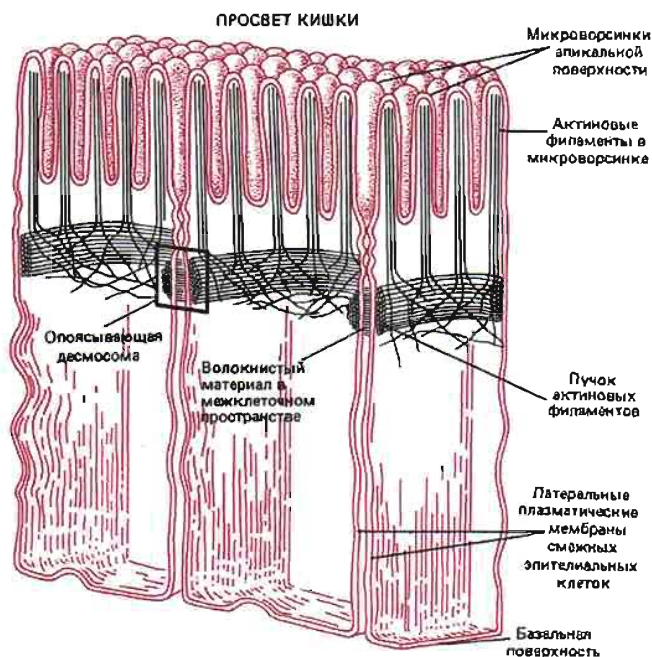
Различные типы клеточных контактов перечислены в табл. 12-1. Основной тип адгезионных контактов называют десмосомами. Плотные контакты (и септированные контакты у беспозвоночных) — главные виды замыкающих контактов. Проводящие контакты бывают двух видов: щелевые контакты и химические синапсы. Через щелевой контакт малые молекулы могут непосредственно переходить из одной клетки в другую, а в химическом синапсе клетки не имеют непосредственной связи, хотя и очень сближены (рис. 12-18). «Входная» клетка синапса (пресинаптическая) выделяет вещество (нейромедиатор), которое диффундирует через синаптическую щель и вызывает реакцию другой, постсинаптической, клетки. Так как химические синапсы подробно рассмотрены в главе 18, мы не будем останавливаться на них здесь. Химические синапсы не следует смешивать с более редкими электрическими синапсами, в которых электрические импульсы непосредственно переходят с одной нервной клетки на другую через щелевой контакт.

12.2.1. Десмосомы скрепляют клетки [6]

Десмосомы встречаются во многих тканях. Они позволяют группам клеток функционировать в качестве структурных единиц. На важную роль десмосом в объединении клеток указывает то, что чаще всего они встречаются в тканях, испытывающих большие механические нагрузки, например в сердечной мышце, в эпителии кожи и в шейке матки. Существуют три разновидности десмосом: обычные «точечные» десмосомы, полудесмосомы и опоясывающие десмосомы. В большинстве эпителиальных клеток встречаются все три разновидности.

Опоясывающие десмосомы образуют непрерывную полосу, охватывающую каждую из соприкасающихся клеток эпителиального слоя поблизости от их апикального конца (рис. 12-19). У соседних клеток такие полосы находятся

Рис. 12-19. Схематическое изображение опоясывающих десмосом в слое эпителиальных клеток тонкого кишечника. Такое образование (его называют также *zonula adherens*) окружает каждую клетку; его характерные особенности – волокнистый материал в межклеточном пространстве и сократительный пучок актиновых филаментов со стороны цитоплазмы.



прямо друг против друга и разделены (в межклеточном пространстве) плохо охарактеризованным волокнистым материалом, который, вероятно, скрепляет взаимодействующие мембраны. Внутри каждой клетки вдоль зоны контакта под самой плазматической мембраной проходят пучки сократительных актиновых филаментов. Возможно, эти пучки осуществляют один из наиболее фундаментальных процессов морфогенеза животных – сворачивание эпителиальных слоев в трубки (рис. 12-20). Полагают, например, что в нервной пластинке ориентированное сокращение пучков актиновых филаментов ведет к сужению апикального конца каждой эпителиальной клетки и в результате – к сворачиванию пластинки в нервную трубку (см. разд. 15.2.8).

«Точечные» десмосомы действуют подобно заклепкам, скрепляющим эпителиальные клетки в отдельных местах (рис. 12-21). Они служат также местами прикрепления кератиновых волокон (называемых еще тонофиламентами, см. разд. 10.6.4), которые проходят через всю клетку, образуя структурный

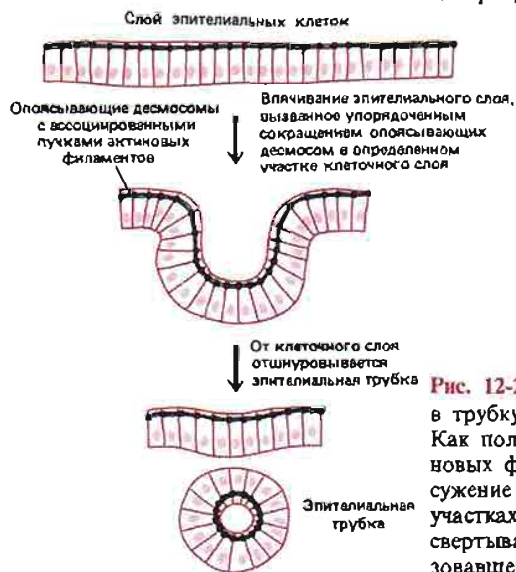


Рис. 12-20. Схема сворачивания эпителиального слоя в трубку (например, при образовании нервной трубки). Как полагают, упорядоченное сокращение пучков актиновых филаментов в опоясывающих десмосомах вызывает сужение апикальных областей клеток в определенных участках клеточного слоя, и в результате этот слой сворачивается в трубку, которая затем отделяется от образовавшего ее эпителия.

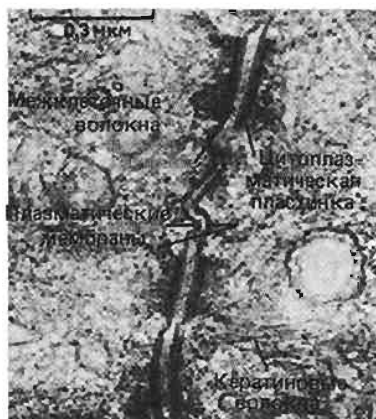
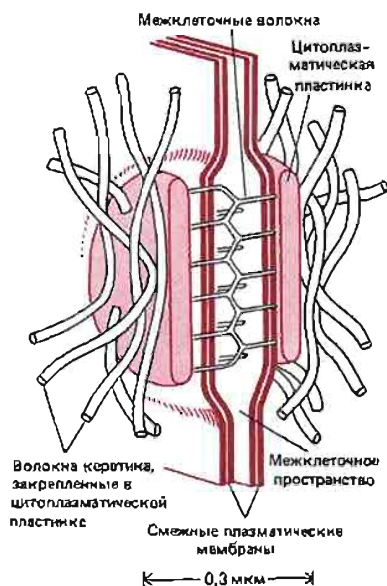


Рис. 12-21. Электронная микрофотография трех «точечных» десмосом между двумя эпителиальными клетками в кишке крысы. [N. B. Gilula. In: Cell Communication (R. P. Cox, ed.), pp. 1-29, New York, Wiley, 1974.]



каркас цитоплазмы. Поскольку в десмосомах клетки соединены также белковыми филаментами других типов, сети кератиновых волокон в соседних клетках оказываются косвенным образом связанными в непрерывную сеть, охватывающую весь эпителиальный слой (рис. 12-22 и 12-23).

Полудесмосомы сходны с десмосомами, но в отличие от них скрепляют не мембраны соседних эпителиальных клеток, а базальную поверхность эпителиальных клеток с подстилающей базальной мембраной (это специализированная структура внеклеточного матрикса; см. ниже). Десмосомы и полудесмосомы действуют как заклепки, распределяющие любые нагрузки по всему эпителиальному слою и по всей подстилающей соединительной ткани (рис. 12-23).

12.2.2. Плотные контакты создают в клеточных слоях барьер проницаемости [6, 7]

Слой эпителиальных клеток покрывают поверхность тела и выстилают все его полости. Несмотря на значительные биохимические различия, у этих слоев есть по крайней мере одна общая функция: они служат высокоселективными барьерами, разделяющими очень различные по химическому составу внутренние и наружные жидкости. Ведущую роль в поддержании функции эпителиев как селективных барьеров играют **плотные контакты**. Например, эпителиальные клетки, выстилающие тонкий кишечник, должны удерживать большую часть его содержимого в просвете кишки и в то же время должны перекачивать оттуда во внеклеточную тканевую жидкость определенные питательные вещества, которые затем всасываются в кровь. Такой перенос осуществляют две группы специализированных транспортных белков: одна из них находится на апикальной поверхности эпителиальных клеток (эта поверхность обращена к просвету кишечника) и транспортирует в клетку избранные молекулы, а другая — на базальной и латеральной (или, как говорят, базолатеральной) поверхности и вновь откачивает эти молекулы из клетки с другой стороны (рис. 12-24). Очевидно, что для поддержания направленного транспорта апикальные насосы не должны диффундировать (в плазматической мембране) на базолатеральную поверхность и наоборот. Кроме того, необходимо предотвратить обратную утечку транспортируемых молекул в полость кишечника. Плотные контакты обеспечивают оба этих условия. Во-первых, они служат препятствием для диффузии молекул в липидном бислое плазматической мембраны. Во-вторых, они так герметично соединяют соседние клетки, что через образующийся непрерывный клеточный слой не проникают даже малые молекулы.

В плотных контактах взаимодействующие плазматические мембраны настолько тесно примыкают друг к другу, что между ними не остается межклеточного пространства: если с одной стороны клеточного слоя ввести электроноплотный маркер, то он не сможет проникнуть за плотный контакт (рис. 12-25). Для поддержания целостности плотных контактов необходимы специальные белки и двухвалентные катионы, так как эти контакты можно разрушить с помощью протеолитических ферментов или веществ, образующих хелаты с ионами Ca^{2+} и Mg^{2+} .

На электронных микрофотографиях видно, что в плотных контактах имеет место прямое соприкосновение определенных белков двух смежных

Рис. 12-22. Сильно схематизированное изображение точечной десмосомы. С внутренней стороны обеих смежных плазматических мембран находится электроноплотная пластинка, связанная с густой сетью кератиновых волокон, которые либо заканчиваются в пластинке, либо проходят вдоль ее поверхности. Прилегающие друг к другу пластинки разных клеток соединены через межклеточное пространство какими-то плохо охарактеризованными волокнами.

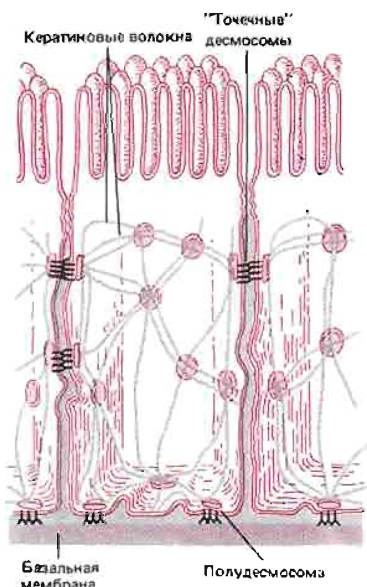


Рис. 12-23. Схема расположения десмосом и полудесмосом в эпителиальных клетках тонкого кишечника. Обратите внимание на то, как сети кератиновых волокон соседних клеток связаны друг с другом через десмосомы и с базальной мембраной через полудесмосомы.

плазматических мембран (рис. 12-26). На препаратах, приготовленных методом замораживания–скальвания, эти белки выявляются как линейные ряды внутримембранных частиц (рис. 12-27). Каждую клетку эпителиального слоя полностью опоясывает полоса, состоящая из многих переплетающихся рядов таких частиц.

У беспозвоночных функцию герметизации клеточных слоев обычно выполняют не плотные, а **септированные контакты**. Последние имеют весьма характерный вид и на электронных микрофотографиях тонких срезов, и при использовании метода замораживания–скальвания. У них есть два отличия от плотных контактов: во-первых, белки септированных контактов расположены значительно более регулярными, взаимодействующими через внеклеточное пространство параллельными рядами; во-вторых, контакт герметизируют сами белки, соседние же плазматические мембраны непосредственно не соприкасаются (рис. 12-28). Так же как и плотные контакты, эти «септированные ленты» полностью опоясывают каждую клетку.

12.2.3. Щелевые контакты позволяют малым молекулам прямо переходить из клетки в клетку [6, 8]

Наиболее распространены в тканях всех животных щелевые контакты. Их называют проводящими, так как они позволяют небольшим водорастворимым молекулам непосредственно переходить из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой, обеспечивая таким образом и электрическое, и метаболическое сопряжение клеток.

Такой способ соединения был впервые продемонстрирован в 1958 г. путем введения микроэлектродов в каждый из двух взаимодействующих нейронов нервной цепочки речного рака. При подаче на электроды разности потенциалов сразу же возникал ток, и это свидетельствовало о том, что неорганиче-

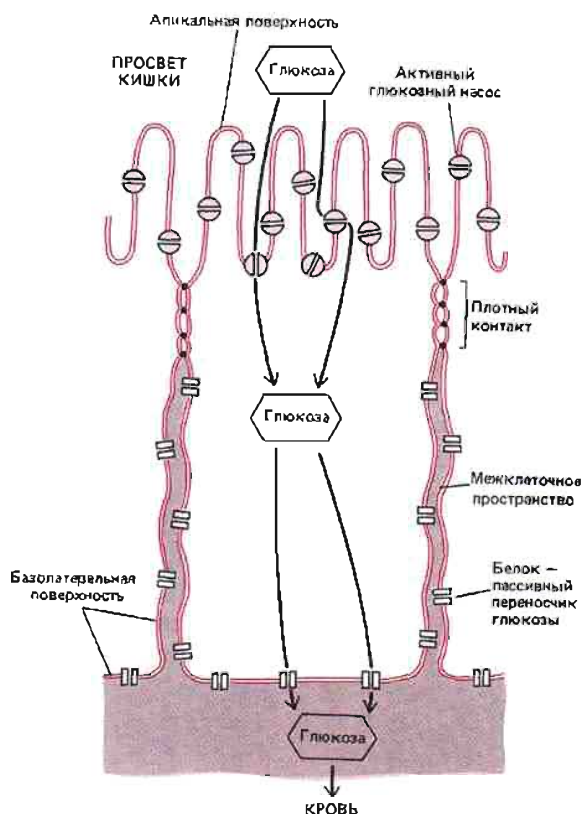


Рис. 12-24. Схема эпителиальной клетки из тонкой кишки: показано, как плотные контакты разграничивают области, в которых могут находиться разные транспортные белки. Такое разграничение обеспечивает перенос питательных веществ из просвета кишки через эпителиальный слой в кровь. В представленном здесь примере глюкоза активно транспортируется в клетку гликозными насосами апикальной поверхности, а затем диффундирует из клетки при участии белков–пассивных переносчиков глюкозы, расположенных в базолатеральной области плазматической мембраны.

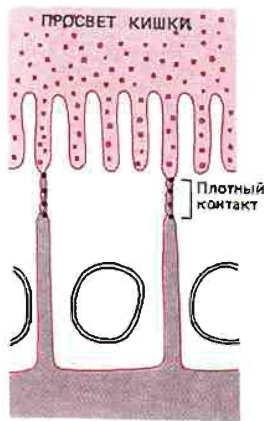


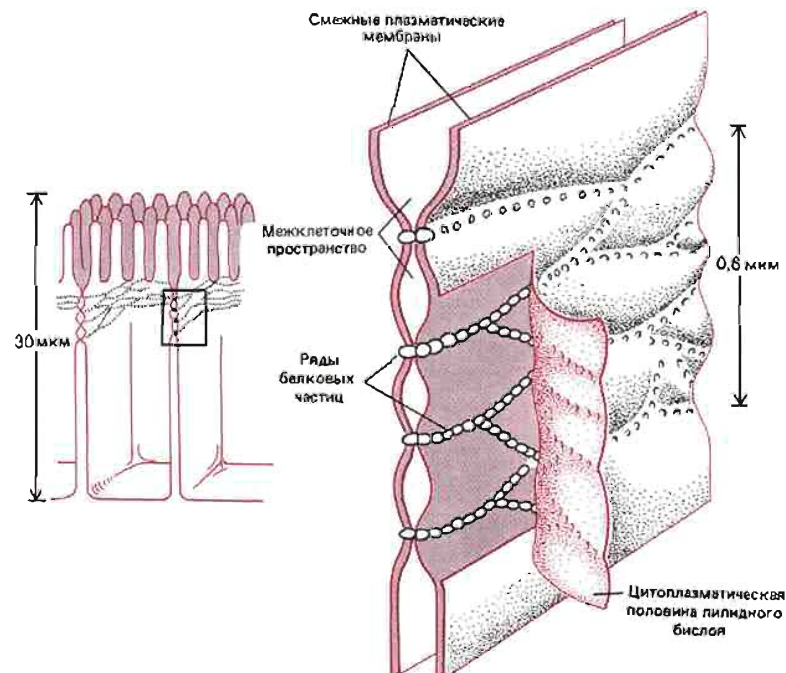
Рис. 12-25. На этой схеме показано, что растворимые молекулы не могут перейти через герметизирующие плотные контакты с одной стороны слоя эпителиальных клеток на другую.

ские ионы (переносящие ток в живых тканях) свободно переходили из одной клетки в другую. В экспериментах, проведенных несколько лет спустя, в одну клетку вводили небольшие флуоресцирующие молекулы, и оказалось, что они с легкостью переходят в соседние клетки, но не просачиваются во внеклеточное пространство. При инъекции флуоресцентных молекул разной величины выяснилось, что вещества с мол. массой менее 1000–1500 могут переходить из клетки в клетку, а более крупные молекулы – нет. Судя по этим результатам, эффективная величина пор, пропускающих молекулы, составляет около 1,5 нм (рис. 12-29). Таким образом, связанные этими каналами клетки могут свободно обмениваться разнообразными малыми молекулами (такими, как неорганические ионы, сахара, аминокислоты, нуклеотиды и витамины), но каждая имеет свой независимый набор макромолекул (белков, нуклеиновых кислот и полисахаридов).

В принципе подобное сопряжение должно обеспечивать *метаболическую кооперацию* клеток, так как внутриклеточные малые молекулы, производимые лишь какой-то субпопуляцией клеток данной ткани, могут использоваться и остальными ее клетками. Хотя до сих пор не удалось прямо продемонстрировать такую метаболическую кооперацию *in vivo*, было показано, что она имеет место в тканевых культурах. Например, мутантные линии клеток, у которых отсутствует фермент тимидинкиназа, не способны включать в ДНК радиоактивный тимидин. Но радиоавтография после добавления в среду радиоактивного тимидина показывает, что при совместном культивировании таких клеток с нормальными клетками (клетками дикого типа), имеющими тимидинкиназу, ДНК мутантных клеток, непосредственно соприкасающихся с нормальными, оказывается меченой (рис. 12-30). Это означает, что какой-то предшественник ДНК, содержащий радиоактивный тимидин, переходит из клетки дикого типа в контактирующие с ней мутантные клетки. В аналогичных экспериментах с мутантными клетками, неспособными образовывать щелевые контакты, подобной метаболической кооперации не наблюдается.

Хотя обычно считают, что электрическое или метаболическое сопряжение клеток осуществляется именно с помощью щелевых контактов, этот вывод основан пока лишь на косвенных данных. Практически во всех случаях, когда

Рис. 12-26. Схема строения плотного контакта между эпителиальными клетками тонкого кишечника. Соседние плазматические мембраны «сшиты» непрерывными цепочками специальных белковых частиц, образующими герметичное соединение. Пояс из таких разветвленных герметизирующих цепочек охватывает каждую клетку. Чтобы показать эти белковые цепочки, внутренний липидный монослой одной из плазматических мембран «отогнут». В электронно-микроскопических препаратах, приготовленных методом замораживания – скалывания, белки плотного контакта остаются не на наружном монослое мембраны, как показано здесь, а на внутреннем (см. рис. 12-27, Б).



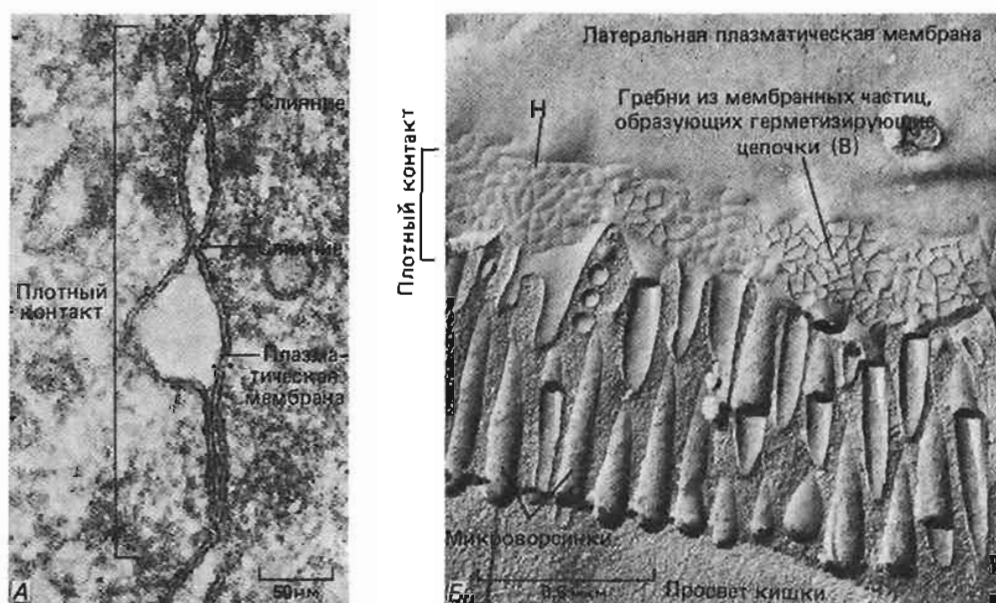
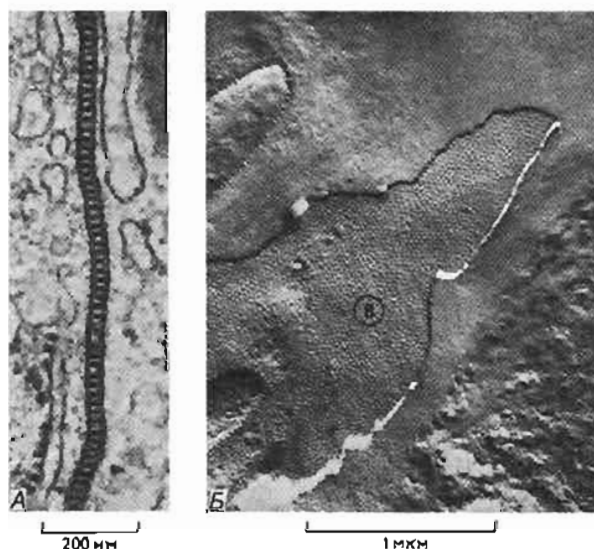


Рис. 12-27. Электронные микрофотографии тонкого среза (А) и скола (Б) плотного контакта между эпителиальными клетками из тонкого кишечника крысы. На срезе контакт виден в поперечном сечении как ряд местных слияний между плазматическими мембранами двух клеток. В случае скола, как всегда при использовании метода замораживания-скалывания, плоскость микрофотографии параллельна поверхности мембраны. Герметизирующие белковые цепочки имеют вид гребней из внутримембранных частиц на внутренней стороне скола (Б) и комплементарных им бороздок — на наружной стороне (А). Обратите внимание, что клетки здесь (Б) ориентированы апикальным концом вниз. [N. B. Gilula. In: Cell Communication (R. P. Cox, ed.), pp. 1-29, New York, Wiley, 1974.]

Рис. 12-28. Электронные микрофотографии тонкого среза (А) и скола (Б) септированного контакта между двумя эпителиальными клетками беспозвоночного (моллюска). Плазматические мембраны смежных клеток соединены регулярно расположенными параллельными рядами белковых частиц. На срезе ряды таких частиц имеют вид электроноплотных поперечных переключателей (септ), а на сколе они видны сбоку как параллельные цепочки внутримембранных частиц, ассоциированных с внутренней (Б) поверхностью скола. [N. B. Gilula. In: Cell Communication (R. P. Cox, ed.), pp. 1-29, New York, Wiley, 1974.]



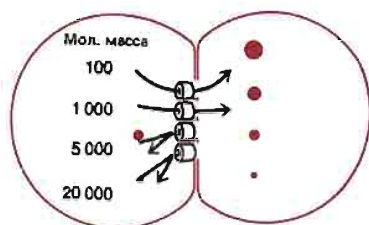


Рис. 12-29. Если в одну из двух клеток, соединенных щелевым контактом, ввести флуоресцирующие молекулы разной величины, то в другую клетку будут переходить только те из них, у которых молекулярная масса не превышает ~1500. Это соответствует эффективной ширине предполагаемого канала около 1,5 нм.



Рис. 12-30. Схематизированное изображение радиоавтографа, демонстрирующего метаболическое сопряжение клеток, связанных щелевыми контактами, в культуре *in vitro*. Мутантные клетки лишены фермента тимидинкиназы и поэтому не могут включать в ДНК радиоактивный тимидин, добавленный в среду. Нормальные клетки способны включать тимидин в ДНК, и их ядра на радиоавтографе усыяны черными точками (зернами серебра). В смешанной культуре нормальных и мутантных клеток метку включают также ядра тех мутантных клеток, которые соприкасаются с нормальными клетками и образуют с ними щелевые контакты. Это обусловлено тем, что в нормальных клетках радиоактивный тимидин включается в низкомолекулярный предшественник ДНК (дезоксиклеозидтрифосфат), который затем через щелевой контакт переходит в мутантную клетку и включается в ДНК.

выявляется сопряжение, удается обнаружить и щелевые контакты. И наоборот, где между клетками позвоночных щелевых контактов нет, там нет и сопряжения. До сих пор, однако, никому не удалось реконструировать функциональные щелевые контакты на искусственной мембране, что необходимо для однозначного подтверждения их предполагаемой роли.

12.2.4. Почему столь многие клетки метаболически и электрически сопряжены с помощью щелевых контактов?

В некоторых тканях роль такого сопряжения очевидна. Например, электрическое сопряжение синхронизирует сокращения клеток сердечной мышцы и клеток гладкой мускулатуры, ответственных за перистальтику кишечника. Аналогичным образом электрические синапсы между нейронами позволяют потенциалам действия быстро распространяться с клетки на клетку без задержки, происходящей в химических синапсах; это дает преимущество в случаях, когда решающее значение имеют быстрота и надежность реакции, например при некоторых реакциях бегства у рыб и насекомых.

Труднее понять, зачем нужны щелевые контакты в тканях, не проявляющих электрической активности. В принципе обмен метаболитами и ионами мог бы служить механизмом координации функций и реакций клеток данной ткани. Например, такая активность эпителиальных слоев, как биение ресничек или сворачивание в трубку при эмбриогенезе (рис. 12-20), могла бы легко координироваться таким путем. До сих пор, однако, не было прямо продемонстрировано, что щелевые контакты играют подобную роль.

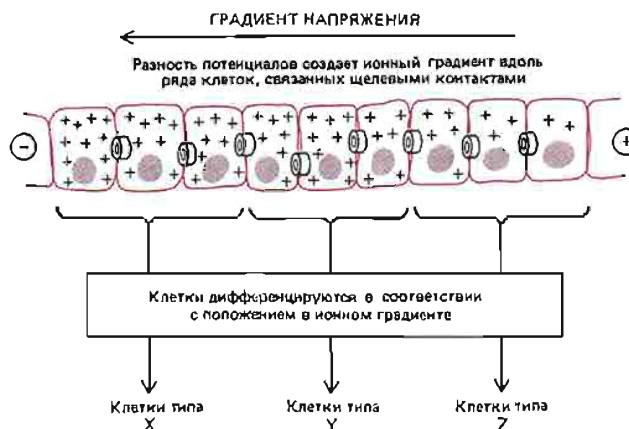
12.2.5. Между многими клетками раннего эмбриона существует ионное сопряжение [9]

Весьма возможно, что сопряжение клеток через щелевые контакты играет важную роль в эмбриогенезе. У раннего эмбриона (у мышинного — начиная с поздней стадии восьми бластомеров) большинство клеток электрически сопряжены друг с другом. Как полагают, в таких эмбрионах метаболическое сопряжение может служить важным способом распределения питательных веществ до того, как разовьется система кровообращения. Например, у зародышей кальмара желточные клетки до начала циркуляции крови связаны со всеми другими клетками, а после начала работы кровеносной системы они остаются сопряженными лишь друг с другом.

В процессе дифференцировки клетки каждого развивающегося органа или ткани обычно утрачивают сопряжение с окружающими тканями. Например, у амфибий клетки нервной трубки при ее замыкании теряют сопряжение с лежащей над ней эктодермой. В некоторых случаях в ходе развития между клетками создается временное сопряжение; оно устанавливается, например, между незрелыми мышечными клетками (миобластами) непосредственно перед их слиянием в многоядерное мышечное волокно. Возможно, что такое временное сопряжение служит одним из механизмов взаимного узнавания клеток в ходе онтогенеза. Согласно этому чисто гипотетическому представлению, клетки способны путем случайного сопряжения «пробовать» друг у друга внутриклеточную среду и разрывать связь с клетками неподходящего «вкуса».

Сопряжение эмбриональных клеток могло бы также служить средством дальнейшей межклеточной сигнализации. Малые молекулы могут переходить через щелевые контакты из участков ткани, где их концентрация поддерживается на высоком уровне, в участки, где поддерживается низкая концентрация. Таким путем может установиться плавный градиент концентрации. Локальное значение концентрации может интерпретироваться клеткой как «информация о положении» и контролировать дифференцировку в соответствии с местом клетки в эмбрионе. Оказалось, например, что у амфибий электрически сопряженные клетки развивающейся нервной пластинки имеют, в зависи-

Рис. 12-31. Градиент напряжения вызывает прохождение тока через щелевые контакты и таким образом создает ионный градиент в сопряженных клетках. Согласно этой чисто гипотетической схеме, ионный градиент позволяет сопряженным клеткам «определять» свое относительное положение в эмбриональной закладке.



мости от положения в пластинке, различный мембранный потенциал. Между участками с разным мембранным потенциалом должен протекать электрический (ионный) ток, создавая в свою очередь вдоль пластинки градиенты концентрации ионов. Любой из этих градиентов мог бы доставлять отдельным клеткам информацию о том, где они находятся и соответственно каким должен быть путь их дальнейшего развития (рис. 12-31).

12.2.6. Возможно, что клетки способны регулировать проницаемость своих щелевых контактов [10]

Экспериментальные воздействия, снижающие рН или повышающие концентрацию свободных ионов Ca^{2+} внутри клеток, быстро (за несколько секунд) и обратимо уменьшают проницаемость щелевых контактов. Хотя все еще не ясно, регулируется ли сопряжение клеток подобными ионными изменениями и в обычных условиях, эти наблюдения позволяют думать, что щелевые контакты представляют собой динамичные структуры, проницаемость которых может контролироваться образующими их клетками.

По крайней мере в одном случае ионный контроль клеточного сопряжения, вероятно, играет решающую роль. При гибели или повреждениях клетки необходимо, чтобы она быстро отсоединилась от своих соседей. Полагают, что это происходит в результате сильного повышения внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция, которые либо входят в клетку через поврежденную плазматическую мембрану, либо накапливаются из-за того, что поврежденная клетка уже не способна эффективно откачивать Ca^{2+} из цитозоля.

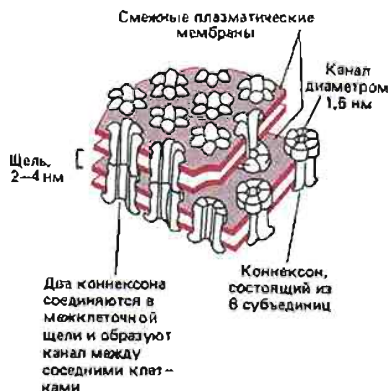


Рис. 12-32. Современное представление о структуре щелевого контакта, основанное на данных электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. Показаны соединенные таким контактом плазматические мембраны двух соседних клеток. Через оба липидных бислоя проходят белковые структуры, называемые «коннексонами»; как полагают, каждый коннексоны состоит из 6 белковых субъединиц. В результате соединения двух коннексонов образуется канал, связывающий одну клетку с другой.

12.2.7. Щелевые контакты состоят из каналов, непосредственно связывающих цитоплазму соседних клеток [6, 11]

Как показано на рис. 12-32, щелевые контакты построены из белков, выступающих из плазматической мембраны и образующих структуры, называемые коннексонами, которые, по-видимому, соединяют цитозоли двух взаимодействующих клеток непрерывным водным каналом. Полагают, что обе клетки образуют коннексоны, каждый из которых представляет собой половину канала. Коннексоны соединены так, что (в отличие от плотных контактов) смежные плазматические мембраны разделены щелью шириной 2–4 нм (отсюда и термин «щелевой контакт»), так что даже сравнительно крупные молекулы могут свободно проходить между ними (рис. 12-33). На электронно-микроскопических препаратах, полученных методом замораживания-скалывания, каждый коннексоны выглядит как внутримембранная частица, и в каждом щелевом контакте можно видеть до нескольких сотен сгущенных коннексонов (рис. 12-34).



Рис. 12-33. Электронная микрофотография тонкого среза щелевого контакта между двумя гепатоцитами (клетками печени) мыши. Щель между обеими плазматическими мембранами заполнена электроноплотным красителем (пропионовым коричневым), добавленным во внеклеточную среду. (С любезного разрешения N. B. Gilula.)

Щелевые контакты удалось выделить из печени крыс благодаря их необычной устойчивости к протеолитическим ферментам и детергентам (рис. 12-35). Судя по результатам анализа таких препаратов, контакты, вероятно, состоят в основном из одного белка с мол. массой около 27 000. Щелевые контакты между диссоциированными клетками *in vitro* образуются за несколько минут (даже в отсутствие синтеза новых белков). Очевидно, в таких случаях происходит самосборка из предсуществующих субъединиц, возможно, диффундирующих в плазматической мембране; их сборку могло бы инициировать связывание с такими же субъединицами близко прилегающей мембраны другой клетки. В культуре клетки позвоночных часто образуют контакты с клетками любых других позвоночных, что говорит о высокой эволюционной консервативности компонентов этих структур.

На рис. 12-36 схематически показаны все разнообразные типы контактов между клетками эпителиального слоя.

Заключение

Плазматические мембраны соседних клеток в различных тканях связаны друг с другом в специализированных участках, называемых клеточными контактами. В большинстве тканей позвоночных имеются три основных типа клеточных контактов: десмосомы, плотные контакты и щелевые контакты. Десмосомы связывают клетки механически — в отдельных местах контакта («точечные» десмосомы) или как непрерывные зоны контакта, опоясывающие

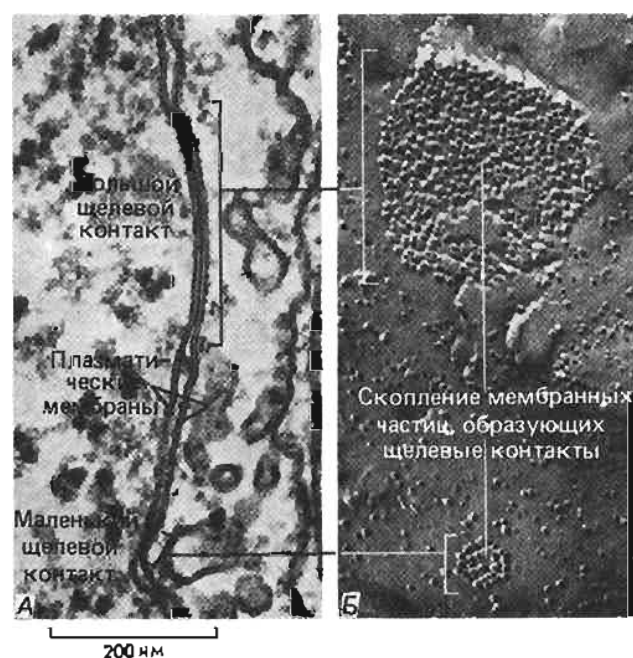


Рис. 12-34. Большой и маленький щелевые контакты между культивируемыми фибробластами. Электронные микрофотографии тонкого среза (А) и препарата, полученного методом замораживания — скалывания (Б). На сколе каждый щелевой контакт выглядит как скопление гомогенных мембранных частиц, ассоциированных исключительно с цитоплазматической стороной скола мембраны. Каждая частица соответствует одному коннексону, показанному на рис. 12-32. [N. B. Gilula. In: Cell Communication (R. P. Cox, ed.), pp. 1-29, New York, Wiley, 1974.]

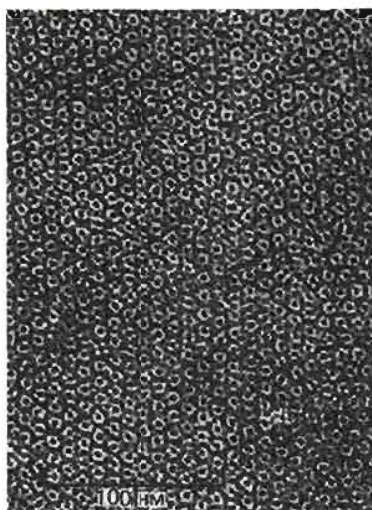


Рис. 12-35. Электронная микрофотография щелевого контакта, выделенного из печени крысы (негативный контраст). Видны организованные в гексагональную решетку коннексоны. Электроплотное центральное отверстие каждого коннексона имеет диаметр около 2 нм. [N. B. Gilula. In: Intercellular Junctions and Synapses (Receptors and Recognition, Series B, Vol. 2, J. Feldman et al., eds), pp. 3-22, London, Chapman and Hall, 1978.]

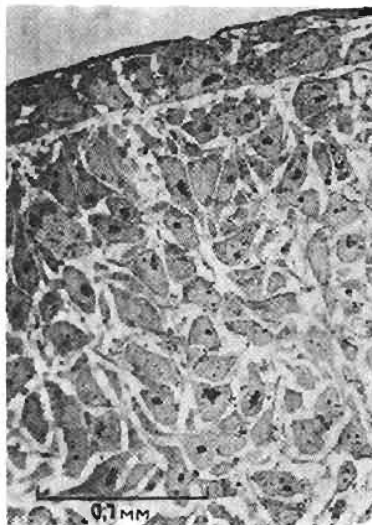


Рис. 12-37. Электронная микрофотография, показывающая при небольшом увеличении клетки, окруженные внеклеточным матриксом (в данном случае это дифференцирующиеся клетки конечности раннего куриного эмбриона). (С любезного разрешения Cheryl Tickle.)

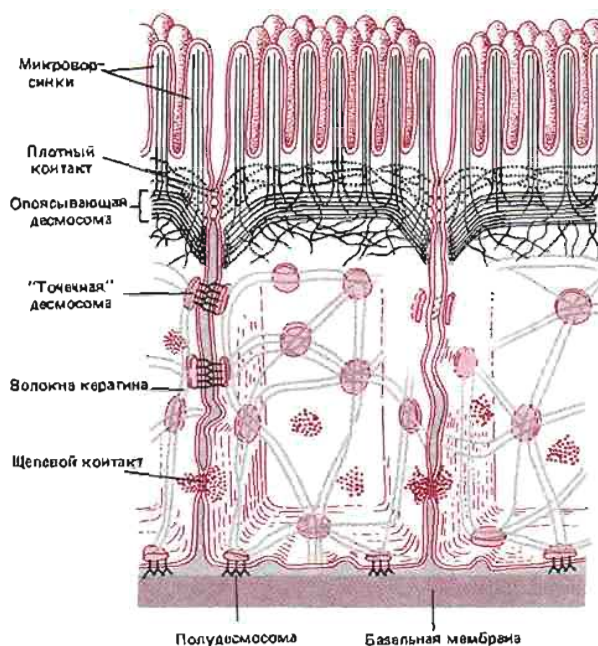


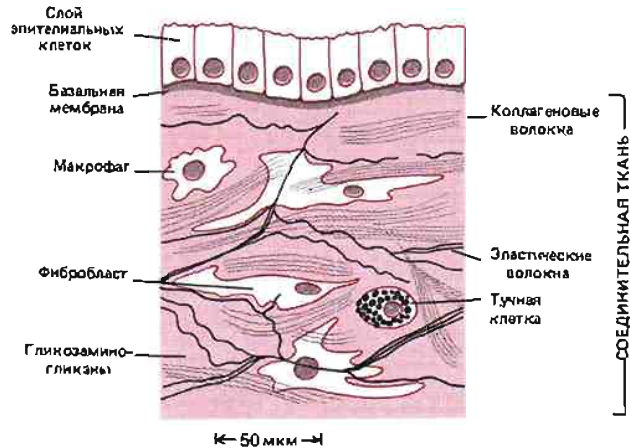
Рис. 12-36. Схема расположения различных контактов между эпителиальными клетками тонкого кишечника.

каждую из клеток эпителиального слоя (опоясывающие десмосомы). Десмосомы обоих типов служат местами прикрепления компонентов цитоскелета. Плотные контакты играют косвенную, но очень важную роль в транспорте малых гидрофильных молекул через слой эпителиальных клеток: во-первых, они настолько плотно «склеивают» плазматические мембраны соседних клеток, что даже малые молекулы не могут просочиться между ними; во-вторых, они препятствуют диффузии специфических транспортных белков из апикальной области в базолатеральную и обратно в липидном бислое плазматических мембран обеих клеток. Щелевые контакты, видимо, образованы группами белковых каналов, которые позволяют веществам и ионам с мол. массой менее примерно 1500 переходить непосредственно из одной клетки в другую. Клетки, соединенные щелевыми контактами, могут свободно обмениваться многими малыми молекулами, и говорят, что между такими клетками существует метаболическое и ионное (электрическое) сопряжение. Щелевые контакты играют очевидную роль в координации работы электрически активных клеток, но до сих пор не ясно, почему клетки многих других типов тоже связаны между собой щелевыми контактами.

12.3. Внеклеточный матрикс [12]

У многоклеточных организмов большинство клеток окружено внеклеточным матриксом—сложной сетью связанных между собой макромолекул (рис. 12-37). В большинстве тканей все эти молекулы—белки и полисахариды—секретируются самими клетками, и во внеклеточном пространстве из них строится упорядоченная сеть. Внеклеточный матрикс служит не только универсальным биологическим «клеем», но и образует высокоспециализированные структуры, такие как хрящ, сухожилия, базальная мембрана и, наконец (при вторичном отложении кристаллов фосфата кальция), кости и зубы. Мы ограничимся рассмотрением внеклеточного матрикса позвоночных, но

Рис. 12-38. Схематическое изображение соединительной ткани, подстилающей слой эпителиальных клеток.



интересные и необычные структуры того же рода есть и у многих других организмов. Например, у бактерий и растений имеются клеточные стенки, у червей и насекомых — кутикула, а у моллюсков — раковины.

До недавнего времени внеклеточный матрикс позвоночных считали сравнительно инертным каркасом, стабилизирующим физическую структуру тканей. Но сейчас стало ясно, что он играет гораздо более активную и сложную роль в регуляции поведения контактирующих с ним клеток — влияет на их развитие, миграцию, пролиферацию, форму и метаболизм. В связи с этим молекулярный состав внеклеточного матрикса достаточно сложен; к сожалению, наши знания о его организации все еще фрагментарны.



