

Б. ГУДВИН

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ КЛЕТОК И РАЗВИВАЮЩИХСЯ ОРГАНИЗМОВ

Перевод с английского

канд. физ.-мат. наук Ф. И. АТАУЛЛАХАНОВА

Под редакцией

д-ра физ.-мат. наук А. М. ЖАБОТИНСКОГО

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

МОСКВА 1979

В книге рассмотрены внутриклеточные биохимические процессы в ходе развития и дифференцировки. Изложены общие представления о регуляции обмена веществ, активности ферментов и генетических систем, данные об индукции и репрессии генов, митотических циклах в клетке прокариотов и эукариотов. Используя современные данные о динамике внутриклеточных процессов, автор пытается раскрыть механизмы, лежащие в основе временной и пространственной дифференцировки клеток.

Предназначена для биофизиков, биохимиков, эмбриологов, молекулярных биологов, а также для математиков и других специалистов, интересующихся вопросами развития организмов. Доступна студентам старших курсов и аспирантам.

Редакция литературы по биологии

2605070000

Г $\frac{21003-129}{041(01)-79}$ 129-79

© 1976 Academic Press Inc. (London) Ltd.
© Перевод на русский язык, «Мир», 1979

ПРЕДИСЛОВИЕ К РУССКОМУ ИЗДАНИЮ

Книга Б. Гудвина «Аналитическая физиология клеток и развивающихся организмов» — одна из струек в обширном потоке попыток создать теоретическую биологию. Пока такой области науки не существует — можно сказать, что биология еще ждет своего Ньютона. Биологическая «теория» в настоящее время уже развилась до способности задним числом удовлетворительно объяснять почти любой экспериментальный факт, однако до возможности предсказывать результаты нетривиальных экспериментов еще далеко. Более того, многие исследователи считают, что в силу специфики биологии создание в ней дисциплины, аналогичной теоретической физике, невозможно. Все же нам кажется, что в будущем удастся построить теоретическую биологию, использующую небольшое число основных принципов и строгий формальный аппарат для логического описания всей картины живого мира и для предсказания результатов ключевых экспериментов.

В своей книге Гудвин рассматривает вопросы устойчивости и самоорганизации в постепенно усложняющемся ряду, начиная от внутриклеточного метаболизма и кончая морфогенезом. Книга содержит интересный и представительный набор новых экспериментальных данных, которые автор всюду пытается трактовать с помощью формального аппарата. В большинстве случаев этим аппаратом является теория динамических систем, хотя время от времени используется теория конечных автоматов и статистическая механика.

В первой главе рассмотрен хорошо известный материал, изложенный на достаточно элементарном уровне. Основной задачей является ознакомление читателя с действием обратной связи в простой ферментативной цепи. Во второй главе рассматривается значительно более сложная система эпигенетического контроля. Автор показывает, что существует несколько уровней регуляции, причем низшие уровни охватывают простые подсистемы и имеют характерные времена порядка нескольких минут. Высшие уровни, связанные с синтезом новых макромолекул, охватывают большие системы, графически изображаемые сетями, с характерными временами порядка десятков минут или

нескольких часов. Здесь автору уже не удастся последовательно использовать формальный аппарат. Зато набор примеров, иллюстрирующих различные молекулярные механизмы, включенные в многоуровневую стабилизацию, весьма поучителен.

Если в первых двух главах рассматриваются только вопросы устойчивости, формально связанные с устойчивостью стационарных точек, то третья глава описывает значительно более сложное, хотя и стационарное поведение. Это клеточный цикл, связанный с метаболическими автоколебаниями. Следует отметить, что в этой главе процесс деления или предшествующее ему удвоение ДНК рассматриваются как существенная часть цикла автоколебаний. Тем самым клеточный цикл представлен как автономная автоколебательная система, не зависящая от так называемых биологических часов, описанных в следующей главе. Между тем существует подробно разработанная Сельковым [4] гипотеза о едином механизме клеточных часов, идущих как в покоящихся, так и в делящихся клетках, причем механизм этих автоколебаний не связан с синтезом нуклеиновых кислот. Эти часы периодически подают сигнал на деление клетки, которое происходит или не происходит в зависимости от других условий.

Проблема внутриклеточных ритмов интенсивно разрабатывается в последние 20 лет, однако окончательной четкой картины так и не создано. Кратко изложенные в книге опыты на таком замечательном объекте, как ацетабулярия, показывают, что в эукариотической клетке существует несколько отдельных, но взаимносинхронизованных автоколебательных систем. Раскрытие иерархической взаимосвязи различных внутриклеточных ритмов является интереснейшей задачей ближайшего будущего.

Анализ пространственных взаимодействий в биологических системах регуляции впервые появляется в третьей главе и в дальнейшем становится главной темой изложения, знакомя читателя с центральной проблемой современной биологии — морфогенезом. Автор рассматривает распределенные системы, где сочетание биохимических превращений с диффузией молекул приводит к появлению пространственно организованных концентрационных полей. Ход развития отдельных клеток определяется внеклеточной концентрацией эффекторных молекул, которая в свою очередь зависит от распределения различных типов клеток в пространстве. Так возникает пространственно-временная связь, обеспечивающая устойчивость структуры ткани. Рассматриваются как стационарные во времени градиенты морфогена (например, так называемая проблема трехцветного флага), так и периодические бегущие волны концентрации регуляторных веществ. Одной из лучших иллюстраций последнего типа поведения является морфогенез миксомицета *Dictyostelium discoideum*, где решающую роль играют периодические волны цАМФ.

Вообще же эта часть книги поднимает гораздо больше интересных вопросов, чем дает готовых ответов. Но таково состояние этой области биологии, и нам кажется, что книга Гудвина будет полезна тем, кто собирается активно в ней работать. В еще большей степени это замечание относится к последней главе. Здесь автор использует многочисленные аналогии и параллели, доказывая свой тезис, что живые системы могут быть определены прежде всего и главным образом как системы, использующие информацию для самосохранения.

Стремление составить необходимый и достаточный набор определений, выделяющих живые системы, с давних пор является отправной точкой всякого биологического теоретизирования. Стоит отметить, что ни физики, ни химики не испытывают столь настоятельной нужды выделить объекты своей науки.

Охват столь широкой темы в небольшой книге неизбежно приводит к определенной субъективности в изложении, и книга Гудвина не является в этом смысле исключением. Мы хотели бы помочь читателю в какой-то степени преодолеть эту субъективность, предлагая список книг на русском языке, в которых более подробно рассматриваются многие из проблем, затронутых в этой монографии.

А. М. Жаботинский
Ф. И. Атауллаханов

ЛИТЕРАТУРА

1. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты, «Наука», М., 1978.
2. Ньюсхолм Э., Старк К. Регуляция метаболизма, «Мир», М., 1977.
3. Жаботинский А. М. Концентрационные автоколебания, «Наука», М., 1974.
4. Иваицкий Г. Р., Кринский В. М., Сельков Е. Е. Математическая биофизика клетки, «Наука», М., 1978.
5. Романовский Ю. М., Степанова Н. В., Чернаяский Д. Е., Математическое моделирование в биофизике, «Наука», М., 1975.
6. Уоддингтон К. Морфогенез и генетика, «Мир», М., 1964.
7. Белоусов Л. В. Проблема эмбрионального формообразования, Изд-во Московского университета, М., 1971.
8. Бодемер Ч. Современная эмбриология, «Мир», М., 1971.

Но человеку должно устремляться
за те пределы, что ему доступны,
Иначе для чего же небеса?
Р. Браунинг, «Андреа дель Сарто»

ПРЕДИСЛОВИЕ АВТОРА

В этой книге я попытался построить картину физиологических свойств клеток и развивающихся организмов, основанную на представлениях молекулярной биологии с одной стороны, и математического моделирования — с другой. Использование термина «аналитическая физиология» базируется на этой двойственной основе, т. е. анализ понимается как в его экспериментальном смысле, так и в математическом, которые взаимно дополняют друг друга.

В первых трех главах книги свойства клеток описываются в терминах теории управления, где гомеостаз и адаптация рассматриваются главным образом как проявление процессов с положительными и отрицательными обратными связями, а стабильность живых систем понимается скорее в информационном, чем в энергетическом смысле. Эти представления возникли в 50-е годы, и их развитие привело к «золотому веку» теории управления и кибернетики в биологии, но сейчас они быстро превращаются в нечто новое, еще не получившее названия. Возможно, это расцвет собственно биологического подхода, в котором преобладающая роль принадлежит понятиям структуры, формы и трансформации, а не концепциям чисто динамической стабильности. По-видимому, этот путь развития наиболее соответствует духу биологии — науки, в которой морфология всегда имела первостепенное значение. Применение аналитического подхода к изучению организации живых систем обусловило появление в последние десятилетия тенденции принижать роль сравнительной анатомии и описательной эмбриологии. Эта тенденция была неотъемлемой частью развития молекулярной биологии. Эффективность аналитического подхода производит глубокое впечатление; это одно из наиболее замечательных достижений за всю историю биологии.

Однако представления об организме, которые мы получаем с помощью молекулярной биологии и теории управления, не дают полной картины, и по мере изложения материала это ста-

новится все более очевидным. Пока речь идет о чисто гомеостатических и адаптивных свойствах клеток, можно практически не касаться структуры и морфологии, но даже в этом случае скоро становится ясно, что размеры и форма должны приниматься во внимание хотя бы минимально. При изучении же стабильности тканей и явлений регенерации и морфогенеза вопрос о формообразовании становится основным, а динамические аспекты физиологии оказываются связанными с процессами, распределенными и организованными в пространстве. Начиная с гл. 4, рассмотрению таких пространственно-временных отношений уделяется все больше внимания. Динамические модели процессов развития, рассмотренные в гл. 5 и 6, все еще основываются на постулатах молекулярной биологии, но в этих моделях начинают учитываться диффузия и распространение волн как важные упорядочивающие пространство процессы. За последнее время достигнут значительный прогресс в понимании механизмов морфогенеза, и в ближайшие годы мы, конечно, станем свидетелями коренного изменения существующих сейчас представлений. Пока еще преобладающие в этой области модели, характеризующиеся относительно статичной организацией, уступят место гибким динамическим пространственно-временным моделям процессов. Некоторые свойства таких моделей я пытаюсь предсказать в этих главах.

Стремясь объединить идеи, развиваемые на протяжении всей книги, и омыслить пределы их применимости и связь с другими областями исследований, близкими, на мой взгляд, по своей природе к биологии развития, я рассмотрел в последней главе подход к изучению поведения организмов, в котором делается попытка объединить феноменологическую позицию с аналитической в духе современного структурализма. При этом организм рассматривается как познающая система, адаптирующаяся и развивающаяся с учетом информации, которую она получает о себе и своем окружении. Динамические формы поведения организма представлены как проявления кооперативной, или коллективной, активности узнающих единиц, а развитие понимается как упорядоченное разворачивание этих форм в пределах структурно стабильной системы, использующей информацию.

Основной мотив книги — рассмотрение концептуального (включая экспериментальный) и математического анализа в постоянной взаимообогащающей связи, хотя они и могут быть разделены согласно вкусам читателя. В отличие от предыдущей книги, в которой мое внимание было поглощено поисками формального описания физиологических процессов внутри клеток, материал, представленный в этой книге, в основном биологический, с привлечением ряда математических приемов, используемых для более подробного анализа некоторых особенностей

поведения клеток и развивающихся систем. Моя научная деятельность начиналась в роли биолога-экспериментатора в области физиологии. Позднее я был отвлечен от этого направления формальной красотой математики и изяществом статистической термодинамики, и мне кажется, что преобладание в этой книге экспериментальных проблем отражает в какой-то мере возвращение к моим первоначальным интересам.

Что же касается структуры книги, то материал организован иерархически, как и подобает биологическому анализу. За кратким описанием представлений о свойствах устойчивости биохимических сетей, предшествовавших идеям теории управления, следует рассмотрение метаболической и макромолекулярной регуляции, клеточного цикла, биологических часов, принципов управления клеточной популяцией и морфогенеза в одноклеточных и многоклеточных организмах. Большая часть этого материала входит в различные курсы, прочитанные рядом поколений студентов университета в Сассексе; я благодарен моим слушателям за исправления и взаимные обсуждения, которые позволили внести ясность в целый ряд проблем. Представленный круг вопросов не является всеобъемлющим: отбор определяется моими личными интересами, т. е. сугубо индивидуален. Всюду, где это было уместно, я стремился выразить мою признательность, но более всего я благодарен людям, которым обязан своими знаниями. Особенно безгранична моя благодарность покойному профессору К. Уоддингтону, которому и посвящена эта книга. Именно его вера в актуальность теоретического анализа и математического моделирования в биологии дала мне благоприятную возможность заниматься исследованиями вне тех идейных горизонтов, которыми я ограничен в экспериментальной работе. Благодаря усилиям Уоддингтона был организован ряд конференций на вилле Сербеллони на озере Комо, которые представляли собой необычный опыт обсуждения вопросов, находящихся на стыке различных дисциплин, и привели к появлению на свет книг «На пути к теоретической биологии». «На пути» в этом заглавии было созвучно мысли Уоддингтона, которая всегда стремилась проникнуть по ту сторону общепринятых представлений и приводила к постоянному «заигрыванию» с еретическими идеями. Однако эта игра с еретическим огнем основывалась на глубоком понимании детального устройства и функционирования живых организмов. Это как раз такой тип равновесия между знанием и предвидением, к которому я стремлюсь, и все, чего мне удалось достичь в этом отношении и что нашло отражение в этой книге, обусловлено в значительной мере влиянием, которое прямо или косвенно оказал на меня К. Уоддингтон. Мне хотелось бы также поблагодарить совет по научным исследованиям Великобритании, чья щедрость в финан-

сировании исследовательской группы аналитической биологии в Сассексе дала возможность привлечь к работе лиц с разносторонней научной подготовкой и творческим подходом к исследованию проблем, относящихся к области биологического анализа такого типа, как описанный в этой книге. Я многим обязан и моим друзьям и коллегам по университету, особенно д-рам Дж. Даумену, Д. Уэбстеру и К. Оутли.

Последняя глава книги основана на идеях, развитием которых я занимался в течение года, свободного от лекций, в Национальном университете Мексики. Совместная работа, выполняемая там физиками и биологами, имела для меня огромнейшую ценность, и я очень благодарен д-рам М. Беррондо, Д. Кохо, О. Новаро, Р. Перес-Паскуале, Р. Перес-Тамайо и Г. Виниэгра-Гонзалесу за многочисленные обсуждения. Руководителям отделов теоретической физики и биомедицинских исследований, д-рам М. Мошински и Дж. Мора, я обязан за гостеприимство и помощь; Королевскому обществу я благодарен за предоставление средств из фонда Ливерхулма, что дало мне возможность посетить Мексику в качестве приглашенного профессора. И, наконец, я особенно благодарен Истаккихуатлю и Попокатепетлю, хотя скорее всего им это и безразлично. Из своего окна в Торре де Сьенснас я нередко любовался их спокойным величием и красотой, и они служили для меня источником вдохновения.

Б. Гудвин

«Сад ветвящихся троп — не совершенный, но и не ложный образ мира, как его представлял себе Цзю Пень. В отличие от Ньютона и Шопенгауэра Ваш предок не верил в единое абсолютное время. Он верил в бесконечный ряд времен, в развивающуюся ошеломляющую сеть расходящихся, сходящихся и параллельных времен. Эта сеть времен, которые сближались друг с другом, разветвлялись, обрывались или ничего не знали друг о друге в течение столетий, охватывает все возможности времени. В большинстве из этих времен мы не существуем; в некоторых живете Вы, но не я, в иных — я, но не Вы, в иных — мы оба. В нынешнем времени, которое благоприятная судьба подарила мне, Вы пришли в мой дом; в другом, проходя по саду, Вы нашли меня мертвым; я произношу эти же слова, но я — всего лишь плод воображения, призрак».

Хорхе Луис Борхес, «Лабиринты»

УСТОЙЧИВОСТЬ И РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Метаболическая сеть

История вопроса начинается в годы, непосредственно предшествующие времени всеобщего распространения теории управления, т. е. до начала 50-х годов. В это время наиболее существенные черты клеточного метаболизма представлялись весьма туманно. Биохимии понадобилось тридцать лет для того, чтобы стала вырисовываться ясная картина, описывающая взаимосвязанные пути превращения метаболитов в живых организмах, где каждая реакция катализируется специальным ферментом. Стало очевидным, что в каждой клетке должны существовать сотни различных ферментов. В связи с этим было высказано мнение, что метаболическое состояние любой клетки строго определяется типами и количеством этих органических катализаторов, а также концентрациями предшественников или питательных веществ, имеющихся в клетке. Полезная, но несколько неточная картина этих разветвленных взаимосвязанных метаболических путей дана на рис. 1.1. Это просто кинетическое описание схемы метаболических путей с некоторыми введенными мною упрощениями.

Можно представить себе такую схему для сотни различных метаболитов S_i с соответствующими константами скоростей прямых и обратных реакций. Эти константы определяются концентрациями ферментов, поэтому первое допущение, используемое в рамках такой метаболической схемы, состоит в том, что концентрации ферментов не изменяются. При поисках аналитических выражений, описывающих коллективное поведение концентраций промежуточных продуктов метаболизма, в первую очередь встает вопрос о времени, в течение которого допустимо полагать концентрации ферментов неизменными. Почти в течение столетия известно явление ферментативной адаптации, которое состоит в том, что культура микроорганизмов приспосабливается к новому источнику углерода (например, галактозе вместо глюкозы), вырабатывая в клетках новый фермент. Это говорит о том, что активности ферментов в клетках действительно изменяются, но у таких организмов, как бактерии или дрожжи, этот процесс требует от 20 мин до нескольких часов. Можно считать, что верхний предел временного интервала,

в течение которого ферментативные активности у таких организмов предположительно остаются постоянными, равен нескольким минутам. Так как нас интересуют изменения концентрации метаболитов (S_i), мы должны выбрать нижнюю границу временного интервала изменения этих переменных. Ее мы можем оценить из числа оборотов ферментов (среднее число молекул субстрата, которое молекула фермента может превратить в продукт в одну секунду). Эта величина лежит в пределах 10^2 — 10^5 ; чаще всего ее значение равно $\sim 10^3$, поэтому для измеримого

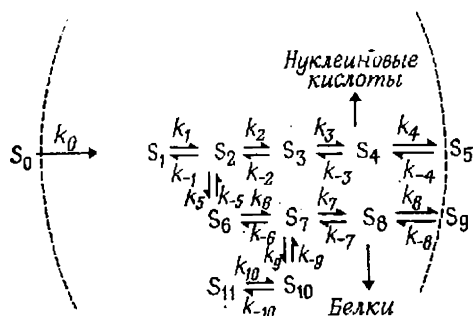


Рис. 1.1. Линейная схема разветвленных реакций, описывающая метаболическую систему клетки. Пунктирные линии — это клеточные мембраны; S_0 , S_6 и S_9 — субстраты, подаваемые извне; S_8 и S_4 — предшественники в синтезе белков и нуклеиновых кислот соответственно.

сдвига концентрации некоторого метаболита, например глюкозо-1,6-дифосфата или аспартата, потребовалось бы по крайней мере несколько секунд. Таким образом, в рамках метаболической схемы типа представленной на рис. 1.1 мы рассматриваем только процессы, протекающие в интервал времени от секунд до минут. Это соответствует характерным временам эксперимента, используемым в энзимологии и при исследовании метаболических процессов.

Наш подход можно сделать более аналитичным, если использовать некоторую дополнительную информацию. Для этого необходимо знать, какова ожидаемая концентрация метаболита в клетке, а ее сравнительно просто оценить из констант Михаэлиса для ферментов. Константа Михаэлиса дает значение концентрации субстрата, при которой скорость ферментативной реакции равна половине максимальной. Можно ожидать, что эта концентрация соответствует эффективному уровню метаболита в живой системе, где работает фермент. Конечно, это всего лишь оценка, так как свойства очищенного фермента *in vitro* почти наверняка отличаются от его свойств *in vivo*, но только оценка нам пока и нужна. Типичная константа Михаэлиса — 10^{-3} М, поэтому

будем считать эту величину средним значением переменной S_1 . Далее, нам нужна оценка концентраций ферментов в клетках. Разумеется, она сильно варьирует для различных ферментов, но среднее ее значение — $\sim 10^{-8}$ М. Используя среднее число оборотов фермента, равное 10^3 (молекул в секунду), мы получим, что скорость изменения концентрации субстрата, обусловленная ферментом, составляет $10^{-8} \text{ М} \times 10^3 \text{ с}^{-1} = 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$. Рассмотрим теперь уравнение для одной из стадий цепи реакций, изображенных на рис. 1.1, например уравнение для превращения S_1 :

$$\frac{dS_1}{dt} = k_0 S_0 + k_{-1} S_2 - k_1 S_1. \quad (1.1)$$

Мы считаем, что S_0 является константой, соответствующей концентрации некоторого исходного субстрата, например глюкозы. Положим, что S_2 также является константой — законное допущение, если слегка отклонить систему от стационарного состояния, изменив S_1 (скажем, инъекцией), и затем наблюдать лишь начальные стадии возвращения к состоянию равновесия. В этом случае мы можем разрешить уравнение относительно S_1 . Записав $a = k_0 S_0 + k_{-1} S_2$ и считая a константой, мы получаем уравнение

$$\frac{dS_1}{dt} = a - k_1 S_1, \quad (1.2)$$

решением которого будет

$$S_1 = \frac{a}{k_1} + b e^{-k_1 t}, \quad (1.3)$$

где b определяется из начальных условий. Если эксперимент заключается в возмущении S_1 , которое вызывает кратковременное отклонение S_1 вверх от его стационарного значения, равного $\frac{a}{k_1}$, то величина этого отклонения равна b . Используя наши предварительные оценки величины $S_1 = 10^{-3}$ М и скорости изменения концентрации субстрата $k_1 S_1 = 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{с}^{-1}$, находим, что $k_1 = 10^{-2} \text{ с}^{-1}$. Можно задать теперь более определенный вопрос: сколько времени потребуется, чтобы начальное отклонение уменьшилось в e раз от своего исходного значения? Очевидно, это время определяется значением t , при котором $k_1 t = 1$, т. е. $t = \frac{1}{k_1} = 10^2 \text{ с}$, или около 2 мин. Это есть время релаксации системы, описываемой уравнением (1.2). Таким образом, мы получили более точный ответ на вопрос о характерном времени метаболических экспериментов и теперь можем использовать это время для определения того, что такое метаболическая система: это такой набор взаимосвязанных переменных, подверженных каталитическому действию ферментов, или, более обобщенно,

превращениям, опосредованным белком, который значительно меняется за времена, слишком малые для существенных изменений в концентрациях макромолекул. Если мы хотим получить динамическое представление о функционировании такой сложной системы, какой является клетка, необходимо использовать аналитические подходы, которые давали бы возможность изучать систему во времени. Традиционные биологические дисциплины в действительности определились именно исходя из этих критериев, стремясь правильно отразить то, что, как мы предполагаем, является организационными принципами самой живой системы. Все вышесказанное является временным аспектом иерархической организации, которая всегда рассматривалась как основа биологической упорядоченности. Мы увидим, как эта динамическая иерархия раскрывается в ходе нашего анализа, помогая нам понять поведение системы при адаптации и развитии.

Устойчивость и закон действующих масс в метаболической системе

Уравнение (1.3) содержит экспоненциальный член с отрицательным показателем. Это показывает, что стационарное состояние кинетической системы, описываемой уравнением (1.2), устойчиво к возмущению. Ответ системы изображен на рис. 1.2. Такое поведение является результатом фундаментального предположения о характере кинетических реакций, воплощенного в законе действующих масс: скорость реакции пропорциональна концентрации реагентов; этот закон и приводит к появлению члена $-k_1 S_1$ в уравнении (1.2). Таким образом, чем больше субстрата S_1 , тем быстрее он превращается в свой продукт. Это справедливо для всех стадий цепи реакций, изображенной на рис. 1.1, т. е. можно предположить, что сеть такого рода устойчива к возмущению любой ее переменной или даже к возмущению любого набора переменных. Справедливость этого положения была показана Хироном (Heagon, 1952), а причиной устойчивости является именно закон действующих масс.

Рассмотрим теперь следствия второго предположения, использованного при представлении промежуточного метаболизма в виде схемы рис. 1.1, где каждая реакция рассматривается как реакция первого порядка относительно своих субстратов. Мы знаем, что многие реакции бимолекулярны: например, в реакцию получения карбамоиласпарагиновой кислоты, катализируемую аспартаткарбамоилтрансферазой, вовлечены оба соединения — аспарагиновая кислота и карбамоилфосфат. Предположение о том, что *in vivo* такие реакции могут быть квазилинейными, так как один субстрат присутствует в фактически насыщающих концентрациях, по-видимому, несостоятельно. Поэтому

уравнения типа (1.1), которые мы используем для описания кинетики, будут в общем случае включать произведения концентраций двух или более переменных вместо того, чтобы быть линейными. Результат Хирона был получен для линейных систем, для которых существует единственное стационарное решение. Для метаболической системы общего вида с квадратичными членами и членами более высокого порядка в кинетических уравнениях никаких твердых выводов подобного рода

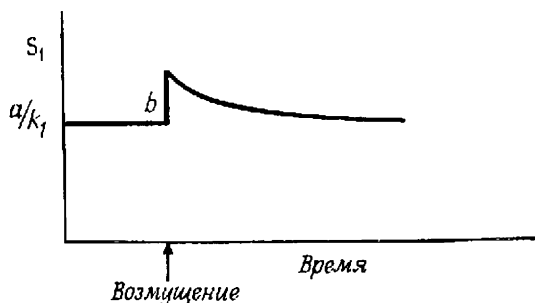


Рис. 1.2. Ответ промежуточного продукта S_1 на малое возмущение амплитуды b .

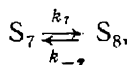
сделать нельзя, потому что просто невозможно получить общие решения и проверить устойчивость различных стационарных состояний. В случае таких нелинейных систем мы немедленно сталкиваемся с серьезными математическими трудностями. Существуют, однако, некоторые соображения общего аналитического характера, которые указывают, что нелинейные сети все же будут иметь локально устойчивые стационарные состояния. Пример такого рода приведен Ньюменом (Newman, 1972); представляет интерес и более ранняя литература по этому поводу (Kacser, 1957; Denbigh, 1948), но при рассмотрении общего случая она недоказательна. Современное исследование качественных типов неустойчивости, которые наблюдаются в химических системах второго и третьего порядка, проведено в интересной статье Тайсона и Лайта (Tyson, Light, 1973). В работе наглядно показано, что для таких систем характерны только очень ограниченные формы поведения, кроме известных асимптотически устойчивых состояний рассматриваемого нами типа (пример такого ответа показан на рис. 1.2). Можно сказать, что, несмотря на отдельные, пусть даже значительные успехи, проблема анализа сложных нелинейных систем и сейчас остается почти такой же трудной, какой она была в начале 50-х годов, и хорошо, что понимание организации метаболических процессов в клетках зависело не от теоретического анализа, а от

эксперимента. В начале 50-х годов были получены некоторые данные о свойствах метаболических мутантов бактерий, которые в корне меняли схему, изображенную на рис. 1.1, возвещая эру кибернетики в клеточной физиологии.

Ингибирование по типу обратной связи в метаболических системах

Рассмотрим, как могла бы вести себя система, изображенная на рис. 1.1, в отсутствие и в присутствии экзогенного источника некоторого метаболита, например S_9 . Предположим, что S_9 — это аминокислота, а наша система — бактерия, скажем *Escherichia coli*. Если аминокислота присутствует в культуральной среде, то она будет транспортироваться через бактериальную мембрану и поступать во внутренний пул аминокислот, обозначенный S_8 , доступный для активации и включения в белок. Так как метаболические реакции термодинамически обратимы (константы скорости для прямой и обратной реакций не равны нулю), аминокислота может превращаться в S_7 , S_6 и т. д. Единственным результатом присутствия S_9 в системе является сдвиг стационарного состояния. Все переменные будут по-прежнему присутствовать в системе, но значения стационарных концентраций будут выше тех, которые были в отсутствие S_9 .

После открытия Ледербергом в 1946 г. пола у бактерий для изучения метаболизма бактерий стали доступны генетические методы анализа и начался период интенсивных и чрезвычайно плодотворных исследований в этой области. К 1955 г. было обнаружено, что у мутантных штаммов бактерий с внутренним блокированием цепи биосинтеза, обусловленным присутствием дефектного фермента, накапливались промежуточные продукты стадий метаболизма, предшествующих блоку (Roberts et al., 1955). Например, если бы мутантным был фермент, катализирующий реакцию



так что $k_7 = k_{-7} = 0$, то мы бы увидели, что предшественники S_6 и S_7 присутствуют в относительно больших количествах. Бактерии, конечно, не способны расти в отсутствие экзогенных аминокислот. Это хорошо согласуется с нашей схемой, если только предположить, что реакция от S_2 к S_6 является экзергонической (выделяющей свободную энергию), так что равновесие сдвинуто в сторону накопления промежуточных продуктов, приводящих к образованию S_8 , конечного продукта цепи. Однако затем было показано, что если конечный продукт подается извне, то предшественники исчезают, а бактерии приобретают способность к

росту (Novick, Szilard, 1954). Это расходится с нашей схемой, так как при $k_7 = k_{-7} = 0$ присутствие или отсутствие S_8 в клетках не должно было бы сказываться на S_6 и S_7 . Было решено, что конечный продукт обладает специфическим действием на фермент, катализирующий первую стадию — реакцию превращения S_2 в S_6 .

Прямое подтверждение это получило в 1956 г., когда Умбаргер показал, что треониндезаминаза, первый фермент из пяти в метаболической цепи от треонина к изолейцину, сильно и специфически ингибируется L-изолейцином, конечным продуктом цепи. Он назвал это явление ингибированием конечным продуктом. В этом же году Йейтс и Парди (Yates, Pardee, 1956) сообщили о специфическом ингибировании цитидинтрифосфатом аспартаткарбамоилтрансферазы, первого фермента в цепи реакций от аспартата к пиримидинам. Интересно отметить, что прямые реакции в обоих этих примерах энергозависимы, что делает их физиологически необратимыми (т. е. существенно необратимыми при физиологических временных масштабах и условиях). Выведение конечного продукта из метаболического пути происходит либо с помощью включения его в макромолекулы (белок или нуклеиновую кислоту для соответствующих ферментов), либо за счет деградации, что дает, следовательно, односторонний поток вдоль пути биосинтеза. Именно это свойство односторонности обеспечивает возможность управления скоростью потока одним ферментом. Экзергоничность первой стадии делает ее термодинамически эффективным местом управления. К тому же заключению приводит логика метаболизма, так как если имеется другой источник конечного продукта (например, питательная среда), то не потребуется ни одного из интермедиатов этого пути метаболизма, поскольку они нужны только для производства конечного продукта. Благодаря обнаружению организмов, которые, по нашим представлениям, ведут себя и логично, и эффективно, мы можем считать, что поняли по крайней мере один из их существенных принципов организации. Интересно, к чему ведет невыполнение этого принципа. Рассмотрим, что случилось бы, если бы, например, лактатдегидрогеназа (ЛДГ) ингибировалась лактатом, продуктом восстановления пирувата в реакции с НАД·Н. Эта реакция физиологически обратима, что дает возможность при некоторых условиях (таких, как сильная мышечная активность) накапливать лактат, а затем, когда позволят условия, окислять его. Поскольку для лактата не существует другого пути превращения, кроме как через пируват, то ингибирование лактатом ЛДГ привело бы к образованию пула «пойманного» продукта и к значительным физиологическим расстройствам. Таким образом, мы видим, что для существования физиологически обратимых стадий имеются

веские причины и что обратимость несовместима с управлением, обеспечивающим наличие клапанов в однонаправленных путях.