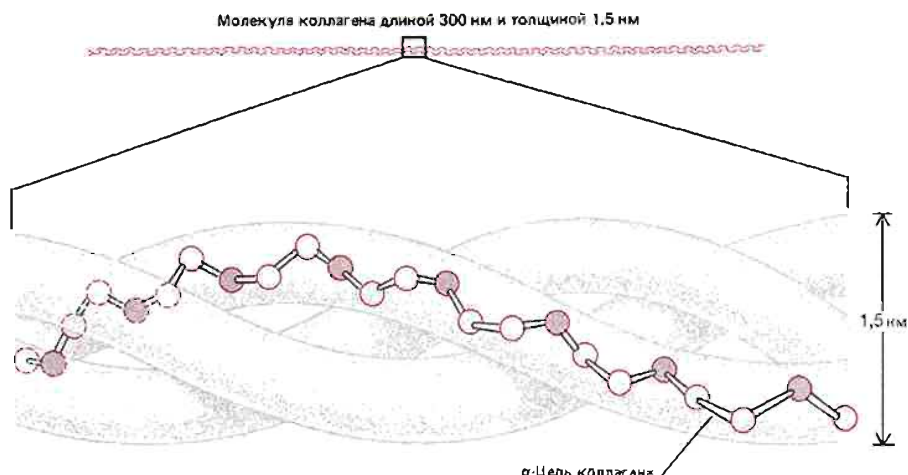
Рис. 12-39. Фибробласты (указаны стрелками) во внеклеточном матриксе рога куриного эмбриона. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Матрикс состоит в основном из коллагеновых фибрилл (в роговиде нет эластических волокон). Гликозаминогликаны, образующие гидратированный гель в пустотах волокнистой сети, при высущивании препарата осели на поверхности коллагеновых волокон (С любезного разрешения Robert Trelstad.)

12.3.1. Внеклеточный матрикс состоит в основном из фибриллярных белковых структур, погруженных в гидратированный полисахаридный гель

Макромолекулы внеклеточного матрикса секретируются находящимися в нем клетками, в особенности многочисленными фибробластами. В специализированных видах матрикса, например в хряще и кости, макромолекулы представляют собой продукт секреции особых клеток; например, хрящ образуют хондробласты, а кость — остеобласты. Два основных класса макромолекул, образующих матрикс, — это 1) *коллагены* и 2) полисахариды из группы *гликозаминогликанов*, которые обычно ковалентно связаны с белком в комплексы — *протеогликаны*. Молекулы гликозаминогликанов и протеогликанов образуют сильно гидратированный гель «основного вещества», в который погружены коллагеновые волокна. Эти длинные волокна укрепляют и упорядочивают матрикс, а водная фаза полисахаридного геля обеспечивает диффузию питательных веществ, метаболитов и гормонов между кровью и клетками ткани. Во многих случаях в матриксе имеются также волокна резиноподобного белка эластина, придающие ему упругость. Кроме того, к основным компонентам внеклеточных матриксов относятся два высокомолекулярных гликопротеина: *фибронектин*, широко распространенный в соединительных тканях (и в крови), и *ламинин*, обнаруженный до сих пор лишь в базальных мембранах. Несомненно, будет открыто еще много других белковых компонентов.

Внеклеточный матрикс с находящимися в нем клетками определенного типа, такими как фибробласты, макрофаги и тучные клетки, часто называют *соединительной тканью* (рис. 12-38 и 12-39). Количество соединительной ткани в различных органах широко варьирует: кожа и кости состоят в основном из соединительной ткани, а в головном и спинном мозге ее почти нет. Относительные количества различных макромолекул и способы их организации в матриксе тоже очень изменчивы, что дает невероятное разнообразие видов

Рис. 12-40. Схема строения молекулы коллагена. Три отдельные спиральные α -цепи скручены в жесткую трехцепочечную спиральную структуру. Каждый третий остаток в каждой α -цепи – глицин (выделен темным цветом); это единственная аминокислота, которая может уместиться в тесной внутренней части тройной спирали. Такую молекулу величиной $300 \times 1,5$ нм принято называть *тропоколлагеном*.



внеклеточного матрикса, каждый из которых отлично приспособлен к функциональным требованиям конкретной ткани. Матрикс может, например, обывествляться, образуя твердые, как камень, структуры костей и зубов, может приобретать почти кристаллическую упорядоченность (прозрачный матрикс роговицы глаза) или образовывать канатовидные коллагеновые волокна сухожилий, которые придают этим тканям огромную прочность при растяжении.

12.3.2. Главный белок внеклеточного матрикса – коллаген [12]

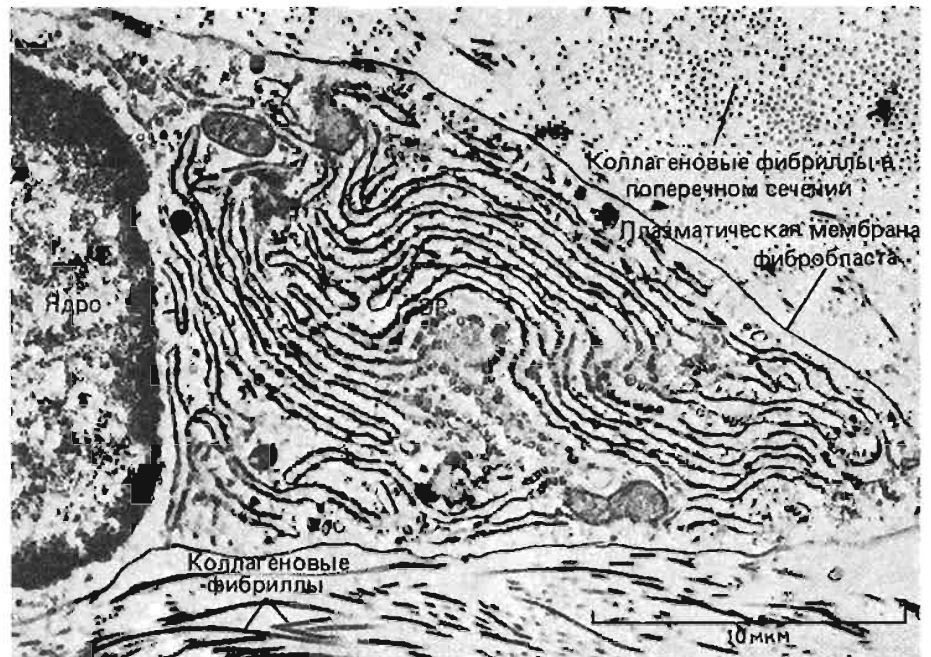
Коллагены – это семейство весьма своеобразных фибриллярных белков; их можно найти у всех многоклеточных животных. У млекопитающих эти белки встречаются чаще любых других и составляют около 25% суммарного белка.

Таблица 12-2. Типы коллагена и их свойства

Тип	Формула ¹	Полимерная форма	Отличительные черты	Местонахождение в организме
I	$[\alpha 1(I)]_2\alpha 2(I)$	Фибрилла	Мало гидроксизина, мало углевода, толстые фибриллы	Кожа, сухожилия, кости, связки, роговица, внутренние органы (составляет 90% всего коллагена организма)
II	$[\alpha 1(II)]_3$	Фибрилла	Много гидроксизина, много углевода, фибриллы тоньше, чем у коллагена типа I	Хрящ, межпозвоночные диски, хорда, стекловидное тело глаза
III	$[\alpha 1(III)]_3$	Фибрилла	Много гидроксипролина, мало гидроксизина, мало углевода	Кожа, кровеносные сосуды, внутренние органы
IV	$[\alpha 1(IV)]_3$ (данные противоречивы)	Базальная мембрана	Очень много гидроксизина, много углевода; видимо, сохраняет концевые пептиды проколлагена	Базальные мембраны
V	$[\alpha 1(V)]_2\alpha 2(V)$	Не известна	Много гидроксизина, много углевода	В небольших количествах встречается во многих тканях

¹ Семь различных α -цепей обозначаются: $\alpha 1(I)$ – $\alpha 1(V)$, $\alpha 2(I)$ и $\alpha 2(V)$.

Рис. 12-41. Электронная микрофотография части фибробласта, окруженного коллагеновыми фибриллами, в соединительной ткани. Сильно развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум (ЭР) фибробласта отражает способность этой клетки к интенсивному синтезу и секреции коллагена и других макромолекул внеклеточного матрикса. (С любезного разрешения Russell Ross.)

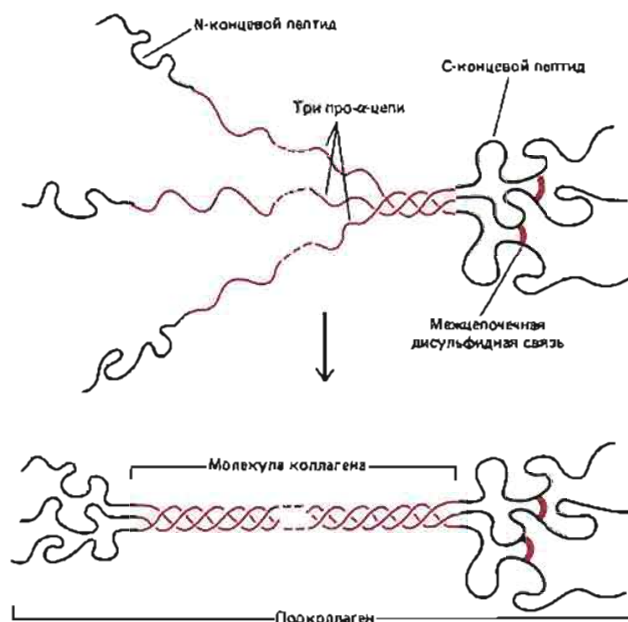


Главная черта всех молекул коллагена – их жесткая трехцепочечная спиральная структура. Три полипептидные цепи коллагена, называемые α -цепями, скручены в одну регулярную спираль наподобие каната и образуют молекулу коллагена длиной около 300 нм и толщиной 1,5 нм (рис. 12-40).

К настоящему времени идентифицированы семь генетически различных α -цепей коллагена, каждая длиной около 1000 аминокислот (табл. 12-2). Хотя в принципе из этих семи α -цепей можно составить более 100 различных типов трехцепочечных молекул, было описано лишь немного типов (менее дюжины). Основные типы обозначаются I, II, III, IV и V (табл. 12-2). Типы I, II и III – главные коллагены соединительных тканей; из них чаще всего встречается тип I, он составляет 90% всего коллагена тела. После секреции во внеклеточное пространство молекулы типов I, II и III образуют упорядоченные полимеры, называемые **коллагеновыми фибриллами**. Это длинные (много микрометров в длину) и тонкие (толщиной от 10 до 300 нм) тяжи, ясно видимые на электронных микрофотографиях (рис. 12-39 и 12-41). Такие фибриллы часто группируются в большие пучки толщиной в несколько микрометров, которые видны уже в обычный микроскоп и называются *коллагеновыми волокнами*. Молекулы типа IV (главный коллаген базальных мембран) и V (его находят в небольших количествах в базальных мембранах и в других местах) не образуют фибрилл, их организация в тканях неясна.

Полипептидные цепи коллагена синтезируются на рибосомах, связанных с мембраной, и выходят в просвет эндоплазматического ретикулума в виде более длинных, чем зрелые цепи, предшественников – про- α -цепей. У этих предшественников имеется не только *сигнальный пептид*, необходимый для того, чтобы «протолкнуть» секретируемый белок через мембрану ретикулума (разд. 7.3.7), но и другие дополнительные участки (*концевые пептиды*) и на аминоконце, и на карбоксильном конце. В просвете эндоплазматического ретикулума каждая про- α -цепь соединяется водородными связями с двумя другими и образует трехцепочечную спиральную молекулу (рис. 12.42). Концевые пептиды, вероятно, нужны для правильного образования тройной спирали, так как сообщалось, что про- α -цепи спонтанно объединяются в тройные спирали *in vitro* при таких условиях, при которых α -цепи не способны к само-

Рис. 12-42. α -Цепи коллагена вначале синтезируются в виде про- α -цепей, содержащих дополнительные концевые пептиды, которые позднее отщепляются. Одна из функций этих концевых пептидов – участие в образовании тройной спирали при сборке молекулы проколлагена. Обратите внимание, что в молекуле проколлагена С-концевые пептиды ковалентно соединены между собой дисульфидными связями.



сборке. Возможно, что концевые пептиды играют также важную роль в упаковке молекул проколлагена вместе с другими молекулами матрикса перед их выведением из клетки.

12.3.3. Полипептидные цепи коллагена необычны по составу и последовательности аминокислот [13]

α -Цепи коллагена исключительно богаты глицином и пролином – обе эти аминокислоты существенны для образования стабильной тройной спирали. Глицин – единственная аминокислота, которая может поместиться внутри такой тесной спиральной структуры; в большинстве участков α -цепи глицин находится в каждом третьем положении. Это наиболее разительный пример гораздо более регулярного характера последовательности аминокислот, чем у типичных глобулярных белков.

Некоторые остатки пролина (и лизина) про- α -цепей гидроксилируются в эндоплазматическом ретикулуме перед образованием трехцепочечной молекулы проколлагена. Остатки гидроксипролина (и гидроксилизина) редко встречаются в других белках. Есть косвенные указания на то, что гидроксилирование групп гидроксипролина образует межцепочечные водородные связи, участвующие в стабилизации тройной спирали. Например, в условиях, препятствующих гидроксилированию пролина (недостаток кислорода, железа или аскорбиновой кислоты – витамина С), спирали проколлагена не образуются. При цинге – заболевании, развивающемся у человека при нехватке витамина С в пище, – негидроксилированные про- α -цепи расщепляются в клетках, что ведет к большой хрупкости кожи и кровеносных сосудов.

Гидроксилирование остатков лизина играет решающую роль во второй посттрансляционной модификации проколлагена. Подобно большинству секретируемых белков, молекулы проколлагена гликозилируются в клетках, перед тем как путем экзоцитоза перейти во внеклеточное пространство. Однако гликозилирование проколлагена необычно в том отношении, что присоединяются короткие (всего два сахарных остатка) олигосахариды, не содержащие сиаловой кислоты, и что они ковалентно связываются с гидроксильной группой гидроксилизина (рис. 12-43). В коллагенах разного типа доля углеводной части весьма различна (табл. 12-2), и ее функция неясна. Дальше

Рис. 12-45. Эта схема объясняет, каким образом ступенчатое расположение молекул коллагена приводит к характерной поперечной исчерченности фибриллы после негативного контрастирования. Поскольку контрастирующее вещество заполняет только промежутки между молекулами, эти промежутки образуют на электронной микрофотографии темные полосы. (Внизу – электронная микрофотография негативно контрастированной фибриллы, любезно предоставленная Robert Nophe.)

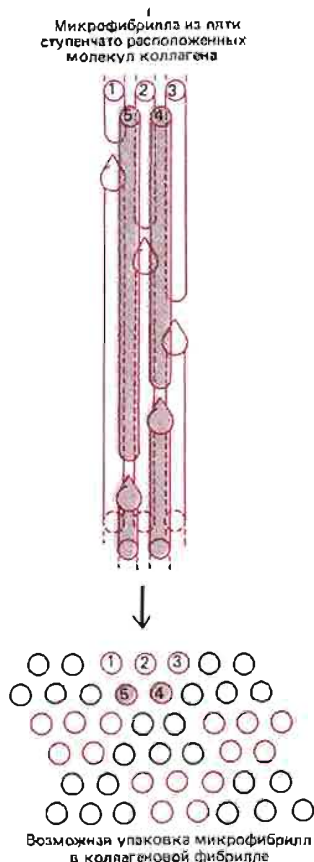
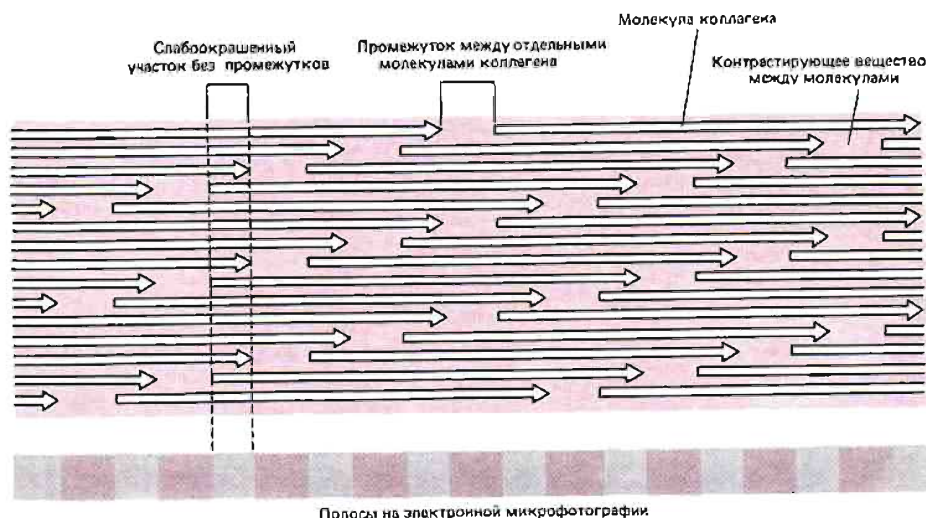
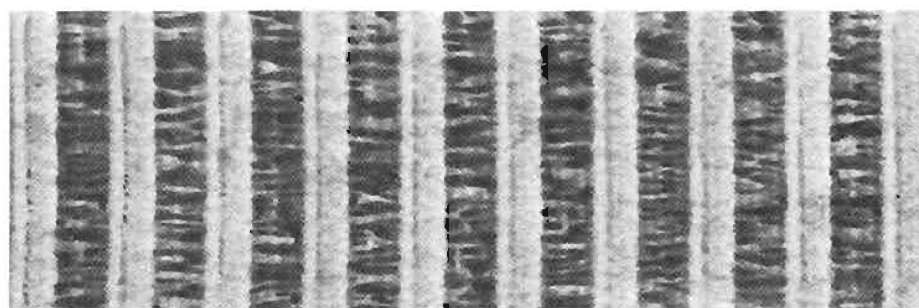


Рис. 12-46. Модель возможного пространственного расположения молекул коллагена в фибрилле. Группы молекул укладываются со сдвигом в 67 нм в длинные микрофибриллы – спирали с пятью молекулами коллагена на виток. Эти микрофибриллы слегка уплотняются, что делает возможной их упорядоченную упаковку в коллагеновую фибриллу. На верхнем рисунке два ближайших к читателю ряда молекул выделены цветом.



от уже выполнивших свою задачу концевых пептидов. При некоторых заболеваниях не происходит полного расщепления проколлагена; в результате нарушается образование коллагеновых фибрилл, и пораженные индивидуумы обладают хрупкой кожей и чрезмерно подвижными суставами. Молекулы проколлагенов типа IV и, возможно, V необычны в том отношении, что, по-видимому, остаются нерасщепленными после секреции. Вероятно, именно поэтому коллагены IV и V не образуют типичных фибрилл.

В электронном микроскопе фиксированные и контрастированные фибриллы коллагена выглядят поперечно исчерченными с периодом 67 нм. Такая картина отражает особенности упаковки отдельных молекул в фибриллу (рис. 12-44). Соседние молекулы смещены относительно друг друга почти на четверть своей длины, т. е. на 67 нм. Предполагается, что такое строение максимально повышает сопротивление всего агрегата растягивающим нагрузкам. На рис. 12-45 показано, как получаются полосы на негативно контрастированных препаратах фибрилл.

Двумерное расположение молекул коллагена со сдвигом 67 нм (рис. 12-44) не вызывает сомнений. Менее ясен вопрос о трехмерной упаковке молекул в цилиндрической фибрилле. Привлекательна модель, в которой группы молекул коллагена сначала образуют (связываясь между собой со сдвигом 67 нм) длинные и тонкие спиральные субъединицы (микрофибриллы) с пятью молекулами на каждый виток спирали. Такие цилиндрические микрофибриллы в свою очередь регулярным образом упаковываются в значительно более толстые коллагеновые фибриллы и при этом несколько уплотняются (рис. 12-46). С этой моделью согласуется тот факт, что на промежуточных этапах формирования коллагеновых фибрилл *in vitro* появляются тонкие волокна.

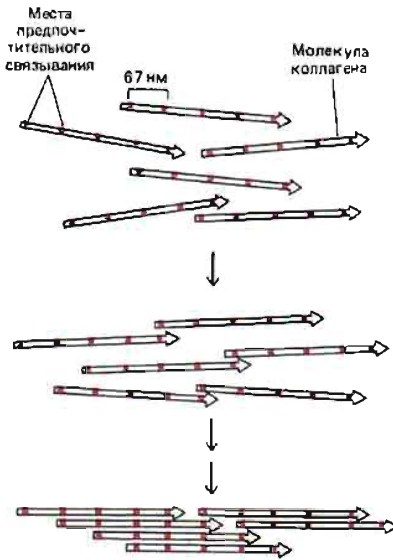


Рис. 12-47. Весьма упрощенная схема, показывающая, как периодическое расположение заряженных и гидрофобных аминокислот по длине молекулы коллагена определяет упаковку молекул в фибрилле. Так как эти остатки (названные здесь «местами предпочтительного связывания») образуют группы, повторяющиеся с периодом около 67 нм, ступенчатое расположение со сдвигом на 67 нм максимизирует число возможных электростатических и гидрофобных связей между молекулами.

Поскольку для сборки фибрилл из молекул коллагена *in vitro* не нужны никакие другие белки, вся необходимая для этого процесса информация должна содержаться в аминокислотной последовательности α -цепей. В то время как остатки пролина, гидроксипролина и глицина ответственны в основном за образование тройной спирали, боковые цепи остальных аминокислот нужны, как полагают, главным образом для построения фибрилл. В самом деле, анализ аминокислотных последовательностей α -цепей с помощью ЭВМ показал, что 1) заряженные и незаряженные остатки группируются вдоль цепи с периодом около 67 нм (что соответствует примерно 234 аминокислотным остаткам); 2) наибольшее число электростатических и водородных связей между двумя α -цепями может образоваться при относительных сдвигах, кратных 67 нм (рис. 12-47).

Чем определяются толщина коллагеновых фибрилл и их расположение в тканях? В пробирке молекулы коллагенов I, II и III образуют фибриллы толщиной около 50 нм. Однако в живых организмах молекулы коллагена одного и того же типа образуют фибриллы разной толщины, от 10 до 300 нм, в зависимости от ткани. Это наводит на мысль, что толщину волокон регулируют какие-то другие компоненты внеклеточного матрикса. Хотя было показано, что с коллагеном связываются различные макромолекулы матрикса, секретируемые вместе с ним, например гликозаминогликаны и фибронектин, неясно, как это может влиять на образование фибрилл.

Неясно также, чем определяется общая организация системы коллагеновых фибрилл в различных тканях. В коже млекопитающих фибриллы кажутся расположенными случайным образом. В отличие от этого в сухожилиях они собраны в параллельные пучки, которые для максимальной прочности уложены по направлению основной нагрузки на сухожилие. А в коже головастика и в роговице цыпленка коллагеновые фибриллы образуют упорядоченные слои, в каждом из которых они лежат параллельно друг другу, но почти перпендикулярно к фибриллам смежных слоев (рис. 12-48). Такая кристаллоподобная организация фибрилл необходима для прочности и для прозрачности, но неясно, как она достигается. В дальнейшем мы увидим, что ориентацию элементов внеклеточного матрикса, вероятно, определяет (по крайней мере отчасти) ориентация цитоскелета клеток, секретирующих макромолекулы матрикса.

12.3.5. Образовавшиеся коллагеновые фибриллы значительно укрепляются ковалентными сшивками [12, 14]

В коллагеновых фибриллах, сформировавшихся во внеклеточном пространстве, образуются межмолекулярные и внутримолекулярные сшивки, что делает фибриллу намного более прочной (рис. 12-49).

Если блокировать такое сшивание, содержащие коллаген ткани становятся хрупкими и такие структуры, как кожа, сухожилия и кровеносные сосуды, легко разрываются. Ковалентные сшивки подобного типа встречаются только в коллагене и эластине и образуются в несколько этапов. Сначала внеклеточный фермент лизилоксидаза дезаминирует определенные остатки лизина и гидроксизина, что ведет к образованию высокоактивных альдегидных групп. Затем эти группы образуют ковалентные связи между собой или с другими остатками лизина и гидроксизина. Некоторые из таких связей сравнительно нестабильны и в конце концов видоизменяются с образованием более

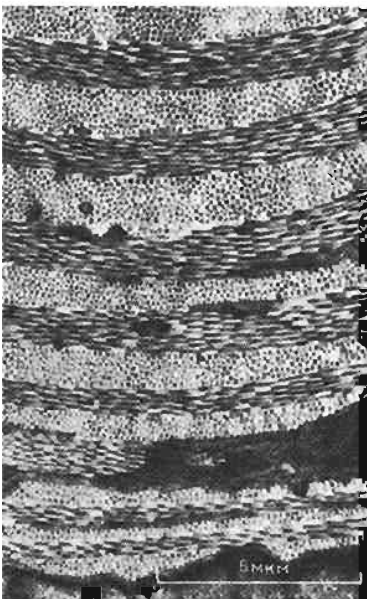


Рис. 12-48. Электронная микрофотография поперечного среза кожи головастика. Видно, что слои коллагеновых фибрилл, подобно слоям дерева в фанере, уложены так, что фибриллы соседних слоев пересекаются под прямыми углами. Подобная укладка, встречающаяся также в роговице, обеспечивает прочность и прозрачность. (С любезного разрешения Jerome Gross.)

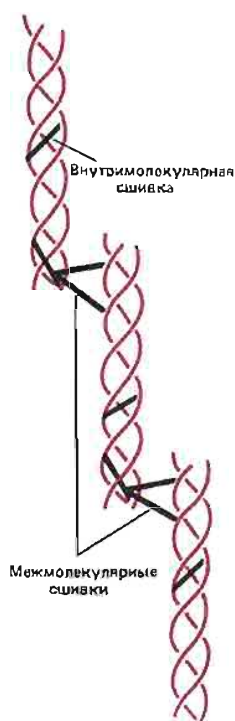


Рис. 12-49. Схема внутримолекулярных и межмолекулярных ковалентных сшивок, образуемых модифицируемыми боковыми цепями лизина в коллагеновой фибрилле.

Рис. 12-50. Схема различных внутриклеточных и внеклеточных событий при образовании коллагеновой фибриллы. Хотя здесь показано, что отщепление концевых пептидов и образование фибриллы происходит после секреции, некоторые данные указывают на то, что отщепление аминоконцевых пептидов и некоторая агрегация молекул коллагена могут происходить непосредственно перед выходом их из клетки. Более крупные агрегаты коллагеновых молекул стабилизируются ковалентными сшивками (на схеме это не показано). В качестве примера упорядоченной укладки фибрилл во внеклеточном пространстве показана сборка большого коллагенового волокна, видимого в световой микроскоп. ЭР—эндоплазматический ретикулум.

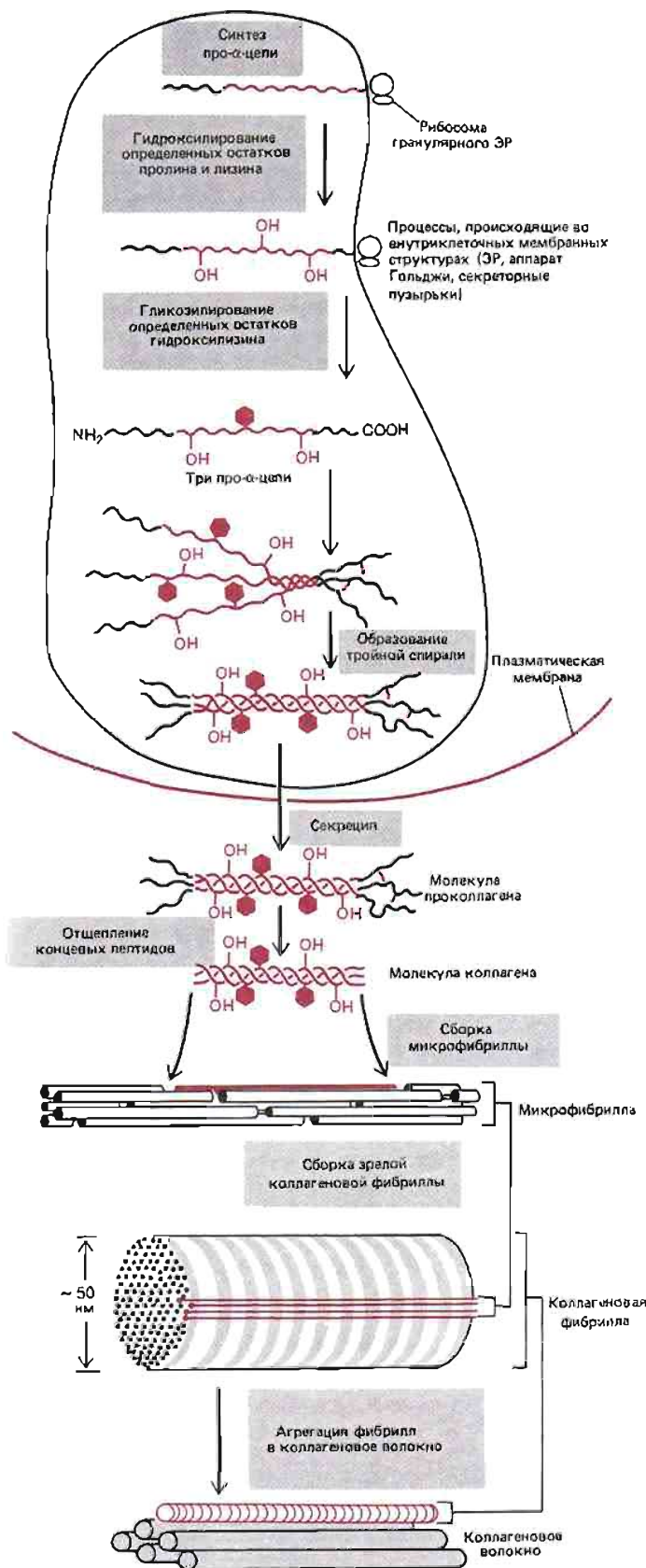


Рис. 12-51. Микрофотография развитой сети эластических волокон в коже человека, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Для удаления коллагена и гликозаминогликанов ткань нагревали под давлением. (T. Tsuji et al., J. Microscop., 115, 165–173, 1978.)

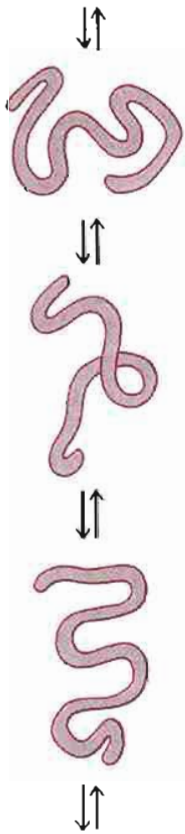
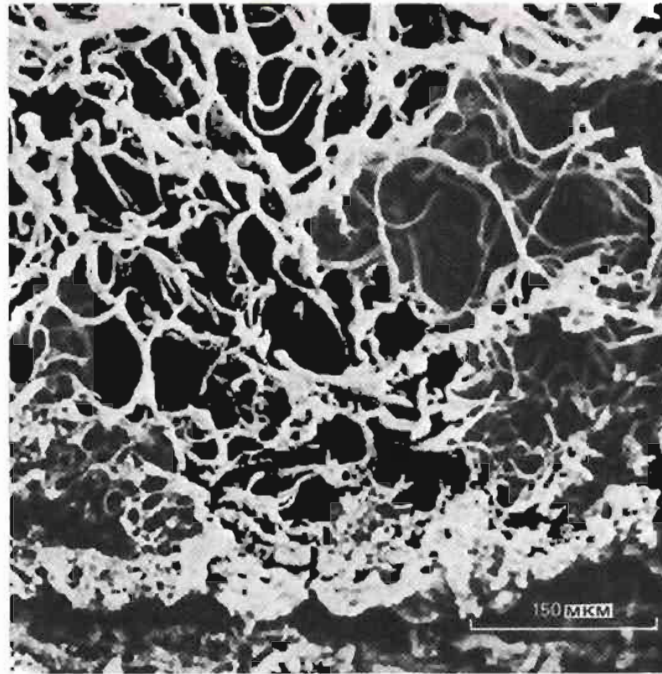


Рис. 12-52. Схема различных случайных конформаций молекулы эластина. В отличие от большинства белков эластина не приобретает определенной характерной для него третичной структуры; его цепь может переходить от одной частично развернутой случайной конформации к другой, третьей и т. д.

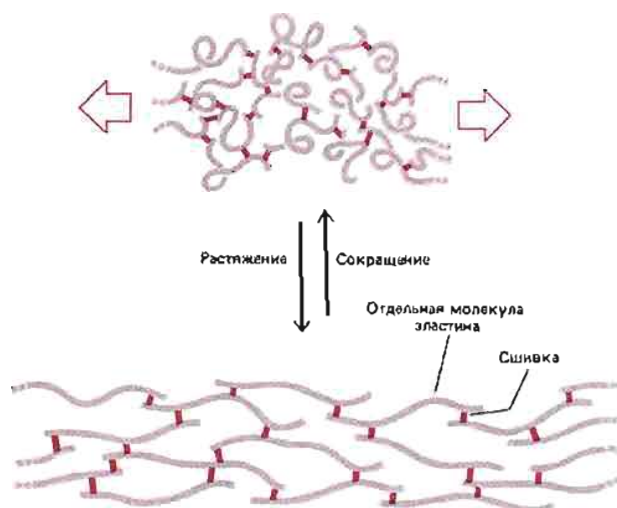
прочных шпиков. Степень сшивания и тип сшивок варьируют от ткани к ткани. Например, в коллагене ахиллова сухожилия сшивок особенно много, так как для этой структуры важна большая прочность.

Теперь нам ясны некоторые способы, с помощью которых секретирующие коллаген клетки могут привести структуру коллагенового компонента внеклеточного матрикса в соответствие с нуждами ткани. Клетки способны синтезировать один или несколько генетически различающихся типов молекул коллагена, а также модифицировать молекулы каждого из этих типов путем посттрансляционного гидроксилирования и гликозилирования в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи. После секреции во внеклеточное пространство молекулы коллагена объединяются в фибриллы, которые в зависимости от требуемой прочности могут быть ковалентно сшиты в большей или меньшей степени. По-видимому, клетки определяют геометрию и свойства фибрилл окружающего матрикса, выделяя вместе с коллагеном различные количества разного рода неколлагеновых молекул. Наконец, мы увидим, что ориентированные клетки могут откладывать ориентированный матрикс, инициируя на своей поверхности сборку фибрилл. Различные этапы построения коллагеновых структур схематически представлены на рис. 12-50.

12.3.6. Эластин, придающий тканям упругость, образован поперечно сшитыми полипептидными цепями с изменчивой случайной конформацией [15]

Некоторые ткани, например кожа, кровеносные сосуды и легкие, должны быть не только прочными, но и эластичными. Обширная сеть эластических волокон внеклеточного матрикса придает этим тканям необходимую им способность сжиматься после временного растяжения (рис. 12-51). Основной компонент таких волокон — эластин — гликопротеин с мол. массой 70 000, который, подобно коллагену, необычайно богат пролином и глицином, но в отличие от коллагена содержит очень мало гидроксипролина и совсем не содержит гидроксизина. Детали синтеза и созревания эластина еще мало изучены. Молекулы эластина секретируются во внеклеточное пространство, где образуют волокна и слои, в которых отдельные молекулы связаны мно-

Рис. 12-53. Молекулы эластина связаны ковалентными сшивками в обширную сеть. Поскольку каждая молекула в этой сети способна растягиваться и сжиматься, вся сеть тоже может сжиматься и растягиваться, подобно куску резины.



жеством сшивок в разветвленную сеть. Функция эластина (в отличие от функций большинства других белков) требует того, чтобы его пептидные цепи сохраняли гибкую случайную конформацию (рис. 12-52). Именно такая структура, состоящая из сшитых друг с другом неупорядоченных цепочек, позволяет всей сети волокон растягиваться и сжиматься, подобно резиновой ленте (рис. 12-53). Вплетенные в сеть эластических волокон жесткие коллагеновые фибриллы ограничивают растяжимость всей сети и тем самым предотвращают разрыв ткани.

Эластические волокна состоят не только из эластина, их поверхность обычно покрыта микрофибриллами гликопротеина. В развивающихся эластичных тканях эти микрофибриллы часто появляются раньше самого эластина, и возможно, что они организуют секретлируемые клетками молекулы эластина в слои и волокна.

12.3.7. Важными компонентами внеклеточного матрикса являются протеогликаны и гиалуроновая кислота [16]

Гликозаминогликаны, которые раньше называли мукополисахаридами, — это длинные неразветвленные полисахаридные цепи, состоящие из повторяющихся дисахаридных звеньев. Гликозаминогликанами их называют теперь потому, что один из двух остатков в повторяющемся дисахариде — это всегда аминосахар (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин). Наличие у многих сахарных остатков сульфатных или карбоксильных групп (или тех и других) придает гликозаминогликанам большой отрицательный заряд (рис. 12-54). По

Рис. 12-54. Повторяющаяся дисахаридная единица гликозаминогликановой цепи дерматансульфата. Обратите внимание на высокую плотность отрицательных зарядов, обусловленную присутствием карбоксильных и сульфатных групп.

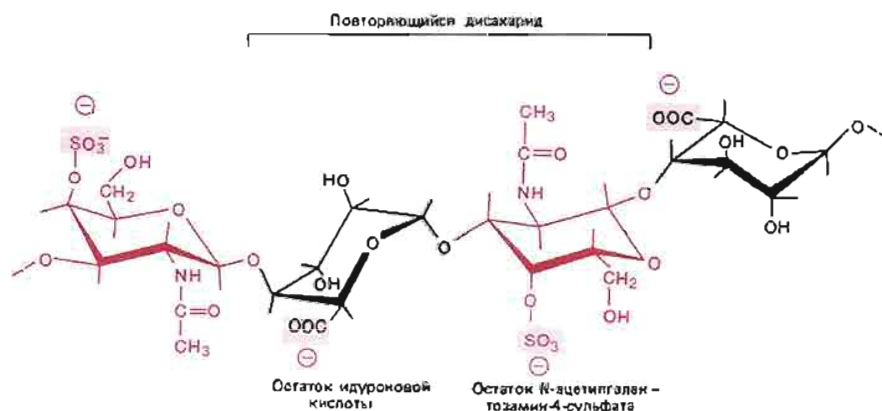


Таблица 12-3. Гликозаминогликаны

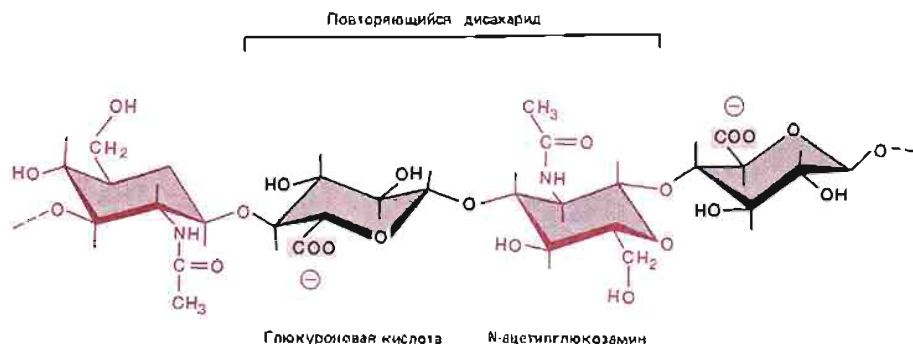
Гликозаминогликан	Мол. масса	Повторяющийся дисахарид (А-В) _n		Число сульфогрупп на дисахарид	Связь с белком	Другие сахара	Распределение в организме
		Остаток А	Остаток В				
Гиалуроновая кислота	4000–8 · 10 ⁶	D-глюкуроновая кислота	N-ацетилглюкозамин	0	—	0	Различные соединительные ткани, кожа, стекловидное тело, хрящ, синовиальная жидкость
Хондритин-4-сульфат	5000–50 000		N-ацетил-D-галактозамин	0,2–1,0	+	D-галактоза, D-ксилоза	Хрящ, роговица, кости, кожа, артерии
Хондритин-6-сульфат	5000–50 000			0,2–2,3	+		Роговица, кости, кожа, артерии
Дерматан-сульфат	15 000–40 000	D-глюкуроновая кислота или L-идуроновая кислота ¹		1,0–2,0	+		Кожа, кровеносные сосуды, сердце, сердечные клапаны
Гепарансульфат	5000–12 000		N-ацетилглюкозамин	0,2–3,0	+		Легкие, артерии, поверхность клеток
Гепарин	6000–25 000			2,0–3,0	+		Легкие, печень, кожа, тучные клетки
Кератансульфат	4000–19 000	D-галактоза	»	0,9–1,8	+	D-галактозамин, D-манноза, L-фукоза, сialовая кислота	Хрящ, роговица, межпозвоночные диски

¹ L-идуроновая кислота – продукт эпимеризации D-глюкуроновой кислоты по месту присоединения карбоксильной группы.

типу сахарных остатков, типу связей между ними, а также числу и положению сульфогрупп различают семь групп гликозаминогликанов; это гиалуроновая кислота (единственная группа с несulfатированными сахарами), хондритин-4-сульфат, хондритин-6-сульфат, дерматансульфат, гепарансульфат, гепарин и кератансульфат (табл. 12-3).

Гиалуроновая кислота (гиалуронат) – это одиночные очень длинные полисахаридные цепи, содержащие несколько тысяч регулярно повторяющихся дисахаридных звеньев (рис. 12-55). Однако гиалуроновая кислота не типичный представитель гликозаминогликанов. Другие нередко содержат несколько различных дисахаридных звеньев, образующих более сложные последовательности. Кроме того, цепи других гликозаминогликанов гораздо короче, в них менее 300 сахарных остатков. И наконец, все другие гликозаминогликаны ковалентно связаны с белком и образуют молекулы протеогликанов (которые раньше называли мукопротеинами). Подобно коллагену, гликозаминогликаны

Рис. 12-55. Повторяющийся дисахарид гялурановой кислоты, которая состоит из очень длинной цепи—до нескольких тысяч сахарных остатков. Обратите внимание на отсутствие сульфатных групп.

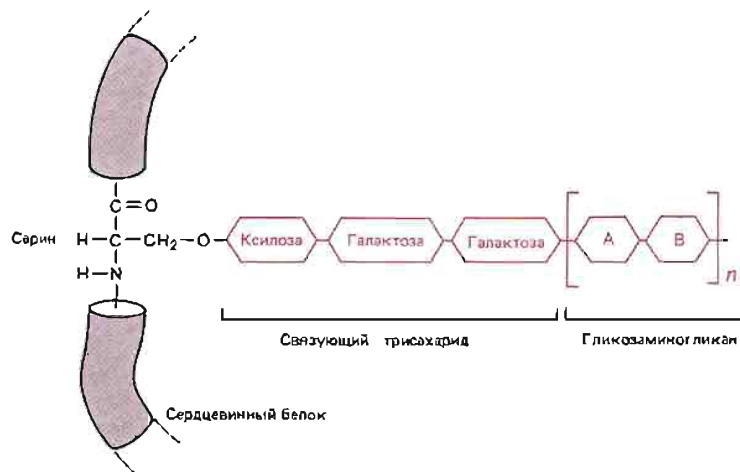


перед секретией подвергаются модификации. Полисахаридные цепи, образовавшиеся путем последовательного добавления моно- или дисахаридных звеньев, модифицируются в аппарате Гольджи в результате ряда координированных реакций сульфатирования и эпимеризации (при эпимеризации изменяется конфигурация функциональных групп вокруг одного из атомов углерода в молекуле сахара). В конце концов, перед тем как покинуть клетку, соответствующие гликозаминогликаны ковалентно связываются с сериновыми остатками **сердцевинного белка** и образуют молекулу **протеогликана** (рис. 12-56).

Протеогликаны сильно отличаются от типичных гликопротеинов. В гликопротеинах углеводный компонент обычно составляет от 1% до 60% массы и представлен многочисленными сравнительно короткими (как правило, менее 15 сахарных остатков) разветвленными олигосахаридами варьирующего состава, которые часто имеют на конце сиаловую кислоту (разд. 6.3.2). В отличие от этого молекулы протеогликанов значительно больше (мол. масса достигает миллионов дальтон), а их углеводный компонент в виде множества длинных неразветвленных цепей гликозаминогликана, обычно не содержащих сиаловой кислоты, составляет 90–95% всей массы. Например, в типичной молекуле протеогликана из хряща может быть около сотни цепей хондроитинсульфата и около 60 цепей кератансульфата, присоединенных к богатому серином **сердцевинному белку** длиной около 1900 аминокислот (т.е. одна цепь гликозаминогликана приходится примерно на 12 аминокислот; рис. 12-57).

В принципе строение протеогликанов допускает почти неограниченное разнообразие. Молекулы могут различаться по величине, содержанию белка, числу и типу гликозаминогликановых цепей. Кроме того, хотя для структуры гликозаминогликанов всегда характерно повторение дисахаридного звена, длина и состав цепей могут быть весьма различными; это относится и к про-

Рис. 12-56. Схема соединения гликозаминогликановой цепи с серином **сердцевинного белка** в молекуле **протеогликана**. К серину присоединен специальный «связующий трисахарид», находящийся на конце цепи гликозаминогликана; остальная часть этой цепи состоит в основном из повторяющихся дисахаридных единиц (состоящих в свою очередь из двух моносахаридов А и В, приведенных в табл. 12-3).



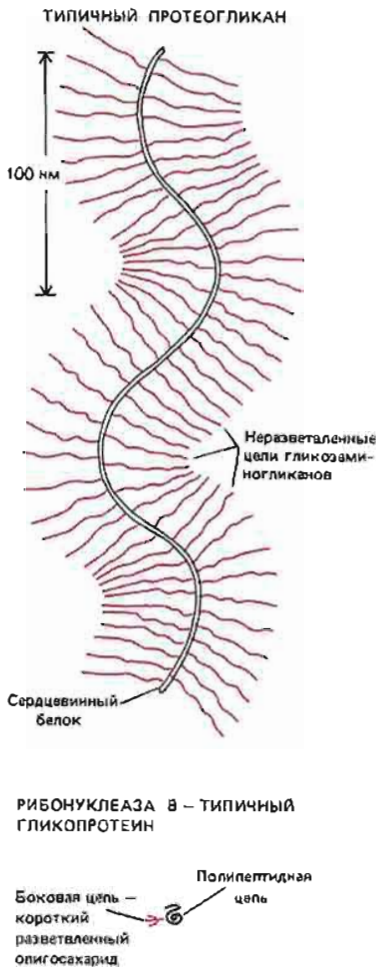


Рис. 12-57. Схематическое изображение типичной молекулы протеогликана, состоящей из множества гликозаминогликановых цепей, ковалентно связанных с сердцевинным белком. В одной молекуле протеогликана часто находят гликозаминогликановые цепи разных типов. Внизу для сравнения в том же масштабе изображена молекула типичного гликопротеина (панкреатической рибонуклеазы В).

странственному расположению гидроксильных, сульфатных и карбоксильных групп вдоль цепи. Хотелось бы думать, что по мере накопления знаний о принципах синтеза и сборки молекул протеогликанов эта безнадежно запутанная картина проявится.

12.3.8. Цепи гликозаминогликанов занимают очень много места и образуют гидратированные гели [16, 17]

Полисахаридные цепи недостаточно гибки, чтобы, подобно многим полипептидным цепям, складываться в компактные глобулярные структуры. Таким образом, цепи гликозаминогликанов стремятся принять конформацию очень рыхлого случайного клубка и занимают огромный для своей массы объем (рис. 12-58). Будучи гидрофильными, они притягивают большое количество воды и даже в очень низких концентрациях образуют гидратированный гель. Эту тенденцию еще более усиливает высокая плотность отрицательных зарядов, которые притягивают осмотически активные катионы. Такая способность гликозаминогликанов притягивать воду создает во внеклеточном матриксе «давление набухания» (тургор), противодействующее сжатию (в то время как коллагеновые фибриллы, напротив, противодействуют растягивающим силам).

Благодаря своей рыхлой укладке и высокой степени гидратации цепи гликозаминогликанов не мешают быстрой диффузии водорастворимых молекул, а также перемещению клеток и их отростков. Они эффективно заполняют межклеточное пространство, несмотря на то что составляют в соединительной ткани меньше 10% от количества фибриллярных белков (коллагена и эластина).

Появляется все больше данных о специальной функции гиалуроновой кислоты в тканях, через которые происходит миграция клеток при заживлении ран и в процессах развития. Гиалуроновая кислота образуется в таких тканях в больших количествах, а ее разрушение ферментом *гиалуронидазой* сопровождается прекращением миграции клеток. Подобные корреляции были обнаружены в разнообразных тканях, и они позволяют предполагать, что локальное увеличение синтеза гиалуроновой кислоты, притягивающей воду и тем самым вызывающей набухание матрикса, может служить общей стратегией облегчения миграции клеток при морфогенезе и регенерации.

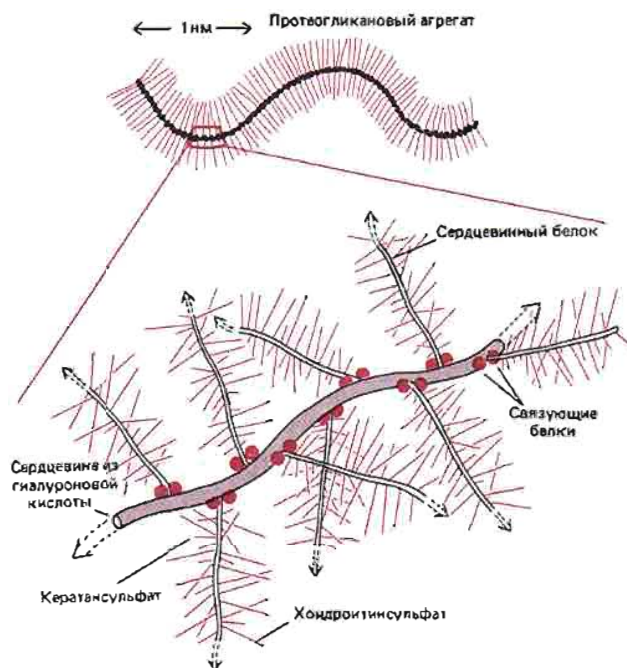
12.3.9. Цепи гликозаминогликанов могут располагаться во внеклеточном матриксе высокоупорядоченным образом [16]

Ввиду структурной гетерогенности молекул протеогликанов кажется маловероятным, чтобы их роль сводилась к созданию гидратированного пространства вокруг клеток и между ними. Не исключено, например, что протеогликианы могут образовывать гели с различным размером пор и разной плотностью зарядов и, таким образом, служить фильтрами, регулирующими движение молекул и клеток в соответствии с их размерами и/или зарядом. Судя по некоторым данным, они выполняют эту функцию в базальной мем-



Рис. 12-58. Относительные объемы различных белков, гликогенной гравулы и гидратированной молекулы гиалуроновой кислоты с мол. массой около $8 \cdot 10^6$.

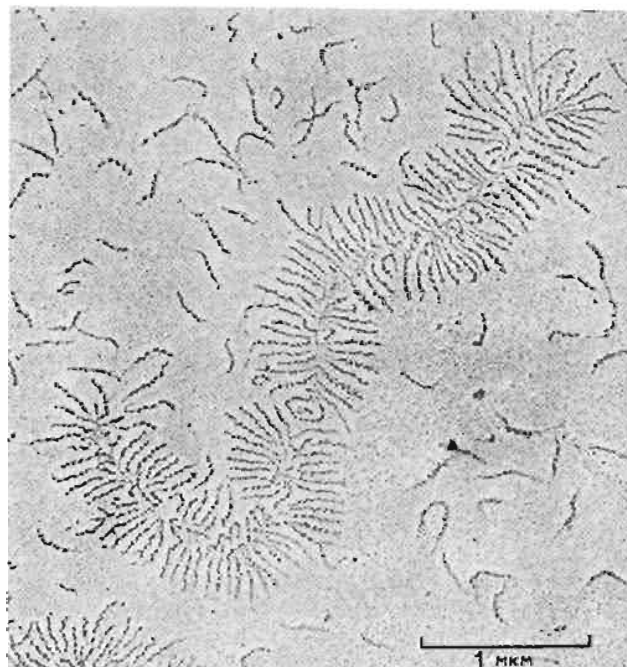
Рис. 12-59. Схема гигантского агрегата протеогликанов (из хряща), состоящего примерно из сотни протеогликановых молекул (вроде изображенной на рис. 12-57), нековалентно присоединенных с помощью двух специальных связующих белков к цепи гиалуроновой кислоты. Молекулярная масса такого комплекса может превышать 10^8 , а занимаемый объем равен объему бактериальной клетки.



бране почечных клубочков, фильтрующей молекулы из кровотока в мочу (см. ниже). Подобные функции требуют высокой упорядоченности цепей гликозаминогликана в матриксе.

Способ организации гликозаминогликанов и протеогликанов во внеклеточном матриксе в значительной части неизвестен. Некоторые из этих молекул могут специфически связываться друг с другом и с другими макромолекулярными компонентами матрикса, например с коллагеном, эластином и фибронектином, и мало вероятно, чтобы такие взаимодействия не играли существенной роли в упорядочении матрикса. Есть протеогликаны, образу-

Рис. 12-60. Электронная микрофотография агрегата протеогликанов из эмбрионального хряща коровы. Агрегат того же типа, что и представленный на рис. 12-59. (Препарат, оттененный платиной; фото любезно предоставлено Lawrence Rosenberg.)



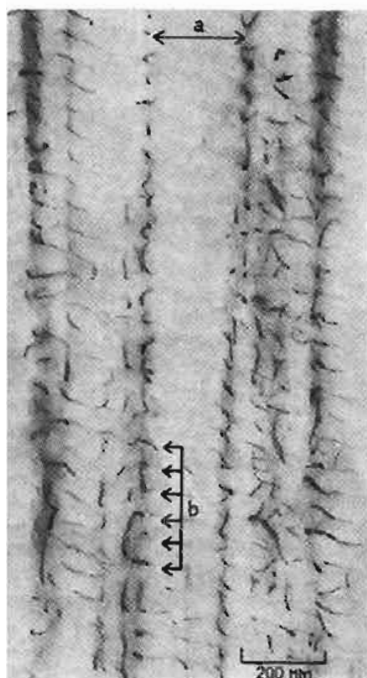


Рис. 12-61. Электронная микрофотография продольного среза сухожилия из хвоста крысы. Препарат контрастирован медьсодержащим красителем для выявления молекул протеогликанов. Протеогликаны образуют сеть волокон, окружающих фибриллы коллагена. В тех местах, где не видно протеогликановых нитей, пересекающих коллагеновые фибриллы (как в случае фибриллы, толщина которой показана двойной стрелкой *a*), плоскость среза, видимо, прошла через середину фибриллы. Тот факт, что протеогликановые нити пересекают коллагеновые фибриллы с интервалами около 67 нм (см., например, нити, показанные стрелками *b*), указывает на специфическое взаимодействие молекул коллагена и протеогликанов. (J. E. Scott, *Biochem. J.*, 187, 887–891, 1980.)

щие большие агрегаты за счет нековалентного взаимодействия их сердцевинного белка с гиалуроновой кислотой. В некоторых случаях с одной цепью гиалуроновой кислоты связывается до сотни мономеров протеогликана; в результате получается огромный комплекс с мол. массой в 100 млн. и больше, занимающий объем, равный объему бактерии (рис. 12-59 и 12-60).

В ряде случаев расположение протеогликанов в ткани можно выявить с помощью электронного микроскопа, так как цепи гликозаминогликанов избирательно связывают некоторые электроноплотные тяжелые металлы. Например, протеогликаны в сухожилии из хвоста крысы выглядят при этом как нитевидные структуры, расположенные между коллагеновыми фибриллами или перпендикулярно им. Любопытно, что они пересекают коллагеновые фибриллы с интервалами в 67 нм, что соответствует структурной периодичности самих фибрилл (рис. 12-61). Такого рода упорядоченное расположение протеогликанов, вероятно, нередко встречается во внеклеточном матриксе. Разнообразие молекул коллагенов и протеогликанов позволяет в принципе образовывать множество различных трехмерных структур.

Цепи полисахаридов, в отличие от большинства полипептидов, не сворачиваются в глобулы, но некоторые из них самопроизвольно объединяются в высокоупорядоченные спиральные и лентовидные структуры. Например, у высших растений микрофибриллярный компонент клеточных стенок образован цепями целлюлозы (полиглюкозы), уложенными в кристаллоподобном порядке рядами плоских слоев (рис. 12-62; см. также разд. 19.1.1). Кроме того, было показано, что цепи двух разных полисахаридов могут специфически взаимодействовать, образуя спиральные агрегаты с вполне определенной регулярной структурой (рис. 12-63). Цепи гликозаминогликанов сами могут принимать разнообразные спиральные конформации. В матриксе возможно и прямое взаимодействие полисахаридов друг с другом, вроде представленного на рис. 12.63.

Ввиду разнообразия структуры и функций внеклеточного матрикса кажется вполне вероятным, что конформации молекул протеогликанов могут быть столь же многообразны, как их химическое строение. Если это так, то мы в лучшем случае еще только начинаем понимать структуру протеогликанов.

12.3.10. Фибронектин – гликопротеид внеклеточного матрикса, способствующий клеточной адгезии [18]

До недавнего времени гликопротеины внеклеточного матрикса (за исключением коллагена) не привлекали к себе особого внимания. Тем не менее уже многое известно о фибронектине – образующем волокна гликопротеине, который состоит из двух субъединиц с мол. массой 220 000 каждая, соединенных дисульфидной связью (рис. 12-64). Углеводный компонент составляет в нем около 5% по весу. Фибронектин образует во внеклеточном пространстве крупные агрегаты. Большая часть белка непосредственно с клетками не соединена, но определенная его доля бывает связана с поверхностью фибробла-

Рис. 12-62. Схема организации молекул целлюлозы в клеточной стенке высшего растения. Микрофибриллы целлюлозы сшиты между собой другими полисахаридами и белками, не показанными на этом рисунке.

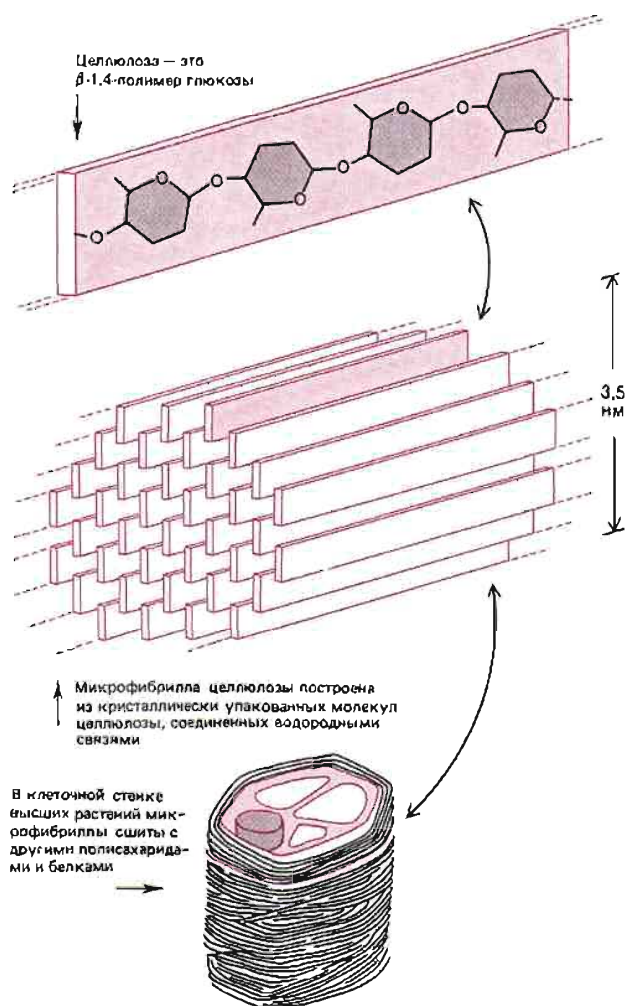
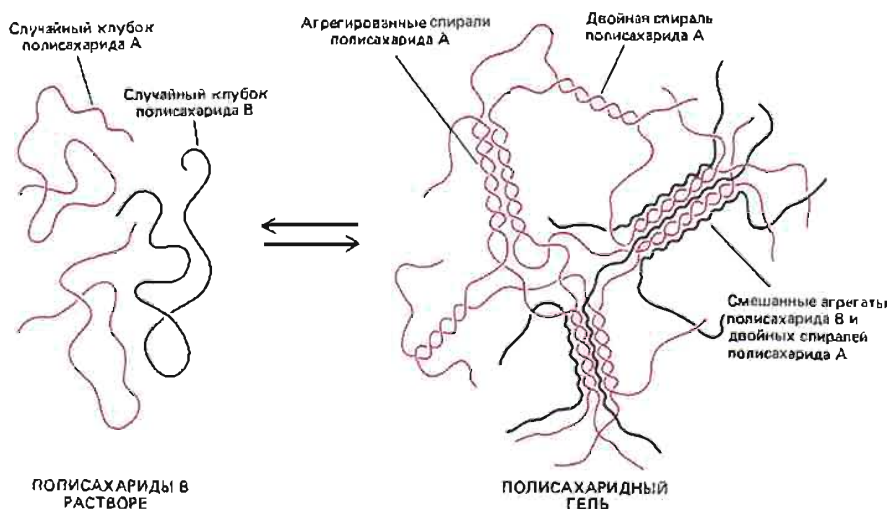
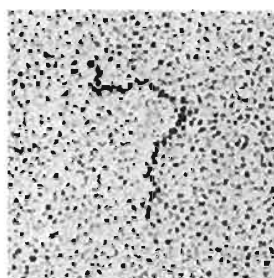
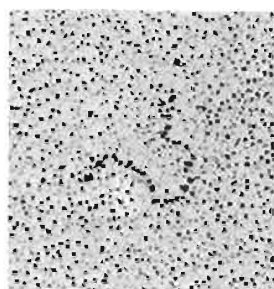


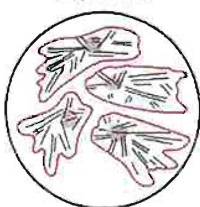
Рис. 12-63. Примеры упорядоченных конформаций, которые могут принять две разные полисахаридные цепи, А и В, при образовании геля. Поскольку взаимодействие между молекулами ограничено определенными участками их цепей и не распространяется на всю молекулу, каждая цепь может объединиться более чем с одним партнером и таким путем образовать решетку геля. К гелеобразующим полисахаридам относятся, в частности, агары (из водорослей) и пектины (из высших растений).



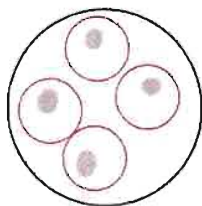


100 нм

Фибробласты, производящие фибронектин



Трансформированные фибробласты, не производящие фибронектина



Добавлен фибронектин



Пучки актиновых филаментов

Рис. 12-64. Электронные микрофотографии молекул фибронектина, напыленных платиной. Каждая молекула состоит из двух идентичных фибриллярных мономеров, связанных концами. (J. Engel et al., J. Mol. Biol., 150, 97-120, 1981.)

стов и других клеток при их росте в культуре. В крови и других жидкостях тела в сравнительно большом количестве содержится близко родственный фибронектину белок – так называемый *глобулин, нерастворимый на холоду* (cold insoluble globulin).

Фибронектин впервые привлек к себе внимание, когда выяснилось, что на поверхности фибробластов, подвергшихся опухолевой трансформации, его количество сильно снижено по сравнению с нормальными фибробластами. Обычно наблюдается хорошая корреляция между уменьшением количества фибронектина на поверхности культивируемых трансформированных клеток и их способностью к образованию опухолей, инвазии тканей и метастазированию после введения животным.

Трансформированные клетки отличаются от нормальных и своим поведением в культуре: они слабо прикрепляются к субстрату, не распластываются, у них не образуется упорядоченных пучков внутриклеточных актиновых филаментов (разд. 10.5.4), и они растут до значительно больших плотностей, чем нормальные клетки (разд. 11.1.8). Если к культуре трансформированных клеток, синтезирующих сравнительно мало фибронектина, добавить большое количество этого белка, клетки быстро прилипают к субстрату, распластываются и образуют упорядоченные пучки актиновых филаментов (рис. 12-65). Эти клетки выглядят как нормальные фибробласты, но по-прежнему размножаются до аномально высокой плотности. Видимо, фибронектин способствует клеточной адгезии, но непосредственно не контролирует пролиферацию клеток. Сейчас показано, что очищенный фибронектин помогает связыванию клеток различного типа с другими клетками, а также с коллагеном и иными субстратами. Так как высокие концентрации фибронектина были найдены в области миграции эмбриональных клеток, полагают, что этот гликопротеин влияет на передвижение клеток *in vivo*, изменяя их адгезивность.

12.3.11. Базальная мембрана – это специализированная форма внеклеточного матрикса, содержащая коллаген особого типа [19]

Базальные мембраны представляют собой тонкие слои специализированного внеклеточного матрикса, подстилающие слои и трубки из эпителиальных клеток; кроме того, они окружают отдельные мышечные волокна, жировые клетки и шванновские клетки (которые, наматываясь на периферические нервные волокна, образуют миелин). Таким образом, базальная мембрана отделяет эти клетки или клеточные слои от окружающей или подстилающей соединительной ткани. В других местах, например в почечных клубочках или легочных альвеолах, базальная мембрана расположена между двумя различными слоями клеток, где она служит высокоселективным фильтром (рис. 12-66). Накапливается, однако, все больше данных о том, что роль базальных мембран не сводится к функциям структурной опоры и фильтра. Они, видимо, способны индуцировать дифференцировку клеток, влиять на их метаболизм,

Рис. 12-65. Добавление фибронектина к трансформированным фибробластам (которые сами не синтезируют фибронектин) заставляет их распластываться и организовывать внутриклеточные пучки актиновых филаментов. Такие клетки сходны теперь по своей морфологии с нормальными фибробластами, синтезирующими фибронектин.

Рис. 12-66. Здесь схематически представлены три типа расположения базальной мембраны (черная линия). Базальная мембрана может окружать клетки (например, мышечные), подстилать слой эпителиальных клеток или располагаться между двумя клеточными слоями (как в почечных клубочках). Обратите внимание, что в почечных клубочках в обоих слоях клеток имеются разрывы, так что барьером проницаемости, определяющим, какие молекулы из крови перейдут в мочу, служит базальная мембрана.

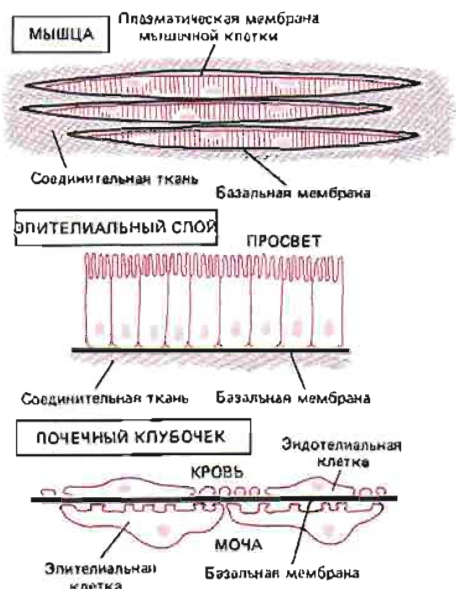


Рис. 12-67. Базальная мембрана роговицы куриного эмбриона. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Часть эпителиальных клеток (Эп) была удалена, чтобы показать верхнюю поверхность базальной мембраны (БМ). С нижней поверхности мембраны взаимодействует густая сеть коллагеновых фибрилл (К). Макромолекулы базальной мембраны синтезируются расположенными на ней эпителиальными клетками. (С любезного разрешения R. Trelstad.)

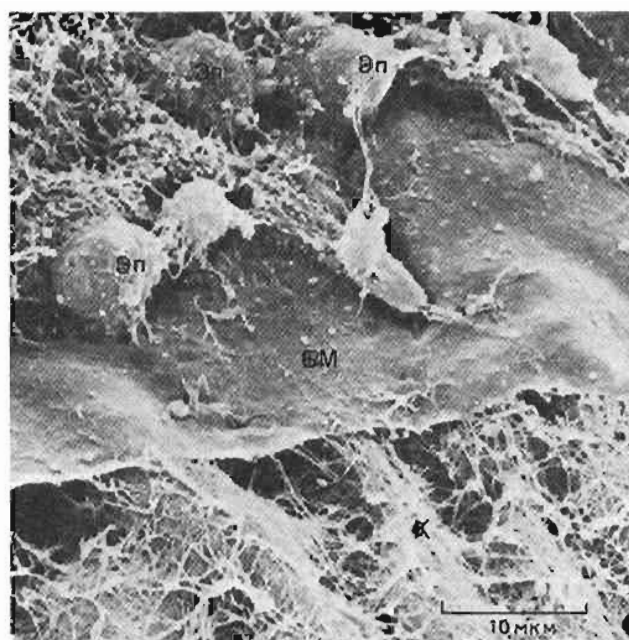


Рис. 12-68. Электронная микрофотография тонкого поперечного среза базальной мембраны, подстилающей эпителиальную клетку роговицы куриного эмбриона. (С любезного разрешения R. Trelstad.)



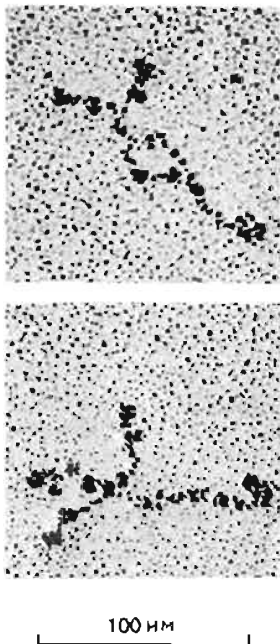


Рис. 12-69. Электронная микрофотография молекул ламинина, напыленных платиной. Каждая молекула имеет форму асимметричного креста с одной длинной и тремя короткими ветвями, что говорит о наличии по меньшей мере двух полипептидных цепей. (J. Engel et al., J. Mol. Biol., 150, 97–120, 1981.)

упорядочивать белки прилегающих к ним наружных клеточных мембран и служить специфическими «магистралями» клеточных миграций.

Базальную мембрану синтезируют сами лежащие на ней клетки (рис. 12-67 и 12-68). Хотя состав ее в деталях варьирует от ткани к ткани и даже от участка к участку в пределах одной мембраны, одним из главных компонентов всегда бывает коллаген типа IV. Про- α -цепи этого типа необычны в том отношении, что у них очень длинные концевые пептиды, которые, вероятно, не отщепляются и после выхода молекул из клетки. Поэтому такие молекулы проколлагена не образуют типичных коллагеновых фибрилл, хотя и соединяются ковалентными сшивками. Наряду с протеогликанами и фибронектином важным компонентом всех до сих пор изученных базальных мембран оказался гликопротеин **ламинин**, состоящий по меньшей мере из двух субъединиц (молекулярная масса 220 000 и 440 000 дальтон), соединенных дисульфидными связями (рис. 12-69). Несомненно, базальные мембраны содержат и много других, еще не идентифицированных, белков. Молекулярная организация базальных мембран детально не изучена, но некоторые данные указывают на то, что ламинин и протеогликаны сосредоточены у внутренней и наружной поверхностей мембраны, а молекулы коллагена находятся в ее среднем слое.

12.3.12. Базальные мембраны выполняют разнообразные и сложные функции

Оказалось, что базальные мембраны выполняют удивительно разнообразные функции. В почечных клубочках базальная мембрана служит полупроницаемым фильтром, регулирующим переход макромолекул из крови в первичную мочу. Для этой функции, по-видимому, необходимы протеогликаны, так как их удаление с помощью специфических ферментов ведет к утрате фильтрующих свойств мембраны. Базальная мембрана может также служить избирательным барьером для клеток; например, базальная мембрана эпителиального слоя предотвращает прямой контакт клеток этого слоя с фибробластами подстилающей соединительной ткани, но не препятствует прохождению макрофагов, лимфоцитов и нервных окончаний.

Базальная мембрана, вероятно, играет важную роль в регенерации тканей. При повреждении мышечной, нервной или эпителиальной ткани уцелевшая базальная мембрана направляет передвижение регенерирующих клеток. Таким образом легко восстанавливается исходная архитектура ткани. Наиболее яркий пример роли базальной мембраны в регенерации мы находим при изучении *нервно-мышечного соединения*, в котором нервная клетка образует синаптический контакт с поверхностью поперечно-полосатого мышечного волокна.

Базальная мембрана полностью окружает мышечную клетку, но в области нервно-мышечного соединения имеет особые свойства. Можно, например, получить антитела, связывающиеся только с этим участком. Специализированная базальная мембрана нервно-мышечного соединения, хотя она и кажется в электронном микроскопе несущественной и слабо выраженной структурой, очень важна для пространственной организации компонентов по обе стороны синапса – того места, где нерв передает сигнал мышце. Данные в пользу центральной роли этой мембраны в построении синапса будут подробно рассмотрены в главе 18 (разд. 18.4.3). Этот хорошо изученный пример с очевидностью показывает, что мы еще многого не знаем о базальных мембранах. Он позволяет также предполагать, что специфические (но пока не идентифицированные) компоненты внеклеточного матрикса могут играть определяющую роль в процессах клеточного узнавания, в том числе тех, с которыми связано эмбриональное развитие.

12.3.13. Внутриклеточные пучки актиновых филаментов организуют макромолекулы матрикса на поверхности клеток и тем самым упорядочивают внеклеточный матрикс [20]

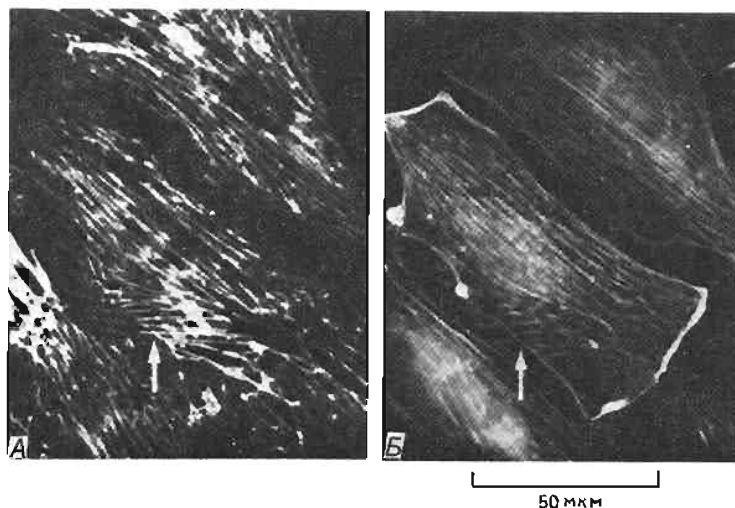
Молекулы фибронектина, коллагена, протеогликанов и гиалуроновой кислоты могут не просто содержаться во внеклеточном матриксе, а находиться в связи с поверхностью клеток. Способ прикрепления этих молекул к наружной стороне плазматической мембраны неясен, а вопрос о том, где кончаются компоненты, связанные с клеточной мембраной, и где начинается внеклеточный матрикс, — в значительной степени семантический. Например, гликокаликс содержит и то и другое (разд. 6.3.1). При использовании флуоресцирующих антител для выявления фибронектина на поверхности культивируемых фибробластов оказывается, что фибронектин расположен удивительно регулярными рядами между соседними клетками и между клетками и субстратом (рис. 12-70, А). Если же клетки обработать цитохалазином, который разрушает внутриклеточные пучки актиновых филаментов, то волокна фибронектина отделяются от клеточной поверхности (точно так же, как во время митоза, когда клетки округляются). По-видимому, существует какая-то косвенная связь между внеклеточным фибронектином и внутриклеточными актиновыми филаментами.

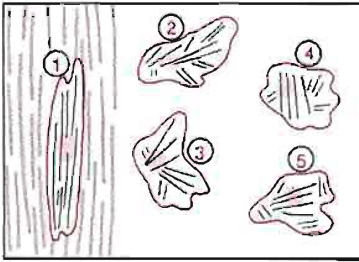
Поэтому не удивительно, что ориентация секретируемых клеткой цепей фибронектина совпадает с ориентацией внутриклеточных пучков актиновых филаментов, причем оба набора волокон ориентированы вдоль длинной оси клетки (рис. 12-70, Б). Есть аналогичные данные о распределении вновь синтезированных молекул коллагена на поверхности фибробластов в культуре, и возможно, что этот коллаген связан с клеточной поверхностью благодаря взаимодействию с фибронектином. Из этого видно, что высокая степень упорядоченности внутри клетки может передаваться внеклеточному матриксу через ориентацию секретируемых макромолекул.

12.3.14. Упорядоченный внеклеточный матрикс в свою очередь влияет на организацию и поведение заключенных в нем клеток [20]

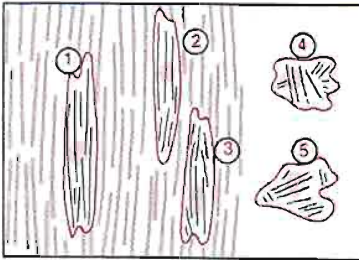
Макромолекулы внеклеточного матрикса оказывают удивительное воздействие на поведение культивируемых клеток — могут влиять на их форму, подвижность, метаболизм и дифференцировку. Например, клетки эпителия роговицы при росте на искусственных поверхностях производят очень мало коллагена и протеогликанов; если же культивировать их на базальной мем-

Рис. 12-70. Иммунофлуоресценция внеклеточных волокон фибронектина (А) и внутриклеточных пучков актиновых филаментов (Б) в трех культивируемых фибробластах крысы. Для выявления фибронектина использованы специфические антитела с присоединенным к ним флуоресцеином, для выявления актина — антитела, связанные с родамином. (R. O. Hynes, A. T. Destree, *Cell*, 15, 875–886, 1978.)

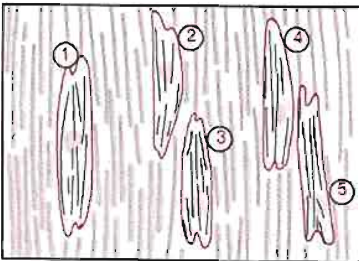




Ориентированный цитоскелет клетки 1 направляет сборку секретируемого этой клеткой ориентированного внеклеточного матрикса.



Ориентированный матрикс достигает клеток 2 и 3 и упорядочивает цитоскелет этих клеток



Теперь клетки 2 и 3 секретируют в окружающую среду ориентированный матрикс. Таким путем упорядоченность цитоскелета передается клеткам 4 и 5

Рис. 12-71. Гипотетическая схема передачи упорядоченности от клетки к клетке через внеклеточный матрикс. Для простоты на рисунке показано, как одна клетка влияет на ориентацию соседних клеток, но та же схема позволяет объяснить и взаимное влияние клеток.

бране либо на слое коллагена или протеогликана, то клетки накапливают и секретируют большие количества этих макромолекул матрикса. Кроме того, эпителиальные клетки, растущие на искусственных поверхностях, имеют неправильную базальную поверхность, а примыкающий к этой поверхности цитоскелет дезорганизован. Но если культивировать те же клетки на базальной мембране или на макромолекулах матрикса, у них будет гладкая базальная поверхность, а примыкающие к ней элементы цитоскелета будут столь же упорядоченными, как и в интактной ткани.

Аналогичным образом при росте культуры трансформированных клеток на слое упорядоченных волокон фибронектина последние индуцируют распластывание клеток и сборку внутри них пучков актиновых филаментов, расположенных параллельно внеклеточным волокнам фибронектина. Вместе с данными о том, что пучки внутриклеточных актиновых нитей могут влиять на расположение секретируемых молекул фибронектина (см. выше), эти наблюдения указывают на возможность двусторонней связи между внеклеточным фибронектином и внутриклеточными волокнами актина через плазматическую мембрану фибробласта.

Поскольку цитоскелет способен упорядочивать секретируемые клеткой макромолекулы матрикса, а они в свою очередь способны организовывать цитоскелет соприкасающихся с ними клеток, ясно, что внеклеточный матрикс может в принципе распространять упорядоченную организацию от клетки к клетке (рис. 12-71). Благодаря этому свойству он мог бы играть центральную роль в создании и поддержании клеточных паттернов тканей и органов в процессе индивидуального развития; взаимодействие между внеклеточным матриксом и клетками при этом могло бы осуществляться через посредство макромолекул матрикса, связанных с клеточной поверхностью.

Заключение

Все клетки различных тканей контактируют со сложной сетью межклеточного матрикса. Матрикс не только скрепляет клетки в тканях и ткани в органах, но и влияет на развитие, полярность и поведение соприкасающихся с ним клеток. Известно, что матрикс содержит три важнейших белка, образующих волокна,—коллаген, эластин и фибронектин, которые погружены в гидратированный гель из переплетенных цепей гликозаминогликанов. Находящиеся в матриксе клетки сами секретируют все эти макромолекулы.

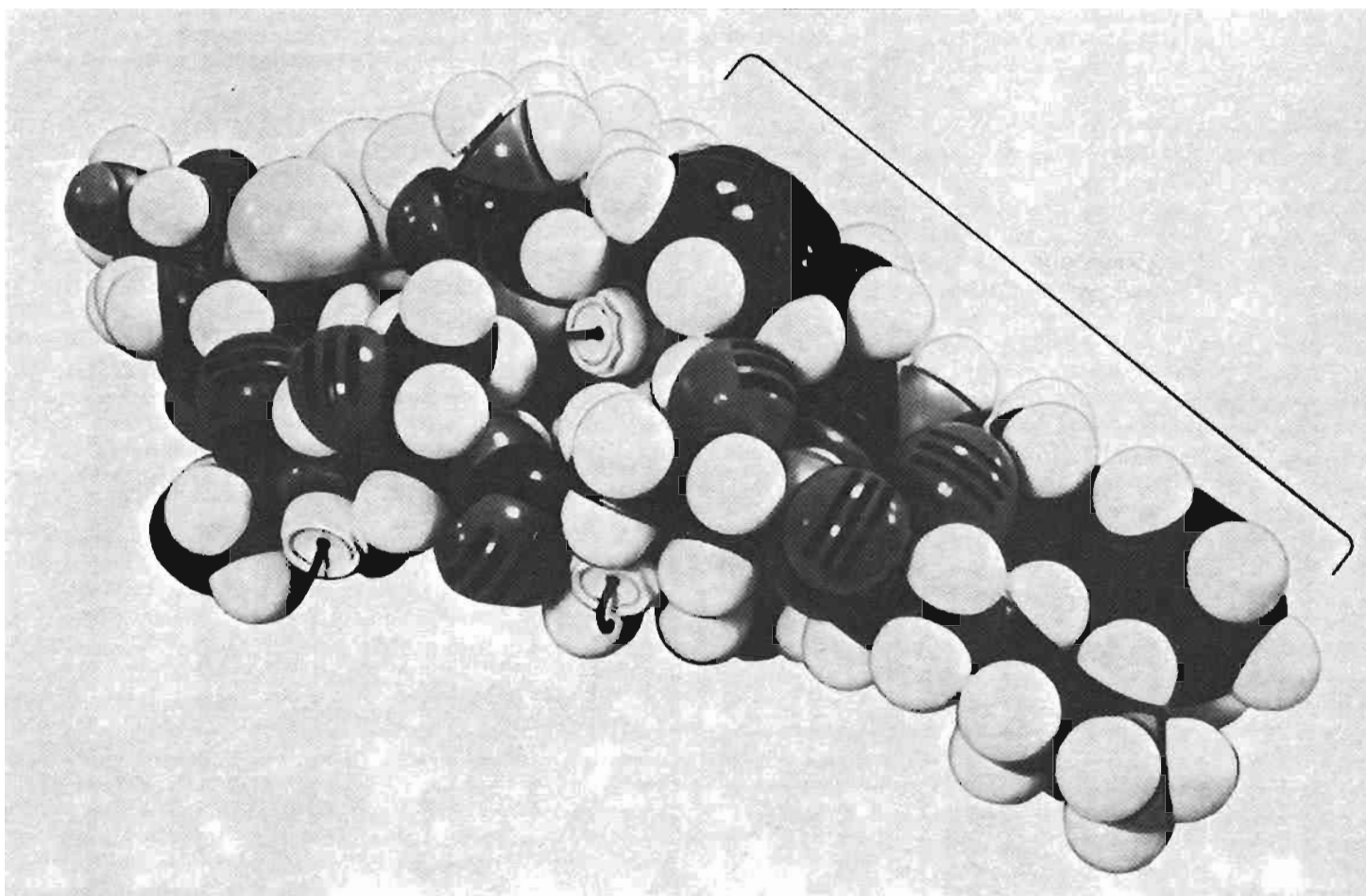
Коллаген состоит из трехцепочечных спиральных молекул, из которых во внеклеточном пространстве строятся длинные, похожие на канаты фибриллы или же слои, которые в свою очередь могут образовывать множество высокоупорядоченных структур. Молекулы эластина образуют обширную сеть, состоящую из ковалентно сшитых волокон и слоев; способность этой сети растягиваться и сжиматься придает матриксу упругие свойства. Молекулы фибронектина образуют волокна, способствующие клеточной адгезии. Гликозаминогликаны представляют собой гетерогенную группу длинных отрицательно заряженных полисахаридных цепей, которые (за исключением гиалуроновой кислоты) ковалентно соединены с белком в гигантские молекулы протеогликанов. Как полагают, все эти белки и полисахариды матрикса могут взаимодействовать, образуя множество различных пространственных структур, причем тип структуры отчасти определяют секретирующие матрикс клетки. Поскольку ориентация элементов матрикса в свою очередь влияет на ориентацию заключенных в нем клеток, вполне вероятно, что упорядоченность может передаваться через матрикс от клетки к клетке.