Имеются, конечно, метаболические пути, в которых поток может течь в любом из двух направлений в согласии с физиологическими потребностями. Классическим примером такой системы является гликолиз—глюконеогенез. Можно было бы предположить, что в этом случае никакой регуляции не происходит и что закон действующих масс задает скорость общего потока просто в соответствии с концентрацией метаболитов на любом конце пути. При этом система работала бы неким присущим ей, довольно инертным способом, но ясно, что это было бы очень неэффективно. Вот почему некоторые из стадий, например, гликолиза по необходимости экзергонические [в частности, катализируемое фосфофруктокиназой фосфорилирование фруктозо-6-фосфата (Ф6Ф) с помощью АТФ с образованием фруктозо-1,6-дифосфата (ФДФ)]. Обращение этой реакции только с помощью закона действующих масс потребовало бы накопления очень большого количества ФДФ, что нарушило бы рН и осмотическое давление внутри клетки, а также привело бы к концентрированию большей части энергии в одном компоненте системы. Поэтому требуется другая стратегия, лишенная этих недостатков; она состоит в превращении ФДФ по другому пути. Клетки для этого используют другой путь от ФДФ до Ф6Ф, на котором происходит гидролиз, и, таким образом, данная стадия снова является экзергонической. Катализирует превращение фермент фосфатаза. Таким образом, представляется, что потеря свободной энергии при гидролизе ФДФ, высвобождающем неорганический фосфат вместо АТФ, как это обычно имеет место в другой реакции, является платой за то, чтобы достигнуть эффективной обратимости этой стадии в последовательности реакций. Ферменты фосфофруктокиназа и фосфатаза в этом случае становятся потенциальными участками метаболического управления с помощью такого процесса, как ингибирование конечным продуктом, и позже мы в этом убедимся. Таким образом, регуляция может происходить и в обратимой последовательности метаболических стадий, но она осуществляется согласно тем же принципам, что и регуляция необратимой или неразветвленной систем, таких, как рассмотренные выше пути биосинтеза, включающие треониндеаминазу или аспартаткарбамоилтрансферазу.

Аллостерические свойства ферментов

Сразу после открытия ингибирования конечным продуктом стало ясно, что в основе функционирования ферментов должен лежать существенно новый принцип. Ингибирование ферментативной активности конкурентными ингибиторами было известно

давно и изучалось в течение многих лет; оба явления были достаточно хорошо поняты. Классическим случаем конкурентного ингибирования является действие на сукцинатдегидрогеназную активность малоновой кислоты, стерически подобной янтарной кислоте (рис. 1.3). Кинетическая схема взаимодействия фер-

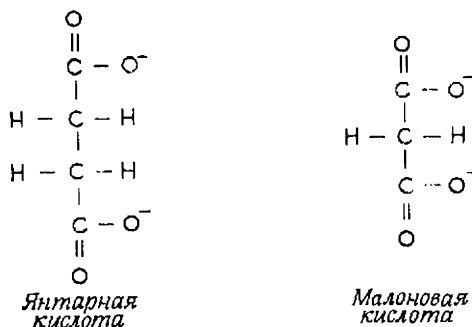
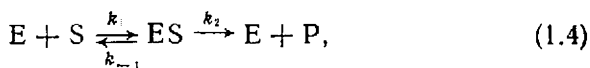


Рис. 1.3. Янтарная и малоновая кислоты стерически очень похожи и поэтому конкурируют за активный центр сукцинатдегидрогеназы.

мента E и его субстрата S и конкурентного ингибитора I следующая. E соединяется с S , давая промежуточный комплекс ES , который затем превращается в $E + P$ (фермент плюс продукт), т. е.



где мы рассматриваем только начальные стадии реакции, когда количество P еще недостаточно велико, чтобы была заметна обратная реакция образования ES . Кроме того, фермент соединяется с ингибитором, давая неактивную форму по схеме



Согласно этим реакциям, мы можем записать следующие кинетические уравнения:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (1.6)$$

и

$$\frac{d[EI]}{dt} = k_3[E][I] - k_{-3}[EI]. \quad (1.7)$$

Имеется также закон сохранения:

$$[E]_0 = [E] + [ES] + [EI], \quad (1.8)$$

где $[E]_0$ — общее количество фермента, первоначально добавленного в реакцию. В стационарных условиях справедливы уравнения

$$\frac{d[ES]}{dt} = \frac{d[EI]}{dt} = 0.$$

Из трех уравнений — (1.6), (1.7) и (1.8) — можно найти $[ES]$ как функцию S и I . Из (1.6) мы получаем

$$[ES] = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2} [E][S] = K_1 [E][S], \text{ где } K_1 = \frac{k_1}{k_{-1} + k_2},$$

а из (1.7) находим

$$[EI] = \frac{k_3 [E][I]}{k_{-3}} = K_2 [E][I], \text{ где } K_2 = \frac{k_3}{k_{-3}}.$$

Подставив отсюда $[E]$ и $[EI]$ в уравнение (1.8), мы имеем

$$[E]_0 = \frac{[ES]}{K_1 [S]} + [ES] + K_2 [E][I] = \frac{[ES]}{K_1 [S]} + [ES] + \frac{K_2 [ES][I]}{K_1 [S]},$$

откуда

$$[ES] = \frac{[E]_0}{1/K_1 [S] + 1 + K_2 [I]/K_1 [S]} = \frac{K_1 [E]_0 [S]}{1 + K_1 [S] + K_2 [I]}.$$

Поскольку скорость реакции $V = k_2 [ES]$, получаем, что

$$V = \frac{k_2 K_1 [E]_0 [S]}{1 + K_1 [S] + K_2 [I]}. \quad (1.9)$$

Предполагая, что субстрат присутствует в избытке, так что его концентрация на начальных стадиях реакции заметно не меняется, мы можем считать S константой и записать соотношение между V и $[I]$ в виде

$$V = \frac{a}{b + K_2 [I]}, \quad (1.10)$$

где $a = k_2 K_1 [E]_0 S$, а $b = 1 + K_1 [S]$. Из этого простого выражения сразу видно, как влияют различные концентрации конкурентного ингибитора, например малоновой кислоты, на начальную скорость окислительной реакции, катализируемой сукцинатдегидрогеназой, согласно модели, характеризующейся уравнениями (1.6) — (1.8). График этой зависимости представлен на рис. 1.4. Это перевернутое изображение хорошо известного соотношения Михаэлиса — Ментен между концентрацией субстрата и скоростью ферментативной реакции, которое можно получить из выражения (1.9), положив $K_2 = 0$; график этой зависимости приведен на рис. 1.5. Обе кривые при $I \rightarrow \infty$ или $S \rightarrow \infty$ соответственно стремятся к своему предельному значению, что характерно для явлений типа поверхностной адсорбции или связывания лиганда, лежащих, как считается, в основе

макромолекулярного катализа. Неконкурентные ингибиторы, например тяжелые металлы или хелаты, действуют на функции фермента неспецифическим образом. Их кинетические эффекты по существу подобны эффектам, описанным для конкурентных ингибиторов, не требуют введения новых принципов функционирования ферментов и дают зависимость между скоростью ферментативной реакции и концентрацией ингибитора того же типа, что и представленная на рис. 1.4.

Ингибирование конечным продуктом, однако, выявляет новый принцип в функционировании ферментов, потому что реакция ингибитора с ферментом является специфической (например, ингибировать аспартаткарбамоилтрансферазу будут только ЦТФ и близкие стерические аналоги), но стерически этот ингибитор совершенно не похож на субстрат фермента. Это ясно из сравнения приведенных на рис. 1.6 структурных формул субстрата и ингибитора аспартаткарбамоилтрансферазы (АКТ), действующего по принципу ингибирования конечным продуктом. Новое свойство ферментов, лежащее в основе их способности узнавать два или более специфических стерических класса

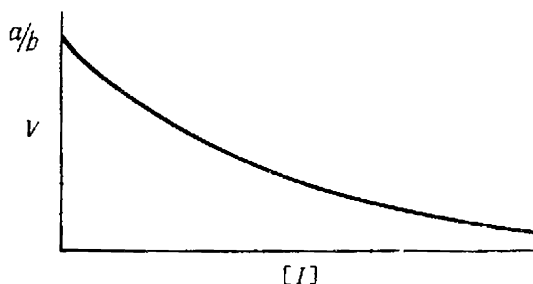


Рис. 1.4. Скорость реакции V , катализируемой ферментом, как функция концентрации неконкурентного ингибитора I .

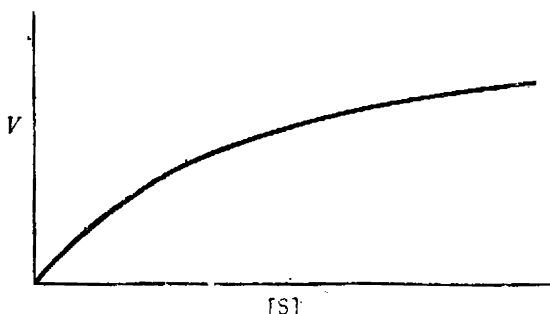


Рис. 1.5. Скорость реакции V , катализируемой ферментом, как функция концентрации субстрата S , согласно схеме Михаэлиса — Ментен.

метаболитов, по очевидным этимологическим причинам было названо Моно и Жакобом (Monod, Jacob, 1961) аллостерическим. Произошло это незадолго до того, как интенсивные исследования данного свойства показали, что ферменты — намного более сложная система, чем предполагалось ранее; это заставило полностью пересмотреть кинетику Михаэлиса — Ментен и стимулировало создание новых моделей функционирования ферментов.

Экспериментальные исследования, лежащие в основе этих достижений, начинались с выделения и очистки аллостерических

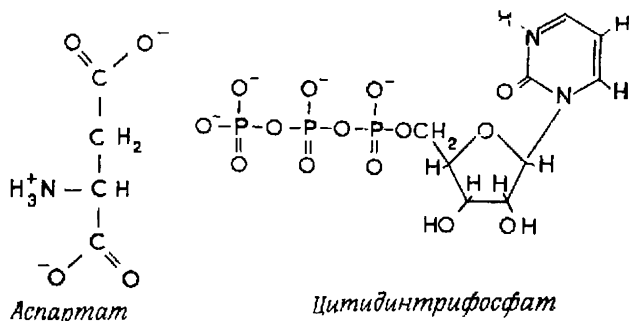


Рис. 1.6. Аспартат, один из субстратов аспартаткарбамоилтрансферазы, структурно совершенно не похож на ингибитор цитидинтрифосфат, действующий по типу ингибирования конечным продуктом.

ферментов из *E. coli* и изучения их кинетических свойств. Герхарт и Парди (Gerhardt, Pardee, 1963) исследовали таким способом аспартаткарбамоилтрансферазу, а Шанжэ (Changeux, 1963) — треониндезаминазу. Эти работы выявили, что реакции с участием очищенных нативных ферментов не следуют классической кинетике Михаэлиса — Ментен. На рис. 1.7 представлена зависимость скорости реакции, катализируемой АКТ, от концентрации аспартата (средняя кривая); треониндезаминаза качественно ведет себя подобным образом. Вместо кривой, являющейся частью гиперболы (рис. 1.5), мы имеем кривую с точкой перегиба. Наличие такой, как ее называют, сигмоидной кривой всегда говорит о том, что кинетика данного фермента сложнее кинетики системы, которую можно представить какой-либо моделью с единственным каталитическим центром. Другие свойства, обнаруженные у аллостерических ферментов, оказались еще более необычными и потребовали разработки совершенно новой кинетической теории. Герхартом и Шахманом (Gerhardt, Schachman, 1965) было показано, что различные воздействия на АКТ, сопровождающиеся разрывом водородных связей (например, прогревание при 62°C в течение 10 мин с последующим

быстрым охлаждением во льду, инкубация с мочевиной, гуанидином или *n*-хлормеркурибензоатом), приводят к тому, что фермент кинетически начинает вести себя в соответствии со схемой Михаэлиса — Ментен (рис. 1.7, верхняя кривая). Потеря сигмоидности, по-видимому, обусловлена диссоциацией фермента на субъединицы — предположение, подтвержденное выделением каталитических субъединиц из раствора обработанного фермента. Следствием этой диссоциации является потеря чувстви-

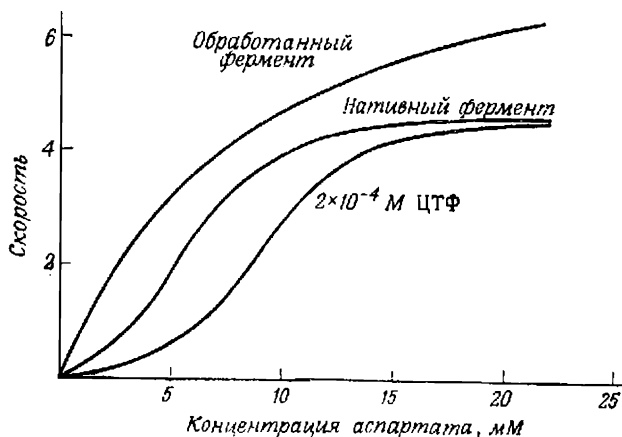


Рис. 1.7. Скорость реакции, катализируемой аспартаткарбамоилтрансферазой, как функция концентрации аспартата при различных условиях, описанных в тексте.

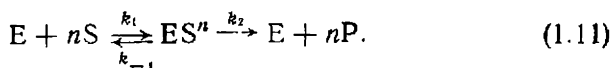
тельности фермента к ЦТФ, ингибитору, действующему по принципу ингибирования конечным продуктом. В присутствии 10^{-4} М ЦТФ нативный фермент ведет себя в соответствии с нижней кривой рис. 1.7. Он имеет ту же кинетику, что и нативный фермент в отсутствие ЦТФ, но концентрация субстрата, необходимая для получения скорости, равной половине максимальной и обозначенной $[S]_{0.5}$, возрастает от 6 до 10 тМ, что дает степень ингибирования. После диссоциации фермента каталитические субъединицы больше не реагируют с ЦТФ.

Фракционирование субъединиц фермента и кристаллографические исследования показали, что структура фермента достаточно сложна. Оказалось, что регуляторная субъединица состоит из двух полипептидных цепей (Rosenbusch, Weber, 1971), а в каталитической субъединице имеется три цепи (Nelbach et al., 1972). Колбергом, Пайджетом и Шахманом (Cohlberg, Piget, Schackman, 1972) была предложена логичная структурная модель нативного фермента, согласно которой каталитические

полипептиды организованы в две системы тримеров с симметрией равностороннего треугольника, а регуляторные полипептиды расположены попарно вокруг каталитических субъединиц, образуя второй, больший равносторонний треугольник. Целостность этой структуры зависит от присутствия некоторых переходных элементов, из которых главную роль играет цинк. Таким образом, мы видим, что нативный фермент — сложная система, высоко организованный макромолекулярный ансамбль со специфическими узнающими центрами для различных молекул, расположенными на разных субъединицах. Поведение целого несомненно отличается от поведения его составляющих, что при попытке объяснить кинетику нативного фермента приводит к постулату о взаимодействии между отдельными частями. Существенной частью процесса является узнавание на молекулярном уровне, с помощью которого центры или специфические группы в макромолекуле взаимодействуют с отдельными метаболитами или лигандами, причем свойства этих центров изменяются при связывании других лигандов с другими центрами той же макромолекулы. Взаимодействия между различными частями одной и той же молекулы обычно интерпретируются как конформационные изменения. Это служит удобным геометрическим представлением того, что, вообще говоря, является перераспределением энергии в макромолекуле.

Кооперативная ферментативная кинетика

Рассмотрим сначала, как объясняется сигмоидный характер кинетики АКТ. Мы знаем, что нативный фермент имеет шесть центров связывания аспарагиновой кислоты, поэтому разумно продолжить видоизменения классической ферментативной схемы, просто увеличивая стехиометрию реакции фермента с субстратом. В общем случае для стехиометрии порядка n мы можем записать



Это приводит к дифференциальному уравнению

$$\frac{d[ES^n]}{dt} = k_1[E][S]^n - (k_{-1} + k_2)[ES^n].$$

В стационарных условиях

$$[E] = \left(\frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \right) \frac{[ES^n]}{[S]^n} = \frac{[ES^n]}{K[S]^n},$$

где

$$K = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}.$$

Используя условие

$$[E]_0 = [E] + [ES^n],$$

получаем

$$[E]_0 = \frac{[ES^n]}{K[S]^n} + [ES^n],$$

откуда

$$[ES^n] = \frac{[E]_0 K [S]^n}{1 + K [S]^n}.$$

Тогда из уравнения (1.11) получим, что

$$V = \frac{dP}{dt} = nk_2 [ES^n] = \frac{nk_2 [E]_0 K [S]^n}{1 + K [S]^n}. \quad (1.12)$$

Очевидно, что при $n = 1$ мы будем иметь уравнение Михаэлиса — Ментен, которое получается из соотношения (1.9), если положить $K_2 = 0$. Какова форма кривой при $n > 1$? Простейший способ выявить качественные особенности V как функции $[S]$ — это найти точки максимумов и минимумов и все точки перегиба. Для этого найдем первую и вторую производные. Положим $k_2[E]_0K = a$, где a — константа, и опустим квадратные скобки в обозначениях концентраций. Тогда

$$\frac{dV}{dS} = \frac{n^2 a S^{n-1} (1 + KS^n) - n^2 a S^n K S^{n-1}}{(1 + KS^n)^2} = \frac{n^2 a S^{n-1}}{(1 + KS^n)^2}. \quad (1.13)$$

Значения S , которые обращают это выражение в 0 и определяют минимум и максимум функции, равны соответственно 0 и ∞ ; при остальных S в этом интервале первая производная положительна. Этим выражение (1.12) отличается от уравнения Михаэлиса — Ментен, для которого, как это видно из рис. 1.5, при $S = 0$ наклон максимален. Наличие у функции единственного максимума и минимума означает, что между ними обязательно имеется точка перегиба. Чтобы найти ее, продифференцируем (1.13):

$$\begin{aligned} \frac{d^2V}{dS^2} &= \frac{n^2(n-1)aS^{n-2}(1+KS^n)^2 - 2n^3aS^{n-1}K(1+KS^n)S^{n-1}}{(1+KS^n)^4} = \\ &= \frac{n^2(n-1)aS^{n-2}(1+KS^n) - 2n^3aKS^{2n-2}}{(1+KS^n)^3} = \\ &= \frac{n^2aS^{n-2}[(n-1)(1+KS^n) - 2nKS^n]}{(1+KS^n)^3}. \end{aligned}$$

Это выражение обращается в 0 при значениях S , равных корням уравнения

$$(n-1)(1+KS^n) - 2nKS^n = 0,$$

или

$$(n-1) - (n+1)KS^n = 0,$$

откуда

$$KS^n = \frac{n-1}{n+1}. \quad (1.14)$$

Ясно, что у этого уравнения имеется только один положительный корень, а следовательно, и одна точка перегиба у функции (1.12) для $S > 0$. Из (1.12) видно, что скорость, равная половине максимальной, достигается при $KS^n = 1$, в то время как из (1.14) следует, что точка перегиба всегда достигается при меньшем значении концентрации субстрата, приближаясь к $(S)_{0.5}$ только в пределе, когда $n \rightarrow \infty$. Для $n = 6$ (значение n для АКТ) точка перегиба имеет место при $KS^n = \frac{5}{7}$. Теперь мы можем качественно построить график функции (1.12) (рис. 1.8).

Другой важный вопрос, который необходимо выяснить, — это влияние различных значений стехиометрического показателя n

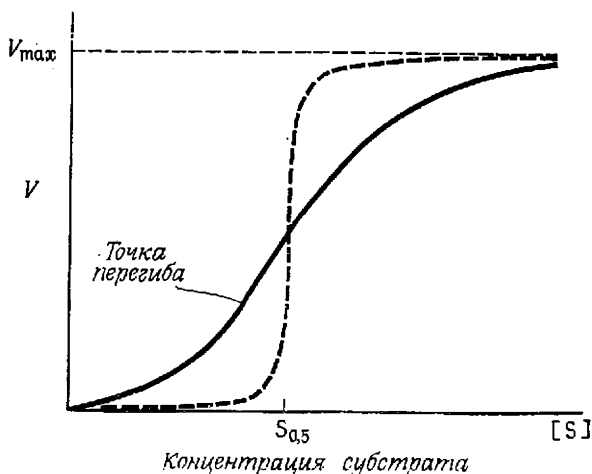


Рис. 1.8. Зависимость V от $[S]$, описываемая уравнением (1.12), при $n > 1$. Сплошная кривая соответствует малым значениям n , а пунктирная — большим.

на максимальный наклон кривой, который имеет место в точке перегиба. Чтобы определить эту зависимость, подставим (1.14) в (1.13); в результате получим соотношение

$$\left. \frac{dV}{dS} \right|_{KS^n = (n-1)/(n+1)} = \frac{n^2 a [(n-1)/K(n+1)]^{(n-1)/n}}{[1 + (n-1)/(n+1)]^2}.$$

Очевидно, что при $n \rightarrow \infty$ это выражение также стремится к бесконечности; следовательно, для очень больших n кривая в точке перегиба приближается к вертикали. Такая зависимость

изображена на рис. 1.8 (пунктирная кривая). Фермент, характеризующийся поведением такого типа, действовал бы как своего рода метаболический выключатель; до тех пор пока концентрация субстрата не приблизится к $[S]_{0.5}$, его активность была бы практически равна нулю, а затем быстро возрастала бы до максимального значения в очень узкой области концентрации субстрата. На первый взгляд существование таких ферментов кажется невероятным, но уже сейчас показано, что ряд ферментов имеет стехиометрию, равную 8, что дает значение $KS^n = \frac{7}{9}$; это близко к значению, характерному для переключения.

Вернемся теперь к допущениям нашей модели и посмотрим, можем ли мы узнать, во-первых, почему простое изменение стехиометрии в модели Михаэлиса — Ментен приводит к таким значительным последствиям, и во-вторых, применима ли эта модель для многомерных ферментов (ферментов, состоящих из субъединиц). При описании сигмоидной кинетики также используется понятие кооперативности. Связано это с тем, что вплоть до точки перегиба малые последовательные приращения концентрации субстрата все больше и больше влияют на скорость реакции, т. е. связь между переменными нелинейна, с положительной второй производной. Кажется, что эти последовательные приращения вызывают такое кооперативное взаимодействие в ферменте, что дальнейшее образование комплекса облегчается, и поэтому скорость реакции возрастает. На первый взгляд мы просто взяли в этом случае $n > 1$, не делая никаких предположений относительно взаимодействия между субъединицами. Однако в действительности, записывая реакцию в виде (1.11), мы сделали очень сильное допущение, а именно: мы предположили, что образование комплекса ES^n может произойти только в случае, если одновременно столкнутся n молекул субстрата с n каталитическими центрами молекулы. С ростом концентрации такая n -молекулярная реакция постепенно становится все более вероятной, и это происходит до тех пор, пока не начнет сказываться насыщение и вторая производная не станет отрицательной. Такое поведение названо случаем бесконечной кооперативности, так как в этой модели субъединицы либо реагируют с субстратом все одновременно, либо не реагируют вовсе.

Прежде чем а priori решать вопрос о возможной применимости модели, давайте посмотрим, какие результаты были получены при сопоставлении этой модели с экспериментальными данными. Хотя исследования сигмоидной кинетики ферментов начались сравнительно недавно, основные черты модели, описываемой уравнением (1.11), были использованы Э. Хиллом еще в 1913 г. в его классических исследованиях оксигенации

гемоглобина. Запишем уравнение (1.11) в применении к гемоглобину. Е заменим на Hb, а S будем рассматривать как концентрацию молекулярного кислорода и положим $k_2 = 0$ (потому что при обратимом связывании и высвобождении кислорода гемоглобином не происходит химической реакции); тогда мы получим соотношение

$$[\text{HbS}^n] = \frac{[\text{Hb}]_0 K [\text{S}]^n}{1 + K [\text{S}]^n}.$$

В этой системе величиной, удобной для наблюдения, является та часть общего гемоглобина, которая оксигенирована:

$$N_s = \frac{[\text{HbS}^n]}{[\text{Hb}]_0} = \frac{K [\text{S}]^n}{1 + K [\text{S}]^n}. \quad (1.15)$$

Это уравнение, конечно, графически представляется такой же кривой, как и приведенная на рис. 1.8. Хилл показал, что для соответствия кривой экспериментальным данным необходимо взять $n = 2,7$. С точки зрения схемы реакции (1.11) это число не имеет смысла, так как оно означает, что с молекулой гемоглобина реагирует 2,7 молекул кислорода. Ясно, что его необходимо рассматривать как среднее, т. е. считать, что одни молекулы гемоглобина несут только одну молекулу кислорода, другие — четыре (максимум, поскольку в гемоглобине четыре гема на молекулу), но большинство — две или три. Этот факт отвергает модель, основанную на предположении, что n молекул (обязательно целое число) реагируют одновременно, образуя комплекс. На самом деле число занятых центров у разных молекул может быть различно, и это необходимо учесть в нашей модели. Но если субъединицы могут реагировать с лигандами независимо, то чем обусловлен сигмовидный характер кинетики, который указывает на то, что между субъединицами существует взаимодействие? Очевидно, для выхода из создавшегося положения необходимо построить модель, которая лежит где-то между схемой Михаэлиса, считающей, что единицы независимы (один центр, реагирующий за один раз, без какого-либо взаимодействия с другими), и схемой Хилла с бесконечной кооперативностью.

На этом этапе ферментативная кинетика несколько усложняется. Я опишу простейшую из моделей, предложенных для объяснения кооперативности и аллостерических эффектов, модель Моно, Уаймена и Шанжэ (Monod, Wyman, Changeux, 1965), да и в этом случае ограничусь лишь основами. Идею модели иллюстрирует схема рис. 1.9, изображающая частный случай фермента с четырьмя субъединицами, каждая из которых имеет один активный центр. Предполагается, что существует два конформационно различных состояния фермента: Р и Е, и фермент спонтанно переходит из одного состояния в другое с константами

скоростей l_1 и l_{-1} в соответствии со схемой рис. 1.9. С субстратом способен реагировать только фермент, находящийся в состоянии E, и в этом случае каждая субъединица может реагировать независимо, причем константы скоростей для этих реакций одинаковы. Моно и др. (Monod et al., 1965) допускали, что с субстратом реагируют обе формы фермента, P и E, но они обладают разным средством. Здесь для простоты принято, что средство для одной из форм равно нулю. В этом случае с точки зрения молекулы субстрата активные центры неразличимы, поэтому нельзя дискриминировать возможные комбинации занятости центров. Я показал только одну из возможных комбинаций для каждого комплекса ES_1 , ES_2 и ES_3 . Для получения кинетики

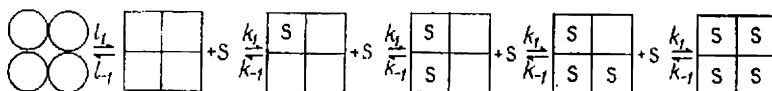
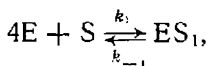


Рис. 1.9. Простейший вариант модели Моно — Уаймена — Шанжё, описывающий кооперативную кинетику фермента.

этой системы будем действовать поэтапно следующим образом. В рамках предположения о стационарности связь между концентрациями E и P есть просто

$$[E] = L[P], \text{ где } L = \frac{l_1}{l_{-1}}.$$

Зависимость между E и ES_1 должна учитывать концентрацию активных центров, доступных для реакции с S, которая равна $4[E]$. Поэтому мы имеем



откуда

$$[ES_1] = 4K[E][S], \quad (1.16)$$

где

$$K = \frac{k_1}{k_{-1}}.$$

На следующей стадии концентрация активных центров равна $3[ES_1]$, так как один центр уже занят, в то время как для обратной реакции, от ES_2 к ES_1 , концентрация занятых центров равна $2[ES_2]$. Поэтому

$$2[ES_2] = 3K[ES_1][S],$$

откуда

$$[ES_2] = \frac{3}{2}K[ES_1][S].$$

Подставляя сюда выражение для $[ES_1]$ (1.16), получаем

$$[ES_2] = \frac{3 \times 4}{2} K^2 [S]^2 [E] = 6K^2 [S]^2 [E]. \quad (1.17)$$

Аналогичным образом для связи между $[ES_2]$ и $[ES_3]$ имеем соотношение

$$3 [ES_3] = 2K [ES_2] [S],$$

откуда

$$[ES_3] = \frac{2}{3} K [S] [ES_2],$$

а подстановка $[ES_2]$ из уравнения (1.17) дает

$$[ES_3] = 4K^3 [S]^3 [E]. \quad (1.18)$$

Наконец, последняя пара комплексов дает нам

$$4 [ES_4] = K [ES_3] [S],$$

откуда

$$[ES_4] = \frac{K}{4} [ES_3] [S].$$

Используя уравнение (1.18), получаем

$$[ES_4] = K^4 [S]^4 [E]. \quad (1.19)$$

Теперь для описания состояния этой системы наиболее полезной функцией является отношение концентрации связанного субстрата к полной концентрации фермента. Это то же самое, что среднее число занятых центров на молекулу фермента; обозначим его через N_s . Полная концентрация связанного субстрата, согласно уравнениям (1.16)–(1.19), равна, очевидно,

$$\begin{aligned} [ES_1] + 2 [ES_2] + 3 [ES_3] + 4 [ES_4] &= \\ &= 4K [E] [S] (1 + 3K [S] + 3K^2 [S]^2 + K^3 [S]^3). \end{aligned}$$

Выражение в скобках — это $(1 + K [S])^3$, поэтому правая часть равенства есть

$$4K [E] [S] (1 + K [S])^3. \quad (1.20)$$

Полная концентрация фермента равна

$$\begin{aligned} [P] + [E] + [ES_1] + [ES_2] + [ES_3] + [ES_4] &= \\ = \frac{[E]}{L} + [E] + 4K [E] [S] + 6K^2 [E] [S]^2 + 4K^3 [E] [S]^3 + K^4 [E] [S]^4 &= \\ = \frac{[E]}{L} + [E] (1 + K [S])^4. \end{aligned} \quad (1.21)$$

Функция, которую мы хотим получить, есть отношение уравнений (1.20) и (1.21), что дает

$$N_s = \frac{4K [E] [S] (1 + K [S])^3}{[E]/L + [E] (1 + K [S])^4} = \frac{4K [S] (1 + K [S])^3}{1/L + (1 + K [S])^4}. \quad (1.22)$$

В общем случае n центров функции имеет вид

$$N_s = \frac{nK[S](1 + K[S])^{n-1}}{1/L + (1 + K[S])^n}. \quad (1.23)$$

Сравнивая его с уравнением Хилла (1.15), мы видим, что главное отличие состоит в появлении всех степеней концентрации субстрата между 0 и n , что соответствует одновременному наличию всех возможных комплексов фермента с субстратом.

Кроме того, в уравнении (1.23) имеется член $\frac{1}{L}$. Если $1/L = 0$ (т. е. $L_1 = 0$, или P на рис. 1.9 отсутствует), то уравнение (1.22) сводится к $N_s = 4K[S]/(1 + K[S])$, являющемуся просто уравнением Михаэлиса, в котором значение N_s на насыщении (при $[S] \rightarrow \infty$) равно 4. Таким образом, сигмоидность кинетики обусловлена присутствием члена $1/L$. Наличие у N_s точки перегиба можно показать тем же способом, что и использованный для анализа кинетики схемы, описываемой уравнением (1.12). Поскольку каждый активный центр реагирует с субстратом независимо, в чем же заключается кооперативность в этой схеме? Мы уже обращали внимание на член $1/L$ в (1.22), обуславливающий сигмоидную природу кривой, поэтому можно предположить, что к кооперативности приводят конформационные взаимодействия между P и E . Основное предположение этой модели состоит в том, что все субъединицы изменяют свое конформационное состояние одновременно. Если молекула субстрата прореагировала с каким-либо центром, образовав ES_1 , то этот комплекс не может вернуться к P кроме как через E . Поэтому на первой стадии реакции субстрата с E образуется молекула с тремя реакционными центрами, которые будут существовать до тех пор, пока S связан с одним из ее центров. Следующая стадия дает аналогичный, но меньший эффект, так как у ES_2 имеется только два центра. После этого начинается преобладать насыщение и кривая асимптотически приближается к своему верхнему пределу. Таким образом, мы видим, что источником кооперативности в этой модели является существование альтернативных конформационных конфигураций P и E вместе со стабилизирующим действием S на каталитически активную форму молекулы.