Литература

Цитированная

1. Kalser D., Manoil C. Myxobacteria: cell interactions, genetics and development, *Annu. Rev. Microbiol.*, **33**, 595–639, 1979.
White D. Cell interactions and the control of development in myxobacteria populations, *Int. Rev. Cytol.*, **72**, 203–228, 1981.
2. Loomis W. F. *Dictyostellum discoideum*. A Developmental System, New York, Academic Press, 1975.
Gerisch G. Chemotaxis in *Dictyostellum*, *Annu. Rev. Physiol.*, **44**, 535–552, 1982.
Gerisch G. Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in *Dictyostellum*, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **14**, 243–270, 1980.
3. Wilson H. V. On some phenomena of coalescence and regeneration in sponges, *J. Exp. Zool.*, **5**, 245–258, 1907.
Humphreys S., Humphreys T., Sano J. Organization and polysaccharides of sponge aggregation factor, *J. Supramol. Struct.*, **7**, 339–351, 1977.
Burger M. M., Burkart W., Weinbaum G., Jumblatt J. Cell-cell recognition: molecular aspects. Recognition and its relation to morphogenetic processes in general. In: *Cell-Cell Recognition*, Society for Experimental Biology Symposium, No. 32 (A. S. G. Curtis, ed), pp. 1–23. Cambridge, Eng.: Cambridge University Press, 1978.
4. Townes P., Holtfreter J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells, *J. Exp. Zool.*, **128**, 53–120, 1955.
Moscona A. A., Hausman R. E. Biological and biochemical studies on embryonic cell-cell recognition. In: *Cell and Tissue Interactions*, Society of General Physiologists Series (J. W. Lash, M. M. Burger, eds.), Vol. 32, pp. 173–185. New York, Raven, 1977.
Roth S., Weston J. The measurement of intercellular adhesion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **58**, 974–980, 1967.
5. Steinberg M. S. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells, *J. Exp. Zool.*, **173**, 395–434, 1970.
6. Staehelin L. A., Hull B. E. Junctions between living cells, *Sci. Am.*, **238**(5), 141–152, 1978.
Gilula N. B. Junctions between cells. In: *Cell Communication* (R. P. Cox, ed.), pp. 1–29, New York, Wiley, 1974.
7. Farguham M. G., Palade G. E. Junctional complexes in various epithelia, *J. Cell Biol.*, **17**, 375–412, 1963.
Goodenough D. A., Revel J. P. A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver, *J. Cell Biol.*, **45**, 272–290, 1970.
8. Furshpan E. J., Potter D. D. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **3**, 95–127, 1968.
Lowenstein W. R. Permeable junctions, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **40**, 49–63, 1976.
Hooper M. L., Subak-Sharpe J. H. Metabolic cooperation between cells, *Int. Rev. Cytol.*, **69**, 45–104, 1981.
Gilula N. B., Reeves O. R., Steinbach A. Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts, *Nature*, **235**, 262–265, 1972.
9. Furshpan E. S., Potter D. D. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture, *Curr. Top. Dev. Biol.*, **3**, 95–127, 1968.
Sheridan J. D. Cell coupling and cell communication during embryogenesis. In: *Cell Surface in Animal Embryogenesis and Development*. Cell Surface Reviews (G. Poste, G. L. Nicolson, eds.), Vol. 1, pp. 409–448, Amsterdam, Elsevier, 1977.
Warner A. E. The early development of the nervous system. In: *British Society of Developmental Biology Symposium 5* (D. R. Garrod, J. Feldman, eds.), pp. 109–127, Cambridge, Eng., Cambridge University Press, 1981.
10. Lowenstein W. R. Permeable junctions, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **11**, 49–63, 1976.
Turin L., Warner A. E. Intracellular pH in early *Xenopus* embryo: its effect on current flow between blastomeres, *J. Physiol. (Lond.)*, **300**, 489–504, 1980.
11. Caspar D. L. D., Goodenough D., Makowski L., Phillips W. C. Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction, *J. Cell Biol.*, **74**, 605–628, 1977.
Hertzberg E. L., Lawrence T. S., Gilula N. B. Gap junctional communication, *Annu. Rev. Physiol.*, **43**, 479–491, 1981.
12. Hay E. D. Extracellular matrix, *J. Cell Biol.*, **91**, 205s–223s, 1981.
Hay E. D., ed. *Cell Biology of Extracellular Matrix*, New York, Plenum, 1982.

13. Prockop D.J., Kivirikko K.I., Tuderman L., Guzman N. The biosynthesis of collagen and its disorders, *N. Engl. J. Med.*, **301**, 13-23, 77-85, 1979.
 Eyre D.R. Collagen: molecular diversity in the body's protein scaffold, *Science*, **207**, 1315-1322, 1980.
 Bornstein P., Sage H. Structurally distinct collagen types, *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 957-1003, 1980.
14. Trelstad R.L., Hayashi K. Tendon collagen fibrillogenesis: intracellular subassemblies and cell surface changes associated with fibril growth, *Dev. Biol.*, **71**, 228-242, 1979.
 Trus B.L., Piez K.A. Compressed microfibril models of the native collagen fibril, *Nature*, **286**, 300-301, 1980.
15. Sandberg L.B., Soskel N.T., Leslie J.G. Elastin structure, biosynthesis and relation to disease states, *N. Engl. J. Med.*, **304**, 566-577, 1981.
 Franzbau C., Faris B. Elastin. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.), pp. 65-93, New York, Plenum, 1982.
16. Lindhal U., Höök M. Glycosaminoglycans and their binding to biological macromolecules, *Annu. Rev. Biochem.*, **47**, 385-417, 1978.
 Chakrabarti B., Park J.W. Glycosaminoglycans: structure and interaction, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **8**, 225-313, 1980.
 Rodén L. Structure and metabolism of connective tissue proteoglycans. In: *The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycans* (W.J. Lennarz, ed.), pp. 267-371. New York, Plenum, 1980.
17. Rees D.A. Polysaccharide Shapes (Outline Studies in Biology), pp. 62-73. London, Chapman and Hall, 1977.
 Trelstad R.L., Hayashi K., Toole B.P. Epithelial collagens and glycosaminoglycans in the embryonic cornea. Macromolecular order and morphogenesis in the basement membrane, *J. Cell Biol.*, **62**, 815-830, 1974.
 Toole B.P. Morphogenetic role of glycosaminoglycans in brain and other tissues. In: *Neuronal Recognition* (S.H. Barondes, ed.), pp. 275-329, New York, Plenum, 1976.
18. Yamada K.M., Olden K. Fibronectins—adhesive glycoproteins of cell surface and blood, *Nature*, **275**, 179-184, 1978.
 Ruoslahti E., Engvall E., Hayman E.G. Fibronectin: current concepts of its structure and functions, *Coll. Res.*, **1**, 95-128, 1981.
 Hynes R.O. Fibronectin and its relation to cellular structure and behavior. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.), pp. 295-334, New York, Plenum, 1982.
19. Kefalides N.A., Alper R., Clark C.C. Biochemistry and metabolism of basement membranes, *Int. Rev. Cytol.*, **61**, 167-228, 1979.
 Timpl R., et al. Laminin—a glycoprotein from basement membranes, *J. Biol. Chem.*, **254**, 9933-9937, 1979.
 Farquhar M.G. The glomerular basement membrane: a selective macromolecular filter. In: *Cell Biology of Extracellular Matrix* (E.D. Hay, ed.), pp. 335-378, New York, Plenum, 1982.
20. Bornstein P., Duksin D., Balian G., Davidson J.M., Crouch E. Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions in vitro and in vivo, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **312**, 93-105, 1978.
 Hynes R. Structural relationships between fibronectin and cytoplasmic cytoskeletal networks. In: *Cytoskeletal Elements and Plasma Membrane Organization* (G. Poste, G.L. Nicolson, eds.), Vol. 7, pp. 100-137, Amsterdam, Elsevier, 1981.



Модель молекулы соматостатина - пептидного гормона из 14 аминокислот. Скобкой указана область, узнаваемая специфическим рецептором клеточной поверхности. (С любезного разрешения Ralph F. Hirschmann.)

Эволюция многоклеточных организмов основана на способности клеток поддерживать связь друг с другом. Эта способность необходима для регуляции развития клеток и для их организации в ткани, для контроля роста и деления клеток и для координации их разнообразных активностей. Важное значение и сложность межклеточных взаимодействий у высших животных позволяют предполагать, что с этими процессами связана у них значительная часть всех генов.

По-видимому, клетки поддерживают связь друг с другом тремя способами: 1) они выделяют химические вещества, передающие сигналы клеткам, расположенным на некотором расстоянии; 2) экспонируют связанные с плазматической мембраной сигнальные молекулы, влияющие на другие, непосредственно контактирующие с ними клетки; 3) образуют щелевые контакты, прямо соединяющие цитоплазму двух клеток (рис. 13-1).

Взаимодействие клеток через щелевой контакт обсуждалось в главе 12. О связи путем прямого взаимодействия молекул внешней клеточной поверхности мало что известно. В принципе такая связь должна отличаться от сигнализации с помощью секретируемых химических сигналов только тем, что сигнальные молекулы связаны с мембраной. Но компоненты мембран трудно солубилизовать и очищать, и в связи с этим нелегко изучать механизм их действия. Поэтому не удивительно, что до сих пор не получено однозначных данных о существовании этой формы межклеточной коммуникации. Если мы наблюдаем влияние клетки на соседнюю, как мы можем удостовериться в том, что сигнал передается молекулами клеточной поверхности, а не короткоживущим щелевым контактом или секретируемым химическим медиатором, действующим на небольшом расстоянии?

В этой главе речь пойдет в основном о не прямых механизмах взаимодействия с участием секретируемых молекул. К счастью, такие молекулы значительно легче изучать, чем связанные с мембраной, и о механизмах их действия известно довольно многое.

13.1. Три стратегии химической сигнализации: локальные химические медиаторы, гормоны и нейромедиаторы

Известны три типа химической сигнализации: 1) большинство клеток тела выделяют одно или несколько сигнальных веществ, которые служат локальными химическими медиаторами, поскольку разрушаются или поглощаются так быстро, что воздействуют лишь на клетки ближайшего окружения; 2) специализированные эндокринные клетки секретируют гормоны, которые разносятся кровью и влияют на клетки-мишени, причем последние могут находиться в самых различных частях организма; 3) нервные клетки образуют со своими клетками-мишенями специализированные контакты (химические синапсы) и секретируют действующие лишь на очень малых расстояниях химические вещества — нейромедиаторы, влияющие (в каждом синапсе) только на одну клетку-мишень (рис. 13-2).

Рис. 13-1. Три различных способа межклеточной химической сигнализации.

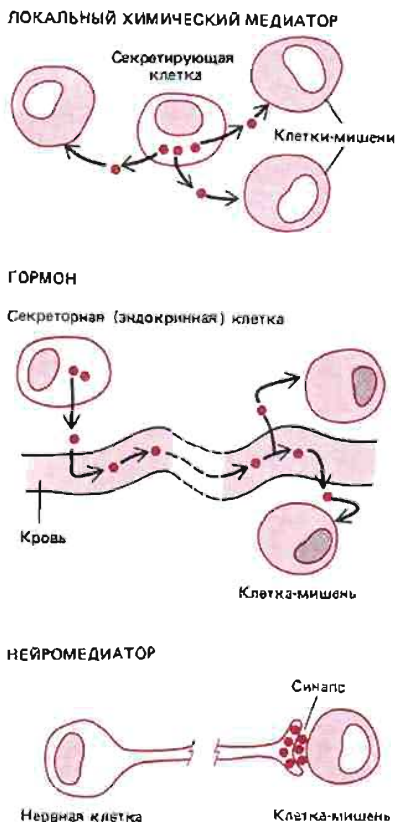


Рис. 13-2. Три различных класса внеклеточных сигнальных молекул.

Эндокринные и нервные клетки специально предназначены для химической сигнализации, они совместно координируют различного рода активность миллиардов клеток, составляющих тело высшего животного. Нервные клетки передают информацию намного быстрее эндокринных, так как для передачи сигнала на большие расстояния они не нуждаются в диффузии и кровотоке: сигнал быстро передается по нервному волокну электрическими импульсами. Только в нервных окончаниях, где высвобождается нейромедиатор, эти импульсы преобразуются в химические сигналы. Нейромедиатор достигает клетки-мишени путем диффузии на микроскопически малое расстояние, что занимает меньше миллисекунды (рис. 13-2). В то время как гормоны в кровотоке очень сильно разбавляются и должны быть способны действовать в чрезвычайно низких концентрациях (обычно $< 10^{-8}$ М), разбавление нейромедиаторов незначительно, и их концентрация у определенных участков клеток-мишеней может быть велика. Например, концентрация нейромедиатора ацетилхолина в синаптической щели нервно-мышечного соединения может достигать около $5 \cdot 10^{-4}$ М. Однако в других отношениях механизмы химической сигнализации с помощью гормонов и нейромедиаторов в общих чертах сходны, и многие сигнальные молекулы, используемые эндокринными клетками, используются также и нервными клетками (нейронами).

13.1.1. Главным регулятором эндокринной системы служит гипоталамус [1]

В определенном участке мозга — гипоталамусе — эндокринная и нервная системы физически и функционально связаны друг с другом. Гипоталамус расположен непосредственно над гипофизом и соединен с ним *ножкой гипофиза*. Гипоталамус осуществляет свою посредническую функцию с помощью клеток, сочетающих особенности нейрона и эндокринной клетки: у них есть выросты, способные проводить электрические импульсы и в то же время выбрасывать сигнальные молекулы в кровь. Поэтому такие клетки называют *нейросекреторными*. При стимуляции нейросекреторной клетки гипоталамуса нейронами высших отделов мозга эта клетка выделяет в кровеносные сосуды гипофизарной ножки определенный пептидный гормон, который затем специ-

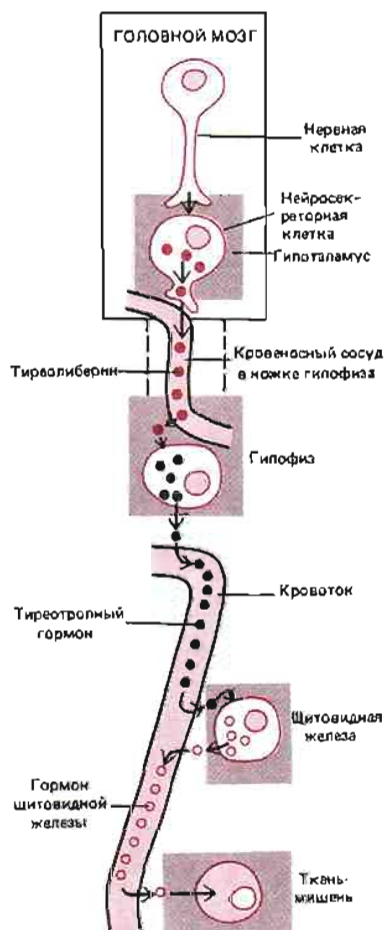


Рис. 13-3. Эта схема показывает, как нервная система непрямым путем регулирует секрецию гормона щитовидной железы. Определенные нейросекреторные клетки гипоталамуса при стимуляции их нервными клетками высших отделов мозга секретируют в кровеносные сосуды гипофизарной ножки тиреолиберин, который в свою очередь вызывает освобождение тиреотропного гормона (ТТГ) специфическими клетками гипофиза. ТТГ побуждает клетки щитовидной железы синтезировать и выделять тиреоидный гормон. Этот гормон стимулирует разнообразные метаболические процессы в большинстве клеток организма. На схеме не показано, что повышение концентрации тиреоидного гормона в крови тормозит секрецию тиреолиберина и ТТГ. Эта ингибирующая обратная связь препятствует чрезмерному повышению уровня тиреоидного гормона в крови.

фически стимулирует или подавляет секрецию гипофизом другого гормона. Многие из гормонов гипофиза, находящихся под такого рода контролем гипоталамуса, стимулируют какую-либо из других эндокринных желез и вызывают секрецию в кровь третьего гормона. Таким образом, гипоталамус служит главным регулятором эндокринной системы. На рис. 13-3 показана эта иерархическая регуляция на примере секреции гормона щитовидной железы (тиреоидного гормона).

В табл. 13-1 приведены некоторые локальные химические медиаторы, нейромедиаторы и гормоны и указаны места их синтеза, структура и основное действие (большая часть их подробнее рассмотрена в других разделах книги). Видно, что структура сигнальных молекул так же разнообразна, как и их функции. К этим молекулам относятся короткие пептиды, более крупные белки и гликопротеиды, аминокислоты и родственные им соединения, стероиды (вещества, образующиеся из холестерина и весьма сходные между собой по структуре) и производные жирных кислот.

13.1.2. Разные клетки по-разному реагируют на один и тот же химический сигнал [2]

Способность клетки реагировать на определенные внеклеточные сигнальные молекулы зависит от наличия у нее специфических белков — **рецепторов**, которые связывают эти молекулы. Многие сигнальные молекулы действуют в очень низкой концентрации (обычно $\leq 10^{-8}$ М), и комплементарные им рецепторы, как правило, имеют к ним высокое сродство (константа связывания $K > 10^8$ л/моль; см. разд. 3.1.3). Большинство клеток взрослых животных специализировано для выполнения какой-то одной главной функции, и все они имеют характерный набор рецепторов, который позволяет им реагировать на все химические сигналы, запускающие или модулирующие эту функцию.

Влияние большинства химических сигналов на клетку-мишень в конечном счете сводится либо к изменению свойств или скорости синтеза уже существовавших в ней белков, либо к инициации синтеза новых белков. В различных клетках-мишенях одни и те же сигнальные молекулы часто затрагивают разные белки и поэтому оказывают различное действие. Например, **ацетилхолин** стимулирует сокращение клеток скелетной мускулатуры, но уменьшает частоту и силу сокращения клеток сердечной мышцы. В данном случае рецептор ацетилхолина у клеток скелетных мышц отличается от рецептора клеток миокарда. Но не всегда причиной служит различие рецепторов. Часто связывание одинаковых сигнальных молекул с идентичными рецепторами ведет к совершенно разным реакциям различных клеток-мишеней. Отсюда следует, что клетки-мишени могут быть запрограммированы двумя способа-

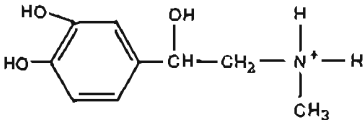
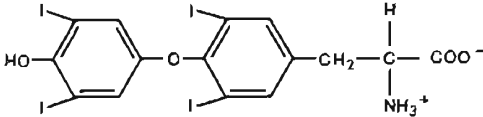
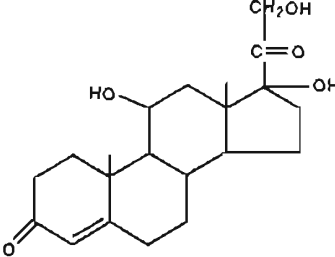
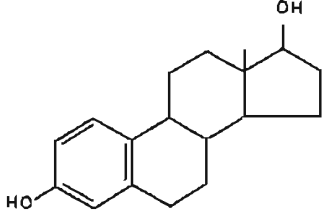
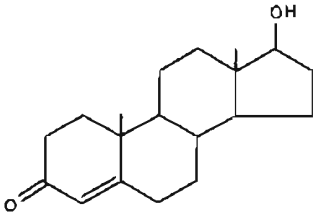
Таблица 13-1. Некоторые примеры сигнальных молекул

Происхождение		Структура	Основные эффекты
Локальные химические медиаторы			
<i>Белки</i>			
Фактор роста нервов	Все ткани, иннервируемые симпатическими нервами	Две идентичные цепи из 118 аминокислот	Выживание и рост сенсорных и симпатических нейронов
<i>Пептиды</i>			
Фактор хемотаксиса эозинофилов	Тучные клетки	4 аминокислоты	Хемотаксический сигнал для лейкоцитов определенного типа (эозинофилов)
<i>Производные аминокислот</i>			
Гистамин	Тучные клетки	$\begin{array}{c} \text{HC}=\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+ \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{N} \quad \text{NH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{C}=\text{H} \end{array}$	Расширяет кровеносные сосуды и повышает их проницаемость
Производные жирных кислот Простагландин E ₂	Клетки многих различных типов		Вызывает сокращение гладкой мускулатуры
Нейромедиаторы¹			
<i>Аминокислоты и родственные соединения</i>			
Глицин	Нервные окончания	$^+ \text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Тормозный медиатор центральной нервной системы
Норадреналин	Нервные окончания		Возбуждающий и тормозный медиатор центральной и периферической нервной системы
γ-Аминомасляная кислота (ГАМК)	Нервные окончания	$^+ \text{H}_3\text{N}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COO}^-$	Тормозный медиатор центральной нервной системы
Ацетилхолин	Нервные окончания		Возбуждающий медиатор нервно-мышечного соединения; возбуждающий и тормозный медиатор центральной и периферической нервной системы
<i>Пептиды</i>			
Энкефалин	Нервные окончания	5 аминокислот	Подобно морфину, тормозит передачу болевых сигналов в ЦНС

Таблица 13.1 (продолжение)

	Происхождение	Структура	Основные эффекты
Гормоны			
<i>Белки и гликопротеины</i>			
Инсулин	Бета-клетки поджелудочной железы	Белок: α -цепь – 21 аминокислота; β -цепь – 30 аминокислот	Способствует утилизации углеводов (включая поглощение глюкозы клетками); стимулирует синтез белка; стимулирует синтез липидов в жировых клетках
Соматотропин (гормон роста)	Передняя доля гипофиза	Белок, 191 аминокислота	Стимулирует синтез в печени соматомединов, которые вызывают рост мышц и костей
Соматомедины	Печень	Белки	Стимулируют рост костей и мышц; влияют на метаболизм Ca^{2+} , фосфата, углеводов и липидов
Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Передняя доля гипофиза	Белок, 39 аминокислот	Стимулирует синтез кортизола корой надпочечников; вызывает освобождение жирных кислот жировыми клетками
Паратгормон	Парашитовидные железы	Белок, 84 аминокислоты	Усиливает резорбцию кости, как следствие – повышает уровень Ca^{2+} и фосфата в крови; усиливает реабсорбцию Ca^{2+} и Mg^{2+} и уменьшает реабсорбцию фосфата в почечных канальцах
Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)	Передняя доля гипофиза	Гликопротеин: α -цепь – 92 аминокислоты; β -цепь – 118 аминокислот	Стимулирует рост яйцевых фолликулов и секрецию ими эстрадиола; стимулирует сперматогенез в семенниках
Лютеинизирующий гормон (ЛГ)	Передняя доля гипофиза	Гликопротеин: α -цепь – 92 аминокислоты; β -цепь – 115 аминокислот	Стимулирует созревание ооцитов, овуляцию и секрецию прогестерона яичником; стимулирует синтез тестостерона в семенниках
Фактор роста эпидермиса	Неизвестно	53 аминокислоты	Стимулирует деление эпидермальных и других клеток
Тиреотропный гормон (ТТГ)	Передняя доля гипофиза	Гликопротеин: α -цепь – 92 аминокислоты; β -цепь – 112 аминокислот	Стимулирует синтез тироксина в щитовидной железе и освобождение жирных кислот жировыми клетками
<i>Короткие пептиды</i>			
Тиреолиберин	Гипоталамус	3 аминокислоты	Стимулирует синтез тиреотропного гормона в передней доле гипофиза
Люлиберин	Гипоталамус	10 аминокислот	Стимулирует секрецию лютеинизирующего гормона передней долей гипофиза

Таблица 13.1 (продолжение)

	Происхождение	Структура	Основные эффекты
Вазопрессин	Задняя доля гипофиза	9 аминокислот	Повышает кровяное давление благодаря сокращению мелких кровеносных сосудов; увеличивает реабсорбцию воды в почечных канальцах
Соматостатин	Гипоталамус	14 аминокислот	Подавляет секрецию соматотропина передней долей гипофиза
Производные аминокислот Адреналин	Мозговое вещество надпочечников		Повышает кровяное давление и ускоряет ритм сердца; повышает гликогенолиз в печени и мышцах и высвобождение жирных кислот жировыми клетками
Тироксин	Щитовидная железа		Повышает метаболическую активность большинства клеток
Стероиды Кортизол	Кора надпочечников		Влияет на метаболизм белков, углеводов и липидов; подавляет воспалительные реакции
Эстрадиол	Яичники, плацента		Вызывает развитие и поддержание женских вторичных половых признаков, созревание и циклическую активность аксессуарных органов половой системы, развитие протоков молочной железы
Тестостерон	Семенники		Вызывает развитие и поддержание мужских вторичных половых признаков; необходим для созревания и нормальной функции аксессуарных органов половой системы

¹ В нервной системе некоторые из этих молекул могут функционировать как локальные химические медиаторы, а не как нейромедиаторы в строгом смысле слова (см. разд. 13.1.6). Возбуждающие нейромедиаторы активируют постсинаптическую клетку, а тормозные подавляют ее активность.



Рис. 13-4. Здесь показано, как одинаковые сигнальные молекулы, присоединяясь к идентичным рецепторам двух разных клеток-мишеней (мышечной и секреторной), могут вызывать разные ответы. Клетки-мишени каждого типа запрограммированы так, что реагируют определенным характерным образом на каждый специфический сигнал.

ми: они либо имеют характерный набор рецепторов, реагирующих на определенный набор комплементарных им химических сигналов, либо отвечают на каждый сигнал как-то по-своему (рис. 13-4).

13.1.3. Реакция клетки на химический сигнал в одних случаях может быть быстрой и непродолжительной, в других — медленной и долговременной

Химические сигналы, приводящие клеточные реакции в соответствие с изменениями среды, обычно вызывают быстрые и кратковременные ответы. Например, повышение уровня глюкозы в крови стимулирует секрецию пептидного гормона *инсулина* эндокринными клетками поджелудочной железы. В считанные минуты повышение концентрации инсулина ускоряет поглощение глюкозы клетками печени и мышц, и концентрация глюкозы в крови падает. Тогда секреция инсулина, а в результате и скорость поглощения глюкозы клетками мышц и печени возвращаются к исходному уровню. Таким путем поддерживается сравнительно постоянная концентрация глюкозы в крови. Нейромедиаторы вызывают еще более быстрые реакции: в ответ на освобождение ацетилхолина из двигательных нервных окончаний клетки скелетной мускулатуры сокращаются и вновь расслабляются всего лишь за несколько миллисекунд.

Химическая сигнализация играет важную роль и в процессах развития животного, нередко определяя время и тип дифференцировки тех или иных клеток. В таких случаях влияние химического сигнала обычно сказывается медленно и бывает продолжительным. Например, в период полового созревания клетки яичника начинают в больших количествах секретировать стероидный женский половой гормон *эстрадиол*. Этот гормон вызывает изменения многих клеток в различных частях организма, что в конце концов приводит к развитию вторичных женских половых признаков, например к увеличению грудных желез. Если секреция эстрадиола прекращается, эти эффекты постепенно исчезают, но некоторые реакции, вызываемые стероидными половыми гормонами на очень раннем этапе развития млекопитающих, необратимы (см. конец табл. 13.1). Аналогичным образом десятикратное повышение концентрации тиреоидного гормона в крови вызывает ряд радикальных и необратимых изменений, приводящих к превращению головастика в лягушку (рис. 13-5).

13.1.4. Сигнальные молекулы могут быть водорастворимыми или жирорастворимыми [1]

Все известные нейромедиаторы, а также большинство гормонов и локальных химических медиаторов водорастворимы. Исключение составляют в основном сравнительно плохо растворимые в воде стероидные и тиреоидные гормоны. Для переноса этих гормонов с кровью их растворимость повышается путем связывания со специфическим белком. Такая разница в растворимости обуславливает фундаментальные различия в механизмах воздействия этих двух классов молекул на клетки-мишени. Водорастворимые молекулы слишком гидрофильны, чтобы прямо проходить через липидный бислой плазматической мембраны; вместо этого они связываются со специфическими белковыми рецепторами на клеточной поверхности. Напротив, стероидные и тиреоидные гормоны гидрофобны и, отделившись от белка-носителя, могут легко проходить через плазматическую мембрану клетки-мишени. Эти гормоны связываются со специфическими белковыми рецепторами *внутри* клетки (рис. 13-6).

Еще одно важное различие между двумя указанными классами сигнальных молекул — это разная продолжительность их жизни в кровотоке или тканевых жидкостях. Водорастворимые гормоны после попадания в кровь обычно удаляются и/или разрушаются за время, измеряемое минутами. Ло-

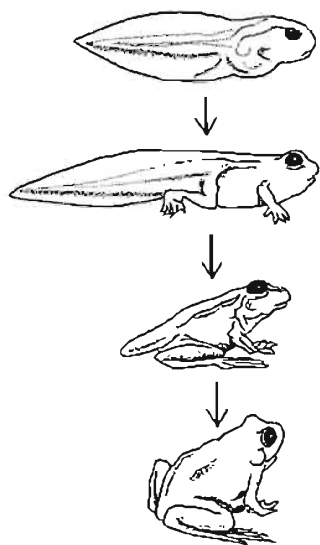


Рис. 13-5. Различные стадии превращения головастика в лягушку. Все эти драматические изменения вызываются тиреоидным гормоном. Если удалить у развивающегося эмбриона зачаток щитовидной железы, животное не претерпевает метаморфоза и продолжает расти в виде головастика. При инъекции тиреоидного гормона такой гигантский головастик превращается в лягушку.

кальные химические медиаторы и нейромедиаторы после выхода в межклеточное пространство инактивируются еще быстрее, за время порядка секунд или миллисекунд. В отличие от этого стероидные гормоны циркулируют в крови часами, а тиреоидные могут сохраняться несколько дней. Поэтому водорастворимые сигнальные молекулы обычно вызывают кратковременные реакции, а водонерастворимые имеют тенденцию вызывать более продолжительный ответ.

13.1.5. Локальные химические медиаторы после их секреции быстро разрушаются [3]

Многие сигнальные молекулы секретируются во внеклеточную жидкость и действуют только на ближайшие клетки. Такие локальные химические медиаторы отличаются от гормонов тем, что очень быстро поглощаются клетками и/или разрушаются и обычно не попадают в кровь в сколько-нибудь значительном количестве.

Некоторые локальные медиаторы секретируются специально приспособленными для этой функции клетками. Например, *гистамин* (производное аминокислоты гистидина, см. табл. 13-1) выделяют главным образом тучные клетки. Эти клетки, присутствующие в соединительной ткани всего тела, накапливают гистамин в больших секреторных пузырьках и в случае повреждения ткани, при местной инфекции или при некоторых иммунных реакциях быстро освобождают его путем экзоцитоза. Гистамин вызывает местное расширение кровеносных сосудов и увеличивает их проницаемость, что облегчает доступ к поврежденному участку фагоцитирующим лейкоцитам и белкам сыворотки (например, антителам и компонентам системы комплемента; см. гл. 17). Среди других химических медиаторов, выделяемых тучными клетками, имеются два тетрапептида, которые привлекают к месту своей секреции лейкоциты из группы *эозинофилов*. Эозинофилы содержат разнообразные ферменты, участвующие в инактивации гистамина и других освобождаемых тучными клетками медиаторов.

В то время как некоторые химические медиаторы, подобно гистамину, секретируются особыми клетками, источником других могут быть клетки различного типа. Важным примером такого рода локальных медиаторов служат *простагландины* – семейство производных жирных кислот с 20 атомами углерода. Так же как и другие локальные медиаторы, простагландины быстро расщепляются специфическими ферментами вблизи места своего синтеза. Известно, что многие из 16 простагландинов, подразделяемых на 9 классов (PGA, PGB, PGC, PGI), связываются с различными рецепторами клеточной поверхности и вызывают разные биологические эффекты. В отличие от большинства сигнальных молекул простагландины не накапливаются в клетках, а непрерывно освобождаются во внеклеточное пространство. Они все время синтезируются в мембранах клеток из предшественников, отщепляемых от фосфолипидов фосфолипазами (рис. 13-7), и все время разрушаются вне клеток. Но многие клетки при активации, вызванной изменением окружающей их среды, увеличивают скорость синтеза простагландинов; в результате их локальная концентрация повышается, что влияет и на саму клетку, выделяющую простагландины, и на ее ближайших соседей.

Простагландинам приписывают множество различных биологических эффектов. Они вызывают сокращение гладкой мускулатуры, агрегацию тромбоцитов и воспалительную реакцию. Например, некоторые простагландины, в больших количествах образующиеся в матке во время родов, по-видимому, важны для стимуляции сокращений гладкой мускулатуры матки. Эти простагландины сейчас широко используют в качестве фармакологических препаратов, вызывающих аборт. Недавно появились данные о том, что действие аспирина и некоторых других противовоспалительных средств, вероятно, основано на подавлении биосинтеза простагландинов.

Не все локальные химические медиаторы быстро разрушаются после их

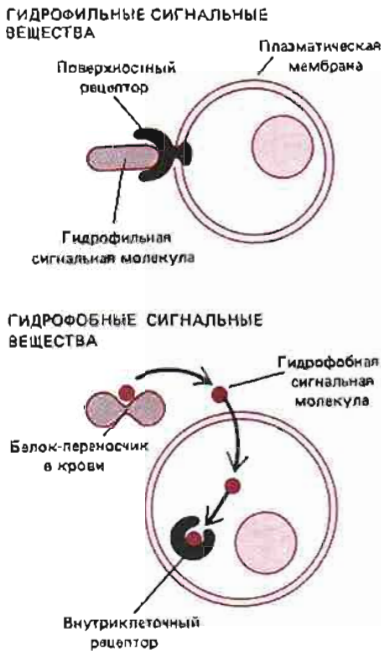


Рис. 13-6. Различия в механизме действия гидрофильных и гидрофобных сигнальных молекул. Гидрофильные молекулы не способны прямо проходить через плазматическую мембрану, поэтому они связываются с рецепторами на поверхности клетки-мишени. Гидрофобные молекулы могут диффундировать через плазматическую мембрану, и они связываются с рецепторами внутри клетки. Будучи нерастворимыми в водных средах, гидрофобные сигнальные молекулы транспортируются кровью в виде комплексов со специальными белками-переносчиками, от которых они отделяются, перед тем как проникнуть в клетку-мишень.

высвобождения. Коллаген и другие компоненты внеклеточного матрикса можно рассматривать как особого рода локальные медиаторы. Они секретируются клетками и вызывают изменения в поведении соседних клеток. Эти молекулы отличаются от других локальных химических медиаторов тем, что они нерастворимы и поэтому не диффундируют из того участка, где были синтезированы. Таким образом, нет нужды в их быстрой инактивации, для того чтобы их влияние не распространялось слишком далеко.

13.1.6. Некоторые сигнальные молекулы, выделяемые нервными окончаниями, вероятно, действуют не как нейромедиаторы, а как локальные химические медиаторы [4]

Нейромедиаторы либо быстро расщепляются в синаптической щели специфическими ферментами (такова судьба ацетилхолина, освобожденного в нервно-мышечном соединении), либо быстро вновь поглощаются выделившими их нервными окончаниями. Немедленное удаление медиатора служит двум целям: ограничивает эффект нейромедиатора постсинаптической клеткой и прекращает воздействие его молекул, так что каждый сигнал очень непродолжителен и может быть почти мгновенно повторен. Это делает сигнализацию чрезвычайно точной.

Нервные и эндокринные клетки направляют свои сигнальные молекулы к клеткам-мишеням совершенно разными способами. Эндокринные клетки каждого типа секретируют свой гормон в кровь, а специфичность ответа целиком зависит от того, какие клетки-мишени имеют рецептор для этого гор-

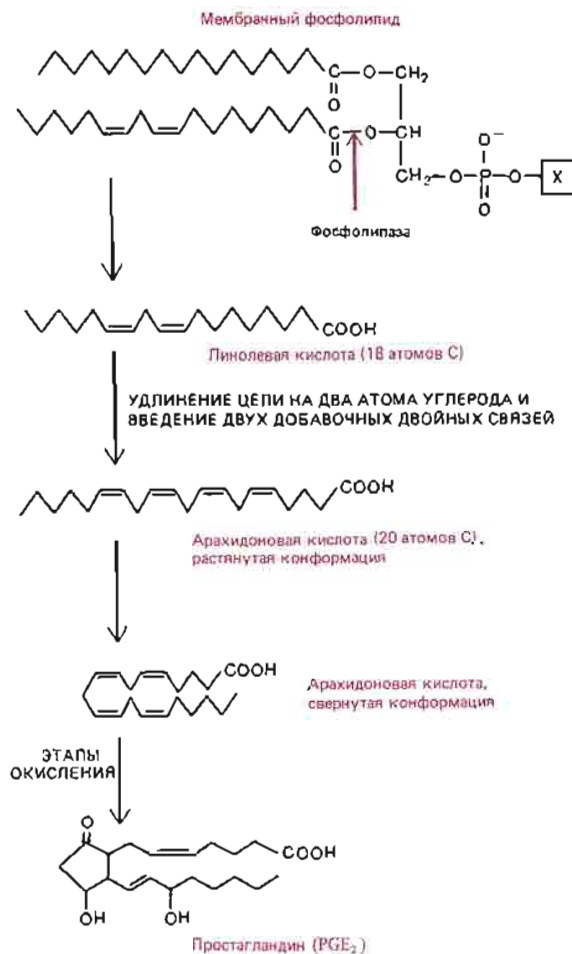
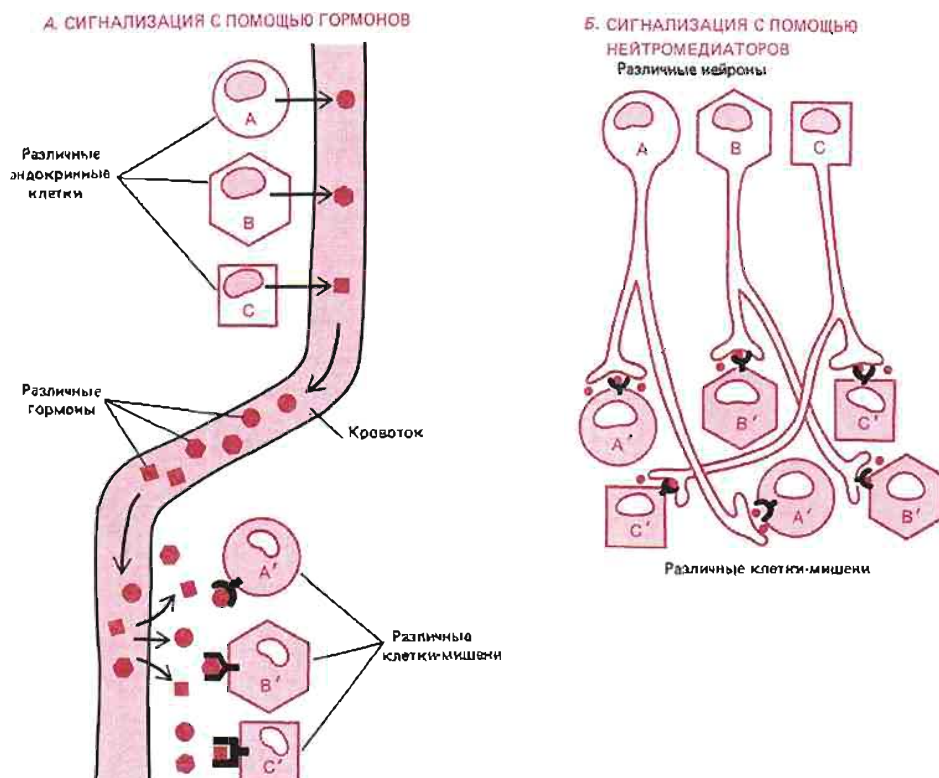


Рис. 13-7. Синтез простагландина PGE₂ (индекс указывает на наличие двух двойных связей вне циклической части молекулы). Простагландины непрерывно синтезируются большинством клеток из цепей жирных кислот, отщепляющихся от мембранных фосфолипидов.

Рис. 13-8. Различия между сигнализацией с помощью гормонов (А) и нейромедиаторов (Б). Клетки эндокринной системы выделяют в кровоток множество различных гормонов, которые действуют на определенные клетки-мишени, имеющие рецепторы для связывания соответствующих гормонов и таким образом «высвобождают» нужные гормоны из внеклеточной жидкости. В отличие от этого у большинства нервных клеток специфичность сигнализации определяется контактом между их отростками и определенными клетками-мишенями: воздействию нейромедиатора, выделяемого нервным окончанием, подвергаются только те клетки, которые имеют с этим окончанием синаптический контакт. В то время как разные эндокринные клетки должны использовать для связи с разными клетками-мишенями различные гормоны, разные нервные клетки могут использовать один и тот же нейромедиатор без ущерба для специфичности связи.

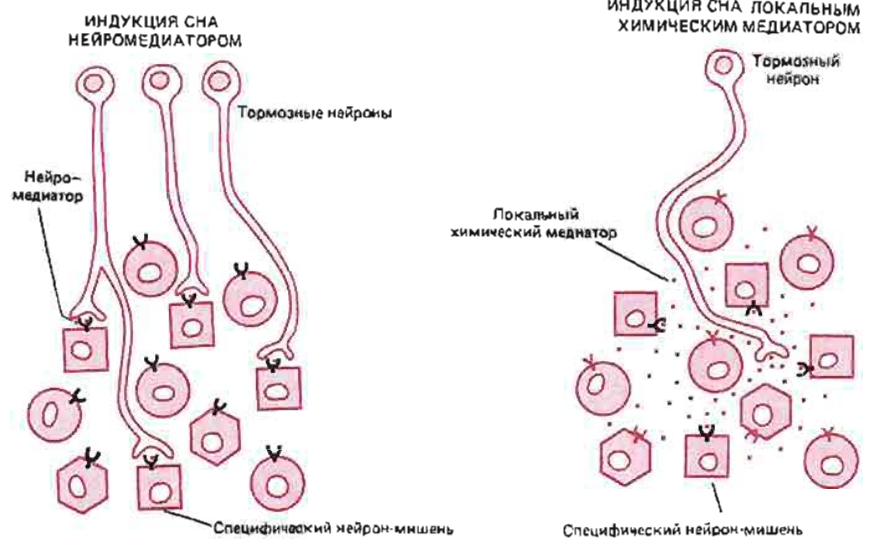


мона. Таким образом, эндокринная система специфически регулирует активность многих различных клеток-мишеней, используя множество разных гормонов (и соответствующих им рецепторов). С другой стороны, скорость, точность и сложная организация сигнальных процессов в нервной системе в значительной степени зависят от анатомических факторов. Хотя клетки-мишени и обладают специфическими рецепторами, специфичность сигнализации определяется главным образом синаптическими связями между отдельными нервными клетками и их мишенями; нейромедиатор высвобождается в синапсе и влияет лишь на соседнюю постсинаптическую клетку (рис. 13-8). Одни нейромедиаторы (*возбуждающие*) стимулируют постсинаптическую клетку, другие (*тормозные*) подавляют ее активность.

Если бы все возбуждающие и тормозные сигналы в нервной системе были направлены описанным образом на единичные клетки, можно было бы обойтись очень небольшим числом сигнальных веществ. Однако в действительности в мозгу позвоночных уже обнаружено более 30 таких веществ, в том числе ацетилхолин, аминокислоты [глицин, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, γ -аминомасляная кислота (ГАМК)], производные аминокислот (норадреналин, дофамин, серотонин и гистамин) и разнообразные пептиды. Это может означать, что многие сигнальные молекулы функционируют не как обычные нейромедиаторы, а как локальные химические медиаторы (*нейрорегуляторы*), которые, освобождаясь из нервных окончаний, диффундируют на небольшое расстояние и влияют на множество находящихся поблизости клеток. Строго говоря, такая сигнализация не является синаптической (одно окончание — одна клетка-мишень), поэтому для обеспечения специфичности необходимо большое число сигнальных веществ (и комплементарных им рецепторов), как в эндокринной системе.

Почему мог возникнуть такой механизм нервной сигнализации, основанный на локальных химических медиаторах? Предположим, например, что сон требует торможения большого числа определенных нейронов в некото-

Рис. 13-9. Две гипотетические схемы индукции сна, основанные на предположении, что для сна необходимо торможение определенных нейронов (показанных квадратами). В принципе торможения можно было бы достигнуть либо с помощью тормозного нейромедиатора, выделяемого нейронами, имеющими синапсы на всех «квадратных» клетках, либо более простым способом — путем высвобождения локального химического медиатора тормозными нервными окончаниями всей той области, где находятся «квадратные» клетки. Предполагается, что в последнем случае именно эти клетки будут тормозиться потому, что только у них есть рецепторы для медиатора.



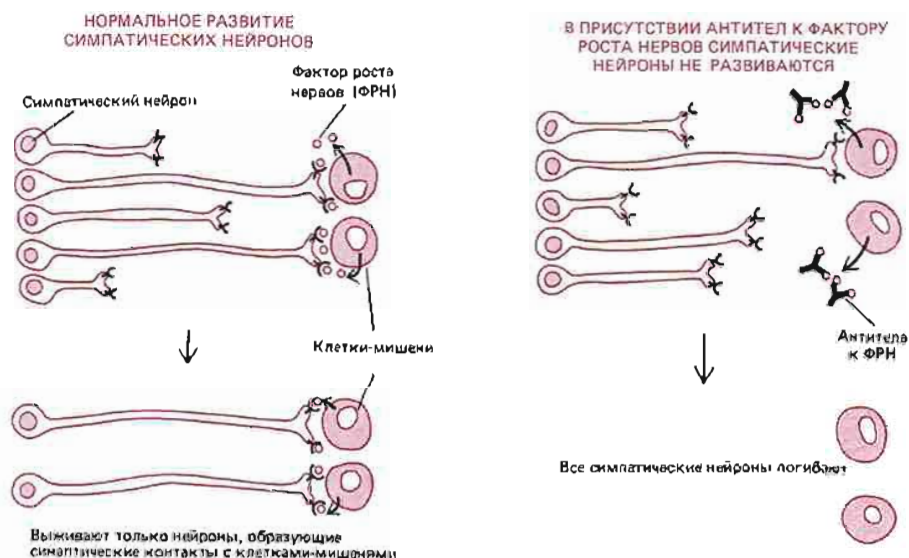
ром участке мозга. Такого результата можно было бы достигнуть, если бы на всех нужных нейронах имелись синапсы специфических тормозных нервных окончаний. Другой возможный способ состоит в том, что сравнительно небольшое число нервных окончаний высвобождает в соответствующей области тормозный локальный медиатор. Если все нужные нервные клетки имеют рецепторы для такого «вещества сна», они будут заторможены (рис. 13-9). И действительно, можно усыпить бодрствующих животных путем инъекции (в желудочки мозга) цереброспинальной жидкости от животных, которым много суток не давали спать.

13.1.7. Некоторые гормоны и локальные химические медиаторы служат специфическими факторами роста [5]

Скорость деления клеток некоторых типов регулируется химическими сигналами. Иногда сигнальными факторами служат обычные гормоны. При половом созревании у млекопитающих эстрадиол стимулирует деление эпителиальных клеток молочных желез. При метаморфозе головастика тироксин вызывает пролиферацию определенных мышечных и хрящевых клеток и в то же время саморазрушение клеток хвоста. Гормон гипофиза *соматотропин* (называемый также *гормоном роста*) стимулирует клеточные деления косвенным образом, заставляя клетки печени (а возможно, и другие клетки) секретировать ряд белковых гормонов, вызывающих деление определенных клеток. Гормоны, с помощью которых соматотропин оказывает свое действие, называются *соматомединами*; они стимулируют рост и метаболизм мышечных и хрящевых клеток. Дети, у которых образуется слишком мало соматотропина, становятся карликами, а те, у которых его слишком много, — гигантами.

Другие факторы роста действуют не как гормоны, а как локальные химические медиаторы. В процессе индивидуального развития выживание и рост нейронов определенных типов зависит от фактора роста нервов (ФРН, димер из двух идентичных полипептидных цепей длиной 118 аминокислот), который, как полагают, секретируется клетками-мишенями этих нейронов. Необходимость ФРН для выживания развивающихся нейронов симпатической нервной системы доказывают наблюдения тройного рода: 1) инъекция антител анти-ФРН новорожденным мышам вызывает избирательную гибель симпатических нейронов (рис. 13-10); 2) многие незрелые симпатические нейроны способны неограниченно долго жить в культуре, не содержащей других клеток, если добавить в среду ФРН, а без ФРН погибают за несколько дней; 3) развивающиеся симпатические нейроны, которым не удалось образовать синап-

Рис. 13-10. Схема, показывающая необходимость фактора роста нервов (ФРН) для выживания развивающихся симпатических нейронов. Введение эмбриону антител к ФРН вызывает гибель симпатических нейронов. Как полагают, ФРН высвобождается из клеток-мишеней и связывается с рецепторами окончаний тех симпатических нейронов, которые образуют синапсы с данными клетками-мишенями.



Выживают только нейроны, образующие симпатические контакты с клетками-мишенями, в норме отмирают, но их можно спасти инъекцией ФРН.

Эти результаты, взятые вместе, позволяют предполагать, что многие развивающиеся симпатические нейроны выживают лишь в том случае, если получают сигналы в виде небольшого количества ФРН, выделяемого клетками, которые они иннервируют (рис. 13-10). Известно, что многие центральные и периферические (в том числе симпатические) нейроны, возникающие в ходе нормального развития, отмирают в первые дни после своего образования. Выживают, по-видимому, лишь те, которые установили синаптический контакт с надлежащими клетками-мишенями. Вероятно, нейронам разного типа для выживания нужны разные специфические факторы — продукты иннервируемых клеток, и ФРН — лишь один из многих факторов такого рода. Видимо, избыточность нейронов при развитии нервной системы обеспечивает иннервацию всех клеток-мишеней.

ФРН может также служить частью механизма, направляющего симпатические нервные волокна к соответствующим клеткам-мишеням. Введение ФРН в головной мозг новорожденного мышонка заставляет симпатические нервные волокна вращать в центральную нервную систему, чего в норме никогда не наблюдается. Аналогичное явление можно продемонстрировать *in vitro*. Если поместить незрелые симпатические нейроны в центральный отсек культуральной чашки, поделенной на три части барьерами из непроницаемой для ФРН силиконовой смазки, то нервные волокна мигрируют через барьер в соседний отсек лишь в том случае, если он содержит ФРН (рис. 13-11).

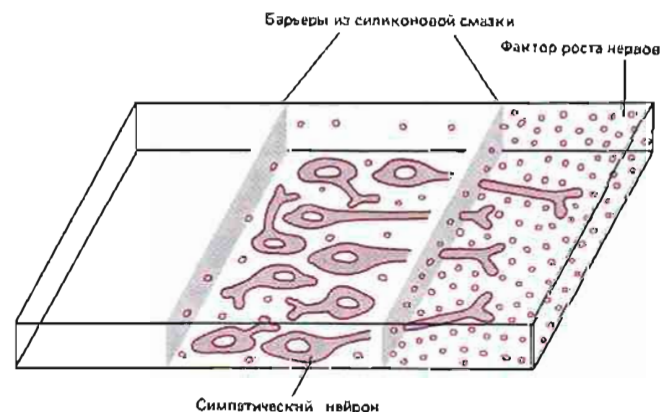


Рис. 13-11. Представленный здесь опыт показывает, что фактор роста нервов (ФРН) может влиять на направление роста нервных окончаний. Если поместить симпатические нейроны в средний отсек культуральной чашки, разделенной на три отсека барьерами из силиконовой смазки, то клетки вытягивают нервные окончания только в один из боковых отсеков — в тот, который содержит ФРН.

Заключение

По механизму действия сигнальные молекулы можно разделить на три основных класса: 1) локальные химические медиаторы быстро поглощаются или разрушаются, поэтому они воздействуют лишь на соседние клетки; 2) гормоны переносятся к своим мишеням, распределенным нередко по всему организму, с кровотоком; 3) нейромедиаторы действуют только на постсинаптическую клетку. Каждый тип клеток организма имеет свойственный ему набор белков-рецепторов, позволяющий запрограммированным и характерным образом реагировать на соответствующий набор сигнальных молекул.

Сигнальные молекулы можно также классифицировать по признаку их растворимости в воде. Гидрофобные сигнальные молекулы, например стероидные гормоны, проходят через плазматическую мембрану и активируют рецепторный белок в цитоплазме клетки, а гидрофильные, в частности нейромедиаторы и большинство гормонов и локальных химических медиаторов, активируют белковый рецептор на поверхности клетки-мишени.

13.2. Сигнализация с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов

Все стероидные гормоны синтезируются из холестерина. Будучи сравнительно небольшими (мол. масса около 300) гидрофобными молекулами, они проходят через плазматическую мембрану путем простой диффузии. Оказавшись внутри клетки-мишени, стероидный гормон каждого типа прочно, но обратимо связывается со своим специфическим рецепторным белком, находящимся в цитоплазме. Присоединение гормона ведет к аллостерическому изменению конформации рецепторного белка, что повышает его способность связываться с ДНК. Поскольку рецепторные белки способны проходить через ядерные поры, при повышении их сродства к ДНК гормон-рецепторные комплексы накапливаются в ядре (рис. 13-12).

Гормоны щитовидной железы тоже представляют собой небольшие гидрофобные молекулы, присоединяющиеся к внутриклеточным рецепторам. Как полагают, по механизму своего первичного действия они подобны стероидным гормонам, но их рецепторы сконцентрированы в ядре еще до присоединения гормона.

13.2.1. Комплексы стероидных гормонов с рецепторами присоединяются к хроматину и регулируют транскрипцию специфических генов [6]

Типичная клетка-мишень содержит около 10 000 рецепторов для стероидных гормонов. Каждый рецептор может обратимо, но с высоким сродством (константа сродства $K = 10^8 - 10^{10}$ л/моль) связать одну молекулу определенного гормона. Когда уровень гормона высок, большинство рецепторов образует комплексы с его молекулами и в этой активированной форме связывается с хроматином ядра. Если уровень гормона падает, равновесие сдвигается в сторону диссоциации этих комплексов и свободные рецепторы возвращаются в цитоплазматический пул (рис. 13-13).

Некоторые активированные рецепторы, связавшись с хроматином, регулируют транскрипцию определенных генов. Однако лишь немногие гены в любой клетке-мишени находятся под прямым влиянием стероидных гормонов. Например, через 30 мин после добавления кортизола к культуре печеночных клеток крысы из тысячи белков, которые можно разделить с помощью двумерного гель-электрофореза, затронутыми оказываются всего семь: количество шести из них увеличивается, а количество одного падает. После удаления гормона скорость синтеза этих белков возвращается к норме. Предполагая, что указанный метод позволяет выявить около 10% клеточных белков,

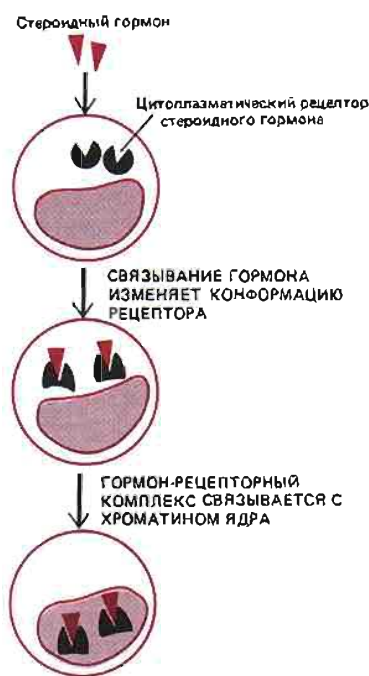
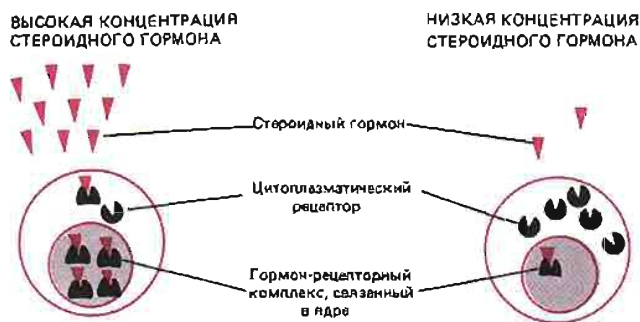


Рис. 13-12. Схема сигнализации с помощью стероидных гормонов. Молекулы стероидов диффундируют через плазматическую мембрану клетки-мишени и связываются в цитоплазме с рецепторными белками. Образующиеся гормон-рецепторные комплексы переходят в ядро, где присоединяются к хроматину и регулируют транскрипцию определенных генов.

Рис. 13-13. Как показано на этой схеме, при высоких концентрациях стероидного гормона большинство молекул-рецепторов образуют комплекс с гормоном и связываются с хроматином ядра клетки-мишени, а при низких концентрациях гормона большая часть рецепторов находится в свободном виде в цитоплазме.



можно заключить, что кортизол, вероятно, непосредственно изменяет транскрипцию всего лишь около полусотни генов. Интересно, что один и тот же рецептор гормона может в разных клетках-мишенях влиять на разные наборы генов (см. разд. 13.2.3).

Как показали эксперименты *in vitro*, присоединение соответствующего стероидного гормона приводит к аллостерическому изменению рецептора (его активации), значительно повышающему сродство рецепторного белка к ДНК из любого источника. Поскольку рецепторы стероидов, по-видимому, непрерывно диффундируют из цитоплазмы в ядро и обратно, считается, что накопление активированных рецепторов в ядре вызывается именно таким усилением их неспецифического связывания с ДНК. Полагают также, что активированный гормоном рецептор приобретает повышенное сродство к нескольким специфическим участкам хроматина, ответственным за регуляцию активности генов, хотя это прямо наблюдать не удается.

Пожалуй, наиболее убедительные данные в пользу описанной выше схемы были получены в экспериментах с мутантными клеточными линиями, отобранными по признаку измененной реакции на кортизол. Мутантные клетки получали из лимфоцитарных опухолей, называемых лимфомами. Подобно некоторым нормальным лимфоцитам, клетки лимфомы гибнут при добавлении к культуральной среде небольшого количества кортизола. Однако мутантные клетки устойчивы к этому действию кортизола. Оказалось, что у некоторых из них рецепторный белок, связавшись с кортизолом, не переходит из цитоплазмы клетки в ядро (рис. 13-14). Хотя такие мутантные рецепторы нормально связывают кортизол, они почти утратили способность присоединяться к ДНК. Эксперименты с разнообразными мутантными рецепторами выявляют сильную корреляцию между их сродством к ДНК в пробирке и миграцией в ядро при связывании кортизола в клетке; поэтому можно предпологать, что ДНК составляет по меньшей мере часть мишени, узнаваемой активированными рецепторами в ядре.



Рис. 13-14. Один из типов мутантных клеток с измененными рецепторами для стероидного гормона: эти рецепторы связывают гормон, но не переходят затем в ядро.

Представление о том, что связывание гормон-рецепторного комплекса со специфическими участками хроматина регулирует транскрипцию определенных генов, получило всеобщее признание, однако прямо идентифицировать эти специфические участки невероятно трудно. Главный источник затруднений — неспецифическое связывание рецепторов с ДНК. Далее, для регуляции 50 генов может быть достаточно связывания лишь малой доли тех 10 000 гормон-рецепторных комплексов, которые содержатся в клетке. А между тем даже 10 000 рецепторов составляют по весу всего только 1/50 000 часть общего клеточного белка; поэтому в высокоочищенном виде рецепторный белок удалось получить лишь в очень малом количестве. В связи со всем этим трудно было выяснить, чем определяется специфичность действия рецепторов для стероидов — узнаванием определенных последовательностей ДНК, особых хромосомных белков или и тем и другим одновременно. Однако недавно с помощью методов геной инженерии удалось клонировать один ген, регулируемый кортизолом, и таким образом получить в большом количестве соответствующую ДНК. Было показано, что очищенный рецептор кор-

тизола специфически связывается с определенными последовательностями ДНК внутри и около клонированного гена. Этот важный результат позволяет думать, что рецепторы стероидов индуцируют транскрипцию генов, узнавая определенные последовательности ДНК.

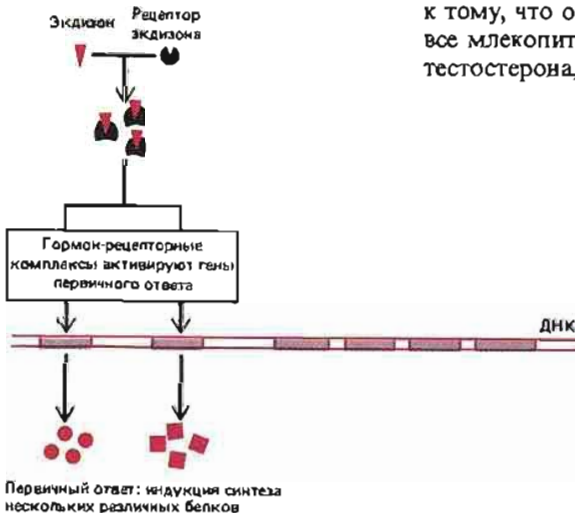
13.2.2. Стероидные гормоны часто вызывают и первичный, и вторичный ответ [7]

Во многих случаях реакция на стероидный гормон бывает двухстадийной. Прямая индукция транскрипции нескольких специфических генов называется *первичным ответом*. Продукты этих генов могут в свою очередь активировать другие гены и вызвать с некоторым запозданием *вторичный ответ*. На этой стадии может достигаться значительное усиление первоначального эффекта.

Разительный пример можно найти у плодовой мушки дрозофилы. В течение 5–10 мин после инъекции стероидного гормона личинки насекомых – экдизона – в гигантских полигенных хромосомах слюнных желез появляются шесть новых участков активного синтеза РНК (они видны в виде *пуфов*, см. разд. 8.1.13). Через определенное время некоторые из белков, синтезированных во время первичного ответа, индуцируют около сотни новых участков синтеза РНК, что приводит к появлению большой группы белков, характерных для вторичного ответа. Один или несколько первичных белков управляют всем ответом, выключая по принципу обратной связи транскрипцию всех генов, участвовавших в первичном ответе (рис. 13-15). Вполне вероятно, что аналогичные механизмы осуществляют усиление и регуляцию многих реакций на гормоны и в клетках млекопитающих.

Рис. 13-15. Схема раннего первичного (А) и задержанного вторичного (Б) ответа клеток дрозофилы на экдизон. Некоторые из белков, синтезируемых при первичном ответе, включают гены, ответственные за вторичный ответ, а другие выключают гены, участвовавшие в первичном ответе. На самом деле в обоих ответах участвует больше генов, чем показано на схеме.

А. РАННИЙ ОТВЕТ НА ЭКДИЗОН



13.2.3. Стероидные гормоны регулируют активность разных генов в разных клетках-мишенях [8]

Реакция на стероидные гормоны, как и на гормоны вообще, определяется не только природой гормона, но не в меньшей мере и природой клетки-мишени. В принципе этому могут быть два объяснения. Либо разные типы клеток имеют разные рецепторы для одного и того же гормона, либо рецепторы одинаковы, но они активируют различные гены. Эксперимент свидетельствует в пользу второго объяснения.

Данные получены в основном при изучении мутантов млекопитающих, у которых изменен рецептор того или иного стероидного гормона. В частности, дефект в рецепторе мужского полового гормона *тестостерона* приводит к тому, что особи с мужским генотипом выглядят как самки; дело в том, что все млекопитающие, не подвергшиеся в эмбриональный период воздействию тестостерона, развиваются по женскому пути. Мутантные самцы имеют пор-

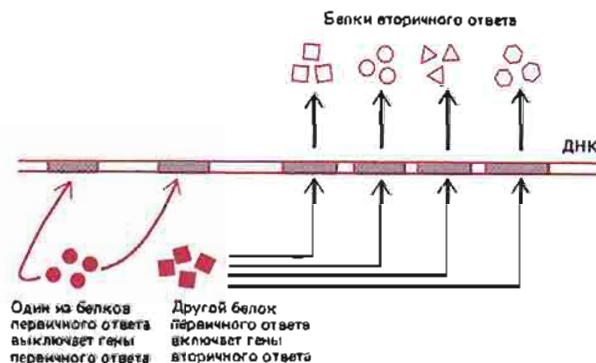
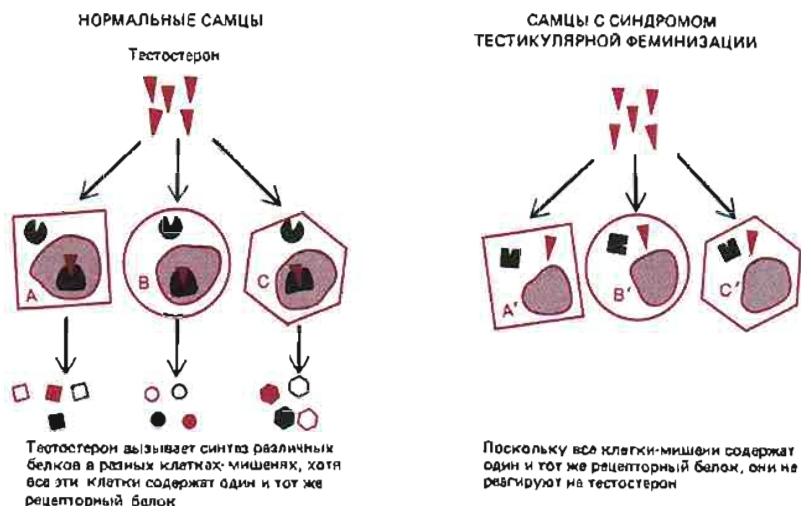


Рис. 13-16. Различные клетки-мишени, содержащие одни и те же рецепторные белки, могут по-разному реагировать на тестостерон. При синдроме тестикулярной феминизации мутация единичного гена, изменяющая рецептор тестостерона, приводит к тому, что все клетки-мишени не способны реагировать на этот гормон.



мальные семенники, вырабатывающие тестостерон, но ткани этих самцов не реагируют на гормон из-за дефектности соответствующих рецепторов. В результате у таких самцов развиваются все вторичные половые признаки самок и их семенники не опускаются в мошонку, а остаются в брюшной полости. Этот синдром тестикулярной феминизации встречается у мышей, крыс и крупного рогатого скота, а также у человека. Хотя изменен только ген, кодирующий рецептор тестостерона, затронутыми оказываются все разнообразные типы клеток, в норме реагирующие на этот гормон (рис. 13-16). Значит, в норме во всех клетках-мишенях содержится один и тот же рецепторный белок, хотя его активация и регулирует совершенно различные наборы генов в клетках разного типа.

Таким образом, общие принципы действия стероидных гормонов ясны. Каждый стероидный гормон вызывает характерный комплекс ответов, так как 1) рецепторы для данного гормона синтезируются только в тех клетках, которые должны на него реагировать, и 2) хроматин клетки-мишени, видимо, организован так, что рецептор стероида активирует лишь нужные гены (см. гл. 18). Поскольку гены, способные активироваться, в клетках-мишенях разного типа различны, связывание одного и того же гормона с одним и тем же рецептором влияет на различные клетки по-разному.

Заключение

Стероидные гормоны — это небольшие гидрофобные молекулы, производные холестерина. Они солибилизируются путем обратимого связывания со специальным белком-переносчиком, содержащимся в крови. Освободившись от переносчика, они диффундируют через плазматическую мембрану клетки-мишени и обратимо связываются в цитозоле со специфическими белками — рецепторами соответствующих гормонов. Связавшись с гормоном, рецепторный белок приобретает сродство к ДНК, что приводит к его накоплению в ядре клетки. В ядре гормон-рецепторный комплекс присоединяется к хроматину и индуцирует транскрипцию небольшого числа генов. Продукты некоторых из этих генов могут в свою очередь активировать другие гены и вызвать задержанный вторичный ответ, усилив таким образом эффект гормона. Каждый стероидный гормон узнается своим особым рецепторным белком, но один и тот же рецептор регулирует разные наборы генов в разных клетках-мишенях. Отсюда следует, что хроматин в клетках каждого типа, вероятно, организован так, чтобы только нужные гены были доступны для регуляции гормон-рецепторным комплексом.

13.3. Сигнализация с участием рецепторов клеточной поверхности и вторых посредников — циклического АМР и ионов кальция

Водорастворимые сигнальные молекулы, в том числе все известные нейромедиаторы, пептидные гормоны и факторы роста, присоединяются к специфическим белковым рецепторам на поверхности клеток-мишеней. Поверхностные рецепторы связывают сигнальную молекулу (лиганд), проявляя большое сродство к ней, и это внеклеточное событие порождает внутриклеточный сигнал, изменяющий поведение клетки. Поскольку эти рецепторы являются неразрывными интегральными мембранными белками и составляют обычно менее 1% общей массы белков плазматической мембраны, их трудно выделить и изучить.

13.3.1. Использование меченых лигандов открыло новые пути в изучении поверхностных рецепторов [9]

Попытки использовать радиоактивные лиганды для выявления рецепторов на поверхности клеток-мишеней начались в 50-х годах, но здесь сразу возникли два затруднения: 1) введение изотопа (обычно радиоактивного иода или трития) в сигнальную молекулу сильно ослабляет ее функциональную активность; 2) большая часть лиганда связывалась с поверхностью клетки-мишени неспецифически, и только малая доля присоединялась к рецепторам. Преодоление этих технических трудностей позволило (около 1970 г.) прямо продемонстрировать наличие специфических рецепторов на поверхности intactных клеток и на изолированных мембранах.

Используя лиганды, меченные радиоактивными атомами, флуоресцентными красителями или электроноплотными молекулами (например, ферритином), сейчас можно изучать количество, расположение и свойства поверхностных рецепторов, а также проследить судьбу образующегося комплекса рецептора с лигандом. Было показано, что число рецепторов конкретного лиганда может варьировать в пределах от 500 до более чем 100 000 на клетку и что сразу после связывания лиганда рецепторы могут либо располагаться на плазматической мембране случайным образом, либо скапливаться в определенных ее участках.

13.3.2. Белковые гормоны и факторы роста поглощаются клеткой путем эндоцитоза при участии рецепторов [10]

Как показали эксперименты с мечеными лигандами, многие из белковых сигнальных молекул попадают внутрь клеток-мишеней путем эндоцитоза, опосредуемого рецепторами (см. разд. 6.5.7). Например, инсулин связывается с рецепторами, диффузно распределенными на поверхности фибробластов. За считанные минуты инсулин-рецепторные комплексы концентрируются в окаймленных ямках и переходят в цитоплазму в эндоцитозных пузырьках (эндосомах). Поэтому вполне возможно, что белковые сигнальные молекулы (или продукты их расщепления) непосредственно действуют внутри клетки примерно таким же образом, как стероидные и тиреоидные гормоны. Следует, однако, помнить, что опосредуемый рецепторами эндоцитоз обычно приводит к переносу внеклеточных молекул в лизосомы (разд. 6.5.7); для того чтобы интересующие нас гидрофильные молекулы могли попасть в цитозоль, им потребовался бы какой-то специальный механизм выхода из эндоцитозного пузырька или лизосомы (рис. 13-17).

Можно путем прямого эксперимента показать, что по крайней мере некоторые сигнальные молекулы могут влиять на клетки, не проникая в них. Например, эффект инсулина можно в точности воспроизвести с помощью специфических антител, присоединяющихся к инсулиновым рецепторам на поверхности клеток-мишеней. Поэтому, хотя инсулин в норме и эндоцитируется, он не может сам по себе служить внутриклеточным сигналом. Точно так же, хо-

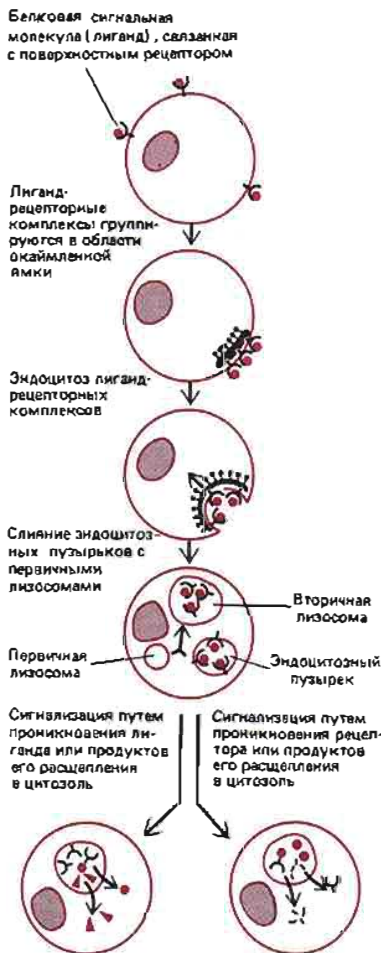
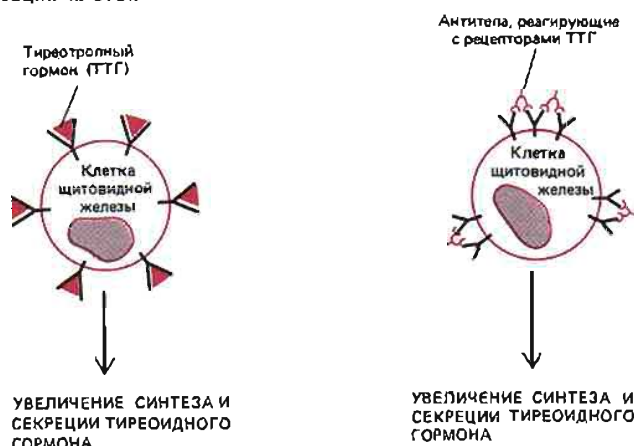


Рис. 13-17. Эта гипотетическая схема показывает, что было бы необходимо для того, чтобы белковые лиганды или их поверхностные рецепторы могли служить внутриклеточными медиаторами собственного действия. Понадобился бы специальный механизм, позволяющий лиганду или рецептору (или продуктам их расщепления) переходить из внутриклеточных пузырьков в цитозоль.

Рис. 13-18. Антитела к поверхностному рецептору тиреотропного гормона (ТТГ) имитируют эффект связывания ТТГ с рецептором. Это позволяет предполагать, что ТТГ не нужен для процесса сигнализации и, вероятно, не служит внутриклеточным медиатором собственного действия.



тя в норме клетки щитовидной железы начинают синтезировать и выделять свои гормоны под действием *тиреотропного гормона* (ТТГ), тот же эффект могут вызвать и антитела, связавшиеся на поверхности клеток щитовидной железы с рецепторами ТТГ (рис. 13-18). И в самом деле, такие антитела являются обычной причиной гиперфункции щитовидной железы у человека — заболевания, при котором эта железа вырабатывает гормоны в избытке. Эти наблюдения показывают, что инсулин и ТТГ не должны непременно проникать внутрь клетки, чтобы воздействовать на нее; однако не исключается возможность, что внутриклеточными сигналами служат сами поверхностные рецепторы этих гормонов, поскольку рецепторы обычно эндоцитируются и в комплексе с гормоном, и в комплексе с антителом (рис. 13-17).

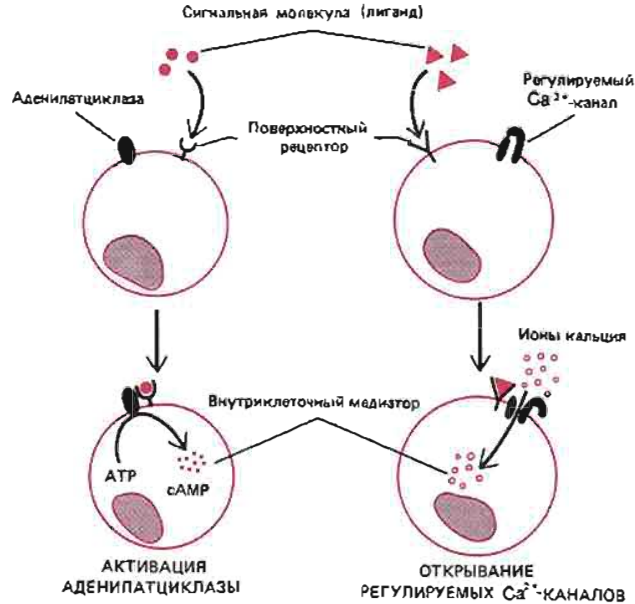
Реакция на многие гидрофильные сигнальные молекулы наступает слишком быстро, чтобы их действие можно было объяснить эндоцитозом с участием рецепторов. Тучные клетки секретируют гистамин уже через несколько секунд после связывания лиганда с поверхностными рецепторами, а реакция на некоторые нейромедиаторы занимает миллисекунды. В этих случаях рецепторы должны передавать воздействие через мембрану и создавать новый внутриклеточный сигнал.

13.3.3. Поверхностные рецепторы передают воздействие лиганда, регулируя активность ферментов и ионных каналов в плазматической мембране [11]

Как полагают, подавляющее большинство поверхностных рецепторов для гидрофильных сигнальных молекул, связав лиганд на внешней стороне мембраны, претерпевает конформационное изменение. Это изменение создает внутриклеточный сигнал, изменяющий поведение клетки-мишени. Внутриклеточные сигнальные молекулы часто называют *вторыми посредниками*, считая «первым посредником» внеклеточный лиганд.

Известны два общих способа создания внутриклеточного сигнала поверхностными рецепторами. Один из них состоит в активации или инактивации фермента, связанного с плазматической мембраной. В некоторых случаях этот фермент катализирует образование растворимого внутриклеточного медиатора, изменение концентрации которого служит сигналом. Важное место среди таких ферментов занимает *аденилатциклаза*, катализирующая синтез *циклического АМР* (сАМР) из АТР на внутренней стороне плазматической мембраны (рис. 13-19). В других случаях активируемый внеклеточным лигандом фермент прямо фосфорилирует клеточные белки. Например, *фактор роста эпидермиса* (ФРЭ) стимулирует деление эпидермальных и многих других клеток, присоединяясь к рецепторному белку клеточной поверхности. Рецепторами здесь служат протеинкиназы (или тесно ассоциированные с ними белки); фермент, активируясь при связывании с ФРЭ, переносит фосфат с АТР на тирозильные остатки определенных клеточных белков, в том числе на сам ре-

Рис. 13-19. Два часто встречающихся механизма, с помощью которых поверхностные рецепторы создают внутриклеточные сигналы: 1) активация мембранной аденилатциклазы ведет к повышению внутриклеточной концентрации циклического АМР; 2) в мембране открываются регулируемые кальциевые каналы, что позволяет ионам Ca^{2+} проникнуть в клетку. Для простоты показано прямое взаимодействие связавшего лиганд рецептора с молекулами аденилатциклазы или ионными каналами; на самом деле сопряжение молекул циклазы и, возможно, кальциевых каналов с рецепторами осуществляют другие мембранные белки.



цептор и на некоторые другие белки плазматической мембраны, а также на ряд белков цитозоля.

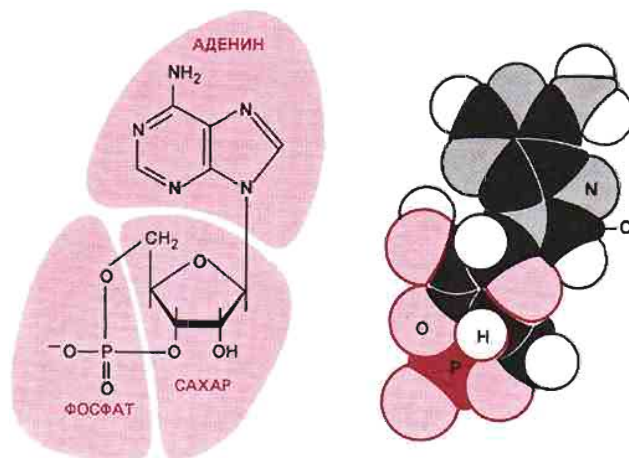
Второй способ действия рецепторов состоит в том, что они открывают или закрывают регулируемые ионные каналы плазматической мембраны. Здесь возможны два механизма создания сигнала: 1) изменение в состоянии каналов порождает небольшой и непродолжительный ионный ток, что приводит к кратковременному изменению мембранного потенциала; 2) открытие каналов приводит к значительному притоку ионов в цитозоль, что в свою очередь вызывает внутриклеточную реакцию. Первый механизм работает главным образом в электрически активных клетках, например в нейронах и мышечных волокнах. Так, например, большинство нейромедиаторов регулирует мембранный потенциал постсинаптической клетки, открывая или закрывая ионные каналы ее плазматической мембраны: падение мембранного потенциала ниже определенного порогового уровня вызывает взрывную деполяризацию мембраны (*потенциал действия*), которая быстро распространяется по всей мембране постсинаптической клетки. Эти изменения мембранного потенциала не сопровождаются заметными изменениями концентраций ионов в цитозоле, так что исходный сигнал, полученный постсинаптической мембраной, не превращается в истинный внутриклеточный сигнал до тех пор, пока распространяющийся потенциал действия не дойдет до нервного окончания. Плазматическая мембрана нервного окончания содержит потенциал-зависимые каналы для Ca^{2+} ; вызванная потенциалом действия временная деполяризация мембраны открывает эти каналы, и ионы кальция устремляются внутрь окончания «вниз» по своему очень крутому электрохимическому градиенту, выполняя роль второго посредника, запускающего секрецию нейромедиатора (см. гл. 18).

Многие животные клетки, не обладающие электрической активностью, имеют поверхностные рецепторы, функционально связанные с Ca^{2+} -каналами плазматической мембраны. Присоединение лиганда активирует эти рецепторы, и каналы открываются, что позволяет ионам Ca^{2+} попасть в цитозоль, где они служат вторыми посредниками (рис. 13-19).

13.3.4. Циклический АМР – вездесущий внутриклеточный медиатор [12]

Циклический АМР (сАМР, рис. 13-20) регулирует внутриклеточные реакции во всех до сих пор изученных прокариотических клетках и животных клетках,

Рис. 13-20. Структурная формула и объемная модель циклического АМР.



имеющих ядро. Хотя сАМР и служит важным внутриклеточным регулятором, он, видимо, не нужен для выживания клеток и их деления, так как некоторые линии эукариотических клеток, не синтезирующие обнаружимых количеств сАМР, нормально растут в культуре.

Большим успехом явилась идентификация сАМР как общего внутриклеточного посредника для различных гормонов. Первые данные о таком растворимом внутриклеточном медиаторе были получены при изучении влияния гормона *адреналина* (эпинефрина) на обмен гликогена в клетках печени. Оказалось, что адреналин активирует фермент *гликогенфосфорилазу*, катализирующий расщепление гликогена. Далее удалось показать, что обработка изолированных мембран печеночных клеток адреналином (в присутствии АТР) вызывает образование низкомолекулярного термолабильного медиатора, способного заменять гормон и активировать фосфорилазу в экстракте из тех же клеток, не содержащем мембран. В 1959 г. удалось идентифицировать этот медиатор как сАМР.

Для того чтобы сАМР мог служить внутриклеточным медиатором, его концентрация в клетке (обычно $\leq 10^{-6}$ М) должна строго контролироваться и в то же время быстро изменяться в ответ на определенные внеклеточные сигналы (под действием гормона уровень сАМР может за несколько секунд увеличиться в 5 раз). Циклический АМР синтезируется из АТР ферментом *аденилатциклазой*, связанным с плазматической мембраной клетки, но быстро расщепляется одним или несколькими внутриклеточными ферментами *фосфодиэстеразами*, которые гидролизуют его до аденозин-5'-монофосфата (5'-АМР) (рис. 13-21). Поверхностные рецепторы, для которых сАМР служит внутриклеточным посредником, действуют, изменяя (обычно стимулируя) активность аденилатциклазы, а не фосфодиэстеразы. Но для того чтобы концентрация любого внутриклеточного медиатора могла быстро увеличиться или уменьшиться, необходим также его непрерывный быстрый распад (или удаление) (см. разд. 13.4.8).

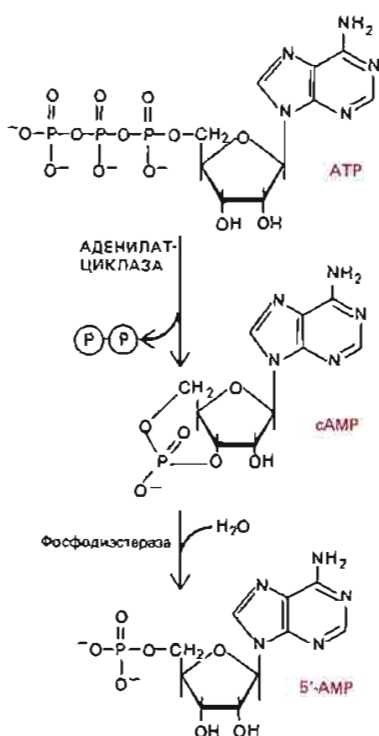


Рис. 13-21. Синтез и расщепление циклического АМР.

13.3.5. Рецептор и аденилатциклаза — это отдельные белки, которые функционально взаимодействуют в плазматической мембране [13]

Многие гормоны и локальные химические медиаторы действуют путем активации аденилатциклазы. Несколько примеров таких сигнальных лигандов и вызываемых ими эффектов приведено в табл. 13-2. Подобно тому как один и тот же стероидный гормон неодинаково действует на различные клетки-мишени, разные клетки весьма различно реагируют на изменение внутриклеточной концентрации сАМР.

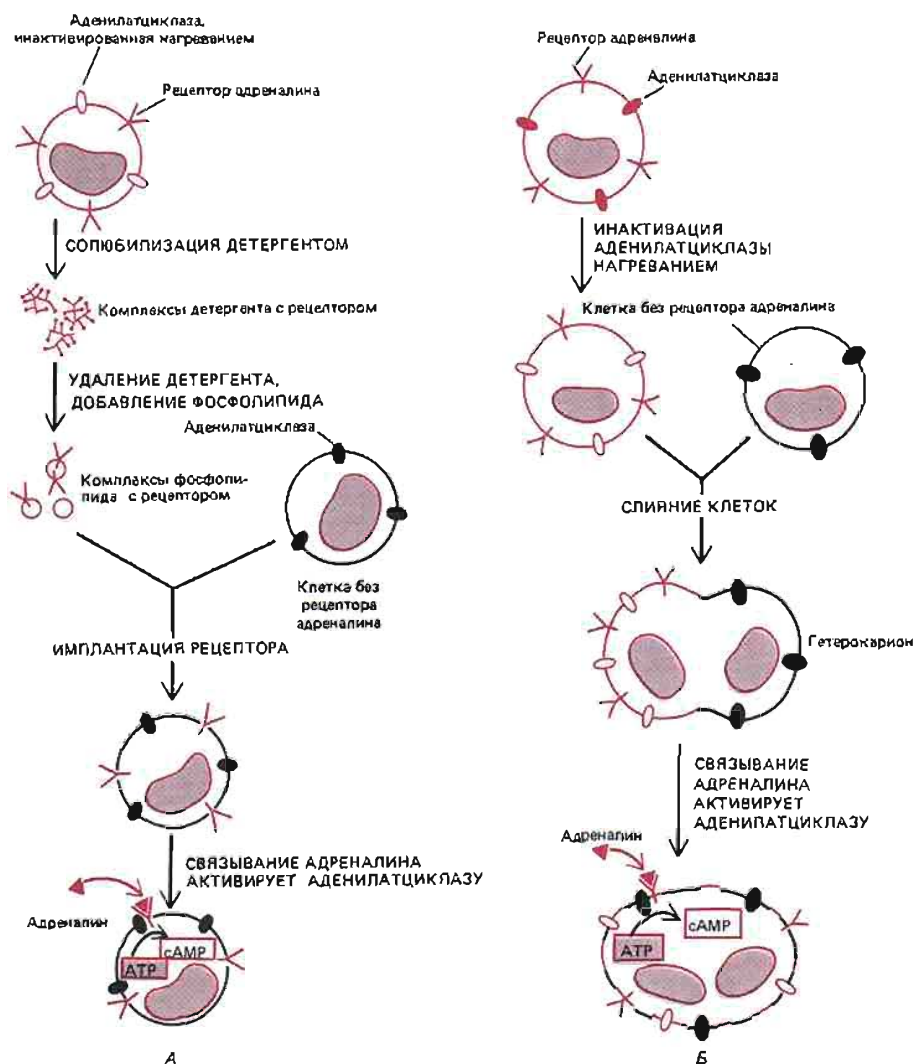
Поскольку каждый тип животных клеток реагирует на повышение концен-

Таблица 13-2. Действие некоторых гормонов на различные клетки, опосредуемое cAMP

Ткань-мишень	Гормон	Основная реакция
Щитовидная железа	Тиреотропный гормон	Секреция тироксина
Кора надпочечников	Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Секреция кортизола
Яичники	Лютеинизирующий гормон	Секреция прогестерона
Мышцы, печень	Адреналин	Распад гликогена
Костная ткань	Паратгормон	Резорбция кости
Сердце	Адреналин	Повышение частоты сокращений
Почки	Вазопрессин	Реабсорбция воды
Жировая ткань	Адреналин, АКТГ, глюкагон, тиреотропный гормон	Расщепление триглицеридов

трации cAMP каким-то своим характерным образом, любой лиганд, активирующий аденилатциклазу в данной клетке, обычно вызывает одну и ту же реакцию. Например, в жировых клетках аденилатциклазу активируют по меньшей мере четыре разных гормона, и все они вызывают распад триглицеридов (резервная форма жира) до жирных кислот (табл. 13-2). Это можно

Рис. 13-22. Опыты с «пересадкой» солубилизованных рецепторов (А) и со слиянием клеток (Б), в которых было показано, что рецепторные белки и молекулы аденилатциклазы разных клеток могут функционально взаимодействовать в плазматической мембране интактной клетки.