Этим исчерпывается все, что имеет отношение к сигмоидной кинетике в этой модели. Как же быть с аллостерическими эффектами? Предполагается, что они возникают за счет изменения константы равновесия L . Если она уменьшается (например, уменьшается l_1), то функциональная зависимость (1.22) при увеличении S будет расти медленнее. Это аналогично ингибированию по типу обратной связи, представленному на рис. 1.7. Тогда механизм действия ингибитора может быть основан на

стабилизации состояния Р, происходящей при связывании ингибитора аллостерическими центрами, которые имеются в данной конформации. Такие центры нужно было бы включить в модель и тогда рассматривать ингибиторы с тех же позиций, что и субстраты, как это и сделано в статье Моно и др. (Monod et al., 1965). Аналогичным образом можно представить себе лиганды, стабилизирующие Е и увеличивающие таким образом *L*. В этом случае они являлись бы активаторами фермента, как АТФ по отношению к АКТ. Другим хорошо изученным примером такого типа является изоцитратдегидрогеназа, которая активируется АМФ (Atkinson et al., 1965).

В еще более общей модели аллостерического поведения белков субъединицы должны были бы изменять свою конформацию индивидуально, но все-таки взаимодействуя друг с другом так, чтобы вероятность конформационного перехода зависела от состояния других субъединиц в мультимере. Такое обобщение включает целый класс возможных моделей; ряд из них исследован Кошландом (Koshland, 1970). Соответствующие этим моделям алгебраические выражения более сложны, чем относительно простое уравнение (1.22), а при современном состоянии вопроса трудно экспериментально различить разные возможности. Несмотря на кажущуюся сложность, из простой геометрической схемы рис. 1.9 видно, что идейные основы наших представлений о поведении макромолекул относительно примитивны. Представленная теория ни в каком смысле не может считаться физической, так как она не располагает выражениями для энергий различных конформационных состояний. Это отражает трудность разработки сколько-нибудь удовлетворительной теории макромолекулярной упорядоченности, чему вряд ли стоит удивляться, если иметь в виду разнообразие и тонко сбалансированный характер поведения, на которое способны белки. Белки составляют молекулярные узнающие системы огромного разнообразия и совершенства, что дает им возможность играть роль тонких дискриминаторов, необходимых для регулирования течения метаболизма.

Цепи управления метаболизмом и их динамика

Введем здесь символические обозначения для представления процессов управления метаболизмом, которые будут полезными в построении иерархии уровней регуляции, характерной для интегрального поведения биологических систем. Как уже говорилось, схему рис. 1.1 нельзя приспособить для адекватного описания специфических регуляторных взаимодействий между ферментами и метаболитами. Я буду использовать для обозначения метаболитов квадраты, а для ферментов — кружки. Тогда

метаболическая последовательность с обратной связью от конечного продукта к первой реакции цепи будет иметь вид, представленный на рис. 1.10. Знак «—» рядом со стрелкой обратной связи обозначает ингибирующее действие конечного продукта на фермент. Из сравнения этого представления метаболического пути с тем, что дано на рис. 1.1, видно, что специфическая петля обратной связи создает частично автономный элемент управления внутри метаболической системы, которая, таким образом, становится разделенной на физиологические регуляторные блоки; эти блоки обладают определенной независимостью. Очевидно, при разных условиях питания скорость-лимитирующим или контролирующим для всей системы становится то один, то другой блок, так что доминирующего блока не существует. Функциональные связи между этими блоками очень подвижны и изменчивы, но в целом устойчивы и отвечают требованиям физиологической адаптации на данном уровне клеточной организации. Такое «созвездие» взаимодействующих, частично автономных, но объединенных блоков с вполне определенными поведенческими шаблонами (суб-шаблонами целого) названо гетерархией в отличие от пирамидоподобной структуры — иерархии, которая имеет строго определенные доминантные связи между своими составными частями. Мы увидим, что и гетерархия и иерархия играют важную роль в физиологической организации и что преобладающий аспект поведения определяется при временном рассмотрении.

Установив, что метаболическая цепь типа изображенной на рис. 1.1 вообще говоря очень устойчива и ее переменные возвращаются к стационарным значениям в течение нескольких минут после возмущения, важно исследовать характеристики устойчивости системы, состоящей из многих взаимодействующих элементов типа представленных на рис. 1.10. Широко известно, что отрицательная обратная связь, в целом придающая системе устойчивость, может тем не менее приводить к непрерывным колебаниям переменных относительно некоторого среднего значения. Таким образом, открытие ингибирования по типу обратной связи значительно изменяет ожидаемую динамику метаболической системы, что за последние примерно 10 лет позволило получить некоторые очень интересные экспериментальные и теоретические данные о колебательном характере процессов клеточного метаболизма.

Существуют два главных динамических следствия введения отрицательной обратной связи в кинетические системы. Первое — это повышение устойчивости по сравнению с уровнем, обеспечиваемым законом действующих масс, который, конечно, продолжает действовать в любой метаболической системе; и второе, парадоксальное, — уменьшение стабильности из-за

возможности возникновения автономных колебаний. Однако эти колебания, называемые предельными циклами, сами по себе устойчивы. Поэтому в специфических цепях с управлением по принципу обратной связи действительно возникает свойство более высокого порядка — динамическая стабильность относительно предельных циклов, так что в дополнение к более привычной устойчивости в точке возникает устойчивая ритмичность.

Если система с отрицательной обратной связью устойчива в точке (устойчива относительно стационарного состояния), то обратная связь будет приводить к «ужесточению» противодействия

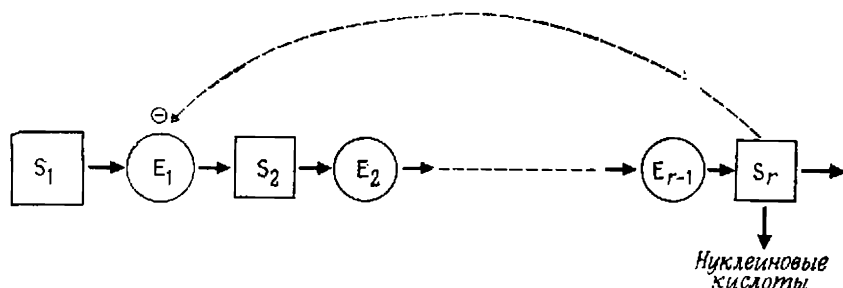


Рис. 1.10. Схема метаболического пути с ингибированием по типу обратной связи первого фермента пути, E_1 , конечным продуктом, S_r , являющимся предшественником в синтезе нуклеиновых кислот.

системы возмущению, так как имеет место активная реакция. Это наглядно видно из рис. 1.10. Предположим, что возмущение таково, что уменьшает S_r . Тогда по закону действующих масс уменьшится выход S_r из пула, но, кроме того, в результате уменьшения ингибирования E_1 возрастет скорость потока по цепи, что приведет к увеличению скорости образования S_2 из предшественника. Это прямое влияние метаболита на скорость существенно изменяет динамическую картину в случае, когда имеется обратная связь. При отрицательной обратной связи система активно реагирует на возмущения, но если этот активный ответ задерживается во времени, то могут возникнуть колебания. Итак, мы видим, что ситуация становится динамически несколько более сложной и в то же время с биологической точки зрения значительно более интересной.

Чтобы исследовать теоретические аспекты этого вопроса, сначала рассмотрим простую двухстадийную цепь управления, для которой $r = 3$ (рис. 1.10). Будем считать, что S_1 является постоянным источником субстрата для E_1 , и предположим, что E_2 реагирует с S_2 согласно схеме (1.11). С точки зрения устойчивости и колебаний важна только самая высокая степень концентрации реагентов, так что использование вместо формули-

ровки Хилла кинетически более адекватной схемы, приводящей к уравнению (1.23), мало что изменило бы в рассмотрении. Поэтому для описания ингибиторного взаимодействия S_3 с E_1 мы используем схему типа схемы Хилла:



Здесь m — стехиометрический коэффициент реакции образования неактивного комплекса $E_1S_3^m$. Тогда система дифференциальных уравнений для S_2 и S_3 будет иметь вид

$$\left. \begin{aligned} \frac{dS_2}{dt} &= \frac{a}{b + K_3 [S_3]^m} - \frac{c [S_2]^n}{1 + K_2 [S_2]^n} \\ \frac{dS_3}{dt} &= \frac{c [S_2]^n}{1 + K_2 [S_2]^n} - d [S_3] \end{aligned} \right\}, \quad (1.25)$$

где

$$\begin{aligned} a &= pk'_1 K_1 [E_1]_0 [S_1]^p, \\ b &= 1 + K_1 [S_1]^p. \end{aligned}$$

Обе эти величины постоянны, так как мы предполагаем, что S_1 — константа и реагирует с ферментом E_1 со стехиометрией p ; $c = nK_2 [E_2]$ и d — скорость удаления конечного продукта S_3 из пула. В общем случае система (1.25) будет иметь единственное положительное стационарное решение, которое получается, если положить $dS_2/dt = dS_3/dt = 0$, хотя может существовать несколько стационарных состояний. Вопрос об устойчивости может быть исследован путем линеаризации уравнений в окрестности стационарной точки, обозначенной $\{\bar{S}_2, \bar{S}_3\}$. Для этого вводят новые переменные, $U_2 = S_2 - \bar{S}_2$ и $U_3 = S_3 - \bar{S}_3$, затем разлагают нелинейные функции в ряд по переменным U_i , считая их малыми и ограничиваясь линейным приближением. В новых переменных система (1.25) имеет вид

$$\begin{aligned} \frac{dU_2}{dt} &= \frac{a}{b + K_3 (\bar{S}_3 + U_3)^m} - \frac{c (\bar{S}_2 + U_2)^n}{1 + K_2 (\bar{S}_2 + U_2)^n} = F_1(U_3) - F_2(U_2), \\ \frac{dU_3}{dt} &= \frac{c (\bar{S}_2 + U_2)^n}{1 + K_2 (\bar{S}_2 + U_2)^n} - d (\bar{S}_3 + U_3) = F_2(U_2) - d (\bar{S}_3 + U_3). \end{aligned} \quad (1.26)$$

Первые производные функций F_1 и F_2 равны

$$\begin{aligned} \left. \frac{dF_1}{dU_3} \right|_{U_3=0} &= \frac{-maK_3 (\bar{S}_3)^{m-1}}{[b + K_3 (\bar{S}_3)^m]^2} = -\alpha, \\ \left. \frac{dF_2}{dU_2} \right|_{U_2=0} &= \frac{nc (\bar{S}_2)^{n-1}}{[1 + K_2 (\bar{S}_2)^n]^2} = \beta. \end{aligned}$$

Тогда система (1.26) сведется к

$$\frac{dU_2}{dt} = F_1(O) - \alpha U_3 - F_2(O) - \beta U_2 = -\beta U_2 - \alpha U_3,$$

$$\frac{dU_3}{dt} = F_2(O) + \beta U_2 - d(\bar{S}_2 + U_3) = \beta U_2 - dU_3,$$

так как, согласно предположению о стационарности, $F_1(O) = F_2(O) = d\bar{S}_3$. Устойчивость этой системы линейных уравнений определяется корнями характеристического уравнения

$$\begin{vmatrix} -\beta - \lambda & -\alpha \\ \beta & -d - \lambda \end{vmatrix} = (\beta + \lambda)(d + \lambda) + \alpha\beta = \\ = \lambda^2 + (\beta + d)\lambda + \beta(\alpha + d) = 0.$$

Поскольку все константы положительны, это уравнение не может иметь корней с неотрицательными действительными частями. Таким образом, стационарная точка системы устойчива. Следовательно, отрицательная обратная связь не может изменить устойчивости двухстадийной последовательности реакций, однако для возникновения неустойчивости и предельного цикла достаточно ввести в последовательность реакций еще одну стадию, перед местом образования обратной связи. Как показал Уолтер (Walter, 1969), предельный цикл в этом случае возникает при $m > 8$. Детально проанализировав петли обратной связи Иейтса — Парди (по терминологии автора), он нашел точные условия, при которых такие цепи управления могут обладать колебательным поведением, зависящим как от числа стадий (величины r), так и от стехиометрии управляемой реакции (величины m). Для описания кинетики ферментов Уолтер использовал линейные выражения, гарантируя таким образом существование единственного положительного стационарного решения. Анализ связи между числом стадий в последовательности реакций и стехиометрией ингибирования по типу обратной связи, необходимой для появления неустойчивости, был проведен Виниэгра-Гонзалесом и Мартинесом (Viniégra-Gonzalez, Martinez, 1969), а в более строгой форме — в последнем интересном и очень ценном исследовании Раппа (Rapp, 1975).

Основываясь на проделанном ранее анализе времен релаксации, можно оценить периоды колебаний в петлях обратной связи (когда такие колебания имеют место) — они должны быть порядка минут. Эти оценки были получены из теоретических соображений (Goodwin, 1963) и на основании расчетов с помощью ЭВМ, выполненных при соответствующих значениях параметров. И лишь сравнительно недавно было показано, что гомогенные ферментативные реакции *in vitro* действительно могут обладать устойчивым колебательным режимом типа пред-

сказанного. Ямазаки и др. (Yamazaki et al., 1967) получили в открытой системе колебания с периодом около 5 мин, используя пероксидазу из хрена и лактопероксидазу в присутствии восстановителя и кислорода. Эта система с обратной связью была проанализирована Дегном и Майером (Degn, Mayer, 1969). Сейчас изучено множество таких систем, но, по-видимому, наиболее интересным представляется гликолитический осциллятор, о наличии которого в целых клетках сначала сообщили Дьюсенс и Амец (в 1957 г.) и который был позже

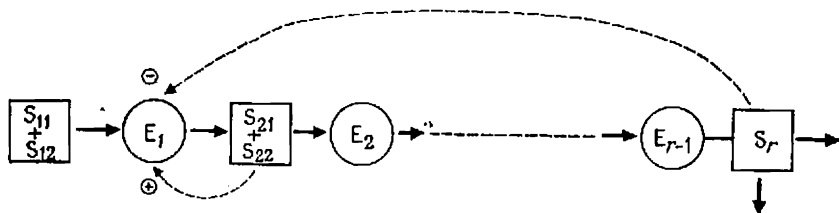


Рис. 1.11. Схема метаболического пути с петлями положительной и отрицательной обратной связи, описывающая гликолитическую цепь.

реконструирован *in vitro* и интенсивно изучался в лабораториях Б. Чанса в Филадельфии и Б. Хесса в Дортмунде (см. обзор Hess, Boiteux, 1971). В ответ на добавление соответствующего источника углерода в бесклеточных экстрактах дрожжей наблюдались колебания концентрации всех промежуточных продуктов гликолиза с периодом от 2 до 20 мин. Это сложная система, но детальный анализ показал, что одним из ферментов, в основном ответственным за колебательный режим, является фосфофруктокиназа (ФФК). Этот фермент — ключевой пункт регуляции в гликолизе, активируется продуктом, аденозинмонофосфатом, и ингибируется конечным продуктом гликолиза, АТФ. В принятых на рис. 1.10 обозначениях соответствующая часть гликолитической цепи для анализа колебательного режима может быть представлена так, как это сделано на рис. 1.11. Здесь S_{11} — фруктозо-6-фосфат; S_{12} — АТФ, выступающий в роли субстрата; E_1 — ФФК; S_{21} — фруктозо-1,6 дифосфат; S_{22} — АДФ (в равновесии с АМФ); E_2 — альдолаза, S_r — АТФ. Мы знаем, что, для того чтобы вызвать колебания при определенных условиях, достаточно введения петли отрицательной обратной связи. Однако ясно, что наличие петли положительной обратной связи будет увеличивать нестабильность такой системы, делая колебания более вероятными. Действительно, нетрудно показать, что если $r = 3$, так что петля отрицательной обратной связи замыкается после двух стадий, то в присутствии положительной обратной связи могут происходить колебания. Полная модель гликоли-

тической системы представлена в работе Хиггинса (Higgins, 1967). Наличие гликолиза во всех клетках наводит на мысль, что эта колебательная система играет какую-то важную физиологическую роль, однако выяснить этот вопрос пока не удастся. В одной из последующих глав мы рассмотрим возможную роль такого рода метаболического осциллятора в эмбриогенезе.

Другой очень интересный с физиологической точки зрения случай метаболических колебаний наблюдается в митохондриях, где вся органелла при вполне определенных условиях претерпевает периодические пространственные и биохимические изменения. В числе переменных, колеблющихся с периодами около 1 мин, находятся: объем, скорость ионного транспорта, интенсивность дыхания и окислительно-восстановительное состояние цитохрома *b*. Функциональная роль этих колебаний неизвестна.

Заключение

При переходе от представления метаболических сетей в виде схемы, изображенной на рис. 1.1, к набору взаимодействующих элементов, как это показано на рис. 1.10 и 1.11, выявились две особенности, достойные внимания, одна — упрощение и другая — усложнение. Упрощение состоит в идентификации частично автономных подсистем целой сети, образованных метаболическими последовательностями, которые приводят к отдельным конечным продуктам. Активность таких последовательностей, измеренная как скорость превращения включенных в цепь метаболитов, может регулироваться независимо от других частей полной системы уровнем конечного продукта, действующего по принципу отрицательной обратной связи на первый фермент. Такое разделение системы на составные части, которые могут независимо реагировать на возмущения, придает системе в целом адаптивную гибкость. Кроме того, это позволяет увеличить скорость ответа по сравнению с той, которая имеет место в полностью связанной сети типа рассмотренной вначале. В то же время здесь возникает дополнительное динамическое усложнение, потому что наличие петель обратной связи может приводить к непрерывным колебаниям концентраций метаболитов с периодами порядка минуты. Это, конечно, обеспечивает клетке богатый выбор динамических режимов, используемый ею при поисках наилучших адаптивных стратегий. С аналитической точки зрения здесь возникают трудности, так как мы не располагаем достаточным числом математических методов для адекватного анализа нелинейных систем типа тех, которые описываются соотношениями (1.25), не говоря уж о дополнитель-

ных сложностях, возникающих из-за возможного наличия петель положительной обратной связи и других взаимодействий. До тех пор пока мы уверены, что численные методы решения таких уравнений позволяют нам получить важные качественные и количественные представления о поведении систем (как это имело место в упоминавшейся работе Уолтера), можно надеяться на появление подходов, которые сделают более адекватным анализ всей нелинейной динамики. В последней главе я рассмотрю один такой многообещающий, на мой взгляд, подход.

УСТОЙЧИВОСТЬ И РЕГУЛЯЦИЯ
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ

Ферментативная адаптация

После исторических работ Пастера о процессе брожения и роли в нем микроорганизмов во Франции начались интенсивные исследования физиологии бактерий. Первое систематическое и всестороннее описание явления ферментативной адаптации можно найти в книге Дюкло, опубликованной в 1899 г. и озаглавленной «*Traité de Microbiologie*». Поэтому вполне понятно, что исследование этого аспекта клеточной физиологии привело в конце пятидесятых — начале шестидесятых годов к появлению одной из наиболее удачных теорий молекулярной биологии, созданной Ф. Жакобом, Дж. Моно и их коллегами именно в Институте Пастера в Париже.

Как мы отмечали в гл. 1, первое доказательство существования специфических управляющих процессов в бактериальном метаболизме появилось в результате исследований мутантных штаммов, — исследований, совмещающих в себе аналитическую мощь генетики и биохимии. Выяснение механизма бактериальной адаптации также обязано этим методам, примененным с большой изобретательностью и творческой фантазией исследователями из Института Пастера. Интересно отметить, что подробный обзор всех имеющихся к тому времени данных о ферментативной адаптации был опубликован Моно в 1947 г. — через год после выхода статьи Ледерберга и Татума (Lederberg, Tatum, 1946), которые сообщили об открытии половой рекомбинации у *Escherichia coli*. В этом обзоре Моно на основе имевшихся к тому времени данных о мутантных штаммах делал заключение о том, что «адаптивные возможности» клеток могут подвергаться как очень сильным, так и незначительным мутационным изменениям, которые влияют на отдельный фермент, совершенно не затрагивая «потенциальных свойств» других ферментов, находящихся в тех же цепях превращений. Он предположил, что «специфические свойства каждого фермента определяются *независимым* наследственным фактором». Далее он продолжает: «Однако следует помнить, что до тех пор, пока не будут применены прямые генетические тесты, эти данные останутся косвенными и неполными. Есть надежда, что блестящее открытие Ледерберга и Татума позволит создать такие тесты».

Лишь десятилетие спустя Жакобу и Моно удалось объяснить молекулярные механизмы, лежащие в основе генетических управляющих процессов в бактериях. Использование мутантов и рекомбинантов позволило получить убедительные доказательства существования свойств генетического аппарата, предвиденных Моно, и глубоко проникнуть в новый мир транскрипции, трансляции и молекулярных принципов регуляции у прокариотов.

Основные черты процесса адаптации устанавливаются очень легко. Если культура бактерии, например *Escherichia coli*, растущая на минимальной солевой среде, обеспечивается смешанным источником углерода, скажем глюкозой и лактозой, то первоначально имеет место экспоненциальный рост, а затем совершенно неожиданно рост прекращается (рис. 2.1). Это плато на кривой роста занимает примерно 50—60 мин, и затем рост возобновляется со скоростью, фактически равной первоначальной скорости роста.

Было показано, что во время второй фазы роста присутствует фермент, которого не было во время начальной фазы. Это β -галактозидаза; ее роль заключается в расщеплении β -галактозидной связи лактозы, что дает гексозы — глюкозу и галактозу. В действительности имеется еще два фермента, которые тоже появляются во время адаптационного периода: β -галактозидпермеаза и β -галактозидацетилаза; оба эти фермента обуславливают транспорт лактозы через клеточную мембрану в клетку, где она может быть катаболизирована. Очевидно, во время начальной фазы роста клетки потребляют исключительно глюкозу, так как лактоза не может проникнуть в клетку до тех пор, пока не будут синтезированы ферменты, необходимые для ее транспорта. Только после того, как запасы глюкозы будут исчерпаны, что легко показать экспериментально, клетки действительно начнут приспосабливаться к использованию лактозы, синтезируя три новых фермента. Эти факты ставят два основных вопроса, касающихся ферментативной адаптации: (1) какие молекулярные процессы вовлечены в индукцию новых ферментов в клетке при заданных изменениях окружающей среды и (2) почему, несмотря на наличие индуктора (лактозы), синтез этих ферментов не идет в присутствии глюкозы?

Как показано в предыдущей главе, непосредственно из времени адаптации следует, что мы имеем дело с более медленным процессом, чем изменение состояния метаболической системы. Уже одно это говорит о том, что вряд ли ферментативная адаптация состоит просто в активации исходно существующего фермента, присутствующего в клетках в неактивной форме, поскольку, согласно предыдущей главе, такие взаимодействия должны происходить в течение секунд или даже меньше.

Однако это необходимо было подтвердить независимо, например методами, аналогичными тем, которые описаны Спигельманом (Spiegelman, 1948), показавшим, что фракции супернатанта из прокипяченных экстрактов адаптированных дрожжей не могут активировать белковые экстракты из неадаптированных дрожжей, а также иммунологическими методами, описанными Коном и Торриани (Cohn, Torriani, 1952), которые показали, что в неадаптированных бактериях нет белка, который бы давал

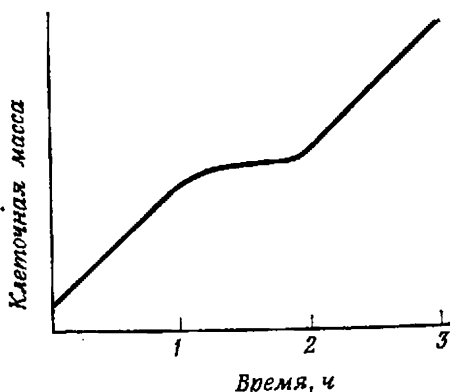


Рис. 2.1. Двухфазная кривая роста бактериальной культуры, развивающейся на смеси субстратов, глюкозы и лактозы, источников углерода. Во время первой экспоненциальной фазы роста потребляется только глюкоза, а во время второй — только лактоза. Во время промежуточной фазы, когда нет роста, происходит адаптация.

перекрестную реакцию с антителами к очищенной β -галактозидазе. Эти и другие исследования, например включение меченых аминокислот в β -галактозидазу в период индукции, позволили установить, что ферменты в ходе адаптации были синтезированы *de novo*. Но для того, чтобы быть уверенным, что отдельные клетки изменяли свое физиологическое состояние от неадаптированного к адаптированному, необходимо было исключить возможность того, что в популяции в ответ на изменение условий питания происходит генетическая селекция. В действительности эта возможность уже была исключена Моно (Monod, 1947), а кроме того, чтобы получить веские доводы в пользу первого объяснения и против гипотезы селекции мутантов, достаточно просто рассмотреть временной масштаб. Бактерии, растущие на минимальной солевой среде плюс источник углерода (глюкоза или лактоза), имеют время генерации около 50 мин — примерно такое же, как время, необходимое для ферментативной индукции. Таким образом, за это время может быть отобрано лишь одно поколение мутантной линии, и если

дальнейший рост культуры был обусловлен только мутантным штаммом, скорость роста не могла бы быть такой же, как до индукции. Мы используем здесь такой же подход, что и в предыдущей главе для идентификации метаболической системы с помощью рассмотрения времен метаболических превращений, которые ограничены снизу числами оборотов ферментов, а сверху — временами, необходимыми для изменения концентраций ферментов. Идентифицируем теперь следующую систему в иерархии, связанную с ферментативной адаптацией, ограничивая ее снизу метаболической системой, в которой имеют место такие явления, как ферментативная активация и ингибирование, а сверху — генетической селекцией, для осуществления которой необходимо несколько поколений. Ферментативная адаптация происходит в течение времени жизни одного поколения и поэтому не представляет собой генетического явления. Это явление эпигенетическое в том смысле, что оно состоит в изменении активности генов, а не основано на генных мутациях и селекции. Поэтому мы можем называть рассматриваемую нами систему эпигенетической системой клетки. Очевидно, время ее ответа лежит в интервале от нескольких минут до часа. Время ответа генетической системы должно определяться временем нескольких генераций и для микроорганизмов равно нескольким часам. Для организмов с более длительным временем генерации время ответа или характерные времена для различных систем будут соответственно другими. Мы увидим далее, что у более сложных организмов эпигенетические системы помимо индукции и репрессии генов включают многие другие процессы, но индукция и репрессия всегда остаются основной особенностью эпигенеза.

Индукция и репрессия генов

Тот факт, что три фермента, участвующие в метаболизме лактозы (β -галактозидаза, β -галактозидацетилаза и пермеаза), всегда присутствуют или отсутствуют вместе и в клетках дикого типа встречаются в одних и тех же пропорциях, наводит на мысль, что, какова бы ни была природа процесса управления, он всегда действует на три гена, кодирующие синтез трех ферментов, в той или иной степени единообразно или координированно. Вся система в целом называется *lac*-оперон. Это единица эпигенетического управления; этимология термина восходит к идее о единой системе, управляемой одним оператором. Как установлено выше, ключом к раскрытию механизма адаптации послужили генетические методы. Были найдены мутантные линии *E. coli*, которые непрерывно синтезировали β -галактозидазу и два других фермента независимо от присутствия

глюкозы или отсутствия лактозы. Такие клетки, потерявшие свойство индуцируемости лактозой, были названы конститутивными мутантами. Конъюгируя их с клетками дикого типа, можно было получать частичные диплоиды, гетерозиготные по индуцируемости, и исследовать их свойства. Было обнаружено, что исходные мутанты, имевшие конститутивный фенотип (всегда синтезирующие ферменты независимо от условий питания), распадаются на два класса, в одном из которых гетерозигота вела себя подобно клетке дикого типа, т. е. была индуцибельна, в то время как гетерозигота другого класса сохраняла конститутивный фенотип. Мутанты первого класса обозначили i^- , стремясь подчеркнуть, что свойство индуцибельности лактозой у них каким-то образом нарушено. Тогда гетерозигота (i^+ , i^-) имеет характеристики дикого типа, так как ген дикого типа (i^+) является доминантным.

Другой конститутивный тип был обозначен O^- , что указывает на наличие какого-то дефекта в рабочей части (operative part) системы управления. Этот дефект не исправляется введением в клетку, несущую O^- , гена дикого типа (O^+). Генетическое картирование показало, что эти два участка различны, но расположены в хромосоме *E. coli* на небольшом расстоянии друг от друга. Кроме того, было обнаружено, что ген O^+ на генетической карте находится очень близко к структурным генам трех ферментов, в то время как ген i^+ расположен несколько дальше от них (для него характерна более высокая частота рекомбинации).

Доминирование i^+ над i^- сразу наводит на мысль, что ген i^+ детерминирует синтез некой молекулы, которая диффундирует в клетке и исправляет недостаток в работе другой хромосомы. Ген O^+ на таких расстояниях никакого действия не оказывает. Действительно, было показано, что O^- влияет только на структурные гены в той же хромосоме, позволяя им производить три фермента, участвующие в катаболизме лактозы. Таким образом, O^- проявляет себя только в *цис*-положении. Если хромосома, несущая гены *lac*-оперона дикого типа, присутствует в клетке с мутацией O^- на другой хромосоме, то обе хромосомы ведут себя независимо. Такой частичный диплоид в отсутствие лактозы будет синтезировать ферменты *lac*-оперона с помощью мутантного оперона, а при индукции лактозой благодаря включению нормального *lac*-оперона будет производить и вторую порцию ферментов. Эти явления из-за ряда осложняющих обстоятельств, которые мы вскоре рассмотрим, не являются совершенно независимыми, но очень близки к таковым.

На основании рассмотренных данных Жакоб и Моно (Jacob, Monod, 1961) предложили изящную модель, которая хорошо объясняла эти данные, и сделали некоторые важные предска-

зания. Суть их представлений можно понять из рис. 2.2. Прямая на этом рисунке изображает часть бактериальной хромосомы с локусами, обозначенными i , O и x , y , z для трех структурных генов β -галактозидазы, ацетилазы и пермеазы соответственно. Пунктирная линия — клеточная мембрана, а отрицательный знак в кружочке означает ингибирование или репрессию. Ген i , называемый теперь регуляторным геном, кодирует мРНК, с которой транслируется белок-репрессор. Этот белок диффундирует

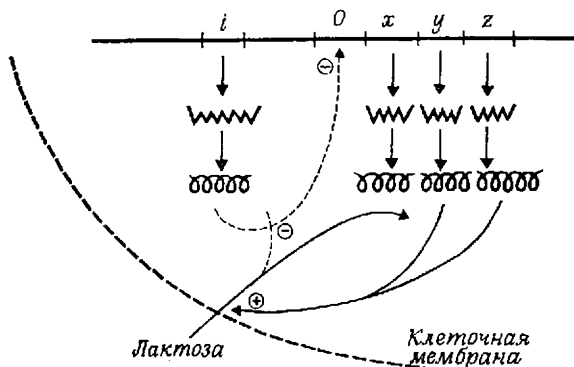


Рис. 2.2. Схема *lac*-оперона, согласно представлению Жакоба и Моно (Jacob, Monod, 1961). Подробности см. в тексте.