объяснить двояким образом: либо рецептор каждого типа тесно связан в плазматической мембране с собственной молекулой аденилатциклазы, либо различные рецепторы имеют общий пул молекул этого фермента. В пользу второго из этих предположений говорят опыты с «трансплантацией» рецепторов. Например, рецепторы адреналина, выделенные из сольобилизованных детергентами плазматических мембран, можно поместить в плазматическую мембрану других клеток, не имеющих собственных рецепторов для адреналина. Такие «пересаженные» рецепторы после активации их гормоном способны к функциональному взаимодействию с аденилатциклазой (рис. 13-22, А).

В более ранних экспериментах для объединения рецепторных белков с молекулами аденилатциклазы использовали не пересадку рецепторов, а слияние клеток. Клетки с рецепторами адреналина, содержавшие инактивированную (нагреванием или химической обработкой) аденилатциклазу, сливали с клетками без рецепторов, но с интактной циклазой. Через несколько минут после слияния такие гетерокарионы реагировали на адреналин значительной активацией аденилатциклазы, что тоже указывает на способность рецепторов одной клеточной мембраны к функциональному взаимодействию с молекулами аденилатциклазы из другой мембраны (рис. 13-22, Б). Поэтому рецептор и аденилатциклазу считают отдельными белками, которые функционально взаимодействуют после активации рецептора.

13.3.6. Рецепторы активируют молекулы аденилатциклазы не прямо, а через GTP-связывающий белок [14]

Активированные рецепторы не стимулируют аденилатциклазу непосредственно. Эти два белка взаимодействуют через третий мембранный белок, который связывает на своей цитоплазматической стороне GTP. На мысль о таком механизме впервые навел тот факт, что для гормональной активации аденилатциклазы в разрушенных клетках необходим GTP. Другим свидетельством в пользу существования GTP-связывающего белка явилось выделение мутантных клеточных линий, у которых связывание адреналина не активирует аденилатциклазу, несмотря на наличие нормальных рецепторов и самой циклазы. Смешивая препараты плазматических мембран таких «разобщенных» клеток с экстрактами мембран других клеток, полученными с помощью детергентов, можно реконструировать чувствительную к гормону аденилатциклазную систему, для работы которой необходим GTP. Есть убедительные данные в пользу того, что упомянутые экстракты содержат особый мембранный GTP-связывающий белок (G-белок), которого нет в «разобщенных» мутантных клетках и который нужен для сопряжения активации рецептора с активацией аденилатциклазы.

Для того чтобы клетки могли быстро реагировать на изменение уровня гормона, активация аденилатциклазы его рецепторами должна продолжаться лишь до тех пор, пока присутствует сам гормон. Такая зависимость обеспечивается тем, что G-белок представляет собой GTPазу, которая самоинактивируется, гидролизуя связанный GTP до GDP и неорганического фосфата. Если при работе с механически разрушенными нормальными клетками использовать вместо GTP его негидролизуемый аналог, то активация аденилатциклазы гормонами усиливается и становится гораздо более длительной.

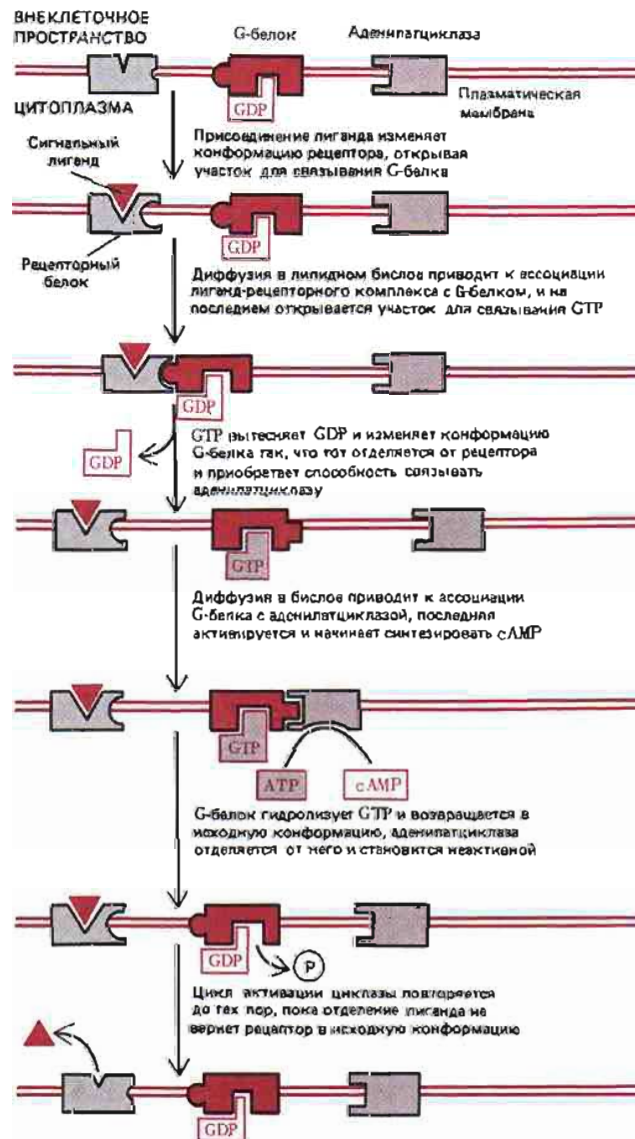
Бактериальный токсин, ответственный за симптомы холеры, подавляет этот нормальный «выключающий» механизм. **Холерный токсин** – это фермент, катализирующий перенос ADP-рибозы с внутриклеточного NAD⁺ на G-белок, который при этом так изменяется, что не может больше гидролизовать связанный с ним GTP. Если теперь молекула аденилатциклазы будет активирована гормон-рецепторным комплексом и молекулой такого модифицированного G-белка, то она останется необратимо активированной. В результате в клетках кишечного эпителия длительно повышается уровень cAMP, что ве-

дет к переходу больших количеств Na^+ и воды в просвет кишечника. Это и есть причина тяжелого поноса, вызываемого холерным токсином.

Таким образом, для активации аденилатциклазы необходимы по меньшей мере три белка плазматической мембраны, которые взаимодействуют в следующей последовательности: 1) присоединение гормона к рецепторному белку изменяет конформацию рецептора, позволяя ему связаться с G-белком при столкновении с ним в липидном бислое и активировать его; 2) теперь G-белок приобретает способность связывать на своей цитоплазматической стороне GTP (вместо GDP); присоединение GTP изменяет конформацию G-белка, и он становится способным активировать молекулу аденилатциклазы, что ведет к синтезу cAMP; 3) G-белок завершает цикл, гидролизова связанный им GTP до GDP, и в результате аденилатциклаза возвращается в исходное неактивное состояние. Одна из моделей этого процесса сопряжения показана на рис. 13-23.

Почему у клеток выработался столь сложный, многоступенчатый механизм передачи сигнала? Зачем понадобилось вставлять GTP-связывающий белок (G-белок) между рецептором и активируемым ферментом? Одна из

Рис. 13-23. Модель сопряжения между активацией аденилатциклазы и активацией рецептора в результате случайных соударений в липидном бислое. В представленном здесь варианте модели предполагается, что рецепторные белки, молекулы аденилатциклазы и GTP-связывающий белок (G-белок) независимо диффундируют в плазматической мембране клетки-мишени и взаимодействуют только после присоединения лиганда к рецепторному белку (но возможно также, что G-белок все время ассоциирован с аденилатциклазой). Хотя на схеме это не показано, каждая молекула активированного рецептора активирует много молекул G-белка, что ведет к большому усилению ответа.

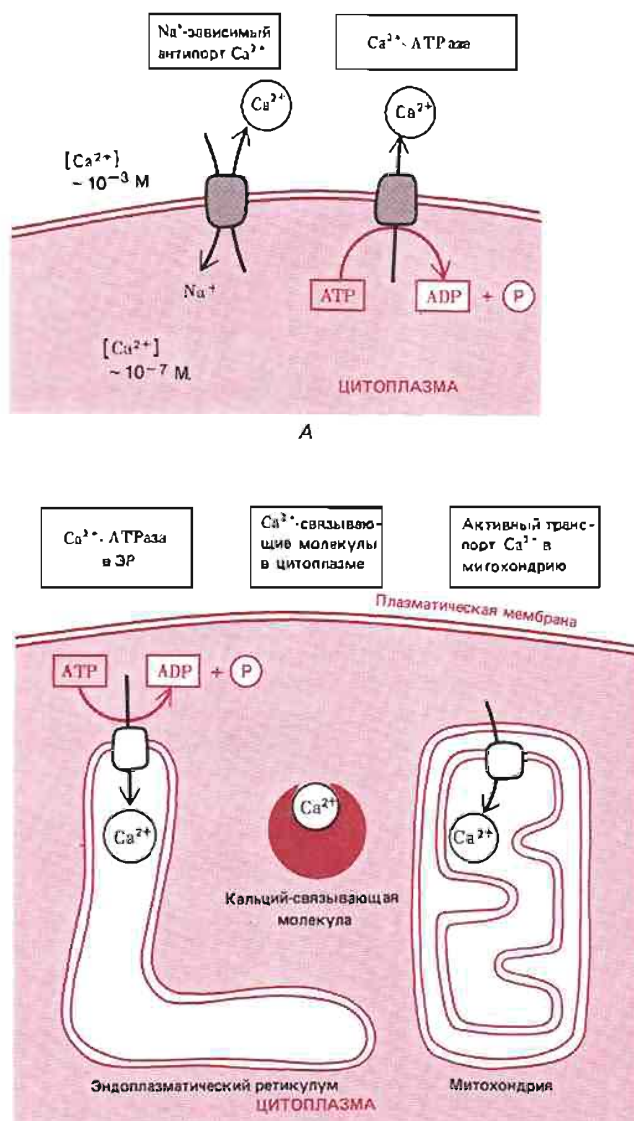


причин – то, что каждый активированный рецептор может столкнуться со многими молекулами G-белка и активировать их, т.е. произойдет большое усиление исходного внеклеточного сигнала. Другая возможность состоит в том, что эта схема в принципе позволяет осуществлять сопряжение рецепторов одного типа не только с аденилатциклазой, но и с рядом других мембранных ферментов и ионных каналов. Не исключено, что G-белок – не единственный адаптор и что в клетках разных типов есть разные адапторы, обеспечивающие сопряжение одного и того же рецепторного белка с различными белками-мишенями в их плазматической мембране.

13.3.7. Ион Ca^{2+} тоже служит вездесущим внутриклеточным медиатором [15]

Появляется все больше данных о том, что ион Ca^{2+} , подобно cAMP, является важным внутриклеточным регулятором и что он служит вторым посредником для некоторых внеклеточных сигнальных молекул. Первые данные тако-

Рис. 13-24. Важнейшие механизмы, позволяющие клетке поддерживать очень низкую концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, несмотря на высокую концентрацию их во внеклеточной жидкости. Ca^{2+} активно откачивается из цитозоля во внеклеточное пространство (А) и в окружающие мембранами внутриклеточные органеллы, такие как эндоплазматический ретикулум (ЭР) или митохондрии (Б). Кроме того, свободные ионы Ca^{2+} прочно связываются различными внутриклеточными молекулами.



го рода были получены в 1947 г., когда удалось показать, что инъекция в клетку скелетной мышцы небольшого количества Ca^{2+} вызывает ее сокращение. Концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, как и содержание сАМР, в норме очень мала. Хотя общая внутриклеточная концентрация ионов кальция близка к внеклеточной ($\geq 10^{-3}$), концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле ($\leq 10^{-7}$ М) более чем в 1000 раз ниже, так как большая часть Ca^{2+} в клетке связана с другими молекулами или заключена в митохондриях и иных клеточных органеллах. Это значит, что существует колоссальная разница в концентрации свободного Ca^{2+} по обе стороны плазматической мембраны животных клеток, и Ca^{2+} стремится войти в клетку.

Чтобы поддерживать это сильно неравновесное состояние, проникновение Ca^{2+} в клетку должно постоянно компенсироваться его удалением. Это достигается в основном с помощью мембранной Ca^{2+} -АТФазы, которая использует энергию гидролиза АТФ для откачивания ионов кальция из клетки. В некоторых клетках Ca^{2+} активно выводят и другие мембранные насосы, которые делают это за счет перехода внутрь клетки ионов Na^+ (принцип антипорта, рис. 13-24, А).

Транспорт через плазматическую мембрану — это не единственный механизм удаления Ca^{2+} из цитозоля. В самом деле, площадь плазматической мембраны в 10–100 раз меньше общей площади мембран различных клеточных органелл, накапливающих Ca^{2+} . Мембранная Ca^{2+} -АТФаза позволяет эндоплазматическому ретикулуму (и в особенности саркоплазматическому ретикулуму мышечных клеток) поглощать из цитозоля большие количества ионов Ca^{2+} против крутого концентрационного градиента, а митохондрии используют для той же цели электрохимический градиент на своей внутренней мембране, создаваемый за счет переноса электронов при окислительном фосфорилировании (разд. 9.1.8).

Свой вклад в удаление из цитозоля свободных ионов Ca^{2+} вносят не только различные мембранные транспортные системы, но и многие связывающие кальций молекулы — как небольшие, например фосфат, так и очень крупные, например Ca^{2+} -связывающие белки (см. ниже). Разного рода механизмы, поддерживающие очень низкую концентрацию ионов кальция в цитозоле, представлены на рис. 13-24.

13.3.8. При активации некоторых рецепторов клеточной поверхности открываются кальциевые каналы плазматической мембраны [16]

Для передачи внеклеточных сигналов клетки используют огромную разницу концентраций Ca^{2+} с двух сторон плазматической мембраны. Точно так же как некоторые поверхностные рецепторы функционально сопряжены с аденилатциклазой, другие сопряжены с кальциевыми каналами в плазматической мембране. Когда в результате активации рецепторов эти каналы на короткое время открываются, ионы Ca^{2+} входят в цитозоль, где действуют в качестве второго посредника (рис. 13-25). Этот механизм характерен для большинства секреторных клеток, активируемых внешними лигандами. В некоторых случаях активация рецептора сначала вызывает деполяризацию плазматической мембраны, а затем изменение мембранного потенциала приводит к открытию потенциал-зависимых Ca^{2+} -каналов и к притоку ионов извне. В других случаях кальциевые каналы открываются независимо от изменений мембранного потенциала и механизм сопряжения между рецепторами и каналами остается неясным.

Другой важный механизм сигнализации с помощью ионов кальция — это освобождение их внутриклеточными органеллами (рис. 13-26). Например, в клетках скелетной мускулатуры активация поверхностных рецепторов ацетилхолина вызывает деполяризацию плазматической мембраны, а это каким-то образом приводит к высвобождению Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума и тем самым к запуску сокращения миофибрилл. Аналогичным

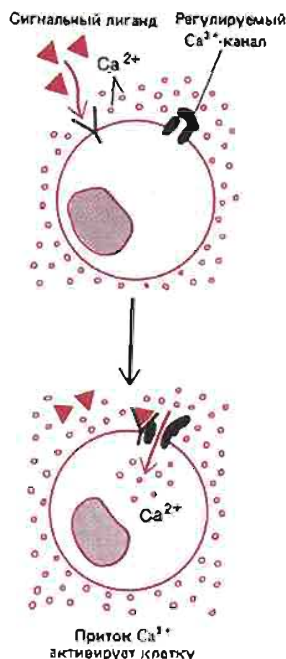


Рис. 13-25. Функциональное сопряжение поверхностных рецепторов с кальциевыми каналами в плазматической мембране. Связывание лиганда с такими рецепторами открывает каналы, позволяя ионам Ca^{2+} входить в клетку «вниз» по крутому электрохимическому градиенту. Хотя для простоты показано прямое взаимодействие лиганд-рецепторных комплексов с каналами для кальция, действительный механизм сопряжения между рецепторами и каналами неизвестен.

образом в некоторых секреторных клетках из внутренних хранилищ освобождаются ионы Ca^{2+} , запускающие экзоцитоз. Каким образом присоединение лиганда к рецептору клеточной поверхности приводит к открытию кальциевых каналов во внутренних мембранах, до сих пор остается загадкой.

Повышение концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, происходящее при воздействии сигнала, всегда непродолжительно. В случае cAMP реакция кратковременна из-за того, что GTP-связывающий белок гидролизует GTP и перестает активировать аденилатциклазу, а фосфодиэстеразы быстро разрушают избыточный cAMP. В случае Ca^{2+} каналы открываются лишь на короткое время, а вошедшие в цитозоль ионы кальция быстро откачиваются оттуда и/или связываются внутриклеточными молекулами.

Заключение

Большинство поверхностных рецепторов, активируемых внеклеточными сигнальными лигандами, создает внутриклеточные сигналы одним из двух способов: они либо изменяют активность связанного с плазматической мембраной фермента, который в свою очередь изменяет концентрацию внутриклеточного медиатора, либо влияют на проницаемость ионных каналов, в результате чего изменяется мембранный потенциал, внутриклеточная концентрация определенного иона или же то и другое.

Многие поверхностные рецепторы функционально связаны с мембранным ферментом аденилатциклазой. Когда к таким рецепторам присоединяется внеклеточный сигнальный лиганд, образующийся комплекс запускает в плазматической мембране ряд взаимодействий между белками, приводящих в конце концов к увеличению (или в некоторых случаях к уменьшению) синтеза cAMP аденилатциклазой. Возникающее изменение внутриклеточной концентрации cAMP поддерживается лишь до тех пор, пока рецептор активирован лигандом, так как активация аденилатциклазы непродолжительна, а избыточный cAMP быстро гидролизруется фосфодиэстеразами.

В результате активации других поверхностных рецепторов в мембране открываются кальциевые каналы, и это приводит к поступлению ионов Ca^{2+} в цитозоль из внеклеточной жидкости или из внутренних хранилищ. Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} бывает лишь кратковременным, так как кальциевые каналы открываются ненадолго, а вошедшие в цитозоль ионы Ca^{2+} быстро откачиваются обратно и/или связываются определенными молекулами.

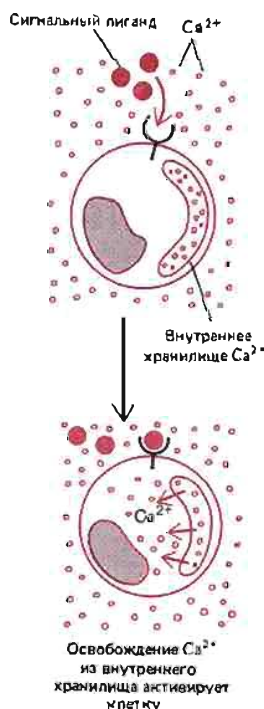


Рис. 13-26. Действие сигнального вещества через поверхностные рецепторы, активация которых приводит к выходу Ca^{2+} в цитозоль из внутренних хранилищ. Известно, что в мышечных клетках внутренним хранилищем Ca^{2+} служит саркоплазматический ретикулум; в других клетках локализация хранилища не выяснена. Механизмы, связывающие активацию рецепторов клеточной поверхности с освобождением Ca^{2+} внутри клетки, также неизвестны.

13.4. Механизмы действия сАМР и ионов Ca^{2+} как вторых посредников

Хотя сАМР и кальций не единственные внутриклеточные медиаторы внеклеточных сигналов, они используются в качестве вторых посредников столь часто, что механизм их действия заслуживает специального рассмотрения. Более того, вполне может оказаться, что эти молекулы участвуют не только в сигнализации с помощью секретируемых лигандов, но и в прямых связях между клетками через щелевые контакты или же сигнальные молекулы, связанные с плазматической мембраной.

13.4.1. Циклический АМР активирует внутриклеточные протеинкиназы [12, 17]

Действие сАМР в животных клетках основано на активации специфических клеточных ферментов, называемых **сАМР-зависимыми протеинкиназами**. Эти ферменты катализируют перенос фосфата с АТР на определенные остатки серина или треонина небольшой группы клеточных белков. Ковалентное фосфорилирование в свою очередь влияет на активность этих белков.

Впервые последовательность событий была выяснена при изучении метаболизма гликогена в клетках скелетной мускулатуры. Гликоген — это основная резервная форма глюкозы, его синтез и распад строго регулируются определенными гормонами. Если, например, животное испугать или подвергнуть иному стрессу, надпочечники секретируют в кровь адреналин, приводящий различные ткани тела в состояние «готовности». Циркулирующий адреналин вызывает, в частности, расщепление гликогена в мышечных клетках до глюкозо-1-фосфата и в то же время прекращает синтез нового гликогена. Глюкозо-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, который затем окисляется в реакциях гликолиза, что приводит к образованию АТР, необходимого для работы мышц. Таким путем адреналин подготавливает мышечные клетки к усиленной работе.

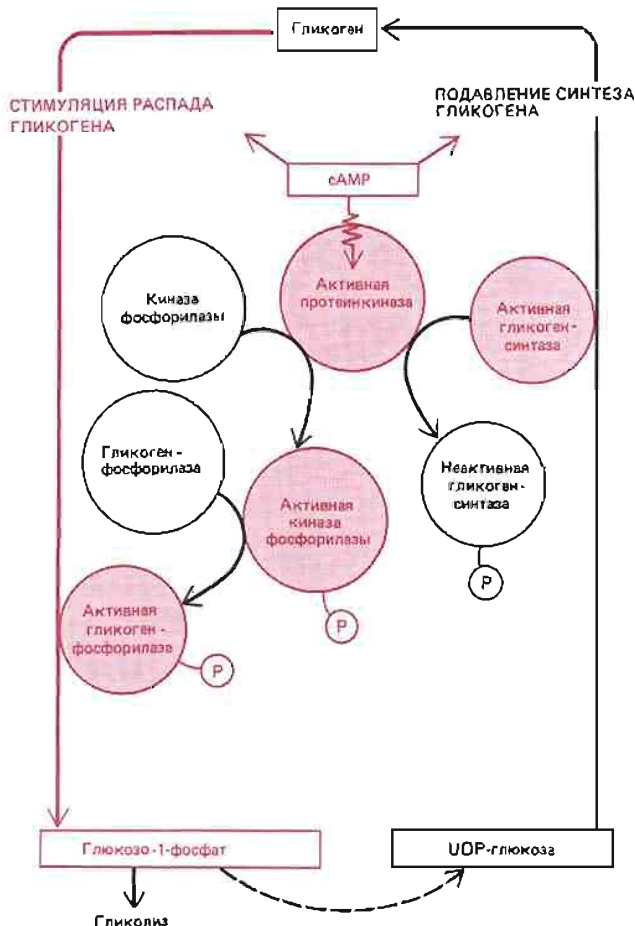
Адреналин активирует аденилатциклазу в плазматической мембране мышечной клетки, и в результате этого в цитоплазме повышается концентрация сАМР. Циклический АМР в свою очередь вызывает активацию сАМР-зависимой протеинкиназы, которая специфически фосфорилирует *гликогенсинтазу* — фермент, осуществляющий последний этап синтеза гликогена из глюкозы. Фосфорилирование гликогенсинтазы ведет к ее инактивации и тем самым прекращает синтез гликогена. Та же протеинкиназа фосфорилирует и другой фермент — *киназу фосфофлазы*; киназа при этом активируется и фосфорилирует еще один фермент, *гликогенфосфофлазу*, которая и отщепляет от гликогена остатки глюкозы.

В результате такого каскада взаимодействий повышение уровня сАМР приводит к подавлению синтеза гликогена и к стимуляции его распада, что максимально увеличивает количество глюкозы, доступное для использования клеткой (рис. 13-27). Регуляция метаболизма гликогена с помощью реакций фосфорилирования иллюстрирует общее правило: ферменты, фосфорилирование которых ведет к их *активации*, обычно участвуют в процессах расщепления, а ферменты, которые при фосфорилировании *утрачивают активность*, обычно связаны с процессами синтеза.

Протеинкиназа мышечных клеток, активируемая сАМР, была очищена, и оказалось, что она состоит из субъединиц двух типов — *регуляторной* субъединицы присоединяется сАМР, а *каталитическая* субъединица катализирует фосфорилирование белков-субстратов. В отсутствие сАМР эти две субъединицы образуют неактивный комплекс. Присоединение сАМР изменяет конформацию регуляторной субъединицы таким образом, что она отделяется и освобождает активную каталитическую субъединицу (рис. 13-28).

Такие сАМР-зависимые протеинкиназы имеются во всех животных клетках. Видимо, они ответственны за все эффекты, вызываемые сАМР. Хотя во

Рис. 13-27. Схема стимуляции распада гликогена и подавления его синтеза в клетках скелетных мышц при повышении уровня циклического АМР в результате присоединения адреналина к поверхностным рецепторам. сАМР активирует специфическую протеинкиназу, которая фосфорилирует и таким путем активирует киназу фосфорилазы, а та в свою очередь фосфорилирует и активирует гликогенфосфорилазу – фермент, расщепляющий гликоген. Та же самая сАМР-зависимая протеинкиназа фосфорилирует и в результате *инактивирует* гликогенсинтазу, участвующую в синтезе гликогена. Активные формы ферментов выделены цветом.



многих случаях белки-субстраты этих протеинкиназ неизвестны, ясно, что в клетках разного типа они различны, и это позволяет понять, почему сАМР неодинаково влияет на разные клетки. В клетках много различных протеинкиназ, и только небольшая часть их регулируется циклическим АМР. Активность некоторых зависит от ионов Ca^{2+} или циклического GMP (см. ниже), но механизм регуляции большинства этих ферментов остается невыясненным.

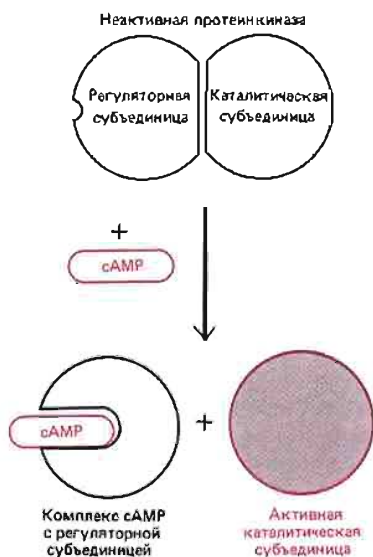
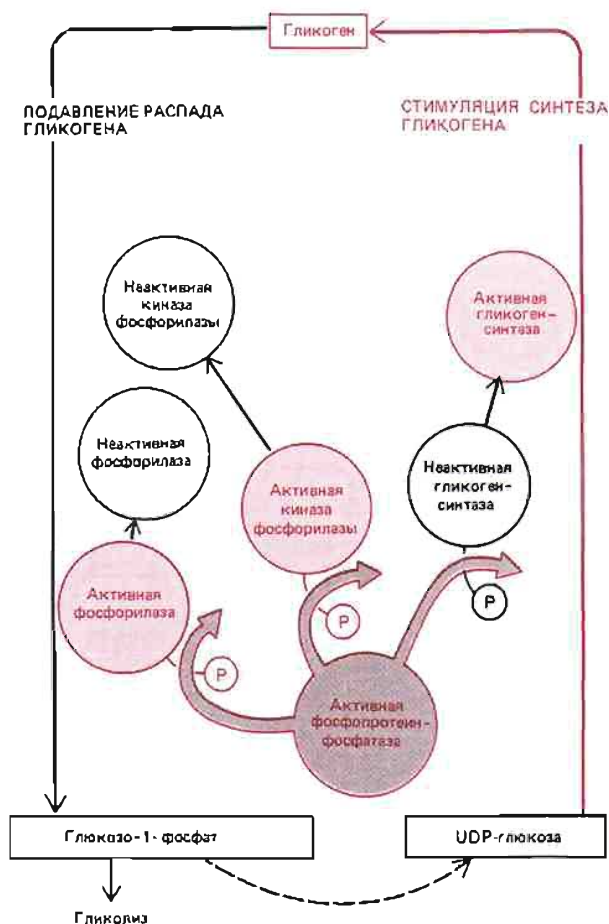


Рис. 13-28. Активация сАМР-зависимой протеинкиназы. Присоединение сАМР к регуляторной субъединице фермента вызывает изменение ее конформации, приводящее к отделению этой субъединицы. Освободившаяся каталитическая субъединица активируется (и поэтому выделена цветом). Хотя для простоты протеинкиназа изображена в виде димера, полагают, что на самом деле это тетрамер, состоящий из двух регуляторных и двух каталитических субъединиц. Каждая регуляторная субъединица имеет два центра связывания сАМР, и освобождение каталитических субъединиц является кооперативным процессом, требующим присоединения более чем двух молекул сАМР на тетрамер. Это делает реакцию киназы на изменение концентрации сАМР значительно более резкой (см. разд. 13.4.9).

Рис. 13-29. Когда уровень сАМР падает, одна и та же фосфопротеинфосфатаза дефосфорилирует все три ключевых фермента в каскаде расщепления гликогена, регулируемого сАМР. Это дефосфорилирование оказывает действие, обратное действию сАМР-зависимого фосфорилирования, – инактивирует ферменты расщепления гликогена и активирует гликогенсинтазу. Напротив, при высоком уровне сАМР активна протеинкиназа, а фосфопротеинфосфатаза ингибирована.



13.4.2. Циклический АМР регулирует также дефосфорилирование клеточных белков [18]

Эффекты сАМР обычно непродолжительны. Это означает, что клетки способны дефосфорилировать белки, фосфорилированные сАМР-зависимой протеинкиназой. Эту обратную реакцию катализирует *фосфопротеинфосфатаза* – фермент, который сам находится под контролем сАМР.

В клетках скелетных мышц одна и та же фосфопротеинфосфатаза дефосфорилирует все ключевые ферменты метаболизма гликогена, регулируемые сАМР (киназу фосфориллазы, гликогенфосфорилазу и гликогенсинтазу; рис. 13-29); ее каталитический эффект противодействует стимулируемому сАМР присоединению фосфата к белкам. Однако сАМР-зависимая протеинкиназа в активном состоянии фосфорилирует и тем самым активирует также специальный белок – *ингибитор фосфатазы*. Этот активированный белок-ингибитор связывается с фосфопротеинфосфатазой и инактивирует ее (рис. 13-30). Активация киназы фосфориллазы при одновременном подавлении фосфопротеинфосфатазы приводит к значительно более сильному и быстрому воздействию повышенного уровня сАМР на синтез и распад гликогена, чем если бы сАМР влиял лишь на один из этих ферментов.

13.4.3. Киназа фосфориллазы служит примером фермента, лишь на короткое время активируемого внеклеточным химическим сигналом [18]

Как уже говорилось, киназа фосфориллазы при повышении уровня сАМР фосфорилирует гликогенфосфорилазу и тем самым вызывает распад гликогена

Рис. 13-30. Эта схема показывает, каким образом cAMP подавляет активность фосфопротенинфосфатазы, которая противодействовала бы реакции фосфорилирования, стимулируемым cAMP. Зависимая протеинкиназа фосфорилирует особый белок-ингибитор фосфатазы, что позволяет ему связаться с фосфопротенинфосфатазой и ингибировать ее.

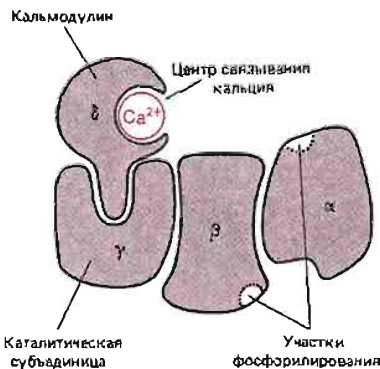
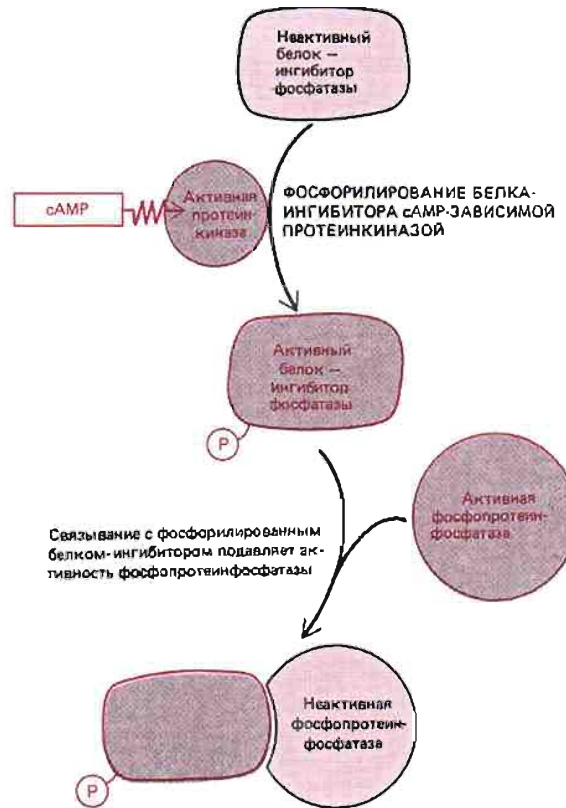


Рис. 13-31. Сильно схематизированное изображение четырех субъединиц киназы фосфорилилазы из мышц млекопитающего. Каталитической активностью обладает γ-субъединица; α- и β-субъединицы участвуют в регуляции этой активности циклическим AMP, а δ-субъединица — в ее регуляции ионами Ca²⁺. Реальный ферментный комплекс содержит по четыре копии каждой субъединицы.

в мышечных клетках. Киназа фосфорилилазы состоит из четырех различных субъединиц, но только одна из них катализирует реакцию фосфорилирования; остальные три играют регуляторную роль и позволяют ферментному комплексу активироваться как циклическим AMP, так и ионами Ca²⁺. Субъединицы обозначают буквами α, β, γ и δ, и ферментный комплекс содержит по четыре копии каждой из них. Каталитическая активность присуща γ-субъединице. δ-Субъединица — это Ca²⁺-связывающий белок кальмодулин (разд. 13.4.5). Субъединицы α и β служат для регуляции с помощью cAMP, обе они фосфорилируются cAMP-зависимой протеинкиназой (рис. 13-31).

Циклический AMP активирует ферментный комплекс, фосфорилируя его β-субъединицы. Затем происходит более медленное фосфорилирование α-субъединиц той же самой cAMP-зависимой протеинкиназой. Предполагается, что фосфорилирование α-субъединицы изменяет конформацию β-субъединицы так, чтобы облегчить ее быстрое дефосфорилирование фосфопротенинфосфатазой. Дефосфорилирование β-субъединицы инактивирует фермент (рис. 13-22). Таким образом, повышение концентрации cAMP активирует киназу фосфорилилазы (а значит, и ее субстрат — гликогенфосфорилилазу) на определенный промежуток времени (около 1–2 мин).

Как мы видим, сравнительно простое взаимодействие всего лишь нескольких белков создает биологический «переключатель», который быстро включается, а затем выключается через определенное время. В предполагаемом цикле cAMP-зависимая протеинкиназа играет двойную роль: сначала она активирует киназу фосфорилилазы, фосфорилируя ее β-субъединицу, а затем, фосфорилируя α-субъединицу, определяет тем самым время инактивации фермента путем дефосфорилирования.

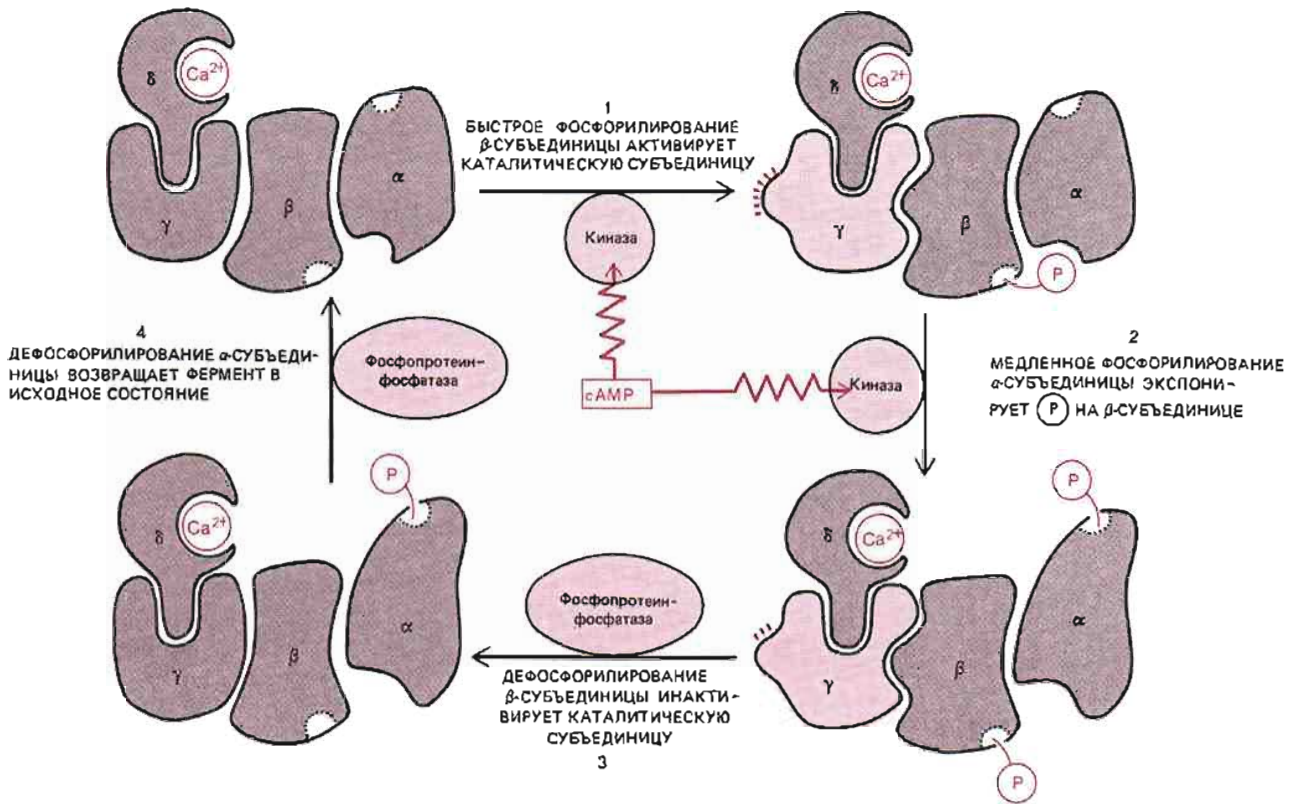


Рис. 13-32. Один из механизмов, позволяющих объяснить скачкообразную активацию и инактивацию киназы фосфоорилазы при изменении внутриклеточного уровня cAMP. δ -Субъединица показана с присоединенным к ней ионом Ca^{2+} , так как протеникиназа может активировать γ -субъединицу лишь в том случае, если с ферментом связан Ca^{2+} .

13.4.4. Путем обратимой ковалентной модификации белков регулируются многие клеточные процессы [19]

Сейчас известно более 25 различных ферментов, регулируемых путем фосфорилирования и дефосфорилирования, а так как с помощью двумерного гелеэлектрофореза в эукариотических клетках выявляются сотни различных фосфорилированных белков, можно думать, что таких ферментов намного больше. Выяснение механизма фосфорилирования – дефосфорилирования привело также к открытию других обратимых ковалентных модификаций, регулирующих активность белков; к таким модификациям, в частности, относятся метилирование – деметилирование, ацетилирование – деацетилирование, уридилрование – деуридилрование, аденилирование – деаденилирование и взаимопревращение SS- и SH-групп. Обратимых ковалентных модификаций так много, что, вероятно, большинство ферментативных реакций, лимитирующих скорость какого-то биологического процесса, регулируется той или иной из этих модификаций. Если учесть сложность обратных связей в одном только метаболизме гликогена, станет ясно, что раскрытие механизмов и кинетических особенностей всех этих важных регуляторных процессов представляет собой грандиозную задачу.

13.4.5. Ионы Ca^{2+} изменяют конформацию внутриклеточных Ca-связывающих белков [20]

Поскольку концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле обычно бывает ниже 10^{-7} М и, как правило, не поднимается намного выше 10^{-5} М даже при активации клеток притоком Ca^{2+} , ясно, что любая структура клетки, которая может быть непосредственной мишенью кальций-зависимой регуляции, должна иметь константу сродства к Ca^{2+} порядка 10^{-6} М. А ввиду того что концентрация в цитозоле свободных ионов Mg^{2+} относительно постоянна и составляет 10^{-3} М, связывающие кальций центры должны обладать такой

избирательностью, чтобы связывать Ca^{2+} по меньшей мере в 1000 раз лучше, чем Mg^{2+} . Этим требованиям удовлетворяют несколько специфических Ca^{2+} -связывающих белков.

Лучше всего охарактеризован кальций-связывающий белок, который был открыт первым, — тропонин С из клеток скелетной мускулатуры; роль его в мышечном сокращении обсуждалась в главе 10 (разд. 10.1.13). Родственный кальций-связывающий белок кальмодулин был обнаружен во всех до сих пор изученных клетках животных и растений. Этот эволюционно консервативный белок оказался вездесущим внутриклеточным рецептором ионов Ca^{2+} , он участвует в большинстве известных регулируемых кальцием процессов в эукариотических клетках. Кальмодулин — это полипептид из 148 аминокислот, сходный по их последовательности с тропонином С, который поэтому можно рассматривать как специализированную форму кальмодулина. Подобно тропонину С, кальмодулин имеет четыре центра с высоким сродством к Ca^{2+} и при связывании с этим ионом претерпевает значительное конформационное изменение.

К белкам, регулируемым кальмодулином при участии Ca^{2+} (таких белков становится известно все больше), относятся некоторые фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов и аденилатциклаза, а также мембранные Ca^{2+} -АТФазы, киназа фосфолипазы и киназа легких цепей миозина мышечных и неммышечных клеток. Типичная животная клетка содержит более 10^7 молекул кальмодулина, что составляет до 1% суммарного клеточного белка. Некоторое количество кальмодулина связано с митотическим веретеном, пучками актиновых филаментов и промежуточными филаментами толщиной 10 нм; таким образом, возможно, что этот белок участвует в регуляции активности структур цитоскелета.

Аллостерическая активация кальмодулина кальцием аналогична активации протеинкиназы циклическим АМР. При изучении киназы фосфолипазы было обнаружено, что кальмодулин является регуляторной субъединицей, постоянно входящей в состав этого фермента (рис. 13-31). Но в большинстве случаев присоединение Ca^{2+} ведет к тому, что ранее свободный кальмодулин связывается в клетке с различными белками-мишенями (рис. 13-33). Например, кальций-зависимая активация фосфодиэстеразы циклических нуклеотидов, аденилатциклазы и некоторых мембранных Ca^{2+} -АТФаз происходит в результате связывания комплекса Ca^{2+} — кальмодулин с регуляторной субъединицей каждого из этих ферментов. Таким образом, реакция клетки-мишени на увеличение концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле зависит от того, какие кальмодулин-связывающие белки имеются в данной клетке. Поскольку кальмодулин может принимать несколько различных конформаций (в зависимости от числа связанных ионов кальция), не исключено, что разные конформации взаимодействуют с разными клеточными белками. Таким путем кальмодулин мог бы в принципе вызывать различную реакцию клеток при разных концентрациях свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле.



Рис. 13-33. Здесь схематически показано, как повышение концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле может косвенным образом активировать ферменты в результате изменения конформации молекул кальмодулина. Хотя для простоты кальмодулин показан лишь с одним центром связывания Ca^{2+} , известно, что каждая его молекула имеет четыре таких центра.

Группы клеточных функций, регулируемых сАМР и ионами кальция, в значительной степени перекрываются, и внутриклеточные концентрации тех и других молекул нередко изменяются под влиянием одного и того же внеклеточного сигнала. Эти две внутриклеточные сигнальные системы могут взаимодействовать по меньшей мере двояким образом: 1) внутриклеточные уровни Ca^{2+} и сАМР способны влиять друг на друга, например кальмодулин может регулировать ферменты синтеза и распада сАМР, а сАМР-зависимые протеинкиназы – фосфорилировать кальциевые каналы или насосы; 2) Ca^{2+} и сАМР могут регулировать один и тот же фермент, например киназу фосфоорилазы может активировать и сАМР-зависимая протеинкиназа, и связывание Ca^{2+} кальмодулином (рис. 13-31).

13.4.6. Служит ли циклический GMP внутриклеточным вторым посредником? [21]

В животных клетках содержится еще один циклический нуклеотид – циклический гуанозинмонофосфат (сGMP, рис. 13-34), но его концентрация минимум в 10 раз меньше концентрации сАМР. Хотя сGMP тоже служит внутриклеточным посредником, его роль отлична от роли сАМР. Гуанилатциклаза, катализирующая образование сGMP из GTP, в отличие от аденилатциклазы не всегда связана с мембраной. В разрушенных клетках она не активируется гормонами и другими внеклеточными сигнальными молекулами. Поэтому полагают, что сGMP не является первичным медиатором всех этих воздействий, хотя в ответ на многие из них уровень сGMP в intactных клетках возрастает.

Одной из функций сGMP может быть модуляция реакций, вызываемых увеличением внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция. Повышенный уровень Ca^{2+} в цитозоле обычно повышает и концентрацию сGMP, либо активируя гуанилатциклазу, либо ингибируя сGMP-фосфодиэстеразу, разрушающую этот нуклеотид. Подобно сАМР, сGMP действует главным образом путем активации определенных протеинкиназ, в данном случае сGMP-зависимых.

13.4.7. Использование вторых посредников и ферментных каскадов невероятно усиливает внеклеточные сигналы

Вторые посредники не только позволяют рецепторам клеточной поверхности переводить внеклеточные сигналы во внутриклеточные, но и обеспечивают значительное усиление первоначального сигнала. Мы уже видели, что в случае активации аденилатциклазы каждая молекула рецептора, присоединившая лиганд, активирует много молекул GTP-связывающего белка, а значит, и много молекул аденилатциклазы. В свою очередь каждая молекула аденилатциклазы катализирует превращение множества молекул АТР в сАМР. Аналогичным образом, если присоединение лиганда к рецептору ведет к открытию кальциевых каналов, в цитозоль проникает сразу много ионов кальция. Эти вторые посредники служат аллостерическими эффекторами, активирующими определенные белки, например протеинкиназы, которые в свою очередь превращают (в случае киназ – путем фосфорилирования) очень большое число молекул-субстратов в «третьи посредники» и т. д. Благодаря таким каскадам одна внеклеточная сигнальная молекула способна вызвать образование в клетке-мишени многих тысяч молекул-эффекторов (рис. 13-35).

Цепь из нескольких последовательно действующих регуляторных белков не только усиливает эффект первичного сигнала, но и создает широчайшие возможности для регуляции. Каждый белок такой цепи может служить независимой мишенью для регуляторного воздействия, как, например, в каскаде распада гликогена в мышечных клетках.

Функционирование подобных «взрывных» метаболических каскадов должно очень строго регулироваться. Поэтому не удивительно, что клетки обла-

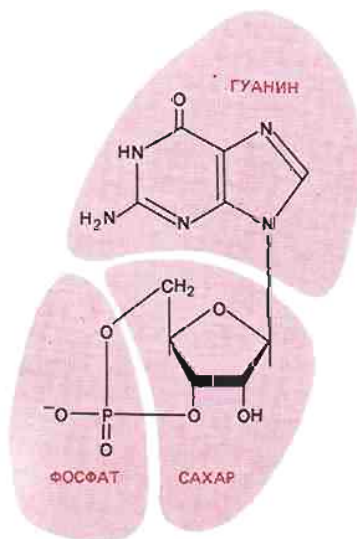
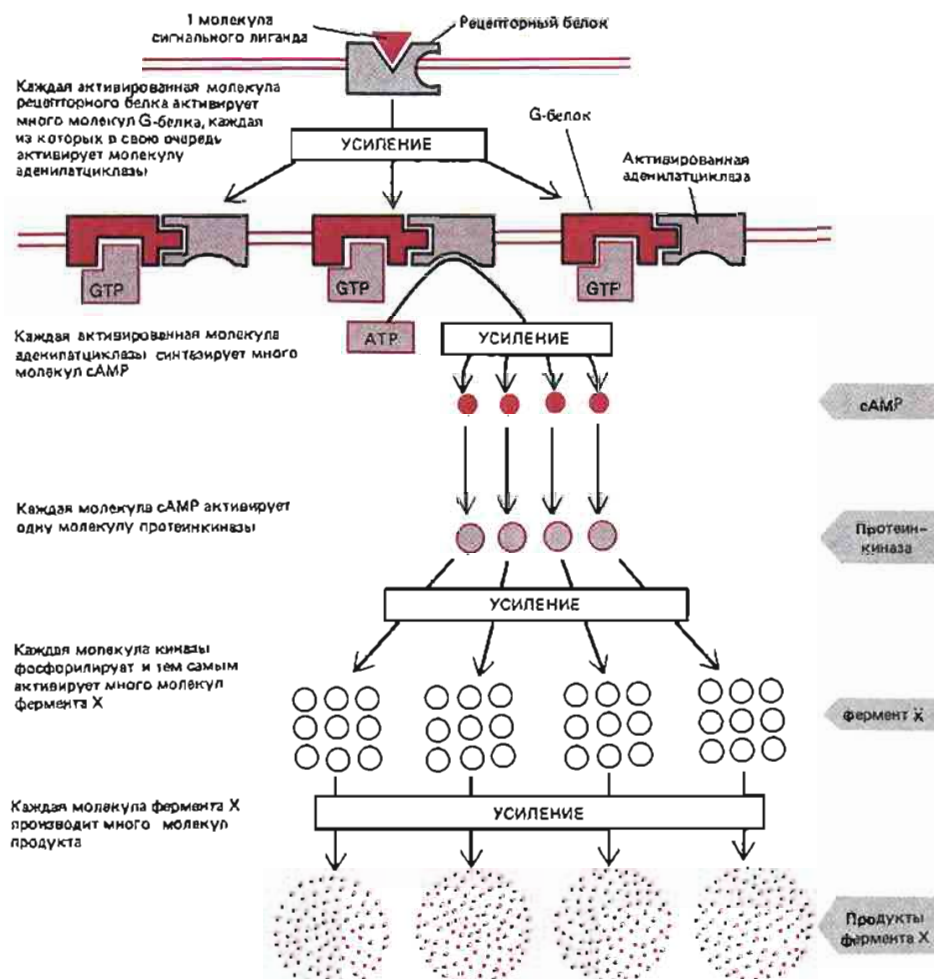


Рис. 13-34. Циклический GMP.

Рис. 13-35. Сопряжение поверхностных рецепторов с аденилатциклазой не только позволяет преобразовать внеклеточный сигнал во внутриклеточный, но и обеспечивает огромное усиление первоначального сигнала. (G-белок – GTP-связывающий белок.)

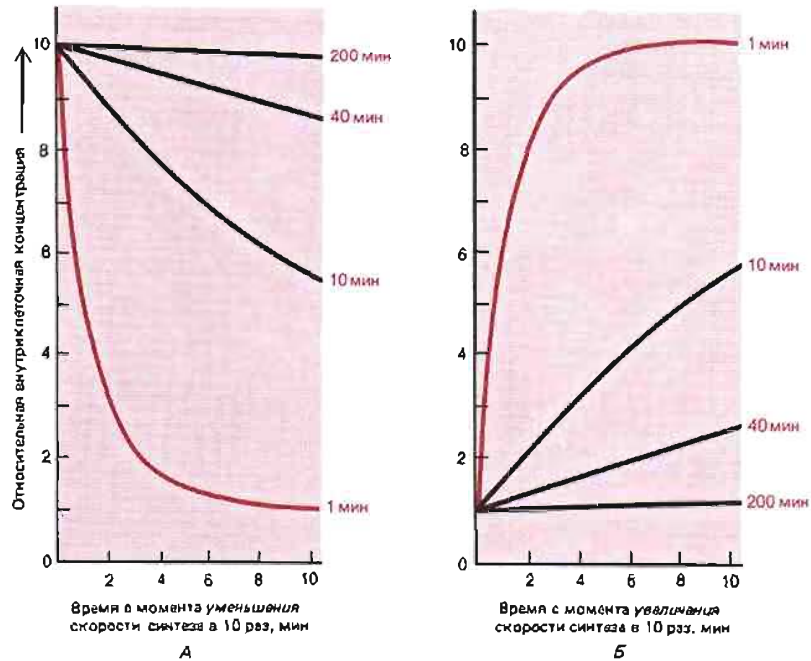


дают столь эффективными механизмами быстрого расщепления циклического АМР и понижения концентрации Ca^{2+} , а также механизмами инактивации ферментов и транспортных белков, активированных при ответе на сигнал. Часто, однако, забывают о том, что быстрое удаление или инактивация сигнальных молекул необходимы не только для выключения клеточного ответа, но и для его быстрого включения.

13.4.8. Концентрация какого-либо вещества может быстро изменяться лишь в том случае, если оно все время подвергается быстрому разрушению или удалению [22]

Если для клетки важно очень быстро изменять концентрацию каких-либо молекул (например, cAMP или Ca^{2+}), то эти молекулы должны непрерывно разрушаться или быстро удаляться иным способом. Рассмотрим, например, два внутриклеточных вещества X и Y, каждое из которых обычно представлено в клетке тысячей молекул. Пусть X имеет низкую «оборачиваемость» – каждую секунду разрушается и синтезируется 10 молекул X, а скорость синтеза и распада Y в 10 раз больше, т.е. 100 молекул в секунду. Если скорость синтеза обоих веществ, X и Y, увеличится в 10 раз, а скорость их разрушения останется неизменной, то спустя 1 с число молекул Y в клетке возрастает почти на 900 ($10 \cdot 100 - 100$), а число молекул X – всего лишь на 90. В общем случае время, за которое концентрация каких-либо молекул достигает половины новой равновесной концентрации после ускорения или замедления их синтеза, равно обычному времени полужизни этих моле-

Рис. 13-36. Относительная скорость изменения внутриклеточной концентрации молекул с различным временем полужизни (указано справа) при увеличении (А) или уменьшении (Б) скорости их синтеза в 10 раз (теоретические кривые). В обоих случаях концентрация молекул, быстро разрушающихся в клетке (цветные линии), быстро изменяется, а концентрация молекул с большими периодами полужизни изменяется пропорционально медленнее. Цветные цифры справа – времена полужизни различных молекул.



кул – времени, за которое концентрация их уменьшится вдвое, если их синтез прекратится (рис. 13-36).

Этот принцип справедлив как для малых молекул, так и для белков, как для внутриклеточных, так и для внеклеточных веществ. Время полужизни многих внутриклеточных белков, подвергающихся быстрому расщеплению или ковалентной модификации, составляет 10 мин или меньше. В большинстве случаев такие белки играют ключевую регуляторную роль и их концентрация в клетке быстро регулируется путем изменения скорости их синтеза.

13.4.9. Клетки могут отвечать на сигнал постепенными или резкими изменениями [23]

Некоторые реакции клеток на сигнальные молекулы бывают плавными (градуальными) и усиливаются по мере увеличения концентрации лиганда. Таковы обычно ответы клеток на стероидные гормоны, вероятно потому, что каждый рецепторный белок связывает одну молекулу гормона, а каждый чувствительный участок хроматина связывает один гормон-рецепторный комплекс. С повышением концентрации гормона пропорционально возрастает концентрация гормон-рецепторных комплексов, а значит, и число этих ком-

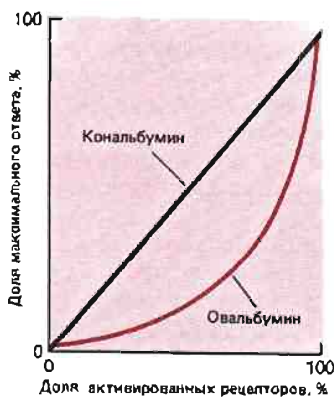


Рис. 13-37. Реакция клеток куриного яйцевода на стероидный гормон эстрадиол. Активированные рецепторы эстрадиола переходят в ядро и включают транскрипцию различных генов. Показана зависимость интенсивности ответа от количества гормона для двух генов, кодирующих белки яйца – кональбумин и овальбумин. Линейная зависимость для кональбумина указывает на то, что ген этого белка включается одной молекулой активированного рецептора. Напротив, запаздывающий прирост синтеза овальбумина при повышении концентрации гормона означает, что для запуска транскрипции овальбуминового гена, вероятно, необходимо присоединение к нему более чем одной молекулы активированного рецептора (в данном случае нужны две молекулы). (Из E.R. Mulvihill, R.D. Palmiter, J. Biol. Chem., 252, 2060–2068, 1977, с изменениями.)

Рис. 13-38. Этот график показывает, как получаются крутые зависимости типа «всё или ничего», если для активации макромолекулы-мишени необходимо одновременное присоединение к ней нескольких молекул-эффекторов. Приведены теоретические кривые для случаев активации при одновременном связывании различного числа (1, 2, 8 и 16) эффекторных молекул.

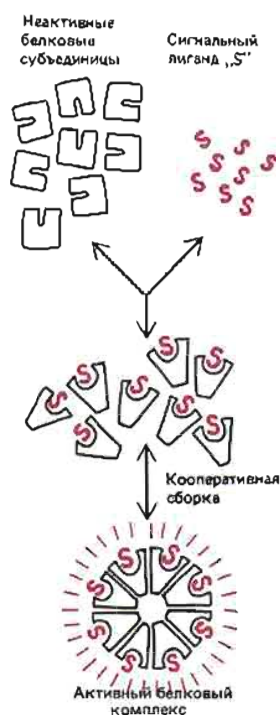
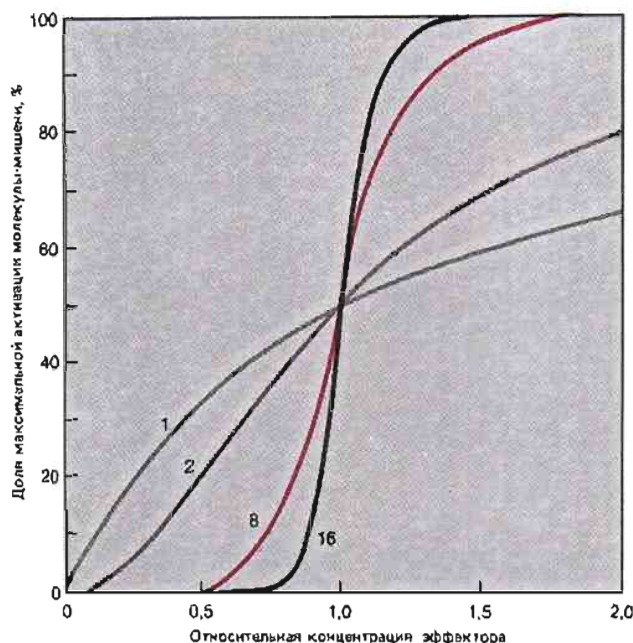


Рис. 13-39. Схема одного из возможных сигнальных механизмов, при котором следует ожидать реакции с резким порогом. В данном примере для образования активного белкового комплекса необходимо одновременное связывание восьми молекул сигнального лиганда.

плексов, присоединившихся к специфическим участкам хроматина. Клеточный ответ в этом случае будет градуальным и линейным.

Однако другие реакции клеток на увеличение концентрации сигнальных лигандов могут начинаться гораздо более резко, а некоторые — практически по типу «всё или ничего». В подобных случаях не наблюдается никакого ответа до тех пор, пока концентрация лиганда не достигнет порогового уровня, а после достижения этого уровня развивается максимальная реакция. Например, некоторые факторы роста действуют как сигналы типа «всё или ничего», заставляющие клетку приступить к репликации ДНК, предшествующей клеточному делению. Каковы могут быть молекулярные основы такого внезапного ответа на плавно изменяющийся сигнал?

Один из возможных механизмов основан на принципе *кооперативности*, когда для активации какой-то макромолекулы-мишени необходимо присоединение к ней нескольких внутриклеточных эффекторов (или их комплексов с рецептором). Например, при некоторых реакциях на стероидные гормоны для активации надлежащего гена, по-видимому, требуется одновременное связывание со специфическим участком хроматина нескольких гормон-рецепторных комплексов. В результате при увеличении концентрации гормона ген активируется более резко, чем в том случае, если бы для его активации достаточно было одного гормон-рецепторного комплекса (рис. 13-37). Аналогичный механизм кооперативности действует при активации с участием кальмодулина: поскольку для принятия кальмодулином активирующей конформации необходимо связывание двух или большего числа ионов Ca^{2+} , повышение внутриклеточной концентрации этих ионов всего лишь в 10 раз вызывает уже 50-кратное усиление активации. Такие кооперативные реакции становятся тем более резкими, чем больше молекул в них участвует, и если их число достаточно велико, то дело может дойти до реакции типа «всё или ничего» (рис. 13-38 и 13-39).

Другой механизм клеточной реакции типа «всё или ничего» мог бы быть основан на наличии *конкурентного ингибитора*, который так прочно присоединяется к внутриклеточному эффектору, что не позволяет ему связаться с мишенью до тех пор, пока концентрация эффектора не превысит концентрацию ингибитора. Подобная схема была предложена для объяснения некоторых особенностей регуляции клеточного деления (см. разд. 11.4.3).

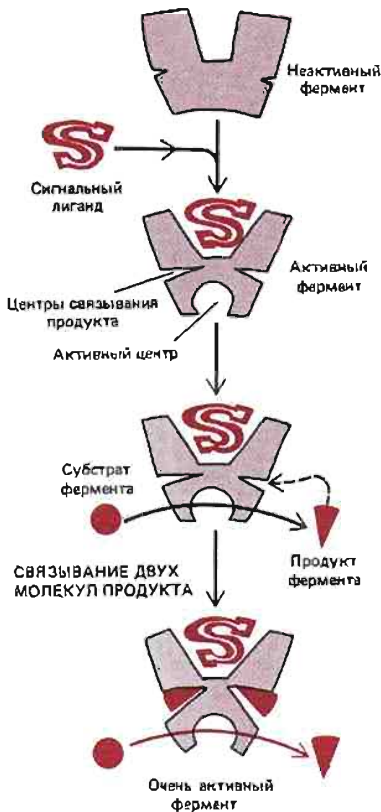


Рис. 13-40. Схема описанного в тексте механизма с положительной обратной связью.

Третий возможный механизм использует принцип положительной обратной связи. С помощью этого механизма нервные и мышечные клетки генерируют по типу «всё или ничего» *потенциалы действия* при связывании нейромедиаторов. Например, при активации ацетилхолиновых рецепторов нервно-мышечного соединения в плазматической мембране мышечной клетки открываются каналы для катионов, и переходящие внутрь клетки ионы Na^+ локально деполяризуют мембрану. Когда деполяризация достигает порогового уровня, в том же участке плазматической мембраны открываются потенциалозависимые натриевые каналы, что приводит к дальнейшему притоку Na^+ , который еще больше деполяризует мембрану и тем самым вызывает открытие еще большего числа каналов для Na^+ . Таким образом волна деполяризации (потенциал действия) распространяется по всей мембране мышечной клетки.

В механизме положительной обратной связи в качестве рецепторных белков могут участвовать не только ионные каналы, но и ферменты. Представьте себе, что некий сигнальный лиганд активирует фермент и что две или больше молекул продукта ферментативной реакции вновь связываются с тем же ферментом и еще больше активируют его (рис. 13-40). Количество продукта такого фермента будет расти очень медленно, пока концентрация активирующего лиганда не достигнет пороговой величины, при которой накопится достаточно продукта, чтобы вызвать ускоряющую активацию фермента. В этот момент наступит резкое повышение концентрации продукта ферментативной реакции. Таким образом, клетка может отвечать на постепенное изменение концентрации сигнального лиганда скачкообразным изменением уровня определенного метаболита. Механизм этого типа в принципе относительно прост, так как для реакции на сигнальный лиганд по типу «всё или ничего» здесь не требуется кооперативного взаимодействия многих центров связывания.

Ответы становятся значительно более резкими и в том случае, если лиганд активирует один фермент и одновременно подавляет активность другого, катализирующего обратную реакцию. Мы уже рассмотрели один пример такого регуляторного принципа, когда говорили о стимуляции распада гликогена в мышечных клетках, где повышение уровня сАМР одновременно активирует киназу фосфорилазы и ингибирует ее антагониста – фосфопроteinфосфатазу (разд. 13.4.2).

Заключение

Непрерывное и быстрое удаление из клетки свободных ионов Ca^{2+} и сАМР делает возможным быстрое изменение концентраций этих внутриклеточных медиаторов в ответ на внешние сигналы. Повышение уровня сАМР активирует сАМР-зависимые протеинкиназы, которые фосфорилируют определенные белки-мишени. Этот эффект обратим, так как при падении уровня сАМР фосфорилированные белки быстро дефосфорилируются. Аналогичным образом повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция влияет на клетки благодаря связыванию Ca^{2+} с кальмодулином, который при этом изменяет свою конформацию и активирует множество различных белков-мишеней, в том числе Ca^{2+} -зависимые протеинкиназы. Поскольку каждый тип клеток характеризуется своим набором белков-мишеней для сАМР-зависимых протеинкиназ и/или кальмодулина (либо кальмодулин-зависимых протеинкиназ), изменение уровня сАМР или Ca^{2+} вызывает в клетках разного типа различные, характерные для них реакции. Таким образом, использование сАМР и Ca^{2+} в качестве вторых посредников позволяет значительно усилить внешний сигнал и сделать его эффект специфичным для клеток того или иного типа.

13.5. Адаптация клеток-мишеней

Клетки-мишени, подвергавшиеся действию сигнального лиганда в течение длительного времени, часто теряют способность реагировать на этот лиганд.

Такая адаптация, или десенсибилизация, обратима и делает многие клетки особенно чувствительными не к абсолютной величине концентрации химического сигнала, а к изменению этой концентрации. Чем же отличается десенсибилизируемая клетка-мишень от клетки с нормальной чувствительностью? Единого ответа на этот вопрос нет. В одних случаях десенсибилизация происходит в результате уменьшения числа поверхностных рецепторов или же их инактивации; в других случаях это следствие изменения белков, участвующих в передаче сигнала после активации рецептора.

13.5.1. Некоторые клетки десенсибилизируются в результате эндоцитоза поверхностных рецепторов [24]

Белковые гормоны и факторы роста, присоединившиеся к поверхностным рецепторам клеток-мишеней, нередко захватываются путем эндоцитоза, опосредуемого рецепторами. Так как эндоцитозные пузырьки (эндосомы) обычно переносят свое содержимое в лизосомы, лиганды, а часто и связанный с ним рецептор подвергаются расщеплению гидролитическими ферментами. Этот процесс не только представляет собой главный путь распада некоторых сигнальных лигандов, но и играет важную роль в регулировании концентрации определенных рецепторных белков на поверхности клеток-мишеней. Хотя распад рецепторов и замена их новыми происходят непрерывно, в отсутствие лиганда время полужизни рецептора составляет около суток. Некоторые лиганды заметно повышают скорость расщепления рецепторов, вызывая эндоцитоз, так что при высокой концентрации такого лиганда число поверхностных рецепторов постепенно уменьшается; в результате этого снижается и чувствительность клетки к данному лиганду. Десенсибилизацию такого типа называют *регуляцией путем уменьшения числа рецепторов*.

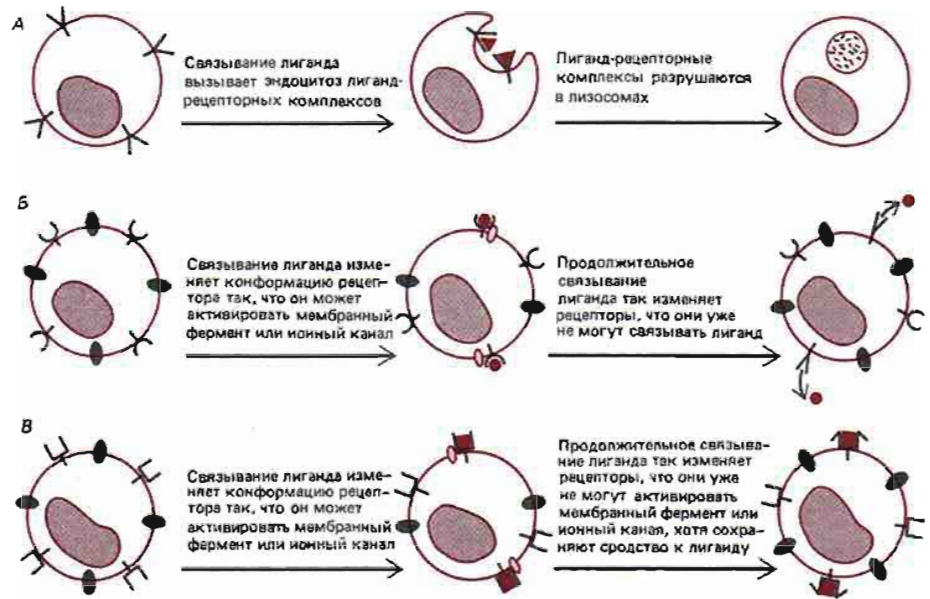
С интересным случаем подобной регуляции мы встречаемся у людей, страдающих ожирением в результате систематического переедания. У них хронически повышено содержание глюкозы в крови, и из-за этого постоянно повышен уровень циркулирующего инсулина. Клетки таких индивидуумов относительно нечувствительны к инсулину, так как число инсулиновых рецепторов у них снижено. Обычно уменьшение числа рецепторов компенсируется более высоким уровнем гормона, но у людей, страдающих ожирением, у которых резервы инсулина недостаточны, развивается дефицит этого гормона, приводящий к *диабету*.

13.5.2. Продолжительная связь с лигандом обратимо инактивирует некоторые поверхностные рецепторы [25]

При необычно высоких концентрациях небольших сигнальных лигандов, например адреналина или ацетилхолина, часто наблюдается другой тип регуляции поверхностных рецепторов. Такие лиганды не вызывают эндоцитоза и расщепления комплексов лиганд-рецептор, но обратимо инактивируют рецепторы. Например, эритроциты лягушки под действием высоких концентраций адреналина постепенно (в течение нескольких часов) теряют способность присоединять адреналин и реагировать на него. Этот эффект не может быть связан с эндоцитированием и разрушением рецепторов, поскольку 1) он проявляется и в опытах с изолированными мембранами эритроцитов и 2) бывает обратимым: чувствительность к адреналину постепенно восстанавливается даже в отсутствие синтеза нового белка. Кажется вероятным, что связывание адреналина ведет к довольно стойкому, хотя и обратимому, изменению конформации рецепторного белка, которое даже спустя долгое время после отделения лиганда препятствует присоединению новой его молекулы. Связано ли это явление с обратимой ковалентной модификацией рецептора, неизвестно.

Такого рода обратимая инактивация поверхностных рецепторов не всегда сопровождается потерей способности связывать лиганд. Долговременное присоединение ацетилхолина к ацетилхолиновым рецепторам мышечной клетки

Рис. 13-41. Три различных способа инактивации рецепторов высокими концентрациями лиганда. Связывание лиганда может привести к эндоцитированию лиганд-рецепторных комплексов и их разрушению в лизосомах (А). Продолжительная связь с лигандом может изменять конформацию рецептора так, что он будет не способен связывать лиганд (Б), или так, что связывание лиганда не будет приводить к активации мембранного фермента или ионного канала (В).



в нервно-мышечном соединении заставляет эти рецепторы принять неактивную конформацию, но инактивированные рецепторы по-прежнему способны связывать ацетилхолин (причем даже с большим сродством, чем обычные рецепторы). Однако в отличие от своей нормальной разновидности инактивированные рецепторы не способны, связав ацетилхолин, открывать в плазматической мембране каналы для катионов и поэтому не могут стимулировать мышечное сокращение. Если активация рецепторов и открытие ионных каналов происходит в первые миллисекунды после связывания ацетилхолина, то инактивация рецепторов происходит медленнее — для нее требуются уже секунды или минуты.

Три различных способа инактивации рецептора лигандом суммированы на рис. 13-41. Хотя все они считаются механизмами уменьшения чувствительности клеток к определенному лиганду, они в принципе могли бы также служить альтернативными способами реагирования на лиганд. Например, можно себе представить, что инактивированный ацетилхолиновый рецептор, непригодный для стимуляции мышечного сокращения, способен вызывать появление внутриклеточного медиатора, регулирующего какое-нибудь другое свойство мышечной клетки.

13.5.3. Десенситилизация клетки-мишени, вызываемая морфином, не обусловлена инактивацией рецепторов [26]

Не все формы адаптации клеток связаны с разрушением или инактивацией рецепторов в результате присоединения лиганда. Например, у наркоманов, употребляющих морфин (рис. 13-42), клетки-мишени в мозгу десенситилизируются по отношению к морфину, но по-прежнему имеют нормальное количество поверхностных рецепторов морфина (опиатных рецепторов). Это позволяет понять, почему морфинистам требуется значительно большая, чем нормальным людям, доза морфина для достижения того же эффекта обезболивания или эйфории. Каков же механизм привыкания к морфину, если он не связан с изменением рецепторных белков? Этот механизм все еще не известен, но вопрос стал уже доступным для изучения *in vitro* на линиях нервных клеток, чувствительных к морфину.

Рецепторы морфина на поверхности таких клеток функционально сопряжены при помощи GTP-связывающих белков с молекулами аденилатциклазы, наподобие того как в мышечных клетках с той же аденилатциклазой сопря-

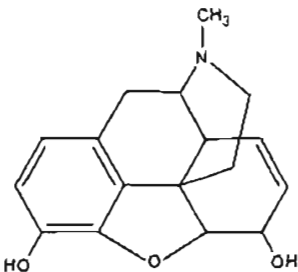


Рис. 13-42. Структура морфина.

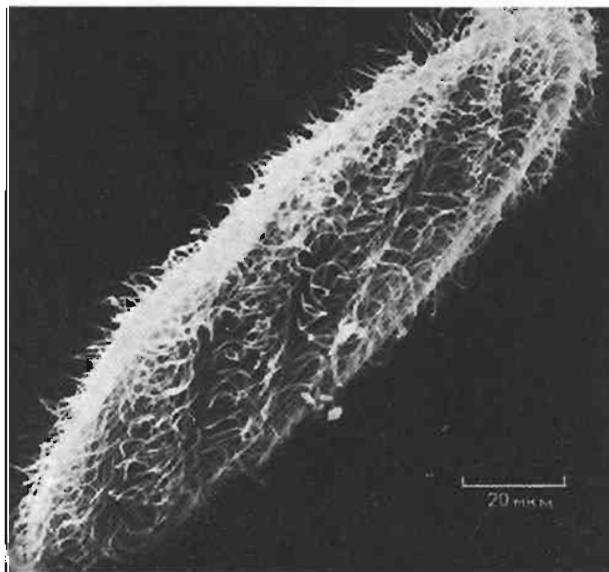
жены рецепторы адреналина. Но в отличие от того, что происходит в мышечных клетках под действием адреналина, в нейронах морфин вызывает *инактивацию* аденилатциклазы, а значит, и уменьшение внутриклеточного уровня сАМР. Если клетки культивировать в присутствии постоянной концентрации морфина, они в конце концов адаптируются так, что и активность аденилатциклазы, и уровень сАМР возвращаются к норме. Адаптация происходит без изменения количества морфина, связанного с поверхностными рецепторами, и не препятствует реакции клеток на дальнейшее увеличение концентрации морфина. Если теперь удалить морфин из культуральной среды, произойдет заметное повышение аденилатциклазной активности и уровень внутриклеточного сАМР очень сильно возрастет. Полагают, что именно увеличение концентрации сАМР ответственно за крайне неприятные симптомы, возникающие при резком прекращении употребления наркотика (беспокойство, потливость, дрожь и т.д.).

Почему некоторые клетки нашего организма имеют рецепторы к веществам вроде выделяемого из маковых зерен морфина? Фармакологи давно подозревали, что морфин может быть аналогом какой-то эндогенной сигнальной молекулы, регулирующей настроение и восприятие боли. В 1975 г. из мозга свиньи были выделены два пентапептида с морфиноподобной активностью, получившие название *энкефалинов*. Вслед за тем из гипофиза были выделены *эндорфины* – более длинные пептиды с аналогичной активностью. Все эти так называемые *эндогенные опиаты* содержат общую последовательность из четырех аминокислот и связываются с теми же поверхностными рецепторами, что и морфин (и родственные ему наркотики). Но в отличие от морфина эти вещества после секреции их клетками быстро распадаются и не накапливаются в таких количествах, чтобы вызывать привыкание, как у морфинистов.

13.5.4. Химическая сигнализация у одноклеточных организмов – полезная экспериментальная модель [27]

Химическая сигнализация между клетками многоклеточных животных могла возникнуть из тех приспособлений, с помощью которых одноклеточные организмы реагируют на химические изменения окружающей среды. В самом деле, некоторые внутриклеточные медиаторы используются организмами того и другого типа.

Рис. 13-43. Микрофотография парамеции, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Эти организмы плавают в результате синхронного бияния ресничек. (С любезного разрешения Sidney Tamm.)



Некоторые бактерии, например *Escherichia coli*, реагируют на недостаток глюкозы увеличением синтеза ряда ферментов, при помощи которых используются другие вещества, способные служить источниками энергии. Эта реакция опосредуется повышением внутриклеточного уровня сАМР. В этом случае сАМР действует таким же образом, как, по-видимому, действуют стероидные гормоны в животных клетках: он присоединяется к особым рецепторным белкам, а комплексы сАМР с рецепторами в свою очередь связываются со специфическими участками бактериальной ДНК и активируют транскрипцию генов, кодирующих необходимые ферменты.

Если парамеция (рис. 13-43) наталкивается на большое препятствие, то направление биения ресничек изменяется у нее на противоположное. Эта реакция связана с кратковременным открытием кальциевых каналов в клеточной мембране, приводящим к поступлению ионов Ca^{2+} в клетку. Повышенная концентрация этих ионов вызывает биение ресничек в обратную сторону, и клетка плывет назад, от препятствия. За несколько секунд ионы Ca^{2+} снова откачиваются из цитозоля, их внутриклеточный уровень возвращается к норме, и клетка снова начинает плыть вперед. Мутанты, лишённые этих регулируемых кальциевых каналов, могут двигаться только вперед, и поэтому их называют «пешечными» (по сходству с шахматной пешкой).

К наиболее изученным ответам одноклеточных организмов на внешние сигналы относятся реакции хемотаксиса, при которых движение клетки направляется к источнику определенного химического сигнала или от него. Мы уже кратко рассматривали хемотаксис у клеточного слизевика *Dictyostelium discoideum* (разд. 12.1.2). Значительные успехи были достигнуты в понимании молекулярных механизмов хемотаксиса у бактерий благодаря наличию большого числа мутантов; в частности, хорошо изучен молекулярный механизм адаптации. Все больше данных указывает на то, что некоторые механизмы адаптации, свойственные бактериям, участвуют и в регулировании хемотаксиса лейкоцитов у позвоночных.

13.5.5. Хемотаксис бактерий — примитивная разновидность «разумного» поведения [28]

Подвижные бактерии плывут в сторону более высокой концентрации питательных субстратов (аттрактантов), например сахаров и аминокислот, и более низкой концентрации вредных веществ (репеллентов) (рис. 13-44). Это простое, но целесообразное поведение — хемотаксис — наиболее интенсивно изучалось на бактериях *E. coli* и *Salmonella typhimurium*.

Бактерии плавают с помощью жгутиков, устроенных значительно проще, чем жгутики эукариотических клеток (разд. 10.2). Бактериальный жгутик — это спиральная трубочка из одинаковых белковых субъединиц. Основание каждого жгутика прикреплено с помощью короткого гибкого крючка к маленькому белковому диску, погруженному в бактериальную мембрану. Этот диск составляет часть микроскопического «мотора», который приводит в быстрое вращение спиральный жгутик, используя энергию трансмембранного протонного градиента (рис. 13-45).

Поскольку жгутики на поверхности бактерий закручены в спираль в определенную сторону, направление их вращения не безразлично. Вращение против часовой стрелки позволяет всем жгутикам собраться в общий пучок, так что бактерия равномерно плывет в одном направлении. Но при вращении по часовой стрелке пучок рассыпается на отдельные жгутики и бактерия начинает случайным образом кувыркаться на месте (рис. 13-46). В отсутствие внешних стимулов вращение дисков изменяется на противоположное каждые несколько секунд, что приводит к характерной картине: прямолинейное движение прерывается резкими изменениями направления в периоды кувырканий.

Аттрактанты и репелленты видоизменяют нормальное движение бактерий. Они присоединяются к специфическим белковым рецепторам и влияют на ча-

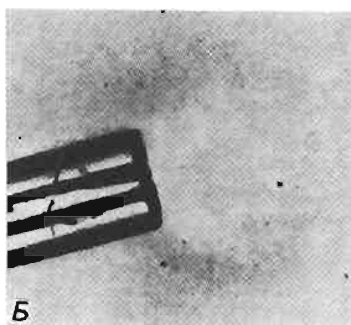
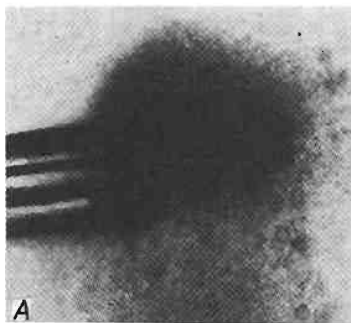
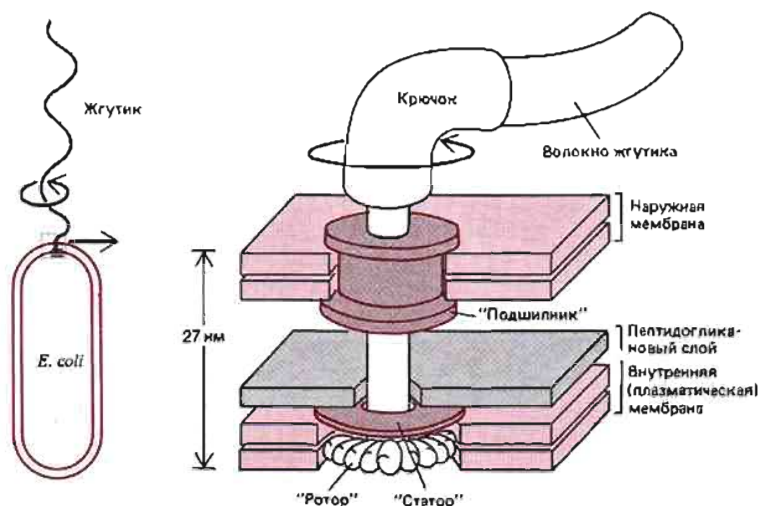


Рис. 13-44. Фотографии бактерий *Salmonella typhimurium*, собирающихся у стеклянного капилляра с аминокислотой серином (А) и избегающих капилляра, содержащего фенол (Б). Снимки были сделаны через 5 мин после внесения капилляров в чашки с бактериями. Такой «капиллярный тест» — простой способ демонстрации бактериального хемотаксиса. (В. А. Rubik, D. E. Koshland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2820–2824, 1978.)

Рис. 13-45. Схема «мотора», вращающего жгутик *E. coli*. «Ротором» служит белковый диск, расположенный в плазматической мембране. Под действием трансмембранного протонного градиента он быстро вращается (около 100 об/с) в липидном бислое относительно другого белкового диска («статора»), который каким-то образом закреплен в пептидогликановом слое. «Ротор» расположен на одной оси с крючком и жгутиком и заставляет их вращаться. Белковый «подшипник» служит для герметизации наружной мембраны в месте прохождения через нее вращающегося стержня. На рисунке неподвижные «детали» окрашены, а вращающиеся оставлены белыми.



стоту кувырканий, увеличивая или уменьшая интервал между двумя последовательными сменами направления, в котором вращаются жгутики. Когда бактерии плывут в сторону большей концентрации аттрактанта, они кувыркаются реже, чем в том случае, когда плывут в противоположную сторону (или когда вообще нет градиента). Поскольку периоды прямолинейного движения длиннее при перемещении «вверх» по градиенту концентрации, бактерии будут постепенно приближаться к источнику аттрактанта (рис. 13-47). Аналогичным образом, встретив возрастающую концентрацию репеллента, бактерии кувыркаются чаще обычного и в результате постепенно удалятся от репеллента.

В естественных условиях бактерии воспринимают пространственные градиенты аттрактантов или репеллентов, реагируя на изменение концентрации этих веществ во времени при своем передвижении с места на место (из-за очень малых собственных размеров бактериям было бы чрезвычайно трудно выявлять пространственные градиенты путем сравнения концентраций на разных концах клетки). В лабораторных условиях изменения концентрации во времени можно моделировать быстрым добавлением или удалением какого-либо вещества. Если добавить в культуральную среду аттрактант, кувыркание, как и следовало ожидать, быстро подавляется, однако через некоторое время, несмотря на присутствие аттрактанта, частота кувырканий возвращается к норме. Этот процесс десенсибилизации, или адаптации, специфичен по отношению к определенному аттрактанту, так как бактерии по-прежнему реагируют на другие неродственные аттрактанты. Они остаются адаптированными к аттрактанту до тех пор, пока нет градиента его концентрации. Быстрое удаление аттрактанта ненадолго повышает частоту кувырканий, а затем наступает адаптация к новому уровню. Адаптация играет в хемотаксисе важную роль, так как позволяет бактериям реагировать не на стационарный уровень, а на изменение концентрации аттрактанта и продлевать движение в благоприятном направлении.