к локусу O — гену-оператору и, связываясь с ним, блокирует (репрессирует) транскрипцию мРНК на структурных генах x , y и z . Предполагается, что это происходит вследствие того, что он занимает участок инициации, с которого начинает работать РНК-полимераза. Лактоза инактивирует репрессор, соединяясь с ним по типу реакции связывания лиганда, рассмотренной в предыдущей главе; при этом изменяется трехмерная конфигурация репрессора, что делает его неспособным связываться с локусом O . Таким образом, согласно этой модели, индукция в действительности является *дерепрессией* — освобождением структурных генов от репрессии. Очевидно, нарушение в гене i , приводящее к образованию дефектного репрессора, который неспособен объединяться с O , даст конститутивный мутант, т. е. это дефект, который исправляется присутствием гена i^+ дикого типа в той же цитоплазме. Мутант O , с другой стороны, дает конститутивность, которая не может быть исправлена нормальным O -геном, что и объясняет эффект *цис*-положения.

Со времени появления этой модели регуляции убедительно показана адекватность ее основных свойств и добавлен ряд деталей, дополняющих картину. Так, удалось выделить

постулированный белок-репрессор (Gilbert, Müller-Hill, 1966), и его свойства оказались именно такими, как предсказывалось моделью. Было показано, что он является тетрамерным белком, состоящим из четырех идентичных субъединиц, каждая из которых способна связывать одну молекулу индуктора. Пока не ясно, сама ли лактоза взаимодействует с этим репрессором при нормальном протекании процесса индукции или инактивирующей молекулой является один из ранних продуктов катаболизма лактозы, такой, как алло-лактоза. Если было бы верно последнее (а в пользу этого имеются некоторые данные; Burgstein et al., 1965), то процесс индукции включил бы петлю положительной обратной связи: алло-лактоза, продукт β -галактозидазной активности, инактивирует репрессор и таким образом приводит к увеличению выхода β -галактозидазы. Но существует другая петля положительной обратной связи, которая привлекает наше внимание к интересной особенности этой модели. За транспорт лактозы в клетку ответственны два других фермента — β -галактозидпермеаза и β -галактозидацетилаза. Чем больше лактозы, тем больше ингибируется репрессор и тем больше будет выход транспортных ферментов. Такой процесс будет протекать с ускорением и остановится только тогда, когда весь репрессор инактивируется, а структурные гены будут работать на полную мощность, но гораздо более важным является вопрос о том, как этот процесс начинается. Некоторое количество транспортных ферментов должно быть в клеточной мембране просто затем, чтобы позволить лактозе войти внутрь клетки и начать индукцию. Как же запускается этот насос? Ответить на вопрос можно следующим образом: насос функционирует всегда, поскольку в системе управления существует утечка. Неиндуцированная популяция бактерий содержит в среднем 0,5 молекул β -галактозидазы на клетку. Эта величина характеризует фоновый ферментативный синтез, обусловленный «шумом» механизма управления: комплекс репрессор — оператор изредка диссоциирует вследствие эффектов теплового шума, что приводит к кратковременному синтезу мРНК. Очевидно, несовершенство является важной особенностью конструкции клетки.

Модель, представленная на рис. 2.2, — это по существу выключатель, действующий по принципу положительной обратной связи, который включается в присутствии лактозы и выключается (с некоторым шумом) в ее отсутствие. При обсуждении ферментативной адаптации мы видели, что в присутствии глюкозы *lac*-оперон выключается и индукция лактозой начинается только после того, как глюкоза удаляется из среды. Как можно объяснить этот «эффект глюкозы»? Встроим простую схему рис. 2.2 в сложную систему клеточного метаболизма и рассмот-

рим физиологическую роль, которую играет *lac*-оперон. Когда клетка снабжается глюкозой, то, выражаясь телеологически, *lac*-оперону нет необходимости функционировать. Он только добавил бы глюкозу к уже вполне обеспеченному ею гликолитическому пути, а производство ферментов *lac*-оперона только отвлекло бы нуклеотиды и аминокислоты на синтез ненужных молекул. Это подобно ситуации, описанной в предыдущей главе, когда клетки, обеспеченные конечным продуктом, например изолейцином, не нуждаются в выработке предшественников изолейцинового синтеза и соответствующим образом регулируют их производство из источника (через первый фермент метаболического пути, ведущего только к этому конечному продукту). Здесь налицо отрицательная обратная связь, и мы можем предположить, что аналогичный процесс имеет место и в управлении активностью *lac*-оперона, когда есть хороший источник углерода, например глюкоза. Проблема состоит в том, чтобы найти этот конечный продукт катаболизма углеводов. Эту роль могли бы играть многие продукты катаболизма, и множество их было исследовано в поисках неуловимого так называемого катаболитного репрессора (Prevost, Moses, 1967). Предполагалось, что такой репрессор управлял бы не только *lac*-опероном, но любой ферментативной системой, которая может поставлять молекулы в катаболический путь, общий для энергетического метаболизма и синтеза белков. На эту роль годятся многие расщепляющие ферменты, такие, как триптофаназа, некоторые дезаминазы, гистидаза, некоторые фосфорилэлазы и т. д. Нам же нужна некая молекула, которая участвует в регуляции активности широкого спектра катаболических ферментов, управляя основным энергетическим потоком в клетке. Результаты последних лет решительно указывают на то, что молекулой, играющей эту роль и действующей как «сигнал глюкозного истощения» в клетке, является цАМФ (Makman, Sutherland, 1965; Crombrugghe, 1971; Pastan, Perlman, 1970). Однако влияние этой молекулы положительно — она индуцирует синтез катаболических ферментов, в то время как в ее отсутствие эти ферменты практически не синтезируются. Таким образом, необходимо рассмотреть управляющую систему, в которой высокий уровень глюкозы даст низкий уровень цАМФ, и наоборот; а кроме того, цАМФ обязательно должен быть индуктором *lac*-оперона.

Пример системы с такими свойствами представлен на рис. 2.3. Я изменил принятые на рис. 2.2 обозначения, чтобы привести их в соответствие с обозначениями, введенными в предыдущей главе для описания молекулярных управляющих процессов, используя кружки для представления точек управления (фактически существующих или потенциальных), а квадраты —

для обозначения метаболитических пулов. Здесь G — гены или опероны, R — полисомы, P_i — репрессор, E_i — β -галактозидаза, E_t — транспортные ферменты, а E_a — аденилатциклаза, катализирующая образование цАМФ из АТФ. *Lac*-оперон представлен как отдельная единица эпигенетического управления. Лактоза поступает в клетку с помощью транспортных ферментов,

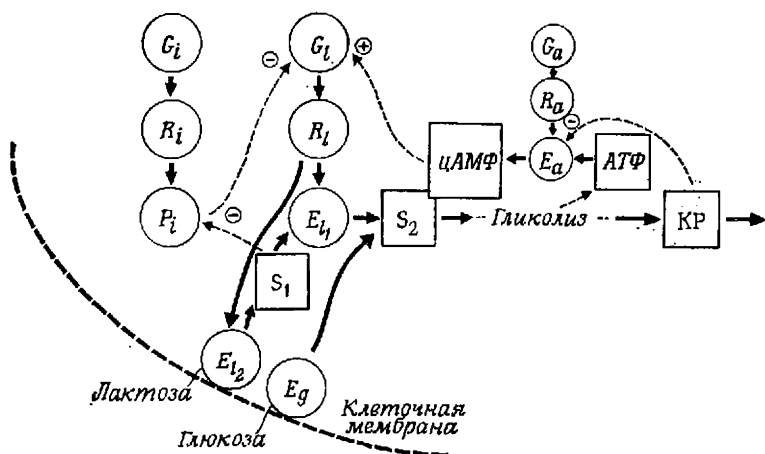


Рис. 2.3. Возможная схема управления для *lac*-оперона, включающая каталитическую репрессию.

локализованных в клеточной мембране, и затем (S_1) выступает в роли инактиватора репрессора. Природа положительной обратной связи этой части управляющей цепи очевидна, так как двойное отрицание равносильно положительному утверждению, и поэтому транспортные ферменты обладают положительным действием. Продукты β -галактозидазной реакции (S_2 на рис. 2.3) включаются в гликолитический путь, приводя к образованию катаболитного репрессора (КР). В процессе гликолиза также синтезируется АТФ, который превращается аденилатциклазой в цАМФ. Принято считать, что катаболитный репрессор является ингибитором аденилатциклазы, как это предполагается в исследованиях Петерковского и Газдора (Peterkovsky, Gasdor, 1974). Циклический АМФ, по-видимому, необходим как сигнал для начала транскрипции *lac*-генов. Существуют данные, что он действительно играет эту роль на промоторе — участке *lac*-оперона, который ответствен за присоединение РНК-полимеразы к ДНК и инициацию транскрипции мРНК (Beskworth, 1967). Этот участок расположен между генами i и O на рис. 2.2.

На рис. 2.3 представлены также фермент E_g , транспортирующий глюкозу, и включение глюкозы в гликолитический путь — пул S_2 . Отсюда ясно, почему клетки дикого типа не производят β -галактозидазу (и транспортные ферменты) в присутствии глюкозы: в этом случае велик пул катаболитного репрессора и количества имеющегося цАМФ недостаточно для инициации транскрипции. Очевидно, что эта роль цАМФ должна быть специфичной для генов, кодирующих катаболические ферменты клетки, так как многие другие гены детерминируют мРНК в этих условиях. Ответ цАМФ на «глюкозное истощение» является примером сигнала управления, функционирующего на сравнительно высоком уровне физиологической регуляции, так как цАМФ управляет не просто одним опероном, как это делает лактоза, а целым классом оперонов, содействующих выполнению одной и той же физиологической функции — обеспечению энергией и производству блоков для анаболизма с помощью катаболических путей метаболизма. В основе такой регуляции лежит отрицательная обратная связь, но детали управляющих взаимодействий могут быть при этом довольно сложными. На рис. 2.3 представлен только один из множества возможных вариантов.

Репрессия путей биосинтеза по типу обратной связи

Хотя *lac*-оперон был первой подробно исследованной системой управления генами, он не является типичным примером регуляции генов в клетках прокариотов. В предыдущей главе мы показали, что достаточным условием существования устойчивой регуляции в цепи управления является наличие петли отрицательной обратной связи, включающей конечный продукт. В случае *lac*-оперона это обеспечивается катаболитной репрессией. Индуктивное или дерепрессивное действие лактозы является дополнительным свойством этой системы, дающим короткую быстро действующую петлю положительной обратной связи, которая приводит к быстрому ответу оперона на индуктивный стимул; ответ стабилизируется более медленно действующим репрессивным эффектом катаболитного управляющего сигнала. Этот контур напоминает гликолитическую систему управления, представленную на рис. 1.11, и обладает теми же динамическими свойствами: система может переходить в колебательный режим. Позже я рассмотрю экспериментальные факты, действительно свидетельствующие об этом. Здесь же я хочу только отметить, что схема работы *lac*-оперона немного сложнее, чем для системы, функционирующей исключительно по принципу отрицательной обратной связи; поэтому интересно знать, есть ли такие более простые системы на уровне

генного управления. Подобная регуляция была обнаружена фактически одновременно с появлением работы, открывшей принципы ингибирования конечным продуктом и лактозной индукции, во второй половине 50-х годов. Типичный пример такого рода можно найти в системе управления ферментами, ответственными за биосинтез аргинина, которых в *E. coli* семь. Если аргинин присутствует в среде культивирования в адекватных количествах, то в культуре не обнаруживается ни один из семи ферментов. В ответ на удаление аргинина эти ферменты через 5—10 мин начинают появляться в клетках и в течение часа накапливаются до значительного уровня. Время ответа системы такое же, что и для β -галактозидазной индукции; при этом удовлетворяются те же основные требования: генная селекция отсутствует, а идет синтез новых белков, так что данный процесс регулируется на эпигенетическом уровне управления. Было показано также, что синтез всех ферментов пути, как и синтез ферментов *lac*-оперона, управляется из одного пункта. Таким образом, эти ферменты составляют единицу эпигенетического управления. Однако, как показали результаты картирования, структурные гены для ферментов синтеза аргинина у *E. coli* K12 не находятся на одном участке хромосомы, как в случае *lac*-генов. Они располагаются тремя отдельными кластерами, так что координированное управление их синтезом должно происходить с помощью плейотропного действия аргинина, т. е., какой бы природы ни был управляющий сигнал, он должен действовать одновременно на все подобные управляющие участки, примыкающие к каждой из трех групп структурных генов; предполагается, что каждая группа устроена подобно *lac*-оперону с операторным участком, примыкающим к структурным генам, как показано на рис. 2.2. Обнаружение конститутивных мутантов с такими же характеристиками, как у мутантов по *lac*-системе, наводит на мысль, что в обоих случаях действуют одни и те же основные молекулярные механизмы, но с одним важным различием. Поскольку присутствие сигнала управления (аргинина) приводит к репрессии, а его отсутствие вызывает индукцию, очевидно, что постулированный репрессор аргининовых структурных генов должен быть активным только в присутствии аргинина и неактивным в его отсутствие. В отличие от репрессора, который связывается с оператором, только будучи свободным от лиганда, и неактивен в связанном состоянии, как *lac*-репрессор и выступающая в качестве лиганда лактоза (или алло-лактоза), аргининовый репрессор не должен связываться с операторами, если он не соединен с аргинином. Доказательство такого свойства аргининовой системы приведено в работах Мааса (Maas, 1961), Фогеля (Vogel, 1961) и Горини и др. (Gorini et al., 1961). Кроме того, было показано,

что аргинин действует по принципу обратной связи как *ингибитор* первого фермента этого пути, орнитинтранскарбамилазы (ОТК).

Мы можем теперь нарисовать цепь управления аргининовой системы, действующую по аналогии с системой управления *lac*-опероном, с учетом описанных выше особенностей. Она изображена на рис. 2.4. Здесь G_1 , G_2 и G_3 — три группы структурных генов, а G_r — ген-регулятор, продуктом которого является неактивный репрессор P_r , названный апорепрессором. Этот апорепрессор в комплексе с аргинином в качестве коре-

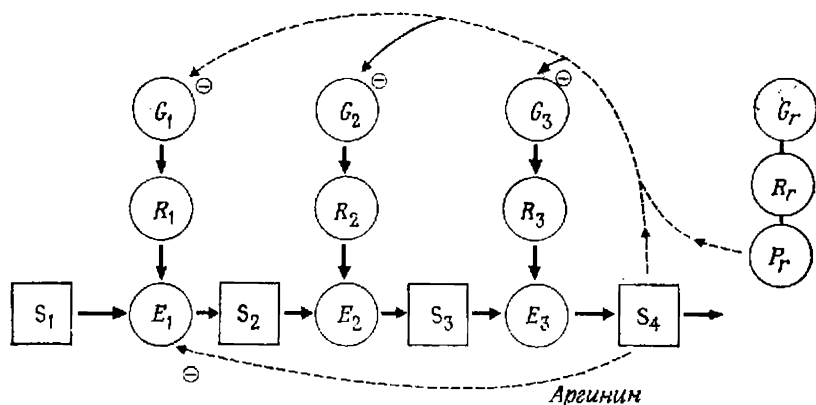


Рис. 2.4. Ингибирование и репрессия по типу обратной связи в аргининовой цепи управления *Escherichia coli*.

прессора образует активный репрессор, который может взаимодействовать с операторами, примыкающими к структурным генам, предотвращая действие РНК-полимеразы и таким образом останавливая транскрипцию. Как и раньше, здесь R — полисомы, E — ферменты, S — метаболиты. На этом рисунке использована несколько более компактная система обозначений: E_1 — это набор ферментов, гены которых сгруппированы в G_1 . Ингибирующее действие аргинина по типу обратной связи сказывается только на первом ферменте в цепи, ОТК, а не на всем наборе.

Теперь ясно видно одно интересное различие между ингибированием по типу обратной связи и репрессией по типу обратной связи: первое действует только на один фермент, первый в метаболическом пути, в то время как последняя — на все гены, входящие в цепь биосинтеза. И опять логика безупречна. Поток в ферментативной последовательности наиболее эффективно можно управлять, воздействуя на первый фермент. Управление еще и другими ферментами ничего нового не дает,

а только бесполезно вовлекает метаболиты в пулы, из которых они не могут выходить. Но когда бактерию снабжают аргинином, она стремится не просто выключить его производство на ферментативном уровне, но и прекратить синтез всех мРНК и ферментов, участвующих в этом процессе, так как их непрерывный синтез теперь большое расточительство. Таким образом, мы видим, как метаболическая и эпигенетическая системы для регулирования физиологической потребности и снабжения жизненно необходимыми конечными продуктами (в данном случае это аргинин) используют принцип соответствия руки и перчатки. Ингибирование по типу обратной связи действует очень быстро (время релаксации около 10^2 с) и регулирует уровень аргинина в ответ на быстрые флуктуации; репрессия по типу обратной связи действует значительно медленнее (время релаксации около $3 \cdot 10^3$ с) и приспособливает популяции макромолекул к различным условиям питания. Инерционность второй системы обусловлена довольно большим временем синтеза макромолекул (около одной молекулы за 5 с) и малой скоростью деградации (несколько минут для мРНК) или разбавления (порядка часа для белка). Из рис. 2.4 мы видим, что выражение «рука в перчатке» применительно к связи между метаболической и эпигенетической системами — это не просто некое образное выражение. Очевидно, что метаболическая система содержится в эпигенетической системе в том смысле, что всякий раз, когда мы говорим, например, о ферментативной адаптации, мы должны включать эффекты ингибирования по типу обратной связи, так как временные интервалы работы первой системы неизбежно содержат в себе времена последней. Таким образом, при конструировании функциональной иерархии физиологии организма должны быть включены связи между уровнями: системы высокого порядка содержат системы более низких порядков, но, конечно, не наоборот. Эти связи могут быть математически формализованы, как это сделано в моей книге «Временная организация клетки» (Goodwin, 1963), в данной же книге я буду мало пользоваться такими методами.

Очевидно, что репрессия по типу обратной связи в аргининовой цепи проще, чем система *lac*-оперона, так же как система управления с обратной связью, изображенная на рис. 1.10, описывающая цепь биосинтеза, проще, чем гликолитическая система, представленная на рис. 1.11. Несомненно, для этих различий имеются веские физиологические причины, так как генерирующие энергию системы, к которым принадлежат и *lac*-оперон, и гликолиз, возможно, требуют более быстрой адаптивной реакции, обеспечиваемой короткими цепями положительной обратной связи, чем процессы биосинтеза. Известные в настоящее время цепи управления очень разнообразны; среди них

имеются модификации рассмотренных выше систем. Интересное обсуждение различных стратегий управления в связи с эпигенетической и генетической стабильностью можно найти в статье Саважо (Savageau, 1974). Между функционально связанными цепями управления существуют сложные взаимодействия, например в случае аргинина и ЦТФ начальные участки обеих цепей синтеза связаны через карбамоилфосфат. Карбамоилфосфатсинтетаза, по-видимому, находится под общим контролем пиримидинов и аргинина (Gorini, Kalman, 1963; Pierard et al., 1965). Таким образом, хотя высказанная в конце предыдущей главы точка зрения на клетку как на систему, разделенную на частично автономные подсистемы управления, все еще в значительной степени справедлива и для следующего уровня эпигенетической системы, в этом случае, когда характер взаимодействий так сложен, она перестает быть столь бесспорной. Тем не менее важно понимать, что основные принципы функционального разделения сохраняются на всех уровнях физиологической иерархии, придавая системе гибкость, адаптивность и быстроту реакции путем использования, так сказать, подпрограмм, которые можно включать или выключать, мало затрагивая все остальные части системы.

Контроль синтеза рибосомной РНК

Как видно из рис. 2.1, рост бактерий при ферментативной адаптации прерывается в экспоненциальной фазе, а затем возобновляется на новом источнике углерода (лактозе) со скоростью, почти равной скорости на глюкозе. Механизм роста клетки во время этой адаптации в основном остается интактным, а изменения происходят только в тех физиологических процессах, которые непосредственно связаны с катаболизмом лактозы. Посмотрим теперь, что произойдет, если клетки перенести из среды, которая обеспечивает только относительно медленный рост (скажем, минимальная солевая среда с глюкозой, время удвоения около 60 мин), в питательную среду, которая позволяет клеткам делиться каждые 20 мин. Какие факторы будут определять изменение общей скорости роста?

Подробное исследование этой проблемы — проблемы регуляции синтеза макромолекул типа ДНК, РНК и белка — было предпринято О. Малё и его коллегами в Копенгагене на бактериях *E. coli* и *Salmonella typhimurium*. Большинство полученных ими результатов изложено в книге Малё в Кьельдегаарда «Управление синтезом макромолекул» (Maalfe, Kjeldegard, 1966). Ряд важных данных содержит и более ранняя работа Малё и Курланда (Maalfe, Kurland, 1963). Они обнаружили, что во время перехода с относительно бедной среды на богатую

(сдвиг вверх) белки, РНК и ДНК ведут себя по-разному. Первой на изменение условий реагирует РНК, концентрация которой в клетках быстро возрастает и примерно через 15 мин после смены среды устанавливается на уровне, соответствующем новой скорости роста. Только тогда устанавливается на новом уровне скорость синтеза белка и, наконец, сразу за белком возрастает до нового значения скорость синтеза ДНК. Конечно, как только достигнуто новое стационарное состояние роста бактерий, все три концентрации должны возрастать с одной и той же скоростью. Но тот факт, что РНК реагирует первой, говорит нам о двух вещах: во-первых, эти виды макромолекул, по-видимому, отделены друг от друга динамически настолько, что они имеют разные цепи управления, и, во-вторых, РНК играет решающую роль в определении общей скорости клеточного роста. Поскольку основная часть этой РНК рибосомная, а транспортной РНК (тРНК) и информационной (матричной) РНК (мРНК) в клетке гораздо меньше, то в этом случае речь идет о системе управления генами рибосомной РНК. Мы уже видели, как синтез мРНК контролируется механизмами репрессии.

Подтверждение того, что фактором, лимитирующим скорость роста, является рибосомная РНК (рРНК), было получено Малё и Курландом, показавшими, что отношение скорости синтеза белка к концентрации рРНК в клетке постоянно в широком диапазоне скоростей роста. Это соотношение может быть записано в виде $\Delta P/R_r = \text{const}$, где ΔP — количество белка, синтезированного в единицу времени, а R_r — внутриклеточная концентрация рРНК. Из этого соотношения следует, что, чем быстрее растут клетки, тем больше должна быть плотность рибосом в цитоплазме, — факт, действительно имеющий место. Клетка, растущая в питательной среде со временем удвоения 20 мин, вся заполнена рибосомами, за исключением ядерных областей, где локализованы хромосомы и рибосомы встречаются редко. Это обычно большие клетки, имеющие в среднем 3,1 ядра. Клетки, растущие со временем удвоения 40 мин, примерно вдвое меньше, содержат $\sim 1,5$ ядра на клетку и обладают почти вдвое меньшей плотностью рибосом, а клетки со временем удвоения 120 мин, совсем маленькие, с немногочисленной популяцией рибосом в цитоплазме, содержат около 1,2 ядра на клетку. Ниже мы рассмотрим, почему клетки меняют свои размеры при разных скоростях роста.

В поисках возможного механизма управления, который объяснял бы тот факт, что во время переходного процесса синтез рибосомной РНК на некоторое время может быть разобщен с синтезом белка и ДНК, а при сбалансированном росте между этими системами существуют вполне определенные соотношения,

Малё и Курланд (Maalfe, Kurland, 1963) использовали два важных результата. Первый факт состоял в том, что клетки, которым не достаёт одной из 20 аминокислот, не синтезируют заметного количества рРНК, хотя синтез рРНК начинается тут же, если их обеспечить требуемой аминокислотой, даже в случае, когда белковый синтез подавлен хлорамфениколом. Второй факт был следующим: если к нормальным клеткам, растущим на минимальной глюкозо-солевой среде (т. е. без аминокислот), добавить хлорамфеникол, то произойдет заметное увеличение скорости синтеза рРНК, подобное тому, которое имеет место при замене бедной среды на богатую, а затем скорость упадет до низкого значения. В целом рост такой культуры, блокированной хлорамфениколом, конечно, останавливается. Оба эти факта указывают на то, что элементами звена управления, связывающего условия роста и скорость синтеза рРНК, являются, по-видимому, аминокислоты, так как хлорамфеникол блокирует белковый синтез, препятствуя переносу аминокислот на рибосому комплексом аминоацил-тРНК.

Следуя логике модели репрессии по типу обратной связи, нам следует искать некий метаболит, который являлся бы продуктом белкового синтеза и действовал как кофактор при репрессии синтеза рибосомной РНК. Таким метаболитом может быть незаряженная тРНК, т. е. тРНК, свободная от аминокислоты. Клетки, которым не достаёт одной из 20 аминокислот, имели бы популяцию таких тРНК, соответствующих отсутствующей аминокислоте, и эти молекулы действовали бы как корепрессоры, активируя репрессор так же, как это делает аргинин при репрессии аргининовых структурных генов. Очевидно, было бы необходимо, чтобы эту роль могла играть любая из 20 разновидностей тРНК, и это требование не кажется неправдоподобным. Вполне допустимо, что у всех тРНК существует нуклеотидная последовательность длиной от 70 до 80 нуклеотидов с мол. весом около 25 000, которая специфически взаимодействует с белковым апорепрессором, давая активный репрессор. В этом случае действие хлорамфеникола легко объясняется накоплением аминокислот в клетках, в которых нет белкового синтеза, что приводит к превращению тРНК в аминоацильную форму и дерепрессии генов рРНК. Степень этой дерепрессии должна зависеть от внутриклеточной концентрации аминокислот в момент начала блокирования хлорамфениколом: если содержание аминокислот в клетке высоко, препарат вызовет небольшое изменение в концентрации аминокислот и поэтому не приведет к заметному изменению в синтезе рРНК, но если уровень аминокислоты в клетке низок, то эффект будет значительным. Это соответствует данным, полученным на культурах, растущих на богатых, средних и бедных средах.

Исходя из наших представлений о цепях репрессии по типу обратной связи, можно ожидать, что должен существовать соответствующий конститутивный мутант; в данном случае это мутант, характеризующийся относительно высокой скоростью синтеза рРНК независимо от условий питания и, следовательно, внутриклеточной концентрации аминокислот. Такой мутант, названный «релаксированным» и обозначенный RC , был обнаружен Стентом и Бреннером (Stent, Brenner, 1961). Ген бактерии дикого типа, RC^+ , имеет рассмотренное выше строгое управление синтезом рРНК, которое срабатывает в ответ на изменения содержания аминокислот. Согласно этим данным, управляющая

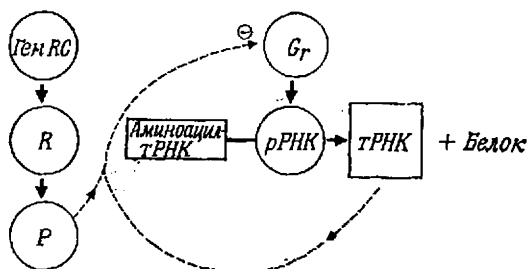


Рис. 2.5. Схема цепи управления синтезом рРНК, согласно представлениям Малё и Курланда (Maaløe, Kurland, 1963).

схема может выглядеть так, как это показано на рис. 2.5. На этом весьма схематичном рисунке G_r — гены, ответственные за синтез рРНК, а рРНК — функционирующие рибосомы, которые производят белок и тРНК из аминоксил-тРНК. Любая из тРНК может функционировать как корепрессор апорепрессора P , продукта активности гена RC . Эта управляющая цепь работает по тем же принципам, что и сеть, представленная на рис. 2.4, и в действительности была сконструирована на основе репрессии по типу обратной связи. К сожалению, несмотря на все свое изящество и кажущееся правдоподобие, она не может объяснить полученные позже данные и нуждается в доработке. Представления о молекулярной основе регуляции синтеза рРНК развивались аналогично теории управления при катаболической репрессии, поскольку до того, как выяснилось, какую роль в «эффекте глюкозы» играет цАМФ, для этой ситуации предлагалась цепь управления, основанная на принципах репрессии по типу обратной связи, несколько более простая, чем изображенная на рис. 2.3. Доказательством более сложной природы регуляции явилось обнаружение Лумисом и Магазаником (Loomis, Magasanik, 1966) в 1966 г. мутанта конститутивного типа, который, подобно мутанту RC^- , характеризуется релаксированным пове-

дением, состоящим в том, что он не реагирует на глюкозу обычным способом и производит β -галактозидазу в присутствии индуктора (необходимое условие) независимо от наличия глюкозы. Поэтому предположили, что этот мутант, обозначенный CR^- (дефектный в отношении катаболитной репрессии), синтезирует дефектный апорепрессорный белок, который в норме объединялся бы с катаболитным репрессором (рис. 2.3) и останавливал транскрипцию с *lac*-оперона. Эта гипотеза в дальнейшем не подтвердилась. Полная картина катаболитной репрессии далеко не ясна. На основании современных данных предлагается механизм, напоминающий изображенный на рис. 2.3, но несколько более сложный; предполагается, что цАМФ, помимо *lac*-генов, влияет на многие другие гены, вовлеченные в катаболические процессы. Конститутивное поведение, аналогичное обнаруженному Лумисом и Магазаником, могло бы возникнуть у мутанта, у которого E_a не отвечает на катаболитный репрессор. Вырисовывающаяся при этом картина, которая рассматривает управление рРНК посредством специфических и в некоторой степени неожиданных метаболитов, довольно близка к той, которая характерна для управления *lac*-опероном; одним из элементов этой системы вполне может оказаться регуляция более высокого уровня интеграции, осуществляемая с помощью вновь открытого метаболита.

Один важный факт, заставляющий усомниться в адекватности схемы управления, изображенной на рис. 2.5, — это отсутствие влияния различных аминокислотных условий и различных мутаций на РНК-полимеразную активность. Другой возможный механизм действия RC -гена мог бы состоять в управлении предшественниками синтеза РНК; такое управление действовало бы на синтез всех РНК — мРНК, тРНК, а также и рРНК. В работе Кэшела и Гэллента (Cashel, Gallant, 1969) было высказано мнение, что когда тРНК того или иного типа не нагружается соответствующей ей аминокислотой, какая-то реакция, обычно участвующая в белковом синтезе, работает вхолостую и что в ходе этой «холостой» реакции, в которой участвует продукт RC -гена, образуется ингибитор реакции фосфорилирования, производящей предшественники синтеза РНК. С помощью автордиографии и хроматографического разделения соединений они показали, что в клетках дикого типа, лишенных аминокислот, метаболит действительно накапливается, а в клетках RC^- — нет. Этот метаболит оказался фосфорилированным соединением неизвестной природы и получил название магического пятна (MS); обозначают его MS1. Позже было показано, что это гуанозинтетрафосфат, ффГфф. Одновременно было обнаружено второе фосфорилированное вещество, обозначенное MS2. Оно, по-видимому, является нетоксичной формой MS1.

Открытие ффГфф и его роли в регуляции синтеза РНК стимулировало довольно интенсивное изучение возможного управляющего контура этой системы. Из работ ряда исследователей (Pederson, Lane, Kalgora, 1973; Hazeltine et al., 1973; Yang et al., 1974) возникает некая общая, довольно неясная в деталях картина. Продуктом *RC*-гена является белок с мол. весом около

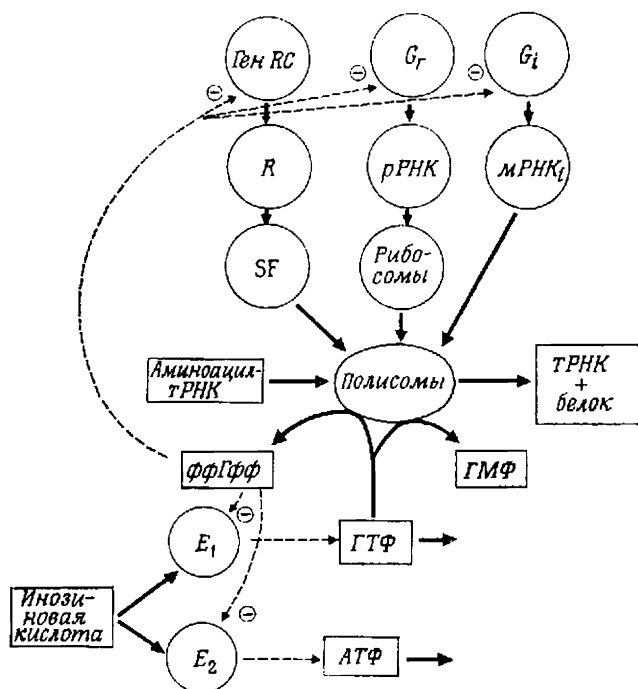


Рис. 2.6. Возможная цепь управления синтезом рРНК с участием ффГфф.

80 000, который назван ограничивающим фактором (stringent factor, SF). Когда его добавляют в реакционную систему, содержащую рибосомы, тРНК, мРНК, ГДФ и АТФ, синтезируется гуанозинтетрафосфат. Возможно, SF сам является участником нормального процесса трансляции, но в отсутствие аминокислоты система производит ффГфф. Этот тетрафосфат — сильный ингибитор первого фермента в биосинтетических путях образования ГТФ и АТФ, так что в первую очередь его действие сводится к остановке синтеза предшественников, необходимых для синтеза РНК. Кроме того, ффГфф отчасти ингибирует РНК-полимеразу и уменьшает время жизни рРНК (Gallant et al., 1972). Таким образом, полная картина управления довольно

близка к той, что изображена на рис. 2.6. Здесь G_r — гены рРНК, а G_i — любой структурный ген.

В присутствии аминоксил-тРНК происходит трансляция и ффГфф не образуется или образуется в малом количестве. Однако в отсутствие аминокислоты рибосомный реакционный комплекс производит ффГфф, который затем ингибирует производство ГТФ и АТФ, угнетая первые ферменты цепи метаболизма от инозиновой кислоты к пуринтрифосфатам, и ингибирует РНК-полимеразу. Хлорамфеникол, по-видимому, непосредственно ингибирует синтез ффГфф, предотвращая таким образом нормальную ограничивающую реакцию. Хотя релаксированный мутант способен синтезировать белок, он не может производить ффГфф и поэтому не в состоянии нормально реагировать на дефицит аминокислот. Таким образом, мы видим, что довольно простая картина, изображенная на рис. 2.5, существенно усложняется. Вместо петли репрессии по типу обратной связи, специфичной для генов рРНК, мы имеем значительно более общую петлю обратной связи, в образовании которой участвует новый метаболит, ответственный за регулируемую функцию высокого уровня. Таким образом, между скоростями синтеза белка и РНК имеется очень тонко отрегулированная связь, осуществляемая с помощью пулов предшественников этих макромолекул. Мы снова видим, что простого разделения прокариотических клеток на функциональные единицы управления провести не удастся; связано это с интегративными эффектами координирующего сигнала. Прототипом единицы управления является путь биосинтеза аргинина, где на репрессию генов, включенных в этот метаболизм, влияет только аргинин, и такой регуляцией затрагиваются только эти гены (Gorini, 1963). Однако репрессия *lac*-оперона и управление синтезом РНК показали нам, что при регуляции физиологической функции имеют место более сложные взаимодействия и координирование достигается с помощью специальных метаболитов, таких, как цАМФ и ффГфф. Их полезно рассматривать в качестве прокариотических аналогов гормонов.

Динамика эпигенетических сетей

Я закончил предыдущую главу разделом о динамике цепей управления метаболизмом, в котором было показано, что наличие петель обратной связи изменяет характер стабильности метаболических процессов и значительно увеличивает динамические возможности системы. Теперь я сделаю то же для эпигенетических управляющих цепей, наметив некоторые подходы, использующиеся при их анализе. Наша основная цель состоит в том, чтобы объединить изучение свойств подсистем, составляющих целое, с некоторым анализом полной системы, которой

в этом случае оказывается клетка, функционирующая в пределах эпигенетических временных интервалов. Здесь мы опять увидим, что для применения этого подхода имеются сильные ограничения, которые определяются главным образом трудностями общего анализа нелинейных систем.

Аналогия со статистической термодинамикой

Один из возможных подходов к анализу динамики клеточного поведения состоит в проведении аналогии между клеткой, рассматриваемой как скопление взаимодействующих цепей управления, и газом, представляющим собой скопление взаимодействующих молекул. С первого взгляда может показаться, что эта аналогия очень мало перспективна. Агрегатные свойства газа, такие, как его температура, давление, объем и сжимаемость, могут быть вычислены путем усреднения исходя из свойств отдельных молекул (массы, скорости, степеней свободы) и их взаимодействий, т. е. с помощью статистической термодинамики. Применимость такого усреднения зависит от того, насколько отдельные молекулы ведут себя независимо друг от друга, т. е. в какой степени отсутствует кооперативность или коллективные свойства. Возникающие ограничения обусловлены наличием таких дающих коллективные эффекты взаимодействий, как вандерваальсовы, электромагнитные и ряд других. Однако методы статистической термодинамики применимы и в этих случаях; они применимы также и в случае жидкостей и кристаллов, где ограничения еще более строгие. Статистический подход имеет важное значение и представляет большой интерес; он позволяет исследовать и анализировать, например, природу фазовых переходов. В последней главе, где будут обсуждаться последствия кооперативных взаимодействий, я рассмотрю приложение некоторых из этих методов к таким явлениям, как клеточный рост и возбудимость мембран. Пока же представляется интересным посмотреть, что получится, если клетку считать совокупностью функциональных единиц, регулируемых особой динамикой управления, в предположении, что эти единицы слабо взаимодействуют друг с другом и коллективное поведение отсутствует.

Я довольно подробно рассмотрел такой режим работы клетки в книге «Временная организация клетки». Моя диссертация, написанная в 1959 г. и послужившая основой для этой книги, базировалась на представлениях о генной регуляции, предшествовавших теории репрессии по типу обратной связи, которая возникла в начале 60-х годов. Это была теория плазматгена, разработанная в основном Спигельманом и Рейнером (Spiegelman, Reiner, 1947) и Спигельманом (Spiegelman, 1948) для объясне-

ния ферментативной адаптации в дрожжах. Моно (Monod, 1947) в своем обзоре ссылается на эту теорию и обсуждает ее модифицированную форму. В основе теории лежало представление о том, что регуляция генной активности в клетках связана главным образом с установлением равновесия между конкурирующими автокаталитическими или самореплицирующимися единицами, соотношения между которыми могли меняться под действием различных факторов окружающей среды, например субстратов. Это модель внутриклеточных процессов чисто эволюционного типа, в которой на систему самовоспроизводящихся и конкурирующих единиц действуют силы естественного отбора. До тех пор пока в конце пятидесятых — начале шестидесятых годов в клеточной биологии не стали использоваться представления о молекулярных процессах регуляции по типу обратной связи, модели клеточной дифференцировки, основанные на эволюционных принципах, были слишком общими и восходили в действительности еще к Вильгельму Ру. Теория плазматгена была одной из них, являясь скорее моделью экосистемы, чем эволюционной моделью, так как она предполагала, что отбор обусловлен влиянием различных условий окружающей среды на уже существующий вид, и не рассматривала никакого аналога мутации генов. Теми единицами, из которых я сконструировал статистическую термодинамику поведения клетки, были самореплицирующиеся или автокаталитические ферментобразующие системы. Я считал, что между этими единицами существуют взаимодействия типа «хищник — жертва», обуславливающие колебательную динамику целой клетки, и рассмотрел определенный тип разрыва «температурной» функции, которую я использовал для объяснения клеточной дифференцировки. Однако, когда я стал понимать, какую роль играют специфические процессы, управляемые по типу обратной связи, в генной регуляции у прокариотов, в качестве основы для анализа я взял физиологическую единицу, аналогичную представленной на рис. 2.4.

Функционально такая единица может быть сведена к более простому виду (рис. 2.7), если предположить, что один из элементов системы репрессии по типу обратной связи является узким местом в системе, и изображать только его. Тогда число стадий в последовательности ферментативных реакций будет зависеть

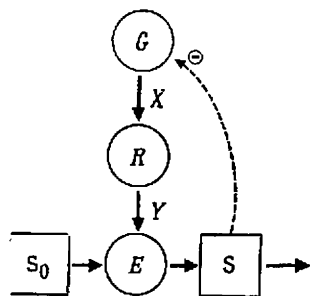


Рис. 2.7. Упрощенное представление репрессии по типу обратной связи. G — ген, R — полисомы, E — ферменты, S_0 — субстрат, а S — продукт, который связывается с геном и репрессирует его.

от того, какая петля считается узким местом. Если предположить, что мРНК (X) определяет скорость белкового синтеза, а фермент (Y) ограничивает скорость образования субстрата S , то для описания транскрипции и трансляции можно вывести очень приближенные уравнения. Считается также, что S ограничивает скорость транскрипции гена G . Эти предположения вполне правдоподобны, поскольку известно, что, если бы скорость ограничивалась каким-либо другим фактором (например, аминокислотами или белковым синтезом), цепь репрессии по типу обратной связи работала бы неэффективно. Используя для описания репрессивного действия S на ген выражение, аналогичное уравнению (1.10), мы можем записать

$$\frac{dX}{dt} = \frac{a}{b + cS^n} - dX, \quad (2.1)$$

где в a и b включены все члены, соответствующие субстратам, скоростям и ферментам, участвующим в синтезе РНК; c — константа ассоциации комплекса репрессор — ген, содержащего n молекул S , d — константа скорости деградации мРНК. Для белкового синтеза мы можем использовать простое уравнение

$$\frac{dY}{dt} = eX - fY, \quad (2.2)$$

где в e входят все константы скоростей, члены, соответствующие субстратам и факторам, участвующим в белковом синтезе, а f — константа скорости деградации белка. Наконец, предполагая, что концентрации субстратов настолько малы, что выражения Михаэлиса линейны и S_0 — константа, мы можем записать

$$\frac{dS}{dt} = gY - hS. \quad (2.3)$$

Эти уравнения качественно подобны выведенным в предыдущей главе уравнениям системы (1.25), но все они, кроме уравнения (2.1), куда входит член, описывающий управление, содержат только линейные члены. Таким образом, исследование их устойчивости можно проводить тем же методом, которым мы пользовались в предыдущей главе — линеаризацией и определением корней характеристических уравнений. Здесь еще раз оказываются очень ценными исследования Уолтера (Walter, 1969, 1970), Виниэгра-Гонзалеса и Мартинеса (Viniégra-Gonzales, Martinez, 1969) и Раппа (Rapp, 1975), которые показывают, какой должна быть зависимость между числом стадий в цепи реакций и стехиометрией управляющей реакции (значением n),

чтобы имели место устойчивость или неустойчивость (колебательный режим)¹.

Чтобы продолжить аналогию со статистической механикой, необходимо преобразовать уравнения (2.1) — (2.3) так, чтобы их можно было проинтегрировать и получить первый интеграл движения; для этого нужно представить уравнения в консервативной форме.

Члены dX и fY в уравнениях (2.1) и (2.2) соответственно должны быть заменены константами d и f . Это означает, что вместо того, чтобы считать скорости деградации пропорциональными концентрациям деградирующих молекул, мы предполагаем, что мРНК и белок деградируют с постоянной скоростью. Это соответствует особым условиям, при которых рибонуклеазы и протеазы всегда присутствуют в скорость-лимитирующих концентрациях, а мРНК и белок инактивируются только в ходе каталитической деградации. Ясно, что эти предположения несут с собой некоторые ограничения, но, как увидим позднее, эти ограничения не так сильны, как можно было бы ожидать.

Дальнейшее упрощение можно получить, воспользовавшись ранее отмеченным различием в характеристических временах ответов эпигенетической и метаболической систем. Уравнение (2.3) описывает метаболические превращения S . Это означает, что время протекания этой реакции гораздо меньше времени, необходимого для значительного изменения Y ; поэтому мы можем принять, что S всегда находится приблизительно в стационарном состоянии, и записать:

$$0 = \frac{dS}{dt} = gY - hS.$$

Отсюда $S = (g/h)Y$ и можно исключить S из уравнения (2.1). Для простоты примем $n = 1$; тогда получим систему уравнений следующего вида:

$$\begin{cases} \frac{dX}{dt} = \frac{a}{b + kY} - d, \\ \frac{dY}{dt} = eX - f. \end{cases} \quad (2.4)$$

Теперь эти уравнения можно проинтегрировать:

$$\begin{cases} (eX - f) \frac{dX}{dt} + \left(d - \frac{a}{b + kY} \right) \frac{dY}{dt} = 0, \\ e \frac{X^2}{2} - fX + dY - \frac{a}{k} \log(b + kY) = \text{const.} \end{cases}$$

¹ Эти результаты были ранее получены Е. Е. Сельковым (Е. Е. Сельков, «Исследование условий возникновения периодических колебаний в системах ферментативных реакций с обратной связью». В кн. «Колебательные процессы в биологических и химических системах», под ред. Г. Франка и др. М.: Наука, 1967, стр. 81—93). — *Прим. ред.*

Константа определяется начальными условиями для переменных X и Y .

Теперь, когда мы имеем интеграл, необходимо понять, что он означает. Это легче всего сделать, преобразовав систему уравнений (2.4) к новым переменным, определенным следующим образом:

$$\begin{aligned}x &= X - \bar{X}, \\y &= Y - \bar{Y},\end{aligned}$$

где $\bar{X}$ и $\bar{Y}$ — стационарные значения переменных, полученные из уравнений (2.4) при $dX/dt = 0$, $dY/dt = 0$. Тогда система уравнений примет вид

$$\begin{aligned}\frac{dx}{dt} &= d \left(\frac{\gamma}{\gamma + y} - 1 \right), \\ \frac{dy}{dt} &= ex,\end{aligned}\tag{2.5}$$

где $\gamma = a/dk$.

После интегрирования получаем

$$\frac{ex^2}{2} + d[y - \gamma \log(\gamma + y)] = C.\tag{2.6}$$

Если $C > 0$, уравнение описывает замкнутую кривую на плоскости xy . Это следует из того, что любая прямая $y = k$, где k — константа, пересекает кривую в двух точках, решениях уравнения

$$ex^2/2 = C - d[y - \gamma \log(\gamma + y)],$$

которые будут действительны, если правая часть неотрицательна. Так же легко можно показать, что любая прямая $x = k$, где k — константа, всегда пересечет кривую в двух точках, решениях уравнения

$$y - \gamma \log(\gamma + y) = C - \frac{ek^2}{2},$$

опять-таки при условии, что правая часть неотрицательна. Кривая такого типа изображена на рис. 2.8. Нелинейность члена, описывающего управление в системе уравнений (2.5), приводит к тому, что она имеет форму яйца, которое казалось мне тогда многообещающим источником целой биологической теории. К сожалению, ничего из этого яйца так и не вылупилось.

Следовательно, система уравнений (2.5) описывает непрерывные колебания, т. е. переменные претерпевают непрерывные циклические изменения относительно своих стационарных значений. Поэтому любое построение статистико-механического типа, основанное на таких уравнениях, может дать нам представление о характере ритмических изменений, обусловленных

колебаниями в цепях репрессии по типу обратной связи. Исходя из наших оценок эпигенетических времен релаксации, можно ожидать, что периоды таких колебаний будут составлять несколько часов. В основе какого свойства клеток могли бы лежать эти ритмы? Одним очевидным кандидатом на эту роль представляется сам клеточный цикл, хотя для того, чтобы достаточно точно смоделировать этот процесс, необходимо преобразовать уравнения. Другая возможность — это биологические часы, где непрерывные колебания происходят с периодами, близкими к 24 ч. Согласно определению, данному в этой главе, оба эти явления эпигенетические, и их можно анализировать описанными методами. Чтобы построить статистическую механику системы, элементы которой описываются уравнениями (2.5) или аналогичными им более сложными уравнениями, необходимо исходить из интегралов типа (2.6) по одному для каждой цепи управления, считая, что все эти цепи вносят свой вклад в динамику системы, и затем с их помощью построить функцию распределения плотности. Эта функция дает вероятность реализации любого возможного состояния динамической системы, состоящей из всех цепей управления и их взаимодействий, как бы они ни были определены. Затем можно попытаться выяснить различные свойства либо целого, либо частей. Операция объединения частей в сложное целое такого типа позволяет использовать ряд довольно мощных аналитических методов и получить статистические ответы на вопросы, которые обычно не удается разрешить, если задавать их в рамках детерминированной системы, с которой начался анализ, а именно системы уравнений, подобных (2.5).

Здесь можно вернуться к выводу уравнений (2.5) и возразить, что предположения, сделанные при их выводе, настолько жесткие, что с самого начала делают применение этих уравнений невозможным. Например, легко показать, что исходные уравнения (2.1)—(2.3) не имеют колебательных решений, если $n = 1$, и что колебания возникают только потому, что не включены члены, описывающие распад соединений в соответствии

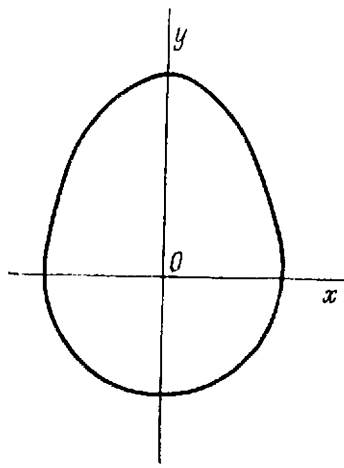


Рис. 2.8. Замкнутая кривая зависимости y от x , описываемая уравнением (2.6).

Здесь можно вернуться к выводу уравнений (2.5) и возразить, что предположения, сделанные при их выводе, настолько жесткие, что с самого начала делают применение этих уравнений невозможным. Например, легко показать, что исходные уравнения (2.1)—(2.3) не имеют колебательных решений, если $n = 1$, и что колебания возникают только потому, что не включены члены, описывающие распад соединений в соответствии

с законом действующих масс. Однако в целом ясно, что если детерминированные уравнения учитывают стохастические свойства и временные запаздывания, так что параметры a и e могут случайным образом флуктуировать, то ранее устойчивая система может стать неустойчивой, проявляя колебательные свойства. Тайвери и Фрэзер (Tiwari, Fraser, 1973) недавно показали, что именно это и происходит с уравнениями (2.1) — (2.3), когда учитываются неизбежные шумы и случайные задержки внутриклеточных молекулярных событий с помощью введения элемента случайности в процесс перемещения мРНК от гена (ДНК) к рибосоме, процессы деградации макромолекул и трансляции. Таким образом, уравнения (2.5), «встроенные» в вероятностный ансамбль статистической механики, могут дать довольно точное описание внутриклеточных процессов.

Есть, однако, более существенное возражение. Оно состоит в том, что такие методы по существу сводятся к операциям усреднения, которые для современного биологического исследования имеют ограниченную ценность. Нас интересует главным образом упорядоченность, являющаяся результатом порядка, а не упорядоченность, возникающая из беспорядка, как это предположил Шредингер в своей очень интересной и до сих пор не утратившей своего значения монографии «Что такое жизнь?» (Schrödinger, 1948). Основная идея этой книги состоит в том, что статистическая механика оказывается моделью, не соответствующей биологическим процессам, потому что упорядоченность организма обусловлена не усреднением по большому числу элементарных событий, а определяется динамическим сопряжением особого рода, позволяющим избежать диссипации энергии в виде тепла или теплового шума. Однако анализ свойств таких динамически упорядоченных систем нельзя считать несовместимым с постулатами статистической механики, и Марковицем (Markowitz, 1971), Мак-Кларом (McClare, 1971), Корнекером (Kornacker, 1972) и Марковицем и Нисбетом (Markowitz, Nisbet, 1973) в этом плане проведены исследования сопряженных упорядоченных биологических систем. Довольно общий подход к изучению упорядоченности в биологии с точки зрения термодинамики был разработан Глансдорфом и Пригожиным (Glandsdorff, Prigogine, 1971), которые ввели понятие, названное ими диссипативной структурой; это такая структура, которая поддерживает свою упорядоченность, утилизируя или диссипируя энергию. Речь идет, конечно, об открытой системе, с которой познакомили биологов фон Берталанфи (von Bertalanffy, 1952) и другие исследователи более чем два десятилетия назад. Результат работы Пригожина и его коллег состоит в том, что они показали, каковы некоторые необходимые термодинамические условия существования отдельных классов динамических

свойств в системах, далеких от равновесия. Но в их анализе отсутствует термодинамическое (макроскопическое) описание этих диссипативных структур. Аналитические методы феноменологического описания стационарных состояний динамически упорядоченных открытых систем были разработаны лишь сравнительно недавно, да и то не все из них являются бесспорными. Я рассмотрю их приложение к некоторым биологическим процессам в последней главе.

Аналогия с вычислительными машинами: клетка как конечный автомат

Рассмотрение взаимодействия эпигенетических цепей управления, основанное на представлении о процессах генетического контроля как о логических переключающих цепях, на первый взгляд представляется подходом, полностью противоположным использованному выше для анализа поведения клеток. Предположение, что активность генов можно рассматривать в терминах таких бинарных элементов типа «да-нет», высказывалось в нескольких работах (например, Monod, Jacob, 1961; Sugita, 1963; Apter, 1966). Однако систематический анализ свойств больших ансамблей таких единиц был впервые проведен Кауфманом (Kauffman, 1969), получившим ряд очень интересных результатов. Предположения, сделанные Кауфманом при конструировании модели эпигенетического поведения в виде сети функционально взаимодействующих генов, состояли в следующем:

1. Ген или включен, или выключен, и поэтому ему может быть приписано число 1 или 0 соответственно.

2. Каждый ген имеет только два «входа», т. е. управляется только двумя метаболическими сигналами (например, *lac*-оперон реагирует на репрессор и на цАМФ, как показано на рис. 2.3). Это требование можно сделать менее жестким, т. е. допустить, что число входов мало, практически не повлияв на результат.

3. Входы могут быть положительными и отрицательными (опять по аналогии с *lac*-опероном, где репрессор обладает ингибирующим, а цАМФ стимулирующим действием), а расположение входов и соединений относительно генов случайно. Поэтому исследуемые сети сконструированы случайным образом и имеют примерно одинаковое количество из всех возможных комбинаций входов и соединений.

Используя эти основные положения, можно представить поведение гена с помощью таблицы переходов между состояниями следующим образом. Предположим, мы рассматриваем ген X с входами из генов Y и Z . Эти входы, конечно, связаны не прямо с генами, а через их продукты (репрессор является продуктом гена i , а цАМФ — продуктом гена, кодирующего аденилатцик-

лазу). Время квантуется единичными шагами такой логической машины или автомата, поэтому мы можем представить переход между состояниями гена X так, как сделано на рис. 2.9. Пары возможных значений входных сигналов в момент T приведены в колонках под переменными Y и Z , а значения для X , соответствующие этим входным сигналам в момент времени $T+1$, — под переменной X . Таблица построена для *lac*-оперона с Y , соответствующим гену i , и Z — гену, кодирующему аденилатциклазу. *Lac*-оперон активен только в том случае, если репрессор

T		$T+1$
Y	Z	X
0	0	0
0	1	1
1	0	0
1	1	0

инактивирован ($Y=0$) и присутствует цАМФ ($Z=1$). Эта таблица определяет функцию, известную под названием бóлевой функции бинарных переменных Y и Z

$$X = f(Y, Z).$$

Для изображения логических функций такого рода вместо графиков используются таблицы.

Рис. 2.9. Бóлевая функция, используемая для описания переключения структурных генов *lac*-оперона в ответ на входные сигналы, полученные в результате активности гена $i(Y)$ и гена, управляющего образованием аденилатциклазы (Z); X представляет собой активность структурных генов.

Очевидно, по-разному размещая нули и единицы в колонке под X , можно получить множество бóлевых функций двух переменных. Поскольку число возможных мест в колонке равно 4 и для каждого из них существует выбор из двух переменных, полное число бóлевых функций двух переменных равно

$$2 \times 2 \times 2 \times 2 = 2^4 = 16.$$

Сеть взаимодействующих генов конструируется путем выбора некоторого числа генов, скажем $N=100$, и присвоения каждому гену случайным образом одной из 16 возможных бóлевых функций. Затем ге-

нам приписываются входы с помощью случайного выбора из общего числа генов, причем если данный ген выбирается несколько раз, то считается, что он выступает в качестве входа для нескольких других генов. В случае N генов состояние сети в любой момент времени будет задаваться вектором, состоящим из ряда N нулей и единиц в порядке нумерации генов. Число возможных состояний сети равно, очевидно, 2^N . Начиная с некоторого начального момента, скажем, когда все гены выключены (0), сеть последовательно пройдет через ряд определенных состояний, согласно правилам перехода (бóлевым функциям), приписанным каждому гену. Таково поведение множества подобных сетей, исследованных Кауфманом с помощью ЭВМ.

Может показаться, что такое исследование не имеет никакого явного смысла. Для $N = 100 \cdot 2^N$ — очень большое число; такие сети имеют множество возможных состояний и, как предполагают, переходят из одного состояния в другое случайным образом. Поскольку сети являются конечными автоматами, совершаемые ими циклы должны иметь конечный период, который может быть, однако, очень большим — до 2^{100} шагов. В действительности это и есть тот результат, который получается, когда число входов на ген равно N , числу генов. Как отмечает Кауфман, если для перехода между состояниями необходима 1 мкс, то время, в течение которого сеть проходит полный цикл, равно примерно 10^7 , умноженному на возраст Вселенной, оцененный Хабблом. Никакая биологическая система не имеет в своем распоряжении такого большого времени.

Было показано, что сети с одним входом на элемент имеют только несколько меньшие времена цикла. Поэтому, когда Кауфман обнаружил, что при числе связей на элемент, равном $2 (K = 2)$, получаются малые продолжительности цикла, причем среднее значение было порядка $\sqrt{N}$, этот результат показался удивительным. Так, для $N = 100$ среднее время цикла равно десяти единицам. Если каждая единица равна 1 мин, то среднее время цикла — 10 мин.

Здесь нам необходимо снова рассмотреть биологическую систему и попытаться сделать некоторые оценки величины N и времени перехода. N — число генов в клетке, а время перехода — время, необходимое для активации гена и получения заметного метаболического ответа. Мы уже оценили, что время перехода варьирует от нескольких минут до одного часа. Для единичных ответов типа рассматриваемых мы можем принять, что это время равно примерно 10 мин.

Оценка числа генов в клетке значительно менее надежна. Для бактерий эта величина равна $\sim 10^3$, а для высших — 10^4 — 10^5 .

Возьмем $N = 10^4$. Тогда для временного шага, равного 10 мин (по оценкам Кауфмана, эта величина равна 1 мин, что скорее всего слишком мало для клеток многоклеточных), средние времена циклов равны $10 \cdot \sqrt{10^4} = 10^3$ мин, или 16,6 ч. Эта величина лежит в том же временном интервале, что и оценки для периодов колебаний в эпигенетической системе, и попадает в диапазон длительностей клеточных циклов многоклеточных. Кауфман применил свои рассуждения к длительности клеточных циклов в клетках различных типов, связывая их с общим содержанием ДНК. Ясно, что основания для этого весьма шатки, и мне кажется, что вдаваться в детали его подхода не следует. Что же на самом деле интересно, так это замечательное

сближение двух подходов к явлению ритмической активности в эпигенетической системе и ожидаемому диапазону значений периода. По-видимому, внутриклеточная динамика процессов управления генами включает колебательную активность, и следствием этого является ритмическое поведение клеток, такое, как клеточный цикл и биологические часы. Интересная особенность подхода Кауфмана состоит в том, что система не нуждается ни в какой специальной конструкции, большинство случайных сетей будут обладать устойчивым циклическим поведением с разумными длительностями цикла. Этот момент очень важен для понимания того, как возникает порядок из неупорядоченности. Это имеет большое эволюционное значение и вводит, таким образом, соображения, касающиеся статистического построения, которые очень интересным образом дополняют статистические динамические подходы, рассмотренные ранее.

Подход Кауфмана к эпигенетическим процессам представляется разумным в аспекте универсальности конструкции, но в плане возможностей применения математического анализа он очень слаб. Это в точности противоположно вышерассмотренному статистическому динамическому приближению, где анализ возможен, но только за счет всеобщности характера взаимодействий. Более поздние исследования Гласса и Кауфмана (Glass, Kauffman, 1973) показали, однако, как можно подойти к анализу рассматриваемой модели. Помимо того, Кауфман (Kauffman, 1973) очень интересно развил свои собственные первоначальные идеи. При применении идеи о переключающихся цепях к изменениям эпигенетического состояния, связанного с явлениями детерминации и трансдетерминации у *Drosophila* (Hadorn, 1966), из рассмотрений вероятностей перехода между состояниями в имагинальных дисках *Drosophila* был сделан ряд интересных выводов, касающихся пространственных границ в развивающемся эмбрионе насекомого. То, что такие выводы удалось получить из модели эпигенетических управляющих процессов, основанной на простом фундаменте булевой логики, указывает на скрытую мощь этого подхода, а также на творческую фантазию Кауфмана и четкость его работы.

МИТОТИЧЕСКИЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛЫ

Прокариоты

В метаболической системе клетки, описанной в гл. 2, концентрации ферментов, входящие в уравнения как параметры, остаются постоянными в течение времени порядка времен релаксации метаболических систем. В эпигенетической же системе активности ферментов и концентрации мРНК и рРНК становятся переменными, подобно концентрациям метаболитов, в то время как «концентрации» генов остаются постоянными, определяя некоторые из параметров. В следующем приближении «концентрации» генов считаются изменяющимися и основное внимание уделяется управлению репликацией ДНК и связанным с этим явлениям в митотическом и клеточном циклах. Как показано в гл. 2, длительности митотического цикла и эпигенетических процессов сильно перекрываются, поэтому проводить различие между ними на основании характерных времен релаксации нецелесообразно. К тому же мы увидим, что управление репликацией ДНК, по-видимому, происходит в основном согласно тем же принципам, что и регуляция активности генов. Это не удивительно, так как ДНК является не более чем одним из видов макромолекул. Поэтому мы включим митотический и клеточный циклы в категорию эпигенетических управляющих процессов. Будем считать, что запас генетической информации остается неизменным, т.е. исключаются мутации и такие процессы, как кроссинговер, инверсии, дупликации и т.д., которые могли бы влиять на объем генетической информации и ее доступность. Эти процессы рассматриваются как источник изменений на следующем уровне функционального анализа клеток и организмов, определяя генетическую систему в целом. Я не буду останавливаться на них подробно, потому что эти процессы, по-видимому, подчиняются принципам, совершенно отличным от принципов регуляции активности: согласно существующим представлениям, изменения в генетической информации рассматриваются только как результат чисто случайных событий, которыми клетки и организмы управляют незначительно или не управляют совсем.

Я остановлюсь сначала на клеточном цикле прокариотов ввиду его сравнительной простоты и наличия достаточно

детальной информации, позволяющей построить молекулярную модель. Так как цикл не имеет ни начала, ни конца, исходная точка должна выбираться согласно некоторому функциональному критерию, который надежно отражает существенную особенность внутриклеточного процесса. Цикл развития бактерий имеет две такие точки: первая — момент разделения двух дочерних клеток и вторая — момент инициации репликации ДНК. Хотя первая из них удобнее с точки зрения эксперимента, вторая оказывается функционально более адекватной. Отклонения в инициации репликации ДНК значительно меньше, чем во времени начала разделения клеток; это указывает на то, что первый процесс гораздо более критичен для клеток, чем второй.