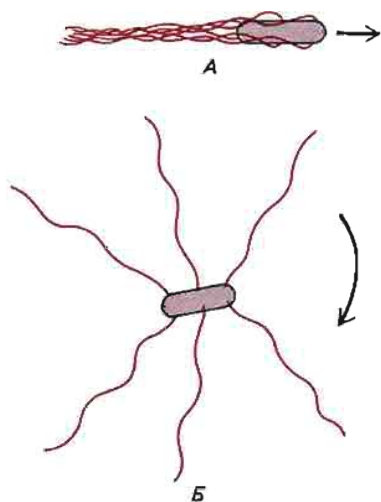


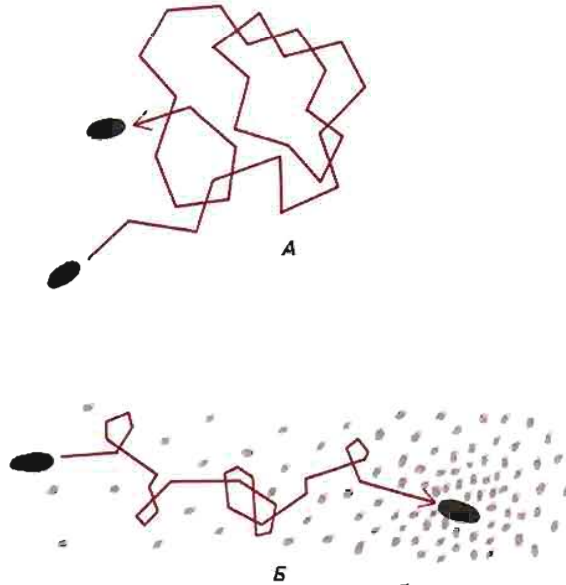
Рис. 13-46. Схема расположения жгутиков *E. coli* при движении. Если жгутики вращаются против часовой стрелки (А), они собираются в единый пучок, который действует как пропеллер и обеспечивает прямолинейное движение. При вращении жгутиков по часовой стрелке пучок расщепляется и бактерия кувыркается на месте.

13.5.6. Изучение мутантов показало, что в хемотаксисе бактерий участвуют четыре группы белков [29]

Молекулярные механизмы бактериального хемотаксиса исследуют путем отбора и анализа мутантных бактерий с различными нарушениями этого процесса. Все выделенные до сих пор мутанты распадаются на четыре обширных класса, отражающих последовательную передачу информации от поверхностных рецепторов к мотору жгутика.

Мутанты первого класса — со специфическим дефектом хемотаксиса — нор-

Рис. 13-47. Схема траектории плывущей бактерии. В отсутствие хемотаксического стимула (А) периоды прямолинейного движения прерываются короткими периодами кувыркания, которые случайным образом изменяют путь бактерии. В присутствии аттрактанта (Б) кувырkanie подавляется, когда бактерия движется в сторону его большей концентрации, что ведет к постепенному приближению бактерии к источнику аттрактанта.

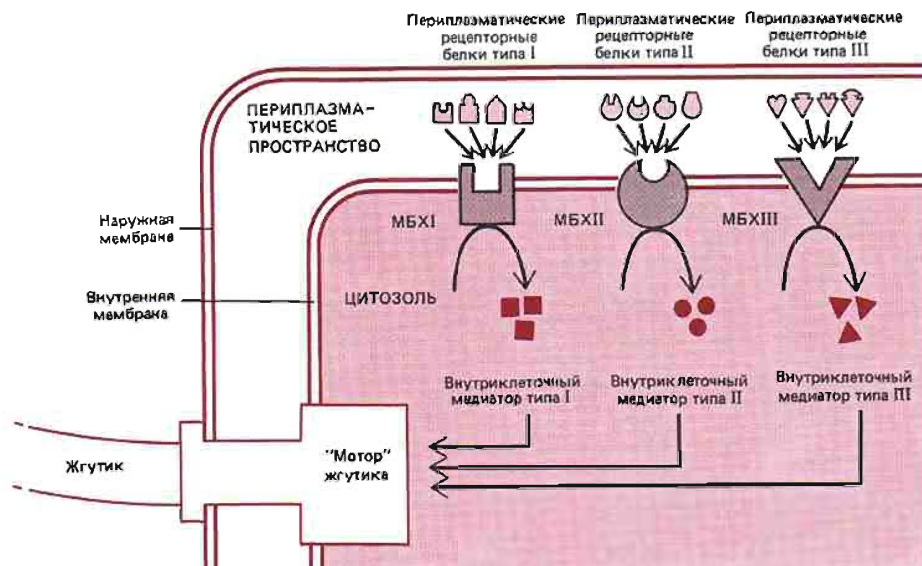


мально плавают и отвечают на большинство стимулов, но не способны реагировать на одно определенное вещество или группу очень сходных веществ. Генетический дефект у этих мутантов локализован в одном из двадцати или более генов, кодирующих различные периплазматические рецепторные белки, которые с высоким сродством связывают определенные химические вещества. Эти рецепторы растворимы и находятся в периплазматическом пространстве (между наружной и плазматической мембранами); это те самые белки, которые участвуют в транспорте соответствующих веществ через плазматическую мембрану (разд. 6.4.11). Хотя в системах транспорта и хемотаксиса используются одни и те же первичные рецепторы, в остальном их механизмы различны. Об этом свидетельствуют мутации, инактивирующие транспорт, но не влияющие на хемотаксис, или наоборот.

Мутанты второго класса – с множественными дефектами хемотаксиса – не реагируют сразу на несколько веществ, для которых имеется соответствующая группа различных рецепторов, но нормально реагируют на вещества, узнаваемые остальными рецепторами. В таких клетках мутация затрагивает один из трех родственных трансмембранных белков, ответственных за передачу хемотаксического сигнала через плазматическую мембрану. Поскольку эти белки при хемотаксисе метилируются (см. ниже), их называют метил-акцептирующими белками хемотаксиса (МБХ). Каждому МБХ соответствует свой набор периплазматических рецепторов, присоединение которых активирует данный МБХ. МБХI связывает рецепторы I типа, МБХII – рецепторы II типа, МБХIII – рецепторы III типа (рис. 13-48). Присоединив аттрактант, периплазматический рецепторный белок претерпевает конформационное изменение и приобретает способность связываться с соответствующим МБХ и активировать его. Активация МБХ вызывает два различных эффекта, соответствующие фазам возбуждения и адаптации в реакции хемотаксиса: 1) возбуждение связано с тем, что активированный МБХ создает внутриклеточный сигнал, заставляющий мотор жгутика продолжать вращаться против часовой стрелки, и в результате клетка продвигается вперед без кувыркания; 2) адаптация происходит благодаря тому, что активированный МБХ становится доступным для метилирования цитоплазматическими ферментами, а метилирование подавляет активность МБХ (см. ниже).

Мутанты третьего класса – совсем неспособные к хемотаксису – не отвечают ни на какие стимулы. У этих мутантов дефектен один из восьми генов, кодирующих различные белки, в том числе ферменты, ответственные за метилирование и деметилирование МБХ, и другие белки, необходимые для передачи информации от рецептора к мотору.

Рис. 13-48. Этапы преобразования сигнала при хемотаксисе у бактерий. Вещества-аттрактанты (не показаны) присоединяются в периплазматическом пространстве к специфическим белкам-рецепторам. Затем рецепторы взаимодействуют с одним из трех метил-акцептирующих белков хемотаксиса (МБХ), находящихся во внутренней (плазматической) мембране, и таким образом активируют его. Это приводит к образованию внутриклеточного медиатора, необходимого для того, чтобы «мотор» жгутика продолжал вращаться против часовой стрелки; таким образом активация МБХ подавляет кувиркание и удлиняет путь прямолинейного движения бактерии. Имеются три группы периплазматических рецепторных белков (типы I, II и III), каждый из которых взаимодействует со своей малой молекулой и со своим МБХ. Некоторые аттрактанты, хотя это и не показано на рисунке, присоединяются прямо к МБХ и активируют его; в таких случаях МБХ служит и рецептором, и преобразователем сигнала.



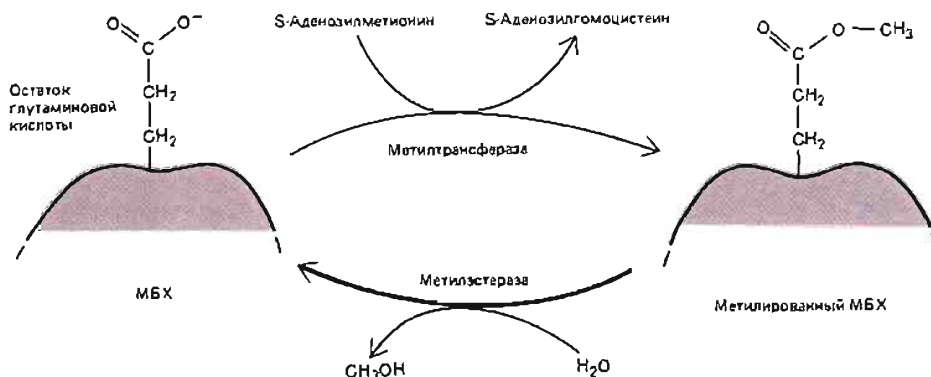
Есть, наконец, еще один класс мутантов, не отвечающих ни на какие хемотаксические стимулы, — это *неподвижные* мутанты. Сюда относятся мутанты с дефектами в одном из двух генов, контролирующих вращение жгутика, и мутанты, дефектные по одному из 16 генов, причастных к синтезу и сборке жгутиков.

13.5.7. Адаптация обусловлена метилированием белков [29]

Имеются убедительные данные в пользу того, что адаптацию при хемотаксисе бактерий обеспечивает ковалентное присоединение метильной группы к МБХ. Если метилирование заблокировано мутацией, адаптации не происходит, и присутствие аттрактанта подавляет кувиркание в течение нескольких дней, а не минут.

За метилирование ответствен растворимый фермент (*метилтрансфераза*), переносящий метильную группу с обычного донора метильных групп *S*-аденозилметионина на свободную карбоксильную группу глутаминовой кислоты в МБХ (рис. 13-49). Аттрактанты, присоединяющиеся к рецепторам I типа, сильно повышают уровень метилирования МБХI, а те, которые связываются с рецепторами II и III типов, вызывают метилирование соответственно МБХII и МБХIII. Новый повышенный уровень метилирования сохраняется до тех пор, пока присутствует аттрактант. На каждую молекулу МБХ может быть перенесено до четырех метильных групп, причем степень метилирования возрастает с повышением концентрации аттрактанта. Если аттрактант удалить, МБХ деметилируется растворимым деметилирующим ферментом

Рис. 13-49. Реакция метилирования и деметилирования МБХ. К каждому МБХ с помощью эфирных связей может присоединиться до четырех метильных групп.



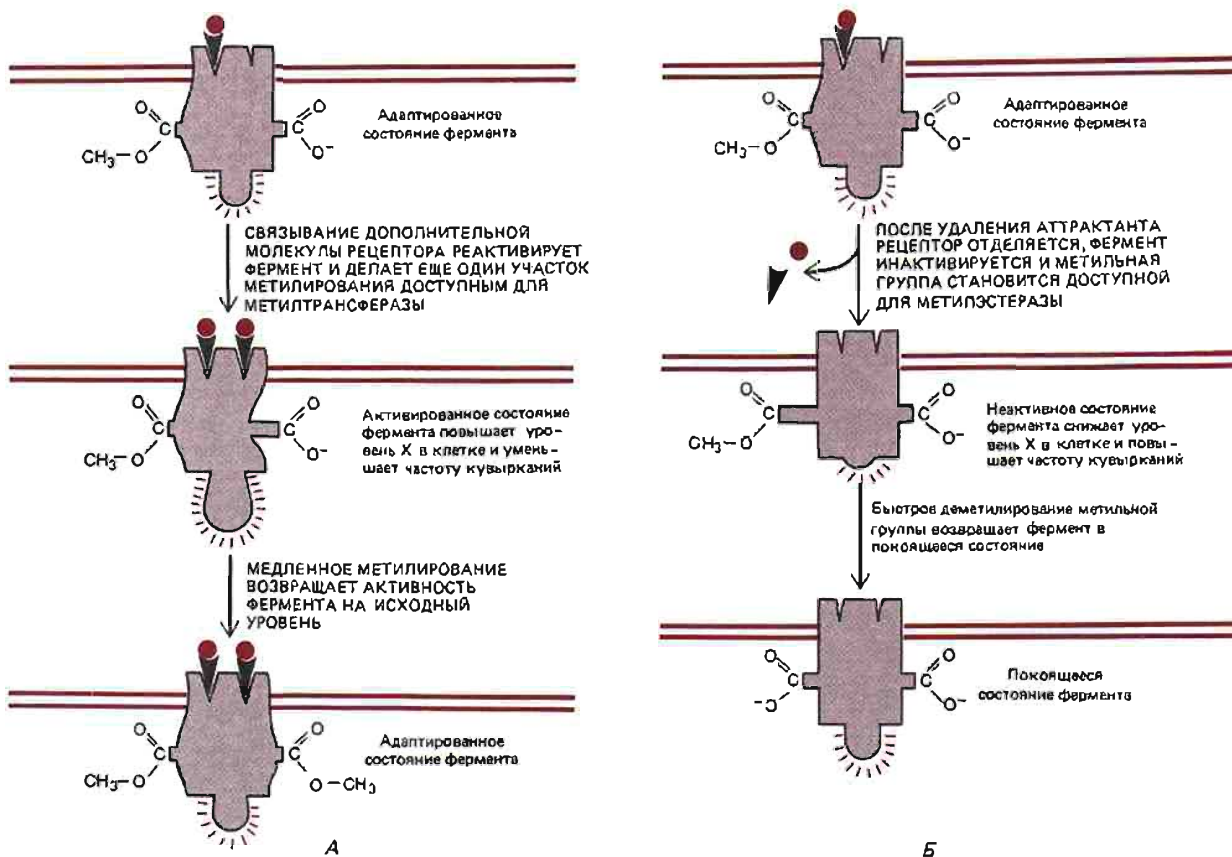


Рис. 13-51. Гипотетическая модель бактериального хемотаксиса, основанная на предположении, что МБХ — это мембранный фермент, синтезирующий внутриклеточный медиатор X. Фермент быстро активируется при связывании рецептора, а в период адаптации медленно ингибируется в результате метилирования. При высокой внутриклеточной концентрации X жгутики вращаются против часовой стрелки и бактерия плывет прямо, а при низкой концентрации X жгутики вращаются по часовой стрелке и бактерия кувыркается. Как видно из схемы, адаптированный МБХ на короткое время реактивируется (так что частота кувырканий уменьшается) при связывании дополнительного рецептора, если концентрация аттрактанта возрастает (А), или инактивируется (так что кувыркание учащается) в результате отделения рецептора от МБХ, если концентрация аттрактанта падает (Б). Обратите внимание, что ферментативная активность МБХ в адаптированном состоянии (с

одной связанной молекулой рецептора и одной метильной группой или с двумя связанными молекулами рецептора и двумя метильными группами) такова же,

что и в состоянии покоя (и соответственно одинаковы в обоих состояниях внутриклеточная концентрация X и частота кувырканий).

приближения к аттрактантам, только все реакции меняются на противоположные. Например, в только что описанной модели рецептор репеллента, присоединившись к МБХ, будет инактивировать его, а не активировать, и в результате внутриклеточная концентрация X упадет. Таким образом, увеличение концентрации репеллента заставит жгутики вращаться по часовой стрелке, что вызовет кувыркание бактерий.

Заключение

Некоторые клетки способны реагировать не на абсолютную величину концентрации сигнального лиганда, а на ее изменение. Это достигается путем обратной, зависимой от времени адаптации к высоким концентрациям сигнального лиганда. Механизм этой адаптации может быть различным. Присоединение лиганда может инактивировать поверхностный рецептор, вызывая его переход в цитоплазму и разрушение или заставляя его принять неактивную конформацию. В других случаях адаптация может быть следствием изменений одного из белков, участвующих в передаче сигнала от активированного рецептора. На молекулярном уровне лучше всего изучена адаптация бактериального механизма хемотаксиса, при которой обратимое метилирование ключевого мембранного белка в цепи передачи сигнала позволяет клеткам передвигаться в оптимальном направлении.

Литература

Цитируемая

1. Williams R.H., ed. Textbook of Endocrinology, 5th ed., Philadelphia, Saunders, 1974.
White A. et al. Principles of Biochemistry, 6th ed., pp. 1185-1317, New York, McGraw-Hill, 1978.
2. Bradshaw R.A., Frazier W.A. Hormone receptors as regulators of hormone action, *Curr. Top. Cell Regul.*, 12, 1-37, 1977.
3. Samuelsson B., Granström E., Green K., Hamberg M., Hammarström S. Prostaglandins, *Annu. Rev. Biochem.*, 44, 669-695, 1975.
Harris R.H., Ramwell P.W., Gilmer P.J. Cellular mechanisms of prostaglandin action, *Annu. Rev. Physiol.*, 41, 653-668, 1979.
4. Pappenheimer J.R. The sleep factor, *Sci. Am.*, 235(2), 24-29, 1976.
5. Levi-Montalcini R., Calissano P. The nerve-growth factor, *Sci. Am.*, 240(6), 68-77, 1979.
Yankner B.A., Shooter E.M. The biology and mechanism of nerve growth factor, *Annu. Rev. Biochem.*, 51, 845-868, 1982.
Campenot R.B. Local control of neurite development by nerve growth factor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 4516-4519, 1977.
6. Yamamoto K.R., Alberts B.M. Steroid receptors: elements for modulation of eukaryotic transcription, *Annu. Rev. Biochem.*, 45, 721-746, 1976.
Ivarie R.D., O'Farrell P.H. The glucocorticoid domain: steroid-mediated changes in the rate of synthesis of rat hepatoma proteins, *Cell*, 13, 41-55, 1978.
Payvar F. et al. Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 6628-6632, 1981.
7. Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., Richards G. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 38, 655-662, 1974.
8. Attardi B., Ohno S. Physical properties of androgen receptors in brain cytosol from normal and testicular feminized (Tfm/y) mice, *Endocrinology*, 103, 760-770, 1978.
9. Lefkowitz R.J., Roth J., Pricer W., Pastan I. ACTH receptors in the adrenal: specific binding of ACTH-¹²⁵I and its relation to adenyl cyclase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 65, 745-752, 1970.
Kahn C.R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters, *J. Cell Biol.*, 70, 261-286, 1976.
10. Kahn C.R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters, *J. Cell Biol.*, 70, 261-286, 1976.
Kahn C.R., Baird K.L., Jarrett D.B., Flier J.S. Direct demonstration that receptor crosslinking or aggregation is important in insulin action, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 4209-4213, 1978.
Rees Smith B., Buckland P.R. Structure-function relations of the thyrotropin receptor. In: *Receptors, Antibodies and Disease* (Ciba Foundation Symposium 90), pp. 114-132, London, Pitman, 1982.
11. Sutherland E.W. Studies on the mechanism of hormone action, *Science*, 177, 401-408, 1972.
Carpenter G., Cohen S. Epidermal growth factor, *Annu. Rev. Biochem.*, 48, 193-216, 1979.
Stevens C.F. The neuron, *Sci. Am.*, 241(3), 54-65, 1979.
12. Sutherland E.W. Studies on the mechanism of hormone action, *Science*, 177, 401-408, 1972.
Pastan I. Cyclic AMP, *Sci. Am.*, 227(2), 97-105, 1972.
13. Ross E.M., Gilman A.G. Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase, *Annu. Rev. Biochem.*, 49, 533-564, 1980.
Schramm M., Orly J., Eimerl S., Korner M. Coupling of hormone receptors to adenylate cyclase of different cells by cell fusion, *Nature*, 268, 310-313, 1977.
14. Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction, *Nature*, 284, 17-22, 1980.
Helmreich E.J.M., Zenner H.P., Pfeuffer T., Cori C.F. Signal transfer from hormone receptor to adenylate cyclase, *Curr. Top. Cell Regul.*, 10, 41-87, 1976.
Johnson G.L., Kaslow H.R., Fajel Z., Bourne H.R. Genetic analysis of hormone-sensitive adenylate cyclase. In: *Advances in Cyclic Nucleotide Research* (P. Greengard, G.A. Robison, eds.), Vol. 13, pp. 1-38. New York, Raven, 1980.
Lai C.-Y. The chemistry and biology of cholera toxin, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, 9, 171-206, 1980.
Cassel D., Pfeuffer T. Mechanism of cholera toxin action: covalent modification of the guanyl nucleotide-binding protein of the adenylate cyclase system, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2669-2673, 1978.

15. Heilbrunn L. V., Wiercenski F. J. The actions of various cations on muscle protoplasm, *J. Cell. Comp. Physiol.*, **29**, 15–32, 1947.
Carafoli E., Crompton M. The regulation of intracellular calcium, *Curr. Top. Membr. Transp.*, **10**, 151–216, 1978.
Racker E. Fluxes of Ca^{2+} and concepts, *Fed. Proc.*, **39**, 2422–2425, 1980.
16. Rubin R. P. The role of calcium in the release of neurotransmitter substances and hormones, *Pharmacol. Rev.*, **22**, 389–428, 1970.
Rasmussen H., Waisman D. The messenger function of calcium in endocrine systems. In: *Biochemical Actions of Hormones* (G. Litwack, ed.), Vol. 8, pp. 1–115, New York, Academic Press, 1981.
17. Cohen P. The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity, *Nature*, **296**, 613–620, 1982.
Hoppe J., Wagner K. G. Cyclic AMP-dependent protein kinase I, a unique allosteric enzyme, *Trends Biochem. Sci.*, **4**, 282–285, 1979.
Smith S. B., White H. D., Siegel J. B., Krebs E. G. Cyclic AMP-dependent protein kinase I: cyclic nucleotide binding, structural changes, and release of the catalytic subunits, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1591–1595, 1981.
18. Cohen P. The role of cyclic-AMP-dependent protein kinase in the regulation of glycogen metabolism in mammalian skeletal muscle, *Curr. Top. Cell Regul.*, **14**, 117–196, 1978.
19. Krebs E. G., Beavo J. A. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes, *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 923–959, 1979.
Cohen P. The role of protein phosphorylation in the neural and hormonal control of intermediary metabolism. In: *Cellular Controls in Differentiation* (C. W. Lloyd, D. A. Rees, eds.), pp. 81–105. London, Academic Press, 1981.
20. Means A. R., Dedman J. R. Calmodulin—an intracellular calcium receptor, *Nature*, **285**, 73–77, 1980.
Klee C. B., Crouch T. H., Richman P. G. Calmodulin, *Annu. Rev. Biochem.*, **49**, 489–515, 1980.
Cheung W. Y. Calmodulin, *Sci. Am.*, **246**(6), 48–56, 1982.
Kretsinger R. H. Mechanisms of selective signaling by calcium, *Neurosci. Res. Program Bull.*, **19**, 213–328, 1981.
21. Goldberg N. D., Haddox M. K. Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 823–896, 1977.
22. Schimke R. T. On the roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in mammalian tissues, *Curr. Top. Cell Regul.*, **1**, 77–124, 1969.
23. Mulvihill E. R., Palmiter R. D. Relationship of nuclear estrogen receptor levels to induction of ovalbumin and conalbumin mRNA in chick oviduct, *J. Biol. Chem.*, **252**, 2060–2068, 1977.
Lewis J., Slack J., Wolpert L. Thresholds in development, *J. Theor. Biol.*, **65**, 579–590, 1977.
24. Raff M. Selfregulation of membrane receptors, *Nature*, **259**, 255–266, 1976.
Kahn C. R., Roth J. Cell membrane receptors for polypeptide hormones: applications to the study of disease states in mice and men, *Am. J. Clin. Pathol.*, **63**, 656–668, 1975.
25. Lefkowitz R. J. Regulation of β -adrenergic receptors by β -adrenergic agonists. In: *Receptors and Hormone Action* (L. Birnbaumer, B. W. O'Malley, eds.), Vol. 3, pp. 179–194, New York, Academic Press, 1978.
Katz B., Thesleff S. A study of the "desensitization" produced by acetylcholine at the motor end-plate, *J. Physiol.*, **138**, 63–80, 1957.
26. Klee W. A., Sharma S. K., Nirenberg M. Opiate receptors as regulators of adenylate cyclase, *Life Sci.*, **16**, 1869–1874, 1975.
Snyder S. H. Opiate receptors and internal opiates, *Sci. Am.*, **236**(3), 44–56, 1977.
27. Schiffmann E., Gallin J. I. Biochemistry of phagocyte chemotaxis, *Curr. Top. Cell Regul.*, **15**, 203–261, 1979.
28. Berg H. How bacteria swim, *Sci. Am.*, **233**(2), 36–44, 1975.
Adler J. The sensing of chemicals by bacteria, *Sci. Am.*, **234**(4), 40–47, 1976.
Koshland D. E., Jr. Biochemistry of sensing and adaptation, *Trends Biochem. Sci.*, **5**, 297–301, 1980.
29. Springer M. S., Goy M. F., Adler J. Protein methylation in behavioral control mechanisms and in signal transduction, *Nature*, **280**, 279–284, 1979.
Koshland D. E., Jr. Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system, *Annu. Rev. Biochem.*, **50**, 765–782, 1981.

10.1. Мышечное сокращение 76
10.1.1. Миофибрилла – сократимый элемент клеток скелетной мускулатуры 76

- 10.1.2. Миофибриллы состоят из повторяющихся ансамблей толстых и тонких филаментов 76
- 10.1.3. Сокращение — результат скольжения филаментов относительно друг друга 77
- 10.1.4. Тонкие филаменты состоят в основном из актина 79
- 10.1.5. Толстые филаменты состоят главным образом из миозина 80
- 10.1.6. Гидролиз АТФ — источник движущей силы мышечного сокращения 80
- 10.1.7. Миозин — это актин-зависимая АТФ-аза 81
- 10.1.8. Миозиновые головки прикрепляются к активным филаментам 82
- 10.1.9. Миозиновые головки «шагают» вдоль активных филаментов 83
- 10.1.10. Актин и миозин закреплены на своих местах в миофибрилле с помощью других белков 84
- 10.1.11. Мышечное сокращение индуцируется повышением внутриклеточной концентрации ионов Ca^{2+} 85
- 10.1.12. Тропонин и тропомиозин осуществляют Ca^{2+} -зависимую регуляцию мышечного сокращения 85
- 10.1.13. Миозин гладких мышц активируется Ca^{2+} -зависимым фосфорилированием 86
Заключение 27
- 10.2. Движение ресничек и жгутиков 88
- 10.2.1. Для ресничек и жгутиков характерны колебательные движения (волны изгиба) 88
- 10.2.2. Ресничка содержит пучок параллельных микротрубочек, образующих структуру типа 9 + 2 89
- 10.2.3. Микротрубочки — это полые цилиндры, образованные молекулами тубулина 89
- 10.2.4. Аксома ресничек и жгутиков содержит белковые связи, «ручки» и «спинки» 92
- 10.2.5. Аксома движется благодаря скольжению микротрубочек 93
- 10.2.6. За скольжение ответствен диненин 94
- 10.2.7. Реснички можно изучать генетическими методами 95
- 10.2.8. Преобразование скользящего движения микротрубочек в изгиб реснички происходит благодаря центральной капсуле аксома 96
Заключение 97
- 10.3. Общие черты микротрубочек и активных филаментов как динамических ансамблей 97
- 10.3.1. Микротрубочки — это высоколабильные структуры, чувствительные к антимитотическим агентам 97
- 10.3.2. Активные филаменты в клетке постоянно образуются и разрушаются 98
- 10.3.3. Вещества, влияющие на полимеризацию актина, изменяют поведение клеток 100
- 10.3.4. Полимеризацию актина и тубулина можно изучать *in vivo* 100
- 10.3.5. Активные филаменты и микротрубочки обладают структурной полярностью и наращиваются с разных концов с неодинаковой скоростью 102
- 10.3.6. Полимеры актина и тубулина могут претерпевать «тред-миллинг» 103
Заключение 105
- 10.4. Центры организации микротрубочек; белки, связанные с микротрубочками 105
- 10.4.1. Цитоплазматические микротрубочки ассоциированы с другими, вспомогательными белками 106
- 10.4.2. Микротрубочки растут из отдельных центров организации 106
- 10.4.3. Центриоли и базальные тельца идентичны в структурном отношении и функционально взаимозаменяемы 107
- 10.4.4. Центриоли обычно возникают путем дупликации 107
- 10.4.5. Какова функция центриолей? 109
Заключение 109
- 10.5. Активные филаменты и белки, связывающиеся с актином, в нематических клетках 110
- 10.5.1. Микроворсинки содержат пучки активных филаментов 110
- 10.5.2. Жесткие пучки поперечнополосатых активных филаментов участвуют в рецепции звука 111
- 10.5.3. Динамические поверхностные структуры с активными филаментами свойственны многим клеткам 112
- 10.5.4. И в нематических клетках есть небольшие сократимые комплексы, напоминающие сократительный аппарат мышц 114
- 10.5.5. Для агрегации миозина в нематических клетках необходимы ионы кальция 115
- 10.5.6. Активные филаменты часто прикрепляются к клеточной мембране 116
- 10.5.7. Движение амёб и фибробластов связано с функционированием активных филаментов 117
- 10.5.8. Амёбодное движение сопровождается переходами геля $\rightleftharpoons$ золь в цитоплазме 118
- 10.5.9. В формировании активного геля участвуют белки, образующие поперечные сшивки 119
- 10.5.10. Фрагментирующие белки могут вызывать Ca^{2+} -зависимое разжижение активных гелей 119
- 10.5.11. Сокращение цитоплазматических гелей происходит при участии миозина 119
Заключение 120
- 10.6. Промежуточные филаменты 121
- 10.6.1. Промежуточные филаменты состоят из фибриллярных полипептидов весьма различной величины 122
- 10.6.2. Разрушение промежуточных филаментов может быть сопряжено с деградацией составляющих их полипептидов 123
- 10.6.3. В клетках разного типа промежуточные филаменты различаются по своему составу 123
- 10.6.4. Кератиновые филаменты укрепляют эпителиальные слои 124
- 10.6.5. Только ли структурные функции выполняют промежуточные филаменты? 125
Заключение 125
- 10.7. Организация цитоскелета 125
- 10.7.1. Методы электронной микроскопии позволяют воссоздать трехмерную картину цитоскелета 126
- 10.7.2. Органеллы и растворимые белки могут быть ассоциированы с цитоскелетом 128
- 10.7.3. Одино-единственный ген трансформирующего вируса вызывает существенные изменения всего цитоскелета 129
- 10.7.4. Общими организаторами цитоскелета, возможно, служат микротрубочки 129
- 10.7.5. Цитоскелет определяет способность клетки реагировать на физическую природу твердой поверхности 131
- 10.7.6. Информация о структуре цитоскелета материнской клетки может передаваться непосредственно цитоскелету дочерних клеток 132
- 10.7.7. Информация о структурной организации цитоскелета может передаваться за пределы клеточной мембраны 133
- 10.7.8. Как движутся клетки? 133
Заключение 134
Литература 135

Глава 11. Рост и деление клеток 139

- 11.1. Контроль клеточного деления 139
- 11.1.1. В многоклеточном организме разные клетки делятся с весьма различными скоростями 141
- 11.1.2. Различия в длительности клеточного цикла определяются в основном длиной фазы G_1 142
- 11.1.3. Определение длины фаз клеточного цикла 142
- 11.1.4. Возможно, что деление клеток контролируется особым «триггерным» белком 145
- 11.1.5. Клеточное деление регулируется рядом механизмов, действующих по принципу обратной связи 147
- 11.1.6. Нормальные клетки млекопитающих, растущие в культуре, перестают делиться, когда им не хватает свободного места 147
- 11.1.7. Деление клеток регулируется также позиционными сигналами 148
- 11.1.8. Опухолевые клетки утрачивают нормальный механизм регуляции роста 149
Заключение 150
- 11.2. Опухолевые вирусы как инструмент для изучения регуляции клеточного цикла 150
- 11.2.1. Онкогены идентифицируются методами молекулярной генетики 153
- 11.2.2. Лучше всего изучены онкогены РНК-содержащих опухолеродных вирусов (ретровирусов) 154
- 11.2.3. Онкогены часто кодируют протениназы 155
- 11.2.4. Увеличение количества нормального клеточного белка может нарушать регуляцию роста клеток 156
- 11.2.5. Активные онкогены были выделены непосредственно из опухолей человека 157
Заключение 158
- 11.3. События, происходящие в фазе S 158
- 11.3.1. Во время фазы S кластеры репликационных виллок активируются одновременно во всех хромосомах 158
- 11.3.2. По мере репликации ДНК в состав хроматина включаются новые гистоны 161
- 11.3.3. Положение участков начала репликации в генах может иметь важное биологическое значение 164

- 11.3.4. Различные генетические участки в одной и той же хромосоме реплицируются в фазе S в разное время 166
- 11.3.5. Временная организация репликационных процессов в фазе S определяется структурой интерфазного хроматина 166
- 11.3.6. Как контролируется последовательность событий при репликации ДНК? 167
- 11.3.7. Связанные с хроматином факторы ответственны за то, что каждый участок ДНК реплицируется в фазе S лишь один раз 167
Заключение 169
- 11.4. Логика клеточного цикла 169
- 11.4.1. Большинство белков синтезируется на протяжении всей интерфазы 169
- 11.4.2. Клеточный цикл включает строго детерминированный ряд последовательных процессов 169
- 11.4.3. Массу клетки, вступающей в митоз, в основном определяют факторы, действующие на ранних этапах цикла 171
- 11.4.4. Фаза G₂ нужна для подготовки клеток к митозу 173
- 11.4.5. Продолжительность клеточного цикла может резко сокращаться, если ее не лимитирует скорость биосинтетических процессов 174
Заключение 175
- 11.5. Клеточное деление 175
- 11.5.1. В делении клетки традиционно выделяют шесть стадий 179
- 11.5.2. Только часть событий в митозе связана с функционированием митотического веретена 179
- 11.5.3. Веретено содержит организованные ансамбли микротрубочек, находящихся в динамическом равновесии между сборкой и разборкой 179
- 11.5.4. Образование веретена в профазе в основном контролируется митотическими центрами, которые определяют положение полюсов 181
- 11.5.5. Каждая хромосома в митозе состоит из двух хроматид и содержит пару кинетохоров, связанных с концами микротрубочек 181
- 11.5.6. Упорядоченное расположение хромосом в метафазе – результат взаимодействия кинетохорных и полюсных нитей веретена 182
- 11.5.7. Метафазные хромосомы удерживаются в обманчиво статичном состоянии сбалансированными поллярными силами 183
- 11.5.8. В анафазе сестринские хроматиды внезапно расходятся 184
- 11.5.9. В анафазе хромосомы подтягиваются к двум полюсам, а полюсы расходятся в результате расталкивания 184
- 11.5.10. По-видимому, сила, раздвигающая полюсы, генерируется дивизоподобной АТФазой, а хромосомы движутся к полюсу с помощью другого механизма 185
- 11.5.11. В телофазе ядерная оболочка образуется сначала вокруг отдельных хромосом 188
- 11.5.12. Митотическое веретено определяет место, где происходит разделение цитоплазмы при цитокинезе 189
- 11.5.13. Актин и миозин создают силу, необходимую для цитокинеза 191
- 11.5.14. В растительных клетках, имеющих клеточные стенки, цитоплазма делится совершенно иным способом 192
- 11.5.15. Цитокинез должен обеспечить передачу цитоплазматических оргanelл обеим дочерним клеткам 194
- 11.5.16. Сложный митотический процесс высших организмов – это результат постепенного совершенствования механизма деления прокариот 195
Заключение 196
Литература 197
- Глава 12. Межклеточная адгезия и внеклеточный матрикс 201**
- 12.1. Клеточное узнавание и клеточная адгезия 201
- 12.1.1. Микробактерии используют выгоды «общественного» ведения 203
- 12.1.2. За объединение амёб слизики в многоклеточное скопление ответственны хемотаксис и специфическая клеточная адгезия 204
- 12.1.3. У губок в видоспецифической агрегации клеток участвует макромолекулярный внеклеточный фактор агрегации 207
- 12.1.4. Диссоциированные эмбриональные клетки позвоночных предпочтительно ассоциируют с клетками той же ткани 218
- 12.1.5. Клетки разных тканей можно расположить в ряд по способности к адгезии 209
Заключение 211
- 12.2. Межклеточные контакты 211
- 12.2.1. Десмосомы скрепляют клетки 211
- 12.2.2. Плотные контакты создают в клеточных слоях барьер проницаемости 213
- 12.2.3. Щелевые контакты позволяют малым молекулам прямо переходить из клетки в клетку 214
- 12.2.4. Почему столь многие клетки метаболически и электрически сопряжены с помощью щелевых контактов? 217
- 12.2.5. Между многими клетками раннего эмбриона существует ионное сопряжение 217
- 12.2.6. Возможно, что клетки способны регулировать проницаемость своих щелевых контактов 218
- 12.2.7. Щелевые контакты состоят из каналов, непосредственно связывающих цитоплазму соседних клеток 218
Заключение 219
- 12.3. Внеклеточный матрикс 220
- 12.3.1. Внеклеточный матрикс состоит в основном из фибриллярных белковых структур, погруженных в гидратированный полисахаридный гель 221
- 12.3.2. Главный белок внеклеточного матрикса – коллаген 222
- 12.3.3. Полипептидные цепи коллагена необычны по составу и последовательности аминокислот 224
- 12.3.4. При секретиции молекулы проколлагена расщепляются с образованием молекул коллагена, которые спонтанно объединяются в фибриллы 225
- 12.3.5. Образовавшиеся коллагеновые фибриллы значительно укрепляются ковалентными связками 227
- 12.3.6. Эластин, придающий тканям упругость, образован перекрещиваемыми полипептидными цепями с изменчивой случайной конформацией 229
- 12.3.7. Важными компонентами внеклеточного матрикса являются протеогликаны и гиалуроновая кислота 203
- 12.3.8. Цепи гликозаминогликанов занимают очень много места и образуют гидратированные гели 233
- 12.3.9. Цепи гликозаминогликанов могут располагаться во внеклеточном матриксе высокоупорядоченным образом 233
- 12.3.10. Фибронектин – гликопротеин внеклеточного матрикса, способствующий клеточной адгезии 235
- 12.3.11. Базальная мембрана – это специализированная форма внеклеточного матрикса, содержащая коллаген особого типа 237
- 12.3.12. Базальные мембраны выполняют разнообразные и сложные функции 239
- 12.3.13. Внутриклеточные пучки актиновых филаментов организуют макромолекулы матрикса на поверхности клеток и тем самым упорядочивают внеклеточный матрикс 240
- 12.3.14. Упорядоченный внеклеточный матрикс в свою очередь влияет на организацию и поведение заключенных в нем клеток 240
Заключение 241
Литература 242
- Глава 13. Межклеточная химическая сигнализация 245**
- 13.1. Три стратегии химической сигнализации: локальные химические медиаторы, гормоны и нейромедиаторы 245
- 13.1.1. Главным регулятором эндокринной системы служит гипоталамус 246
- 13.1.2. Разные клетки по-разному реагируют на один и тот же химический сигнал 247
- 13.1.3. Реакция клетки на химический сигнал в одних случаях может быть быстрой и непродолжительной, а в других – медленной и долговременной 251
- 13.1.4. Сигнальные молекулы могут быть водорастворимыми или жирорастворимыми 251
- 13.1.5. Локальные химические медиаторы после их секреции быстро разрушаются 252
- 13.1.6. Некоторые сигнальные молекулы, выделяемые нервными окончаниями, вероятно, действуют не как нейромедиаторы, а как локальные химические медиаторы 253
- 13.1.7. Некоторые гормоны и локальные химические медиаторы служат специфическими факторами роста 255
Заключение 255
- 13.2. Сигнализация с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов 257
- 13.2.1. Комплексы стероидных гормонов с рецепторами присоединяются к хроматину и регулируют транскрипцию специфических генов 257
- 13.2.2. Стероидные гормоны часто вызывают и первичный, и вторичный ответ 259
- 13.2.3. Стероидные гормоны регулируют активность разных генов в разных клетках-мишенях 259
Заключение 260

- 13.3. Сигнализирующая с участием рецепторов клеточной поверхности и вторых посредников—циклического АМР и ионов кальция 261
- 13.3.1. Использование меченых лигандов открыло новые пути в изучении поверхностных рецепторов 261
- 13.3.2. Белковые гормоны и факторы роста поглощаются клеткой путем эндоцитоза при участии рецепторов 261
- 13.3.3. Поверхностные рецепторы передают воздействие лиганда, регулируя активность ферментов и ионных каналов в плазматической мембране 262
- 13.3.4. Циклический АМР—вездесущий внутриклеточный медиатор 264
- 13.3.5. Рецептор и аденилатциклаза—это отдельные белки, которые функционально взаимодействуют в плазматической мембране 264
- 13.3.6. Рецепторы активируют молекулы аденилатциклазы не прямо, а через GTP-связывающий белок 266
- 13.3.7. Ион Ca^{2+} тоже служит вездесущим внутриклеточным медиатором 268
- 13.3.8. При активации некоторых рецепторов клеточной поверхности открываются кальциевые каналы плазматической мембраны 269
Заключение 270
- 13.4. Механизмы действия сАМР и ионов Ca^{2+} как вторых посредников 271
- 13.4.1. Циклический АМР активирует внутриклеточные протеинкиназы 271
- 13.4.2. Циклический АМР регулирует также дефосфорилирование клеточных белков 273
- 13.4.3. Киназа фосфолипазы служит примером фермента, лишь на короткое время активируемого внеклеточным химическим сигналом 273
- 13.4.4. Путем обратимой ковалентной модификации белков регулируются многие клеточные процессы 275
- 13.4.5. Ионы Ca^{2+} изменяют конформацию внутриклеточных Са-связывающих белков 275
- 13.4.6. Служит ли циклический GMP внутриклеточным вторым посредником? 277
- 13.4.7. Использование вторых посредников и ферментных каскадов невероятно усиливает внеклеточные сигналы 277
- 13.4.8. Концентрация какого-либо вещества может быстро изменяться лишь в том случае, если оно все время подвергается быстрому разрушению или удалению 278
- 13.4.9. Клетки могут отвечать на сигнал постепенными или резкими изменениями 279
Заключение 281
- 13.5. Адаптация клеток-мишеней 281
- 13.5.1. Некоторые клетки десенсибилизируются в результате эндоцитоза поверхностных рецепторов 282
- 13.5.2. Продолжительная связь с лигандом обратимо инактивирует некоторые поверхностные рецепторы 282
- 13.5.3. Десенсибилизация клетки-мишени, вызываемая морфином, не обусловлена инактивацией рецепторов 283
- 13.5.4. Химическая сигнализация у одноклеточных организмов—полная экспериментальная модель 284
- 13.5.5. Хемотаксис бактерий—примитивная разновидность «разумного» поведения 285
- 13.5.6. Изучение мутантов показало, что в хемотаксисе бактерий участвуют четыре группы белков 286
- 13.5.7. Адаптация обусловлена метилированием белков 288
- 13.5.8. Модель бактериального хемотаксиса 289
Заключение 290
Литература 291

МОНОГРАФИЯ

Брюс Албертс.
Денис Брай,
Джулиан Льюис
Мартин Рэфф,
Кейт Робертс,
Джеймс Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ
КЛЕТКИ
Том 3

Спец. научн. редактор канд. биол. наук П. Л. Иванов. Ст. научн. редактор Ю. И. Лашкевич. Мл. научн. редактор Р. Ф. Кулякова. Художник Е. И. Волков. Художественный редактор Л. М. Кузнецова. Технический редактор М. А. Страшнова. Корректор Н. В. Андреева.

Слабо в набор 19.11.85. Подписано к печати 08.12.86. Формат 84 × 108¹/₁₆. Бумага офсетная № 1. Гарнитура таймс. Печать офсетная. Объем 9,25 бум. л. Усл. печ. л. 31,08. Уч.-изд. л. 35,23. Изд. № 4/4396. Тираж 13 500 экз. Зак. 1206. Цена 2 р. 90 к

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Можайский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при Государственном комитете СССР по делам издательства, полиграфии и книжной торговли.
г. Можайск, ул. Мира, 93