До сих пор мы совсем не говорили о пространственной структуре и цитологии клеток, если не считать краткого упоминания о мембране в связи с *lac*-опероном. Характерная особенность подхода к функционированию клеток, основанного на теории управления, состоит в том, что, поскольку речь идет о динамике клетки, очень важной переменной является время; понятие же пространства в таком подходе практически отсутствует. Клетку можно рассматривать как сферу, ограниченную мембраной, и считать, что все составные части — ДНК, РНК, белки и метаболиты — равномерно распределены внутри этой сферы. Но начиная с момента, когда речь идет о клеточном цикле, необходимо ввести некоторые минимальные пространственные ограничения. Эти ограничения станут более значительными позже, в связи с процессами развития, когда вместо обыкновенных дифференциальных уравнений должны будут использоваться уравнения поля, включающие пространственные переменные. В данный момент отметим только, что в популяциях бактерий, растущих в однородных благоприятных условиях, клетки имеют одинаковые размеры в любой исходной точке клеточного цикла, показывая, что они способны в каком-то смысле измерять свой собственный объем и разделять его на примерно равные половины при делении. Бактерии, преимущественно используемые для изучения клеточного цикла, — *E. coli* и *Salmonella typhimurium* — по форме близки к цилиндрам и растут вдоль продольной оси. Первый признак разделения — это появление кромки, названной перегородкой, которая идет по поверхности цилиндра на уровне середины продольной оси. Положение этой перегородки, по-видимому, точно контролируется, так что клетка имеет некоторую пространственную информацию, которую она использует для определения локализации этой структуры (Walker, Pardee, 1968).

Нормальные временные связи между репликацией ДНК и клеточным делением могут изменяться под действием различных факторов, показывая, что эти события не связаны причин-

но каким-либо жестким образом. Например, бедная среда, отсутствие Mg^{2+} , пенициллин, кристаллический фиолетовый, ультрафиолетовое и рентгеновское излучение — все это препятствует формированию перегородки и поэтому останавливает клеточное деление, а репликация ДНК и общий рост продолжают. В результате формируются очень длинные клетки в виде нитей. Репликацию ДНК можно разобщить с ростом также и с помощью митомицина С, фенетола или при исключении из инкубационной среды тимина; при этом происходит значительный рост клеток, а ДНК не синтезируется (Pardee, 1968). Существуют мутанты, в которых клеточное деление и разъединение дочерних клеток продолжают в отсутствие репликации ДНК; при этом образуются клетки, не содержащие ДНК. Такие клетки не могут, конечно, жить очень долго (Adler et al., 1967; Inoue, 1969). Все эти факты показывают, что периодические явления инициации репликации ДНК и инициации формирования перегородки способны к автономной цикличности; таким образом, они имеют свои собственные механизмы управления или же оба процесса управляются с помощью внешнего осциллятора.

Так как бактериальная хромосома представляет собой замкнутую кольцевую ДНК длиной около 1,3 м, то, по-видимому, разумно было бы предположить, что в основе биологических часов лежит циклическое движение процесса репликации по хромосоме со скоростью, пропорциональной скорости роста бактерии. Однако есть данные, которые решительно противоречат этому (Yoshikawa, 1967). Быстро растущие бактерии повышают общую скорость репликации ДНК не увеличением скорости включения в точку роста, а увеличением числа растущих точек, иницируя второй цикл репликации прежде, чем закончится первый. Таким образом, часы должны скорее иметь характер осциллятора, управляющего событиями инициации с помощью циклических изменений концентрации, а не представлять собой автоматическое перемещение по замкнутой направляющей. Далее, по-видимому, разумно было бы предположить, что аналогичный осциллятор управляет началом создания перегородки и что между этими двумя осцилляторами в норме существует определенный сдвиг по фазе. В результате этого сдвига образование перегородки начинается после прекращения репликации ДНК, а затем до самого деления проходит время 20 мин (так называемый D-период) (см. работу Helmstetter, Cooper, 1968). Нормальный период времени, необходимый для полной репликации хромосом, С, составляет около 40 мин независимо от скорости роста (Helmstetter, Pierucci, 1968). Эти величины определяют момент инициации репликации ДНК в клетках, растущих с любой данной скоростью. Например, если время удвоения клетки равно 30 мин, то репликация ДНК заканчивается за

20 мин до деления, а инициация происходит за 40 мин до этого, так что инициация репликации хромосом, разделенных между дочерними клетками, совпадает с делением, приведшим к образованию их прародителей. Очевидно, инициации должны происходить в клетках такой культуры каждые 30 мин. Если время генерации изменяется до 50 мин, то инициация реплика-

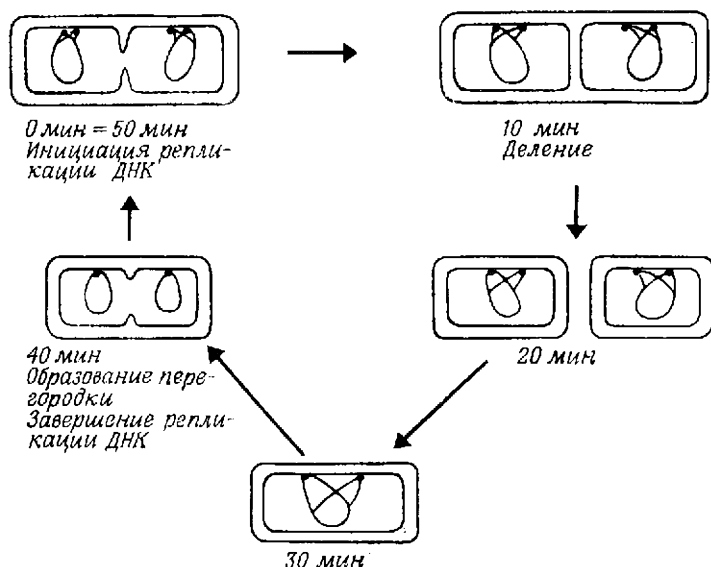


Рис. 3.1. Схематическое изображение клеточного цикла бактерий, показывающее распределение во времени процессов инициации репликации ДНК, возникновения перегородки и деления клетки в 50-минутном цикле.

ции ДНК для дочерних клеток происходит за 60 мин до их разделения, т. е. за 10 мин до деления, приводящего к образованию родительской клетки. Таким образом, мы видим, что репликация ДНК может иницироваться в любой момент клеточного цикла, но этот момент для любого заданного времени генерации будет фиксирован.

Эти структурные и временные отношения для 50-минутного клеточного цикла схематически представлены на рис. 3.1. Инициация репликации ДНК происходит в нулевой момент времени (такое же состояние, как при 50 мин) и отмечена появлением второй точки на мембране, примыкающей к месту прикрепления каждой хромосомы. Этот участок определяет начало хромосомы, репликация ДНК иницируется здесь и продолжается в обоих направлениях до тех пор, пока две репликационные вилки не достигнут терминальной точки, расположенной примерно

напротив начала (Masters, Broda, 1971). Поскольку репликация и рост продолжают, эти участки из-за роста мембраны раздвигаются, разное, таким образом, дочерние хромосомы в разные стороны. Впервые это было показано Жакобом, Райтером и Кузиным (Jacob, Ryter, Tuzin, 1966) при изучении *Bacillus subtilis*. Рост мембраны у прокариотов, таким образом, играет роль митотического аппарата (имеющегося у эукариотов), разделяющего дочерние хромосомы. Хромосомы, конечно, представляют собой двойные спирали, а репликация полуконсервативна, но для простоты хромосомы на рисунке изображены в виде одиночных нитей. Окончание репликации хромосом совпадает с началом формирования перегородки. Очень ясное и полное обсуждение этих процессов дано в обзорной статье Доначи, Джонса и Тизера (Donachie, Jones, Teather, 1973).

Репликон и гипотеза инициатора

Одна из первых молекулярных гипотез, выдвинутых для объяснения управления репликацией ДНК, основывалась, как и следовало ожидать, на операторно-репрессорной модели регуляции активности генов, рассмотренной в предыдущей главе. Основанием для этого послужило следующее. Было показано, что никакой фрагмент бактериальной ДНК, введенной в клетку, не обладает способностью к автономной репликации; ею обладает только функционально интегральная единица, названная репликоном. Одной из таких единиц является бактериальная хромосома, но существуют и другие, такие, как половой фактор *E. coli* и умеренные бактериофаги. Каждая из них содержит информацию, необходимую для собственной репликации, и поэтому составляет единицу управления. Тогда должны существовать мутанты, у которых управление тем или иным способом нарушено. Такие мутанты были обнаружены Жакобом, Бреннером и Кузиным (Jacob, Brenner, Suzin, 1963), которые предложили гипотезу репликона. Они показали, что две генетически различные мутации вызывают прекращение инициации ДНК, и предположили, что один из затронутых мутацией генов ответствен за производство белка, необходимого для инициации синтеза ДНК, а другой связан с прикреплением ДНК к клеточной мембране, что необходимо для репликации. Первый ген был назван геном-инициатором, а второй — геном-репликатором и, как считалось, определял начало хромосомы. Согласно этим представлениям, цепь управления действует по принципу положительной обратной связи, причем предполагается, что один раз в каждом цикле репликации гены, инициатор и репликатор, становятся активными, что приводит к синтезу белков, необходимых для следующего цикла инициации. Несовершенство этой

гипотезы очевидно, поскольку она не объясняет ни того, что именно управляет синхронизацией активности этих генов, ни того, как частота их активности связана с клеточными временами генерации. Модель, рассматривающая эти моменты, предложена Сомпейраком и Малё (Sompayrac, Maalfe, 1973).

В связи с притоком физиков в биологию в конце 50-х и начале 60-х годов были введены представления об «элементарных частицах» клеточных функций, названия которых образованы неологизмами с суффиксом «он», в соответствии с употреблением этого суффикса в физике, как, например, в терминах фотон, электрон, позитрон и т. д. Придумывание названий для новых единиц, таких, как мутон, цистрон, зимоц, стало довольно популярным развлечением в молекулярной биологии; одной из таких единиц является и репликон. В сообщении в *Journal of Theoretical Biology* сразу после введения понятия «репликой» указывалось, что для того, чтобы наши представления о клеточной организации обрели законченность, нужна еще только одна единица — лепрекон¹. С ее введением стали бы понятны все аспекты клеточного поведения. На основании современных данных представляется, что в отличие от прокариотов, которые имеют только по одному лепрекону, эукариотические клетки должны иметь много таких единиц, так что концепция не только завершает картину для бактерий, но и одновременно дает полное объяснение до тех пор загадочного поведения регулярных процессов у эукариотов.

Гипотеза репрессора инициации

Гипотеза репликона основана на том факте, что для инициации репликации ДНК необходимы какие-то белки. То, что такие белки должны существовать, вряд ли удивительно, но из этого ни в каком случае не следует, что они играют роль нормальных внутриклеточных регуляторов инициации. Возможно, их присутствие — это просто необходимое условие инициации аналогично тому, как наличие фермента в клетке является необходимым условием протекания реакции с заметной скоростью. Как мы видели, сами ферменты не выступают при этом в роли управляющих сигналов в метаболической или эпигенетической системах. Следовательно, наличие инициаторных и репликаторных мутантов отлично согласуется с тем, что окончательное управление инициацией репликации ДНК связано с другим белком, действующим как репрессор инициации. Такая модель находит-

¹ Лепрекон (leprechaun; ирландский фольклор) — дух в виде маленького хитрого старичка, который, будучи пойманным, может открывать клады. — *Прим. ред.*

ся в большем соответствии с исходной репрессорно-операторной моделью, чем гипотеза инициатора. Она также дает нам идею способа, которым клетка может измерять свой собственный объем.

Притчард, Барт и Коллинз (Pritchard, Barth, Collins, 1969) высказали предположение, что каждый репликон имеет ген, который кодирует белок, способный предотвращать инициацию репликации ДНК путем взаимодействия или с инициатором, или непосредственно с хромосомой; этот белок работает, следовательно, как репрессор инициации. Они предположили, что ген локализован в ДНК сразу после центра инициации (постулированный ген-репликатор), который для любого данного штамма бактерии находится в фиксированной точке хромосомы. Вскоре после начала репликации ДНК этот ген-репрессор удваивается, и, как предполагается, происходит вспышка синтеза мРНК. Трансляция этой мРНК приводит к появлению белка-репрессора Н, который предотвращает следующий цикл инициации репликации ДНК. Репликация в этом случае происходит с нормальной для нее скоростью, и клетка растет со скоростью, зависящей от условий питания. Концентрация репрессора инициации по мере роста клетки будет уменьшаться, так как предполагается, что после недолгой вспышки синтеза репрессора, которая имеет место сразу после удвоения гена, образование репрессора прекращается и что белок устойчив. Следующий цикл репликации ДНК иницируется только после того, как концентрация репрессора падает ниже некоторого порогового значения, достигаемого при определенных размерах клетки. Таким образом, мы видим, как увеличение размеров клетки причинно связано с управлением инициаций и как клетка «измеряет» свой собственный объем. Концентрация репрессора в клетке растет и падает пилообразно, как это показано на рис. 3.2, причем инициация происходит в точках минимума. Точная форма нисходящей части кривой зависит от того, линеен или экспоненциален клеточный рост; последний вариант и представлен на этом рисунке. Как было показано выше, клеточное деление может произойти в любой конкретной точке цикла, определяемой скоростью роста. Заметим, что клеточное деление не меняет внутриклеточных концентраций и поэтому не влияет на кривую, которая изображена на рис. 3.2. Максимальное значение равно $2h_c$, где h_c — порог инициации, так как удвоение клеточного объема к моменту деления вызывает уменьшение концентрации в 2 раза согласно принятым постулатам. Из этой модели имеется ряд следствий, которые рассмотрены в статье Притчарда и др. (Pritchard et al., 1969). Одно из них — зависимость между клеточным объемом и временем генерации g , которая совершенно естественно возникает из их гипотезы. Возможность

получения такой зависимости из постоянства $C + D$ (времени репликации хромосом плюс времени образования перегородки), установленного Хельмстеттером и Купером (Helmstetter, Cooper, 1968), была впервые отмечена Доначи. Не так давно он предложил объяснение регуляции размера клеток в терминах

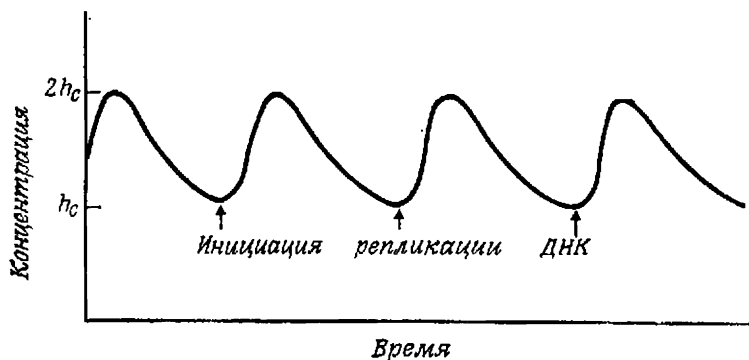


Рис. 3.2. Гипотетический осциллятор, лежащий в основе управления инициацией репликации ДНК в модели Притчарда и др. (Pritchard et al., 1969).

концепции элементарной клетки (Donachie, Begg, 1970; Donachie et al., 1973).

Выберем некоторый начальный объем бактериальной клетки и обозначим его V_n . Удобной величиной представляется объем, соответствующий клетке, которая растет со временем генерации $C + D = 60$ мин, так как такая клетка будет иметь одну пару репликационных вилок, иницированных за время каждого клеточного деления. Предположим, что рост отдельных клеток экспоненциален, так что мы можем записать

$$V = V_n \cdot 2^{t/g},$$

где g — время генерации клетки. Очевидно, для частного случая $g = 60$ мин при $t = 60$ мин $V = 2V_n$, и клетка разделится. Предположим теперь, что клетка перенесена в более богатую среду, где скорость ее роста вдвое больше и она достигает объема $2V_n$ за 30 мин, т.е. раньше, чем закончатся репликация и разделение хромосом ($C + D$). Тогда клетка не сможет разделить при объеме $2V_n$, так как репликация и разделение хромосом еще не закончены, и к моменту времени, когда ей представится возможность разделиться, достигнет значительно большего объема. Поэтому когда дочерние клетки действительно разделятся, объем их будет значительно больше, чем V_n , а именно

$$\frac{V_n \cdot 2^{(C+D)/30}}{2}.$$

Тогда объем клетки, растущей со временем генерации g , сразу после деления равен

$$V = \frac{V_n \cdot 2^{(C+D)/g}}{2}.$$

Отсюда видно, что, чем быстрее растут клетки, тем больше клеточный объем, что и обсуждалось в предыдущей главе в связи с данными, полученными Малё и его коллегами при исследовании *Salmonella typhimurium*.

Используя модель Притчарда и др., мы можем попытаться сделать еще один шаг для того, чтобы найти зависимость между V_n и концентрацией молекул репрессора инициации N в клетке. Предположим, что число таких молекул, синтезируемое в расчете на хромосому, есть a . Исходный объем в этом случае снова равен V_n — объему клетки, имеющей только одну репликационную вилку, которая иницируется каждым делением. Тогда концентрация синтезируемого репрессора равна

$$h_c = \frac{a}{V_n}, \quad (3.2)$$

так как амплитуда изменения есть h_c . Подставляя в уравнение (3.1) вместо V_n его значение из уравнения (3.2), мы получим

$$V = \frac{a}{2h_c} 2^{(C+D)/g}. \quad (3.3)$$

Таким образом, мы имеем зависимость, связывающую размеры клеток, время генерации, исходный объем и пороговую концентрацию репрессора инициации. Это стало возможным благодаря фундаментальным данным Хельмстеттера и Купера о постоянстве $(C+D)$, которое сохраняется в значительном диапазоне времен генерации, хотя и нарушается у очень медленно растущих культур.

Совершенно очевидно, что множество проблем при этих рассмотрениях остается незатронутым и формулируются только некоторые основные черты клеточного цикла прокариотов. Зависимость, установленная между временем генерации и объемом, вносит в схему управления пространственный аспект, хотя и делает это в минимальной степени. Если мы захотим нарисовать схему цепи управления репликацией ДНК, мы должны будем изобрести какой-нибудь метод представления самого процесса роста, в чем до сих пор не было необходимости. Чтобы представить логику модели Притчарда согласно принципам обратной связи, мы можем рассмотреть схему типа изображенной на рис. 3.3, используя обозначения, введенные в двух предыдущих главах.

Здесь мы изображаем рост как «конечный продукт» действия РНК и белка на питательные вещества. Кружок с R_n

обозначает мРНК репрессора инициации H , который блокирует репликацию ДНК, обозначенную двойной стрелкой. Рост инактивирует H с помощью простого процесса разведения. Ясно, что это представление неудовлетворительно, поскольку влияние роста на H не опосредуется специфическим сигналом. Использо-

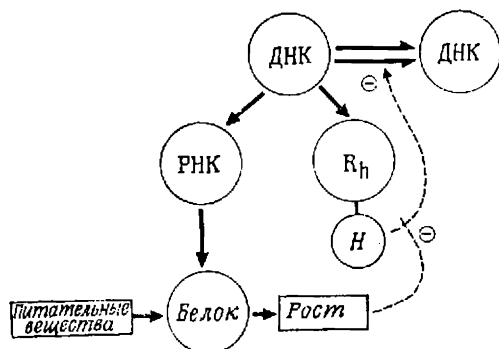


Рис. 3.3. Схема управления связью между ростом и репликацией ДНК у бактерий, основанная на модели Притчарда и др. (Pritchard et al., 1969).

ние схемы сетей управления полезно и адекватно только в том случае, если стрелки соответствуют идентифицируемым сигналам или информации, опосредованной специфическими молекулами. Поэтому мы теперь вынуждены отказаться от этого представления.

При выводе дифференциальных уравнений, описывающих динамику такой модели, влияние роста учитывается относительно простым способом. Запишем концентрацию некоторых молекул, например определенного типа мРНК, в клетке объемом V в виде

$$X = \frac{N_X}{V},$$

где N_X — число молекул мРНК в клетке. Аналогично запишем концентрацию соответствующих белков как

$$Y = \frac{N_Y}{V}.$$

Изменение Y во времени будет описываться следующим уравнением:

$$\frac{dY}{dt} = \frac{1}{V} \frac{dN_Y}{dt} - \frac{N_Y}{V^2} \frac{dV}{dt}. \quad (3.4)$$

Можно считать, что количество синтезируемых в единицу времени белковых молекул пропорционально количеству имеющихся гомологичных молекул мРНК, которое равно $N_X = XV$, пред-

полагая, как и раньше, что мРНК служит скоростью-лимитирующим фактором белкового синтеза. Поэтому, если белок устойчив,

$$\frac{dN_Y}{dt} = \alpha X V.$$

Подставляя это выражение в уравнение (3.4) и записывая Y вместо $\frac{N_Y}{V}$, мы получаем

$$\frac{dY}{dt} = \alpha X - \dot{V} Y, \text{ где } \dot{V} = \frac{dV}{dt}.$$

Если рост клеточного объема экспоненциален, то

$$\dot{V} = \mu V$$

и уравнение (3.4) сводится к

$$\frac{dY}{dt} = \alpha X - \mu Y. \quad (3.5)$$

Для неэкспоненциального роста в производную концентрации белка время входило бы явным образом. Если белок неустойчив и при этом разрушается со скоростью, пропорциональной своей собственной концентрации, в уравнении (3.5) будет присутствовать еще один член, $-\gamma Y$, так что оно примет вид

$$\frac{dY}{dt} = \alpha X - \beta Y, \text{ где } \beta = \mu + \gamma.$$

Аналогичный подход применим и к другим типам молекул; отсюда видно, что общий вид уравнений не обязательно изменяется при наличии роста, который, если он экспоненциален, входит в них как дополнительный параметр. В следующей главе мы рассмотрим уравнения как для отдельных клеток, так и для клеточных популяций, которые позволят нам исследовать детали клеточного цикла при изменяющихся условиях в культуре. А в последней главе будет представлено аналитическое исследование роста, рассматриваемого как кооперативный процесс.

Эукариоты

Цитологической основой различий между прокариотами и эукариотами является то, что последние имеют четко выраженные ядра, отделенные от цитоплазмы ядерной мембраной. Почему развилась такая органелла, неясно. Функционирование генов может вполне нормально происходить и в цитоплазме, как это и имеет место у прокариотов, и можно было бы привести доводы в пользу того, что наличие ядерного барьера действует просто как препятствие для свободного обмена информацией

между генами и остальной частью клетки. Конечно, с точки зрения управления непросто понять, зачем нужна ядерная оболочка. Однако здесь полезно принять во внимание структурные соображения, например проблему упаковки реплицированных хромосом для надежной доставки их в дочерние клетки. Если бы хромосомы были рассеяны по внутриклеточному пространству произвольно, то было бы труднее собрать их вместе для распределения между дочерними клетками при митозе. Эту проблему можно было бы решить таким же способом, как это сделано у бактерий, — присоединением хромосом к участкам мембраны и их физическим разделением при росте мембраны. Но в клетке, у которой нет выделенной оси, эта операция сильно затруднена. К тому же отсутствие в клетках животных структурной опоры в виде твердой стенки и многочисленность хромосом делают такой процесс еще более трудным. Поэтому конструкция внутреннего сортирующего устройства — митотического веретена — становится чем-то обязательным, а ядерная оболочка держит хромосомы вместе, как пачку, для того, чтобы гарантировать полную сохранность структуры вплоть до начала деления.

Однако, возможно, роль ядерной мембраны эукариотов в процессе самой генной регуляции более значительна. Постепенное усложнение генома высших организмов, по-видимому, шло путем дупликации существующих генов с последующим расхождением копий. Не все РНК, транскрибированные с этих копий, функциональны, так как очень большое количество РНК разрушается в ядрах эукариотов, очевидно никогда не играя какой-либо информационной или структурной роли. Возможно, этот непрерывный метаболизм РНК в ядрах есть необходимый элемент адаптивного потенциала этих организмов, и в таком случае ядерная мембрана играет важную роль, сохраняя РНК, так что последняя может эффективно совершать свои превращения, оставаясь в относительно высоких концентрациях. Аналогичные соображения относятся и к проблеме удержания управляющих молекул, например репрессоров, вблизи их активных центров, не позволяя им рассеиваться по всему объему эукариотической клетки. Истинная природа регуляторных молекул у эукариотов является предметом бурных дебатов, однако сравнительно недавно Наора (Naora, 1973) представил убедительные данные в пользу того, что серьезными кандидатами на роль регуляторов являются низкомолекулярные ядерные РНК. Это положение было обобщено Риннеем (Reapney, 1975), построившим смелую теорию функционирования РНК при регуляции и эмбриональной индукции у многоклеточных, в которой он дает объяснение причин быстрого метаболизма РНК в ядрах. Несомненно, у мембраны имеется множество физиологических функций, включая также и функции избирательной проницае-

мости, но наше представление об этих процессах все еще неполно и постоянно меняется. Конечно, для эукариотической клетки на современном уровне наших знаний нельзя предложить никакой сколько-нибудь надежной схемы управления. Однако это не мешает нам попытаться сформулировать некоторые простые логические принципы и на их основе построить некую общую схему, не вдаваясь в детали процессов на молекулярном уровне.

Представление клеточного цикла в виде последовательности стадий

Митотический цикл удобно рассматривать как упорядоченную во времени последовательность физиологических событий, которые в совокупности составляют полный набор процессов, происходящих между двумя митозами. Мы видели, что в бактериях существует четко выраженная упорядоченная связь между репликацией хромосомы и ростом перегородки, которая физически разделяет две дочерние хромосомы, заключая их в разные клетки. Такое временное упорядочивание необходимо для выполнения структурных требований: например, прежде чем хромосомы будут разделены между дочерними клетками, они должны дублироваться. Именно существование структурных ограничений такого типа делает необходимым появление в клетках упорядочивающих во времени процессов, периодические сигналы которых обусловлены метаболическими колебаниями того или иного рода. Как мы видели, у прокариотов последовательные циклы хромосомной репликации могут перекрываться во времени — вторая инициация происходит до того, как завершается первая репликация хромосомы. Никакие структурные ограничения таким перекрыванием не нарушаются. Однако у эукариотов фаза дубликации хромосом всегда выделена во времени, так что за один цикл происходит только одно удвоение (за исключением особых случаев, приводящих к полиплоидии, при которой осуществляется последовательная дубликация хромосом без деления клетки). Это позволяет представить цикл так, как показано на рис. 3.4. Наиболее просто физиологически идентифицируемыми частями цикла являются М — фаза митоза и S — фаза репликации ДНК. Эти фазы, или стадии, разделены другими периодами, обозначаемыми G_1 и G_2 ; в течение этих периодов происходят события, о которых до сих пор мало что известно (отсюда и их обозначение G — от слова «гар» — промежуток). Фаза G_1 по своей продолжительности сильно колеблется даже в пределах одного типа клеток (например, эпидермальные клетки мыши); длительность фаз S и G_2 обычно задана более точно и равна нескольким часам каждая, хотя существуют и исключения (например, у гидры меняется

длительность именно фазы G_2 ; David, Campbell, 1972). Фаза митоза или деления ядра короче других, и за ней обычно следует цитокинез — не показанное на схеме деление клетки на две.

Задача, стоящая перед экспериментатором, изучающим клеточный цикл эукариотов, состоит в том,

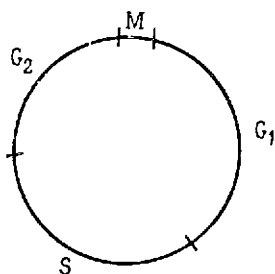


Рис. 3.4. Фазы клеточного цикла эукариотов.

чтобы выявить связь между событиями, происходящими на различных стадиях, и затем, если это соответствует его мировоззрению и философии, построить причинную модель для объяснения переходов клетки от одной стадии к другой. Стадии — это, конечно, разные состояния клетки, заданные в виде концентраций различных веществ, физических связей между ними и скоростей различных процессов, происходящих одновременно. Предел, до которого каждую стадию можно подразделять далее на составные

части или подстадии, зависит от количества информации о протекающих процессах. Пока такой информации для подразделения фаз недостаточно.

Saccharomyces cerevisiae

Очень важные данные об организации клеточного цикла эукариотов дали интересные генетические исследования дрожжей, проведенные Хартвеллом и др. (Hartwell et al., 1974). Они выделяли термочувствительные мутанты, которые при 23°C росли нормально, а при 36°C прекращали рост в некоторой определенной точке цикла. Мутанты были классифицированы в соответствии с этапами клеточного цикла, которые они могли пройти, и тогда начала вырисовываться картина причинных связей между наблюдаемыми процессами — инициацией репликации ДНК, синтезом ДНК, появлением почки, миграцией ядер, цитокинезом и т. д. Оказалось, что у дрожжей существуют две причинные последовательности: одна, связанная с внутриядерными событиями, такими, как инициация репликации ДНК, синтез ДНК и деление ядер, и другая, включающая появление почки, миграцию ядер, цитокинез и клеточное деление. В обычных условиях они связаны вместе в начале общим «стартовым» событием, а в конце — цитокинезом и клеточным делением. Однако имеются мутанты, в которых эти процессы разобщены, в результате чего, например, последовательные циклы ядерных явлений могут происходить без образования почек и цитокинеза и, наоборот, последовательные циклы образования почки могут совершаться с нормальной частотой без какой-либо корреляции

с событиями в ядре. Это совершенно аналогично разобщению хромосомных и цитоплазматических явлений, которые могут иметь место в бактериях, где последовательные циклы репликации ДНК возможны в отсутствие процессов образования перегородки и деления клетки точно так же, как последовательные циклы роста и деления у некоторых термочувствительных мутантов совершаются в отсутствие синтеза ДНК. Таким образом, мы приходим к выводу, что либо каждой периодической последовательностью управляют разные осцилляторы или часы, в норме сопряженные, либо обе они приводятся в действие одним особым осциллятором, который в этом случае должен управлять «стартовым» событием.

Physarum polycephalum

При изучении причинных связей, определяющих митотический цикл, очень полезным оказался миксомицет *Physarum polycephalum*. Во время вегетативной фазы этот организм представляет собой синцитий, непрерывную массу цитоплазмы, которая по своим размерам может достигать нескольких сантиметров и содержать миллионы ядер. В лабораторных условиях грибок обычно выращивают на кружках фильтровальной бумаги диаметром 2—3 см, насыщаемой снизу питательной средой. Особенностью этого организма, которая делает его замечательным объектом для биохимических исследований митотического цикла, оказывается непрерывность цитоплазмы, что приводит к высокой степени синхронности митозов во всех ядрах. Таким образом, мы по существу имеем дело с системой, которая ведет себя как одна очень большая клетка. Большие размеры, конечно, удобны для биохимического анализа. Исчерпывающий обзор поведения этого организма и схемы биохимических явлений, характеризующих его митотический цикл, можно найти у Раша (Rusch, 1970). Нам же для построения моделей митотического цикла нужны лишь некоторые данные о необходимых условиях, определяющих ряд зависимостей между событиями, которые происходят на различных стадиях цикла рис. 3.4.

Культуры плазмодия *Physarum* иницируют, нанося пипеткой аликвоту микроплазмодиев на фильтровальную бумагу, где они сливаются и образуют большую синцитиальную массу. Микроплазмодий *Physarum* — это грибок, растущий в условиях погруженной культуры во встряхиваемых флаконах; непрерывное перемешивание предотвращает слияние отдельных клеток. В пределах каждого микроплазмодия митозы синхронны, но между разными плазмодиями синхронность отсутствует, пока отсутствует связь. Поэтому слившиеся микроплазмодии первоначально рассинхронизированы, но приблизительно через 10 ч

после соединения наблюдается 99%-ная синхронность митозов на протяжении всего синцития. Сильная вариабельность длительности фазы G_1 у эукариотов подчеркивается тем фактом, что у *Physarum* этой фазы не существует вообще; синтез ДНК начинается непосредственно после телофазы, последней стадии фазы M , и продолжается около 3 ч. За этим следует фаза G_2 длительностью от 5 до 7 ч при 26°C , когда миксомицет выращивается на обедненной среде. Митоз продолжается около 20 мин, поэтому полное время цикла — от 8 до 10 ч.

Является ли репликация ДНК необходимым условием митоза у *Physarum*? На этот вопрос можно получить довольно четкий ответ. Когда происходит слияние маленького плазмодия, находящегося в S -фазе, с большим плазмодием, как раз готовым вступить в митоз, то митоза ядра маленького плазмодия все равно не происходит. Значит, для того чтобы начался митоз, репликация хромосом должна быть завершена. Это предположение подтверждается тем фактом, что задержка репликации ДНК с помощью 5-фтордезоксисуридина задерживает митоз на одно и то же время. Снятие ингибирования приводит к митозу спустя приблизительно 6 ч, показывая, что шестичасовая фаза G_2 — также необходимый этап подготовки к митозу. Однако ядра, которые завершили синтез ДНК, могут немедленно вступить в митоз, если их перенести в плазмодии, находящиеся в конце периода G_2 ; следовательно, в фазе G_2 идет главным образом подготовка цитоплазмы к митозу. Эту стадию подготовки к митозу можно подавить вплоть до 20 мин перед митозом тепловым шоком (30 мин при 38°C), который вызывает задержку, пропорциональную времени пребывания плазмодия в периоде G_2 . Менее чем за 20 мин до митоза тепловой шок приводит к абортному митозу из-за разрушения митотических веретен; хромосомы при этом не разделяются и ядра входят снова в S -фазу и становятся после псевдомитоза тетраплоидными.

Культуры, инициированные в разное время и поэтому в разные фазы митотического цикла, можно заставить соединиться друг с другом, что позволяет поставить эксперименты по слиянию так, чтобы можно было найти основные соотношения между различными стадиями цикла. Если принять гипотезу, аналогичную гипотезе инициатора в управлении репликацией ДНК, то можно предположить, что слияние плазмодия в S -фазе с плазмодием в G_2 -фазе приведет к преждевременному началу репликации ДНК в ядрах последней. Однако этого не происходит — факт, который противоречит данным, полученным на *Amoeba proteus* (Prescott, Coldstein, 1967), и опытам по слиянию HeLa-клеток и куриных эритроцитов (Harris, 1967). Если принять гипотезу инициации репрессорного типа, то можно предположить, что если ядра в S -фазе перенести в плазмодий

в фазе G_2 , то ядра приостановят репликацию ДНК, так как они теперь будут находиться при сверхпороговой концентрации репрессора. Это предположение также не подтвердилось: ядра в фазе S продолжали включать 3H -тимидин в цитоплазме с фазой G_2 . Однако при ближайшем рассмотрении оказывается, что эти результаты не являются неожиданными. Если в *Physarum* имеется белок-инициатор, вскоре после синтеза он израсходуется или разрушится, так что грибки в S-фазе не обязательно будут иметь дополнительный инициатор после самых ранних стадий репликации ДНК. Аналогично репрессоры инициации будут эффективно ингибировать только процессы, связанные с самым началом S-фазы. Как только хромосомы начали репликацию, они вполне могут вести себя автономно. Действительно, твердо доказано, что имеется высокоупорядоченная последовательность событий, управляющая репликацией каждой отдельной хромосомы эукариотического ядра, — различные части хромосомы реплицируются в определенной последовательности. Эти хромосомы, конечно, намного сложнее, чем бактериальная хромосома, состоящая из множества (около 10^3) отдельных реплицирующихся единиц или «репликонов», каждый из которых, вероятно, синтезируется как единое целое. Единицы в пределах одной эукариотической хромосомы начинают свою репликацию в определенной последовательности, и, возможно, это происходит автономно, как только получен первый сигнал для репликации хромосомы. Этот первый сигнал в целом плазмодии может быть очень коротким и является следствием либо того, что концентрация инициатора выросла выше порогового значения, либо того, что концентрация репрессора упала ниже порога. Чтобы сделать выбор между этими двумя возможностями, требуются тщательные эксперименты по выбору времени слияния. Такие эксперименты недавно были поставлены Заксенмайером, Реми и Плэттнер-Скоубелом (Sachsenmaier, Remy, Plattner-Schobel, 1972), а также Кауфманом и Вилле (Kaufman, Wille, 1975), что позволило получить важные данные о природе системы управления митозом в этом организме.

Заксенмайер и др. использовали плазмодии, фазовый сдвиг между которыми всегда составлял 6 ч (половину 12-часового цикла этих культур), и соединяли их в различные фазы цикла. Они обнаружили, что если в одном плазмодии, скажем А, прошло от 0 до 6 ч после митоза, а во втором, В, от 6 до 12, то слияние всегда приводит к задержке развития В и ускорению развития А. Величина задержки всегда приблизительно одна и та же, около 30 ч, что составляет половину разности фаз между культурами. Если, с другой стороны, в плазмодии А прошло от 6 до 12 ч после митоза, а в В — от 0 до 6 ч, то результатом слияния являются задержка развития А и ускорение развития В,

как и ожидалось, так как состояния А и В просто поменялись местами. Из этих данных Заксенмайер и др. сделали вывод, что митоз управляется диффундирующим веществом, концентрация которого меняется пилообразно, т.е. так, как ведет себя концентрация репрессора инициации в предложенной Притчардом и др. модели управления инициацией синтеза ДНК у бактерий. Однако Заксенмайер и его коллеги предположили, что вещество, контролирующее митоз в *Physarum*, — это митоген, концентрация которого достигает своего максимума при митозе, а затем быстро падает до минимума за счет расходования или разрушения во время митоза. Таким образом, эта гипотеза предполагает положительное управление митозом, т.е. она аналогична теории инициатора в управлении репликацией ДНК. Соображения, на которых строится это утверждение, вытекают из более ранних работ Брюера и Раша (Brewer, Rusch, 1968), в которых было показано, что 30-минутные тепловые шоки (38°C) в культурах *Physarum*, растущих при 26°C, вызывали задержки во времени достижения митозов, и эти задержки росли от 15 мин при шоке за 6 ч до митоза до 2 ч при шоке за 2 ч до митоза. Затем задержка резко уменьшалась. На основании этих данных было высказано предположение, что термолabile вещество, по-видимому белок, накапливается в *Physarum*, когда гриб готовится к митозу, и затем используется при митозе; отсюда и был сделан вывод о существовании митогена.

Ни гипотеза митогена, ни гипотеза пилообразных релаксационных колебаний не следует с необходимостью из этих данных. Действие теплового шока можно объяснить, например, инактивацией фермента, разрушающего малую молекулу, действующую как корепрессор в регуляции митоза. В этом отношении было бы интересно поставить опыты по синхронизации на грибах, разделенных фильтрами с определенными размерами пор, для того, чтобы получить некоторое представление о молекулярном весе вещества — сигнала связи.

Постулат о пилообразной (релаксационной) ф́орме колебаний осциллятора основывается на том, что имеется скачок от задержки по фазе к опережению по фазе, который происходит при переходе через митоз, как описано выше. Однако можно предположить, что такой разрыв возникает при слиянии систем с любым периодическим сигналом управления только в силу свойств предельного цикла. Этот вывод следует из элегантного качественного исследования колебаний, имющих характер предельного цикла, выполненного Винфри (Winfree, 1970, 1971) при работе с биологическими часами (см. гл. 4). Кауфман и Вилле (Kauffman, Wille, 1975) использовали этот анализ для разработки экспериментального метода идентификации некоторых основных характеристик митотического осциллятора *Phy-*

sarum. И хотя основные принципы этого анализа будут рассмотрены позже (при обсуждении работы Винфри о часах у *Drosophila*, контролирующих вылупление личинок), применительно к *Physarum* стоит остановиться на данном вопросе именно здесь, так как используемые при этом представления все

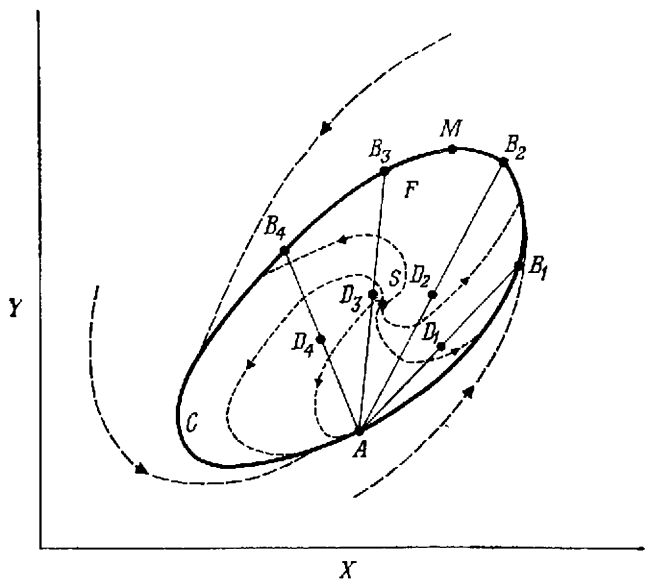


Рис. 3.5. Предельный цикл с наматывающимися траекториями, предложенный Кауфманом и Вилле (Kauffman, Wille, 1975) для объяснения регуляции митотического цикла у *Physarum polycephalum*, и предсказание результатов экспериментов по слиянию.

еще относительно непривычны в биологии, а я думаю, что они имеют наиболее важное значение в изучении периодических процессов.

Согласно гл. 1, устойчивый предельный цикл — это замкнутая кривая, которая является асимптотическим пределом траекторий процесса, развивающегося во времени. Пример двумерного предельного цикла показан на рис. 3.5, где приведены траектории, разматывающиеся к замкнутой кривой, *C*, из неустойчивой особой точки *S*, и траектории, наматывающиеся на цикл снаружи. Применяя эту картину к митотическому циклу *Physarum*, мы идентифицируем *X* и *Y* как два основных вида молекул, включенных в колебания, управляющие инициацией митоза; одной из этих молекул может быть митоген. У нас есть две переменные, потому что минимальное число, которое может породить предельный цикл, равно 2. Даже колебательный

процесс, представленный на рис. 3.2, фактически есть предельный цикл, так как для описания процесса использованы две переменные — концентрации мРНК и репрессора. Если построить график зависимости одной из них от другой, то мы получим картину, напоминающую представленную на рис. 3.6. Тот факт, что мРНК, как предполагается, синтезируется очень коротким импульсом и затем распадается, означает, что части цикла, отмеченные словом «быстро», проходятся очень быстро, в то время как другая часть цикла представляет собой медленное разбавление репрессора в результате роста клетки. Рассмотр-

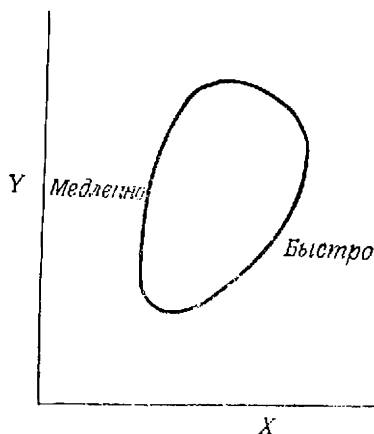


Рис. 3.6. Предельный цикл, управляющий клеточным циклом бактерий, в модели Притчарда и др. (Pritchard et al., 1963). Здесь X = мРНК репрессора инициации (H); $Y \equiv H$.

рим, как можно было бы представить слияние грибков разного относительного возраста в соответствии с рис. 3.5. Пусть точка A представляет собой состояние осциллятора, управляющего митозом, в данный момент до начала митоза. Если плазмодий в таком состоянии сольется с плазмодием, представленным точкой B_1 , расположенной ближе к митозу (точка M на кривой), то их цитоплазмы объединятся и система окажется в некотором промежуточном состоянии между A и B_1 , представленном точкой D_1 на хорде AB_1 . Это, конечно, только качественное геометрическое представление. Слившиеся грибки затем будут двигаться по траектории, которая проходит через D_1 , вернуться на предельный цикл в некоторой точке, промежуточной между точками, представляющими состояния первоначальных грибков A и B_1 , если предельный цикл у них остался ненарушенным. Таким образом, если промежуток между A и B равен 3 ч и B_1 опережает A , то можно ожидать, что слившаяся пара вступит в митоз часа через полтора после момента времени, ожидае-

мого для B_1 , в предположении, что D_1 находится на равном расстоянии от A и B_1 .

Допустим теперь, что A фиксировано, так что один плазмодий всегда в момент слияния находится в одном и том же состоянии, а состояние другого изменяется и представляется точками B_2, B_3, B_4 . Тогда для предсказания результата слияния можно использовать один и тот же подход. Вскоре после слияния плазмодии окажутся в состояниях D_2, D_3, D_4 . Из D_2 плазмодий вернется на предельный цикл по траектории, проходящей через D_2 , и это приведет ее к точке, расположенной между предполагаемыми состояниями плазмодиев A и B_2 . Это опять дает запаздывание для B_2 и опережение по фазе для A . Однако в случае состояний A и B_3 , дающих при слиянии D_3 , возвращение на предельный цикл происходит в точке между A и B_3 , лежащей на противоположной стороне от особой точки S . В этом случае можно сказать, что митоз плазмодия A задерживается, а B_3 ускоряется; то же верно и для A и B_4 . Разрыв, таким образом, обусловлен существованием особенности S , неустойчивого фокуса внутри предельного цикла. Зная точные координаты точки, в которой происходит разрыв, можно сделать некоторые выводы относительно формы предельного цикла и расположения S , так как координаты показывают, насколько симметрично расположен цикл относительно фокуса. Этим методом можно оценить время, затрачиваемое на прохождение различных частей цикла. Кауфман и Вилле (Kauffman, Wille, 1975) назвали рассматриваемое явление разрывом дуги и с его помощью нашли форму постулированных колебаний, управляющих митозом у *Physarum* (см. также Kauffman, 1974). Затем они использовали этот анализ для того, чтобы предсказать действие теплового шока различной длительности в отдельные фазы цикла, и получили хорошее соответствие со своей моделью. Им также удалось показать, что осциллятор сам не является частью митотического процесса, так как нарушение последнего может не сказаться на первом.

Следует, наконец, помнить, что постулат митогена не обязателен и что в репрессорной модели осциллятор был бы зеркальным отображением осциллятора, изображенного Кауфманом и Вилле. Для того чтобы получить дополнительную информацию по данному, а также другим вопросам, возникающим в процессе этих очень интересных исследований, нужно выделить управляющие молекулы или исследовать слияние клеток, разделенных фильтрами.

Выяснению молекулярной природы постулированного митогена посвящена недавно выполненная работа Бредбери и его коллег (Bradbury et al., 1974 a, b). Исследуя изменение

содержания фосфата в гистоне FI, выделенном из ядер *Physarum*, они обнаружили заметные колебания в цикле с максимумом в конце фазы G₂, как раз перед митозом. Эти данные соответствуют способности препаратов ядер, полученных с помощью ультразвука, фосфорилировать гистон FI тимуса теленка и являются веским доводом в пользу того, что ядерная киназа синтезируется к концу фазы G₂ и затем быстро инактивируется в течение M- и ранней S-фаз. Тепловой шок заметно уменьшает фосфорилирование, а Бредбери и др. (Bradbury et al., 1974b) показали, что эти температурные эффекты хорошо согласуются с более ранними исследованиями теплового шока, проведенными Брюером и Рашем (Brewer, Rusch, 1968). Предполагалось, что фосфорилирование гистона FI инициирует конденсацию хромосом, после чего следуют остальные события митоза. Единственным несоответствием между этим предположением и данными Кауфмана и Вилле (Kauffman, Wille, 1975) является то, что, согласно последним исследованиям, можно нарушать митотический процесс, не сдвигая фазу митотических часов; по-видимому, ядерная киназа сама не может быть составной частью осциллятора, управляющего клеточным циклом, хотя и должна регулироваться этим осциллятором.

О взаимоотношениях между ДНК, РНК и синтезом белка у *Physarum* известно несколько больше, что очень важно для создания детальной картины митотического цикла у этого организма. Однако в данный момент нам достаточно отметить, что эти взаимоотношения сложны и что идентифицировать физиологические сигналы, которые регулируют переходы из одного состояния в следующее, очень трудно. Важно понимать, что ввиду крайней сложности взаимодействий набор сигналов, который управляет переходами из одного состояния в другое, может не быть фиксированным и что при изменении условий скорость-лимитирующими могут стать другие наборы параметров. Поэтому, возможно, лучше рассматривать клеточный цикл в виде совокупности как вероятностных и детерминированных процессов с некоторыми общими ограничениями, налагаемыми на их временную упорядоченность, так и многих событий, которые могут происходить в случайной последовательности. Поскольку ряд переходов от одной стадии к другой может управляться вероятностными, а не детерминированными событиями, вместо моделей типа изображенных на рис. 3.2, основанных на детерминированных осцилляторах, мы можем рассматривать чисто случайные процессы, скажем пуассоновского типа, которые определяют скорость перехода из одного состояния цикла в другое. Далее я кратко рассмотрю такую модель, но в данный момент стоит отметить, что между этими двумя подходами нет антагонизма. Чтобы детерминированный осциллятор (рис. 3.2)

мог удовлетворительно описать реальный процесс, управляющий инициацией репликации ДНК, вариабельность которого 10—20%, необходимо ввести его в «шумовое» биохимическое пространство. Я рассмотрел такую модель для бактериального клеточного цикла (Goodwin, 1970), но применение статистической механики к предельному циклу, используемое здесь для представления осциллятора, сталкивается с рядом трудностей. Проще и лучше использовать исходную модель, которую я исследовал в вышеупомянутой книге и кратко рассмотрел в предыдущей главе, учитывая результаты Фрейзера и Тайвери (Fraser, Tiwari, 1974). Я воспользуюсь ею в следующей главе, для того чтобы выяснить, какие взаимодействия между эукариотическими клетками управляют их ростом. На данном этапе я хотел бы проследить все уровни эукариотической организации на пути к многоклеточным и, в частности, к млекопитающим, где необходимо рассматривать не только жизненный цикл, но и его связь с тканевым гомеостазом, включая явления дифференцировки клеток и проблему неопластического роста.

Клеточный цикл млекопитающих

При изучении организации событий во время роста и цикла деления клеток млекопитающих было использовано множество различных типов клеток — от клеток почки детеныша хомячка до принадлежащих человеку клеток HeLa, выделенных из опухоли шейки матки. На основании большого количества данных построено несколько общих моделей, которые стремятся задать направление современных исследований в этой области. Одна из них рассматривает интересную гипотезу о связи между репликацией ДНК и управлением геномом, которая была названа теорией чистого гена. В 1964 г. Кишимото и Либерман, работая с клетками почки кролика, заметили, что если во время фазы S с помощью актиномицина D блокировался зависимый от ДНК синтез РНК, то митоз приостанавливался, но если актиномицин D добавлялся спустя час после окончания S-фазы, митоз проходил нормально. Они предположили, что во время S-фазы и в течение одного часа после ее окончания синтезировалось некоторое количество мРНК, детерминирующей белок, необходимый для митоза. Используя для ингибирования белкового синтеза пуромицин, они обнаружили, что добавление этого вещества в любой момент S-фазы (длительностью около десяти часов) и большей части фазы G₂ (длительностью четыре часа), как и ожидалось, вызывало полное прекращение митоза. Далее они высказали еще одно интересное предположение, что в клетках млекопитающих синтез мРНК обязательно сопряжен с

S-фазой. Эта гипотеза основана на данных о том, что и ДНК-полимераза, и РНК-полимераза для функционирования нуждаются в «голой», или «чистой», ДНК, а это возможно только во время S-фазы, когда ДНК лишена своей белковой оболочки (гистонов и кислых белков). Разделение, или раскрытие, не затрагивает всей хромосомы одновременно, а происходит на участках, где идет репликация.

Эта гипотеза не сохранилась в своей исходной форме, так как сейчас известно, что синтез мРНК может происходить как во время S-фазы, так и во время фаз G_1 и G_2 . В настоящее время гипотеза сформулирована в несколько более общем виде и известна под названием «теория квантующего митоза»; впервые она была четко сформулирована Хольтцером (Holtzer, 1963). Эта теория постулирует, что для изменения регуляторного состояния гена (т. е. его включения или выключения) клетка должна пройти митотический цикл, во время которого ген может быть переключен некоторым управляющим сигналом. Таким образом, клетка становится компетентной для изменения своего эпигенетического состояния только при прохождении полного цикла, причем хотя S-фаза, конечно, очень важна, но в реализации этой способности участвует не только она. Поскольку обычно клетки, которые прошли дифференцировку, не делятся, стабильность дифференцированного состояния хорошо объясняется этой теорией, правильность которой, помимо данных Хольцера (Holtzer, 1963), относящихся к процессу митогенеза, подтверждается и другими важными работами. Например, Стокдэйл и Торпер (Stockdale, Torper, 1966), выполнив очень интересные исследования индукции производства казеина в ткани молочной железы мыши, обнаружили, что клетки стимулируются к вступлению в S-фазу и приступают к делению при добавлении к органным культурам железистой ткани инсулина, но производство казеина индуцируется только в случае, если вместе с инсулином добавляются кортизон и пролактин. Последние два гормона, добавленные без инсулина, не в состоянии вызывать образование казеина. Казеин не синтезировался в том случае, если к культурам вместе со всеми тремя гормонами добавлялся колхицин; при этом отсутствовал и клеточный цикл, так как колхицин блокировал клетки в митозе. Авторам удалось также показать, что когда в ответ на инсулин в ткани молочной железы девственных мышей происходит задержка синтеза ДНК и клеточных делений, то задерживается и производство казеина в ответ на присутствие гидрокортизона и пролактина; оба процесса задерживаются примерно на 48 ч. Таким образом, наблюдаемая корреляция весьма сильна.

Однако позднее (Vonderhaar, Torper, 1974) пришлось изменить первоначальную гипотезу обязательного сопряжения S- и

М-фаз с развитием компетентности клетки к реакции на специфический индуцирующий стимул в ткани молочной железы. Это было вызвано тем, что, как оказалось, эксплантаты тканей, взятых у неполовозрелых мышей, способны синтезировать белки молока в ответ на инсулин, гидрокортизон и пролактин, не проходя фаз S и M. Было найдено, что для приобретения такой способности должна пройти клеточный цикл только ткань молочных желез девственных животных, достигших половой зрелости. Это наводило исследователей на мысль, что развитие клеток молочной железы у достигших зрелости девственных мышей может быть приостановлено в фазе G₁ по прошествии некоторого критического периода, совпадающего с изменением компетентности, в то время как клетки молочных желез неполовозрелых животных могут быть остановлены в фазе G₁ перед этим периодом. Это положение очень сильно изменяет первоначальную гипотезу Хольтцера, заставляя отказаться от представления, что необходим полный цикл (квантующий митоз) или что существует жесткая корреляция между событиями S-фазы и процессами, участвующими в индукции генов. Но один интересный факт по-прежнему остается — существование критического периода в фазе G₁, когда клетка становится способной менять свое эпигенетическое состояние. На это указывают данные о том, что некоторые процессы, опосредованные мембраной, такие, как транспорт Na⁺ в мышинные клетки линии L5178Y (Jung, Rothstein, 1967) и потребление 2-аминоизомасляной кислоты в клетках яичника китайского хомячка (Sander, Pardee, 1972), удваивают свою скорость в определенный момент времени фазы G₁. Берридж (Berridge, 1975) предложил интересную модель, описывающую множество явлений, которая предполагает, что в клеточном цикле главную роль играют циклические нуклеотиды и ионы кальция.

То, что прохождение клеточного цикла не является обязательным условием дифференцировки, было четко установлено в случае регенерации головы у *Hydra* (Wolpert et al., 1971), когда при блокировании делений клеток ультрафиолетовым облучением была получена тем не менее полная регенерация гипостома и щупалец. Кроме того, согласно Куку (Cooke, 1973), у зародышей позвоночного *Xenopus laevis* (южноафриканская шпорцевая лягушка), у которых клеточные циклы остановлены на стадии 10 коллемидом или митомизином, нормальный морфогенез и гистодифференцировка происходят вплоть до стадии 26. Изменения предполагаемой судьбы клетки, вызванные имплантацией вторичного организатора, также происходят нормально при этих условиях. Эти данные согласуются с данными Вандерхаара и Топпера (Vonderhaar, Torper, 1974) и противоречат гипотезе квантующего митоза.

Управление скоростью цикла и клеточная дифференцировка

Для того чтобы учесть клеточную дифференцировку у многоклеточных, необходимо внести в рис. 3.4 небольшое изменение. Суть этого изменения видна из рис. 3.7. Здесь стрелка, выходящая из клеточного цикла после M , показывает, что клетки в этой точке бифуркации принимают решение: вступить ли им на путь дифференцировки или продолжить движение по циклу. Исследователи расходятся в своих мнениях о том, в какой момент происходит это отклонение — сразу после M или в некоторой точке фазы G_1 . Однако поскольку дифференцирующиеся клетки в основном диплоидны, а не тетра- и более плоидны, то нормальный путь к дифференцировке, по-видимому, действительно начинается сразу после митоза, а не из фазы G_2 . Эта закономерность, конечно, имеет свои исключения, как почти все биологические закономерности, поскольку организмы для достижения своих целей используют огромное множество разных стратегий.

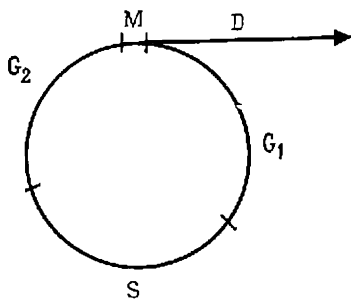


Рис. 3.7. Клеточный цикл эукариотов с ответвлением, ведущим к клеточной дифференцировке (D).

У схемы, представленной на рис. 3.7, имеется одна особенность, которая вводит в заблуждение и должна рассматриваться как недостаток: может показаться, что процесс клеточной дифференцировки и клеточный цикл работают по принципу «все или ничего», хотя на самом деле это не так. В течение эмбриогенеза, по мере того как происходят органогенез и клеточная дифференцировка, темп клеточных делений постепенно падает, но промежуточные состояния определенно существуют: частично дифференцированные клетки (миобласты, эритробласты, нейробласты и т. д.) продолжают делиться. Кроме того, четко различимы между собой линии стволовых клеток различных тканей органов у взрослых (тех органов, которые сохраняются в стационарном состоянии путем непрерывного возобновления клеток и дифференцировки, как, например кожа, печень, почка и т. д.), хотя их роль состоит в том, чтобы делиться со скоростью, определяемой некоторыми критериями, характеризующими потребности ткани или органа (используя язык теории управления). Хотя в таких системах клетки, которые в ответ на стимул к дифференцировке покидают стволовую популяцию, изменяют свое состояние, как правило, внезапно, нельзя счи-

тять, что этот процесс протекает строго по принципу «все или ничего». Чтобы передать гибкость связи между клеточным циклом и клеточной дифференцировкой, нужна гораздо более динамическая картина, чем та, которая дана на рис. 3.7.

Теперь мне хотелось бы остановиться на некоторых исследованиях, дающих динамическую картину тканевой организации и в то же время допускающих построение и исследование модели тканевого гомеостаза с отрицательной обратной связью. Аналогично тому, как проблема управления репликацией ДНК привела нас к вопросу о том, каким образом клетки измеряют свои размеры, проблема управления клеточной дифференцировкой в ткани заставляет исследовать задачу поддержания ее пространственной организации. Это подводит нас к другому уровню биологической иерархии, характерному для многоклеточных. Динамически мы все еще работаем в пределах эпигенетической системы, хотя время теперь измеряется днями. Это происходит потому, что период клеточного цикла высших организмов обычно лежит в диапазоне 10—100 ч.

Эпидермис млекопитающих и кейлонная теория

Очень удобной тканью для анализа пространственных и временных связей, лежащих в основе ее стабильности, оказывается эпидермис млекопитающих. Он просто организован, легко доступен и обладает хорошими способностями к регенерации. В основном эпидермис состоит из базального слоя толщиной в одну клетку, где происходит деление, слоя толщиной в две-три клетки, где, как показано, клетки тем более дифференцированы, чем дальше они находятся от базального слоя, верхнего слоя чешуек или пластинок, представляющих собой полностью дифференцированные кератинизированные клетки. Эти чешуйки постепенно, по мере изнашивания, сбрасываются и заменяются другими, возникающими в результате дифференцировки.

Ткань легко поранить, и процесс заживления затем может изучаться в деталях. Главной реакцией на повреждение является локальное увеличение митотического индекса клеток в базальном слое. Такой ответ можно было бы вызвать или положительным сигналом, или снятием отрицательного, как мы это видели повсюду, при анализе процессов управления в клетках. Теория, основанная на положительном управлении, постулирует, что из поврежденного эпидермиса высвобождается гормон повреждения и стимулирует клетки базального слоя к делению. Отрицательное управление предполагает существование ингибитора клеточного цикла, концентрация которого в результате повреждения локально уменьшается. Простой тест, который позволяет сделать выбор между этими гипотезами, состоит в следующем. Наносят рану на ухе мыши, удалив эпидермис на

одной стороне из области в несколько миллиметров шириной. Поскольку мякоть уха так тонка, что гормон повреждения, предположительно высвободившийся из поврежденного эпидермиса на периферии раны, должен диффундировать не только в соседние базальные клетки на одной стороне, но и через дерму к базальным клеткам на другой стороне, митотическая активность будет стимулироваться с обеих сторон уха у краев раны. Если же удаление эпидермиса приводит к удалению ингибитора, то базальные клетки неповрежденной поверхности, как можно ожидать, должны увеличить свою митотическую активность по всей площади раны, что и было показано Буллоу и Лоуренсом (Bullough, Laurence, 1960). Эти данные стимулировали изучение экстрактов эпидермиса в присутствии ингибитора митоза (Bullough, Laurence, 1964), в результате чего удалось идентифицировать и частично охарактеризовать ингибитор, названный Буллоу кейлоном (Bullough, 1962). Им оказался гликопротеид с мол. весом около 30 000—40 000 (Hondius-Boldingh, Laurence, 1968). Этот кейлон подавлял митотическую активность эпидермиса *in vivo* и *in vitro* вплоть до 60% в зависимости от концентрации и других факторов, увеличивающих его активность, среди которых особенно выделяются адреналин и гидрокортизон (Bullough, Laurence, 1968). Он оказался тканеспецифичным, но не видоспецифичным, причем первое свойство необходимо для диффундирующего гомеостатического управляющего сигнала.

К настоящему времени выполнен ряд исследований, показавших, что помимо эпидермиса ингибиторы кейлонного типа имеются и в других тканях (см. обзор Bullough, 1975). Следует отметить, что основной принцип управления ростом ткани с помощью отрицательной обратной связи был выдвинут гораздо раньше, чем появилась конкретная гипотеза, воплощенная в кейлонную теорию. В общем виде эта гипотеза была рассмотрена Вейссом и Каванау (Weiss, Kavanau, 1957), а экспериментаторы, например Сэйтрен (Saetren, 1956), обнаружили ингибиторы, экстрагируемые из тканей. Такие сообщения всегда принимаются с некоторым скептицизмом, поскольку подавить рост нормальной клетки можно фактически любым неочищенным тканевым экстрактом. Убедительно показать существование специфического ингибитора можно только после его очистки, описания его действия и доказательства специфичности. Это не сделано ни для одного из полученных кейлонов, а до тех пор, пока отсутствует полная биохимическая идентификация, будет сохраняться неопределенность статуса кейлонной гипотезы. Однако непрерывное накопление данных в пользу общего положения о существовании тканеспецифичных ингибиторов митоза вселяет уверенность, что роль кейлонов как важных элементов

комплекса, управляющего клеточным циклом многоклеточных, будет в конце концов установлена.

Очень важным представляется вопрос о точке действия кейлона в клеточном цикле. Первоначальные данные Буллоу и Лоуренса (Bullough, Laurence, 1964) указывали на то, что эта точка находится в поздней стадии G_2 -фазы, так как снятие с клеток ингибирования приводит в полосках эпидермиса к быстрому повышению митотического индекса. Кроме того, Иверсен (Iversen, 1970) показал, что экстракты эпидермиса мышей ингибировали включение 3H -тимидина в клетки HeLa; это позволяет предположить, что точка управления может также находиться в конце G_1 -фазы. Позднее Марксу (Marks, 1973a) и Элджио (Elgjo, 1973) удалось дифференцировать в мышинном эпидермисе два ингибитора, один из которых подавлял митотический индекс, а другой — индекс включения 3H -тимидина в культурах эпидермальных клеток. Последний, названный G_1 -ингибитором, по-видимому, связан с клеточной мембраной. Оба типа молекул — гликопротеиды, но они различаются по своим биохимическим характеристикам. Элджио (Elgjo, 1973) нашел, что G_1 -ингибитор присутствует большей частью в дифференцирующихся клетках, а G_2 -ингибитор — главным образом в базальных клетках. Исследование Франкфурта (Frankfurt, 1971) наводит на мысль, что помимо своих ингибиторных эффектов эпидермальные кейлоны могут индуцировать дифференцировку клеток и даже могут вызывать переход клеток из фазы G_2 к дифференцировке без прохождения фазы М.

Наличие большого числа возможных молекулярных цепей управления, посредством которых кейлоны могли бы проявлять свое действие на активность генов в ядре эпидермальной клетки, дслагает сейчас бесполезным тщательное рассмотрение этого вопроса. Предложен ряд различных теорий управления генами у эукариотов, например теории Бриттена и Дэвидсона (Britten, Davidson, 1969), Крика (Crick, 1971), Пола (Paul, 1972) и Наоры (Naora, 1973), но их детали на самом деле не имеют значения для данной проблемы, которая представляется скорее динамической, чем молекулярной. Наша цель состоит в том, чтобы показать, что, приняв отдельные положения кейлонной гипотезы, можно получить некоторое представление о гомеостатических свойствах эпидермиса и в пространстве, и во времени. Для простоты используем положения, принятые для прокариотов при описании организации генетических управляющих цепей в эпидермальных клетках, но будем помнить, что никаких выводов о конкретных молекулярных механизмах явления делать из такого представления нельзя. На рис. 3.8 кружки, отмеченные «оперон клеточного цикла» и «оперон дифференцировки», относятся к совокупностям генов, которые почти наверняка

щий «репрессор», который специфически действует на оперон дифференцировки, и ген кейлона G_2 , специфичного для данной ткани. Этот кейлон, как показано, действует на белки, необходимые для митоза, P_m , блокируя фазу G_2 . Адреналин и гидрокортизон действуют синергично с G_2 -кейлоном, активируя связанный с мембраной рецептор S_2 , который инициирует производство внутриклеточного посредника M_2 . Существуют некоторые данные, что этим посредником служит цАМФ (Marks, 1973 b). Белки — продукты оперона дифференцировки — на рис. 3.8 обозначены как P_i , они синтезируются на соответствующих мРНК. В эпидермисе одним из таких белков является кератин.

Допущения, сделанные о состоянии пролиферирующих клеток такой ткани, как эпидермис, очень сильны; они означают, что мы полностью игнорируем вопрос о том, как клетки оказались в этих специфических условиях, т.е. рассматриваем только очень ограниченные аспекты развития. В гл. 5 и 6 я остановлюсь на вопросах, касающихся природы и происхождения ранних морфогенетических полей; возникающая при этом картина процессов, инициирующих пространственное упорядочивание, будет сильно отличаться от рассматриваемой сейчас, когда мы имеем дело с поддержанием тканей. Как будет показано в гл. 5, ограниченность регенеративных возможностей зрелых тканей млекопитающих наводит на мысль, что ранние процессы развития сильно отличаются от более поздних. В данный момент мы интересуемся тканевым гомеостазом. Повторяю, что весьма упрощенная схема рис. 3.8 не должна пониматься буквально. Наша задача — рассмотреть динамическое поведение системы с указанным общим типом взаимодействия между группами генов. Последние связаны с различными клеточными функциями и со средой через специфические белки, которые могут реагировать на внеклеточные сигналы и изменять внутриклеточные состояния.

Если взять клетку, находящуюся в цикле, то репрессор не даст ей дифференцироваться и митозы будут продолжаться. Однако связывание некоторого кейлона с клеточной мембраной снизит темп клеточных делений, концентрация репрессора уменьшится и будет образован и включен в мембрану некоторый внутриклеточный кейлон типа i . Это может привести к установлению нового стационарного состояния, характеризующегося непрерывным клеточным делением с пониженной скоростью и частичной дифференцировкой клеток, или к постепенному изменению системы в направлении дифференцировки. При этом в результате увеличения репрессии оперона клеточного цикла и снижения уровня репрессора, подавляющего оперон дифференцировки, будут производиться все больше и больше кейлона.

Характер клеточного цикла таков, что в зависимости от природы окружающих воздействий и степени сродства управляющих сигналов система может вести себя или как переключатель, перебрасываясь из одного состояния в другое (при этом либо один оперон включен, а другой выключен, либо оба оперона пребывают в некотором промежуточном стационарном состоянии), или непрерывно колебаться от состояния роста к состоянию дифференцировки. Таким образом, бинарная логика рис. 3.7, означающая, что клетки в некоторой стадии должны принимать решение, повторить ли им цикл или дифференцироваться, есть очень сильное упрощение, обусловленное крайней элементарностью схемы цепи. Эта схема сама является упрощением, и поэтому при анализе динамических процессов в рамках бинарной логики применительно к клеточным состояниям нужно соблюдать осторожность.

Теперь необходимо принять во внимание главный фактор, определяющий состояние клетки, — ее окружение. Для этого мы должны рассмотреть пространственную организацию ткани. Упрощенная схема строения эпидермиса приведена на рис. 3.9. В контакте с базальной мембраной находится базальный слой стволовых клеток, выше расположены дифференцирующиеся клетки, а полностью дифференцированные ороговевшие клетки без ядер, состоящие главным образом из кератина, находятся на поверхности. Изображенная на рисунке вертикально организованная колонка клеток представляет собой, согласно Поттену (Potten, 1974), эпидермальную пролиферативную единицу, гексагональную в поперечном сечении. Клетки связаны друг с другом внутри и между этими единицами через десмосомы. Фигуры митозов видны только в клетках, примыкающих к базальной мембране, за исключением поврежденного участка, где редкие клетки, находящиеся в стадии митоза, встречаются и выше. Этот непрерывный процесс образования клеток на основании, которое у взрослого организма имеет фиксированную площадь, приводит к тому, что клетки дистально выжимаются из этого слоя по направлению к поверхности, на которой чешуйки непрерывно утрачиваются. Таким образом, клетки по мере дифференциации перемещаются вверх. Если в соответствии с рис. 3.8 клетка производит тем больше кейлона G_1 , чем больше она дифференцирована, то установится внеклеточный градиент концентрации кейлона, которая будет возрастать от основания к поверхности. Крутизна градиента увеличится, если кейлон, кроме того, будет удаляться с кровью, циркулирующей в сосудах под базальной мембраной.

Другой ингибитор, G_2 -кейлон, производимый главным образом базальными клетками, очень неустойчив (Elgjo, 1973) и по-видимому, играет вспомогательную роль по отношению к

процессу, управляющему фазой G_1 . Возможно, он стимулирует образование небольшого пула клеток на поздней стадии фазы G_2 , которые реагируют на любое нарушение (например, повреждение или аппликацию канцерогена), увеличивающее скорость выхода ингибитора из базальных клеток и позволяющее клеткам быстро делиться, способствуя, таким образом, восстановительному процессу. Этот кейлон, следовательно, играет роль

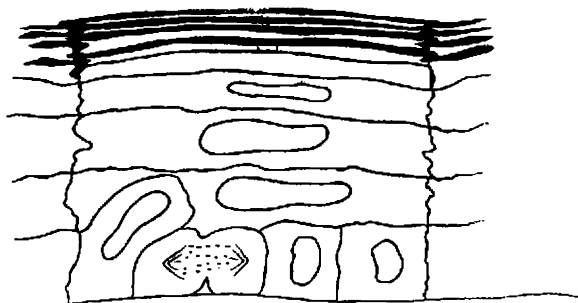


Рис. 3.9. Схематическое представление структуры эпидермиса.

локальной отрицательной обратной связи. Другие элементы в полной системе управления, такие, как мезенхимальный фактор, производимый дермой и индуцирующий клеточное деление (Bul-lough, 1975 а), не рассматриваются.

С помощью простых схем, представленных на рис. 3.8 и 3.9, можно объяснить основные особенности гомеостатического поведения эпидермиса в ответ на ранение или другое повреждение. Поскольку удаление слоя эпидермиса вплоть до базальной мембраны или до более поверхностного слоя приведет к удалению клеток, которые производили кейлон, то локальная концентрация кейлона упадет. При этом будет происходить утечка кейлона из клеток в окрестности раны из-за отсутствия других клеток, повышенного кровообращения, омывающего действия лимфы и т. д. Таким образом, клетки будут освобождены от ингибирования и скорость клеточного деления возрастет. Поскольку клетки накапливаются и вытесняются из базального слоя, то на периферии раны они будут приближаться к дифференцированным клеткам и вступать с ними в латеральный контакт; дифференцированные клетки производят кейлон, который будет индуцировать в делящихся клетках дифференцировку. Эти клетки в свою очередь будут индуцировать дифференцировку своих соседей, и дифференцировка распространится от периферии к центру раны. Но при этом клетки, которые были вытеснены из базального слоя, будут удалены от кровеносных сосудов, расположенных под базальным слоем; поэтому концентрация кейлона в них возрастет и дифференцировка распространится по всей

центральной зоне раны. Можно ожидать, что в центральных областях раны, где индукция дифференцировки идет наиболее медленно, будет иметь место перепроизводство клеток. О таком явлении в эпидермисе мыши при ответе на канцероген сообщил Иверсен (Iversen, 1961). На основании этих данных он предложил механизм действия отрицательной обратной связи кейлонного типа, но не провел тщательного пространственного исследования. Вообще заживление раны идет постепенно от периферии к центру.

Эта простая градиентная гипотеза пространственной организации ткани и ее устойчивости в ответ на нарушение характерна для целого класса моделей развития, предложенных для объяснения образования структур и морфогенеза. По сути дела, в основе всех таких моделей лежит предположение о существовании источников и стоков вещества, способного к диффузии, которое распределяется по пространству и определяет состояние клетки в любой области градиента, точно так же, как это имеет место в эпидермисе. В кейлонной модели каждая клетка оказывается источником или стоком, если кейлон внутри клетки разрушается с некоторой скоростью, в то время как базальная мембрана определяет границу между стоком (кровообращением) и делящимися клетками. Вместе с простой схемой рис. 3.8 это дает искомую модель. Насколько правильно она описывает механизмы поддержания гомеостаза эпидермиса — это другой вопрос. Эпидермис, конечно, значительно более сложная ткань, чем это изображено на рис. 3.9, где представлены клетки только одного типа и последовательность их состояний от деления до дифференцировки. Помимо этих клеток, существуют волосы, сальные железы, поры и множество других структур, составляющих целую ткань, однако к ним, возможно, применимы описанные выше принципы. Интересный анализ управления размером и ростом органов, основанный на кейлонной гипотезе, проведен Глассом (Glass, 1973), который показал неустойчивость таких систем, что может быть очень интересно с точки зрения злокачественного роста — тема, которая будет кратко рассмотрена ниже.

Кейлонная модель, как мы видим, больше связана с тканевым гомеостазом, чем со стабильностью отдельных клеток, например с поддержанием средних клеточных размеров в делящейся популяции. Мы не рассмотрели проблему регуляции размера у эукариотов, как это было сделано для прокариотов, хотя этот вопрос, конечно, тоже очень важен. Первая гипотеза, сформулированная Гертвигом (Hertwig, 1908), была основана на предположении о том, что начало деления клетки определяется отношением ядерного объема к цитоплазматическому.

Такая теория может интерпретироваться на молекулярном уровне в терминах управляющего процесса репрессорного или инициаторного типа; в роли фактора разведения в регуляции концентрации может выступать клеточный объем. Например, ядра могут играть роль источника репрессора инициации, а цитоплазма — стока (область деградации), причем скорости производства и деградации репрессора могут быть скоррелированы с объемами ядра и цитоплазмы соответственно. Поскольку объем ядер остается относительно постоянным, а рост размеров клетки главным образом обусловлен цитоплазмой, то в процессе роста скорость деградации репрессора в какой-то момент превысит скорость его производства и концентрация репрессора уменьшится. Когда она упадет до критического значения, будет иницирована некоторая фаза клеточного цикла (скажем, S-фаза), и тогда клетка перейдет к митозу и делению. Такая модель, как это ни кажется невероятным из-за ее крайней простоты, объясняет сохранение постоянного среднего клеточного размера при данной скорости роста с помощью тех же принципов, на которых построена модель регуляции размеров бактерий (модель Притчарда и др.). В зависимости от предположений, сделанных о связи между скоростью роста и скоростью образования управляющих молекул в ядре, можно получить постоянство клеточного размера при различных скоростях роста или некоторую другую вполне определенную зависимость между ними.

Теперь известно, что в ее первоначальном, предложенном Гертвигом виде модель не соответствует поведению эукариотических клеток. Прескотт (Prescott, 1956) показал, например, что малое отношение объемов ядра и цитоплазмы оказывается недостаточным условием для индукции деления у гигантской амебы *Chaos chaos*. Он выявил это, индуцируя асимметричные деления у амебы, а затем обнаружив, что дочерняя клетка с обширной цитоплазмой и, следовательно, малым отношением объемов ядра и цитоплазмы (меньшим, чем для клеток, вступающих в митоз и цитокинез) тем не менее не сразу вступает во второе деление. Однако время до вступления в следующее деление у такой клетки было значительно короче, чем время нормальной генерации, — оно уменьшилось с 24 до 16 ч. Эти результаты полностью соответствуют общим выводам, полученным из данных по изучению *Physarum* и клеток почки кролика и состоящим в том, что клетка может начать делиться только после выполнения некоторых обязательных условий. Одно из них — завершение репликации ДНК. Эти результаты согласуются также с простой моделью управления клеточным циклом, основанной на отношении мощностей ядерного источника и цитоплазматического стока. Действительно, если ядро оказывается в большой цитоплазме, то можно предположить, что происходит

преждевременная инициация, скажем, S-фазы. Роль репрессора инициации могла бы играть молекула типа кейлона.

Часто полагают, что результаты экспериментов по слиянию клеток, в которых цитоплазма одного типа вызывает инициацию S-фазы в ядре другого типа [как в экспериментах, описанных Харрисом и др. (Harris et al., 1969)], послужили веским доводом в пользу существования положительного сигнала, аналогичного инициатору, контролирующему репликацию ДНК. Однако из вышесказанного ясно, что если разные цитоплазмы различаются способностью к деградации репрессора, то индукцию в результате слияния можно объяснить с помощью любой из двух гипотез. Для того чтобы разрешить эту неопределенность, нужно либо иметь клетки с мутациями управления, которые можно соединять с нормальными клетками и изучать доминирующие отношения (как это было сделано Жакобом и Моно для *lac*-оперона *E. coli*), либо выделить и очистить вещества, заметно влияющие на отдельные события в клеточном цикле (как это делается в современных исследованиях на кейлонах).

При рассмотрении кейлонной гипотезы нужно иметь в виду ее возможное значение для терапии опухолей, ибо ясно, что существование тканеспецифичного ингибитора митозов, который можно выделить и очистить, позволяет надеяться на возможность клинического использования его для управления ростом в новообразованиях. Однако достаточно просто взглянуть на рис. 3.8, чтобы понять всю сложность этого вопроса; введение кейлона животному с опухолью, скажем, на коже должно приводить к ингибированию митотической активности и нормальной, и опухолевой ткани, но, по-видимому, больше первой, чем последней, так как опухоль уже не подчиняется нормальному физиологическим процессам управления и поэтому предположительно менее чувствительна. Пока инъекции кейлона продолжаются, митотическая активность будет подавлена, но после прекращения инъекции восстановится *status quo ante*. Этот момент был четко отмечен Иверсеном (Iversen, 1970). Однако, как это ни удивительно, в настоящее время имеются данные (Bullough, Laurence, 1968; Rytomäa, Kiviniemi, 1968; Mohr et al., 1968), которые показывают, что таким способом можно получить регрессию некоторых опухолей, и даже имеется сообщение о проведении полного курса лечения меланомы у мышей и хомячков. Эти результаты представляют значительный интерес и показывают, что механизм действия кейлонов значительно более сложен, чем это следует из простой схемы рис. 3.8. Некоторые интересные возможности данного метода рассмотрены в недавно опубликованной обзорной статье Буллоу (Bullough, 1975, b). Достаточно отметить, что основная концепция управления с помощью отрицательной обратной связи, очевидно, при-

носила и продолжает приносить большую пользу не только при изучении организации прокариотов, но также и при подходе к одной из вечных проблем физиологии многоклеточных — проблеме управления клеточным ростом и связанной с ней проблеме нарушения управления, имеющего место в опухолях.

Вероятностные модели клеточного цикла и его управления

Как отмечалось ранее, какую бы модель мы ни выбрали для описания поведения клеток во время клеточного цикла, в нее должен быть каким-то образом введен стохастический (вероятностный) фактор. Простейший вариант — это предположение, что молекулярные осцилляторы, ответственные за ритмическое поведение отдельной клетки, имеют различные фазы и частоты, так что суммарным результатом их активности оказывается «шумовой» цикл (Engleberg, 1968). Такая модель была бы детерминированной на молекулярном уровне и не рассматривала бы случайных процессов, таких, как спонтанная диссоциация комплексов репрессор — оператор или других молекулярных ассоциаций, участвующих в регуляции, флуктуаций скоростей реакций, обусловленных изменениями температуры, частоты столкновений, ориентации реагирующих молекул и т.д. Поскольку на молекулярном уровне картина биохимических процессов, происходящих в клетке, оказывается по своей природе «шумовой» (особенно если в этих процессах участвует мало молекул, как в случае процессов, регулирующих активность генов), то, по-видимому, наиболее естественно предположить, что стохастический фактор вводится главным образом на этом уровне. Согласно крайней точке зрения, детерминированные элементы клеточного поведения отсутствуют вообще в том смысле, что на осциллятор не накладывается никаких динамических ограничений, детерминирующих определенную форму колебаний с данной частотой и амплитудой. Можно считать, например, что клетка разделится, когда произойдет ряд событий, каждое из которых имеет данную вероятность появления как функцию времени, и что эти события могут происходить в любом порядке. Такая модель не предполагает существования причинного цикла в клетках, так как не налагает никаких ограничений на упорядоченность событий. Подобный подход был использован Раном (Rahn, 1932), что дало распределение вероятностей для времени генерации клеток, не очень хорошо соответствующее экспериментальным данным; такое соответствие можно было бы получить, сделав ряд дальнейших допущений, например присвоив разные вероятности разным событиям. Наиболее серьезным возражением против данного подхода представляется отсутствие в такой модели определенной S-фазы, за которой следует фаза G₂,

что противоречит подавляющему большинству экспериментов. Кендолл (Kendall, 1948) модифицировал эту модель, предположив, что события, составляющие цикл, хотя и определяются зависящими от времени вероятностями, происходят тем не менее последовательно. Тогда действительно появляется цикл, но корреляция между одним циклом и следующим не обязана существовать, так как после окончания цикла процесс каждый раз начинается заново и никакого влияния одного цикла на другой не существует. Для динамического осциллятора это не так, поскольку его поведение зависит от начальных условий и степени устойчивости процесса. Известно, что времена генерации материнских и дочерних клеток скоррелированы, и поэтому, как показано рядом авторов (Schaechter et al., 1962; Powell, Errington, 1963; Kubitschek, 1966), требуется ввести некоторую связь между генерациями. Это может быть сделано различными способами, как описано Марром, Пэйнтером и Нильсоном (Marr, Painter, Nilson, 1959) в статье, где построена очень общая вероятностная модель, весьма удачно описывающая клеточный цикл.

Все имеющиеся модели клеточного цикла, за исключением модели Рана (Rahn, 1932), явно или неявно предполагают существование каких-то часов — постулат, который выводится из последовательного характера процесса, происходящего от одного клеточного деления до другого. Однако если решающий шаг в этой последовательности управляется чисто случайным событием, то можно задать вполне законный вопрос: проходят ли растущие и делящиеся клетки цикл? Доказательство того, что в эукариотическом ядре это действительно так, представлено в интересной статье Смита и Мартина (Smith, Martin, 1973). Согласно этим авторам, данные, полученные для распределения времен генерации в культурах различных типов клеток, решительно указывают на то, что действительно имеется случайное событие, которое управляет переходом клеток из некоторой стадии фазы G_1 в детерминированную последовательность событий, ведущих к окончанию митоза. Хотя сама эта последовательность и стохастическая, она значительно более организована во времени, чем случайные инициирующие события, определяющие переход, на основании чего авторы считают необходимым ввести в фазу G_1 недетерминированное состояние А. Такое предположение очень интересно видоизменяет основную концепцию клеточного цикла, локализуя практически весь шум в одном событии, вместо того чтобы распределять его равномерно по всему циклу. Однако проблема построения модели, которая объясняла бы как устойчивость роста и процесса деления, так и их стохастические свойства, по-прежнему остается нерешенной. Я снова вкратце остановлюсь на этом вопросе в последней главе в связи с феноменологическим подходом к описанию клеточного цикла,

КЛЕТОЧНЫЙ РОСТ, СИНХРОННОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЦИКЛОВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ

Три разных состояния упорядоченности клеточных популяций можно (и в каком-то смысле полезно) классифицировать по аналогии с тремя состояниями материи: газ, жидкость, твердое тело.

В первом случае мы можем рассматривать свойства культуры клеток, каждая из которых имеет внутреннюю упорядоченность, так, как мы это делали в трех предыдущих главах, считая, что никакой иной упорядоченности в популяции клеток, за исключением той, которая обусловлена усреднением индивидуального поведения клеток, не существует. Именно так обычно бывает в бактериальных популяциях, где каждая клетка, подобно молекуле газа,— высоко упорядоченная система, и при этом между клетками нет достаточно сильного взаимодействия, способного привести к какой бы то ни было организации популяции. Ниже я рассмотрю хеостат как модель установившегося роста такой популяции и проанализирую аналогию между поведением этой модели и некоторых типов популяций клеток многоклеточных.

При наличии у особей характерных динамических режимов глобальная упорядоченность может возникнуть любым из двух способов: под влиянием внешнего воздействия, которое может заставить особей вести себя согласованно, или в результате достаточно сильного взаимодействия между индивидуумами, что приведет к появлению устойчивой динамической упорядоченности. Я рассмотрю примеры обоих типов поведения при синхронизации клеток с помощью внешних периодических вынуждающих функций и при изучении устойчивости стабильных ритмов в популяциях клеток, обладающих биологическими часами. Для таких популяций характерна исключительно временная упорядоченность — отдельные клетки свободно движутся друг относительно друга и взаимодействие осуществляется только с помощью сигнала связи. Это состояние частичной упорядоченности клеток можно считать аналогичным состоянию молекул в жидкости, где отдельные молекулы свободно перемещаются друг относительно друга, но существуют некоторые ограничения на распределения энергии.

Третье состояние упорядоченности клеток имеет место в том случае, когда существуют пространственные и временные ограничения, приводящие к пространственно-временной упорядоченности, обусловленной наличием еще более сильных взаимодействий между единицами; это аналогично состоянию молекул или атомов в твердых телах, особенно в кристаллах. В следующей главе я рассмотрю четырехмерную упорядоченность, характеризующую состояние развивающегося эмбриона. Здесь обнаружится одна интересная деталь — на этом уровне организации имеет смысл совсем отказаться от понятия клеток, так как ткань можно рассматривать скорее как непрерывную среду, чем как совокупность отдельных частиц. Но в данной главе единичная клетка по-прежнему играет основную роль элемента в синхронной или асинхронной популяции.

Хемостат

Устройство, предназначенное для выращивания клеточных популяций в постоянных химических условиях, было описано в 1950 г. Новиком и Сциллардом (Novick, Szilard, 1950) и Моно (Monod, 1950), причем для объяснения его функционирования в обеих работах использовалась по существу одна и та же теория. Прибор в своей основе очень прост и со времени появления с большим успехом применяется при изучении клеточной физиологии и поведения популяций. Схема его представлена на рис. 4.1. Сосуд 1 содержит питательную среду, необходимую для роста клеток (таких, как бактерии, дрожжи, LS-клетки и т. д.), которые могут расти в суспензионных культурах. Скорость поступления f питательных веществ в сосуд 2, где происходит рост, регулируется с помощью специального устройства. Это устройство изображено здесь в виде кружка со стрелкой. Сосуд 2 содержит объем V культуры клеток; быстрое перемешивание поступающей среды осуществляется с помощью мешалки, поддерживающей содержимое сосуда однородным. Объем сохраняется постоянным с помощью сливного рукава, через который культура вытекает в сосуд 3 с той же скоростью, с какой из сосуда 1 поступает среда. В сосуд 2 подается также воздух, и имеется устройство для отбора проб. Сосуд 3 служит для сбора клеток, которые могут быть использованы затем для получения биологических продуктов (лекарств, витаминов, белка, спирта и т. д.).

Интуитивно ясно, что, если скорость потока через сосуд 2 не превышает максимальную скорость роста клеток внутри него, в системе установится стационарное состояние роста, которое будет устойчивым к малым возмущениям клеточной плотности или концентрации питательных веществ. Чтобы показать это, выведем дифференциальные уравнения, описывающие поведение

соответствующих переменных. Эти переменные — концентрация клеток в сосуде (x), измеренная, например, в единицах сухого веса на 1 мл культуры, и концентрация питательного вещества или субстрата (s), которая ограничивает скорость роста клеток; ее тоже удобно выражать в $\text{мг} \cdot \text{мл}^{-1}$. Предположим, что такой скоростью-лимитирующий субстрат существует, поскольку иначе

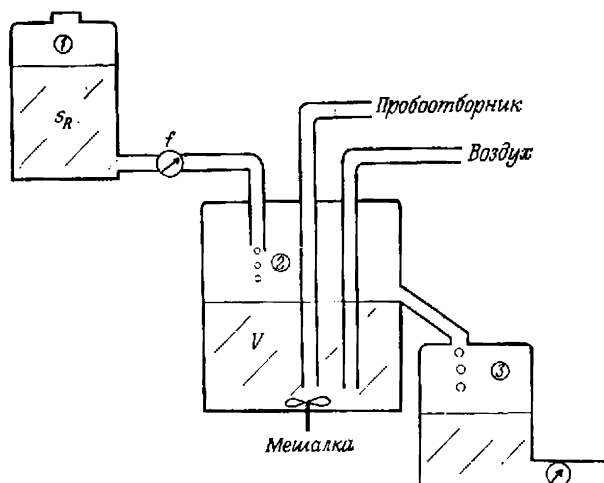


Рис. 4.1. Схема хемостата.

нельзя определить, что же управляет ростом. Тогда можно предположить, что некоторое необходимое питательное вещество поддерживается при такой концентрации, что от него зависит скорость роста. Концентрация этого питательного вещества в сосуде 1 равна $s_R = \text{const}$.

Рассмотрим уравнение, описывающее изменение концентрации клеток x . Число клеток увеличивается из-за роста, который при постоянных условиях окружающей среды экспоненциален. Таким образом, скорость клеточного роста равна

$$\left(\frac{dx}{dt} \right)_{\text{рост}} = \mu x.$$

Скорость вымывания клеток из культуры определяется следующим образом. Пусть скорость потока f измеряется в $\text{мл} \cdot \text{мин}^{-1}$. Тогда масса клеток, которая вымывается из культуры каждую минуту, равна fx $\text{мг} \cdot \text{мин}^{-1}$, что вызывает изменение концентрации в сосуде $|x/V$ $\text{мг} \cdot (\text{мл} \cdot \text{мин})^{-1}$. Это будет

разбавление за счет выведения клеток. Следовательно, изменение концентрации клеток имеет вид

$$\frac{dx}{dt} = \left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{рост}} - \left(\frac{dx}{dt}\right)_{\text{выведение}} = \mu x - \frac{f}{V} x.$$

Введя $D \equiv f/V$, получим

$$\frac{dx}{dt} = \mu x - Dx. \quad (4.1)$$

Далее нам необходимо найти уравнение для s . Субстрат поступает в сосуд со скоростью $f s_R$ мг·мин⁻¹, что вызывает изменение концентрации его в сосуде $f s_R/V = D s_R$ мг·(мл·мин)⁻¹, где s_R измеряется в мг·мл⁻¹. Скорость выведения равна Ds , где s — концентрация лимитирующего скорость субстрата в сосуде 2. Третий член, который необходимо учесть в выражении для ds/dt , описывает потребление субстрата клетками. Введем величину Y , равную весу клеток, образованных на единицу субстрата. Эта величина известна как константа выхода. Например, для бактерии *Aerobacter cloacae*, растущей на среде, где лимитирующим субстратом является глицерин, Y принимает значение 0,5, т. е. на каждые 0,5 мг прироста бактерий потребляется 1 мг глицерина. Конечно, бактерии поглощают из среды и множество других соединений, таких, как N, P, S, K, Na, Mg и т. д., в виде различных солей, но они присутствуют в количествах, не ограничивающих скорость, и поэтому не входят в систему уравнений как переменные. Уравнение для s , таким образом, примет вид

$$\frac{ds}{dt} = D s_R - Ds - \frac{\mu x}{Y}. \quad (4.2)$$

Поскольку мы предположили, что s — переменная, которая ограничивает скорость роста, то теперь необходимо определить μ как функцию s . Из рассмотрения работы *lac*-оперона мы знаем, что поступление источника углерода в бактерии регулируется особым ферментом, пермеазой, локализованной в клеточной мембране. Поэтому скорость роста будет зависеть от катализируемой ферментом реакции. Это утверждение, конечно, было бы справедливым, даже если бы специальная пермеазная система отсутствовала, потому что скорость утилизации питательного вещества все равно зависела бы от активности некоторого фермента. Поэтому разумно взять функциональную зависимость μ от s в виде выражения для скорости реакции, катализируемой ферментом, с s в качестве субстрата. Сейчас, записывая вид этой зависимости, мы имеем возможность выбора: можно воспользоваться уравнением Михаэлиса — Ментен (1.9) с $K_2 = 0$ или взять одно из более сложных уравнений — (1.11) или (1.23), описывающих ферменты с сигмоидной кинетикой. Естественно,

что Новик и Сцилард (Novick, Szilard, 1950) и Моно (Monod, 1950) использовали более простое выражение Михаэлиса — Ментен, так как в то время кооперативность ферментов еще не была обнаружена. Итак, следуя им, примем

$$\mu = \frac{\mu_m s}{K_s + s}. \quad (4.3)$$

где μ_m — максимальная скорость роста, аналог максимальной ферментативной активности, а K_s — аналог константы Михаэлиса [$1/K_1 = (k_{-1} + k_2)/k_1$ в уравнении (1.9)]. Величина μ_m определяется собственной скоростью роста клеток и, следовательно, зависит только от их наследственной структуры.

Подстановка выражения (4.3) в уравнения (4.1) и (4.2) дает нам пару уравнений:

$$\frac{dx}{dt} = \left\{ \frac{\mu_m s}{K_s + s} - D \right\} x, \quad (4.4)$$

$$\frac{ds}{dt} = D(s_R - s) - \frac{\mu_m}{Y} \frac{xs}{(K_s + s)}. \quad (4.5)$$

Стационарное состояние (если оно существует) определяется некоторой парой значений s и x , при которых производные обращаются в 0. Обозначим эти значения как $\tilde{x}$ и $\tilde{s}$; они должны определяться уравнениями

$$\left\{ \frac{\mu_m \tilde{s}}{K_s + \tilde{s}} - D \right\} \tilde{x} = 0, \quad (4.6)$$

$$D(s_R - \tilde{s}) - \frac{\mu_m}{Y} \frac{\tilde{x}\tilde{s}}{(K_s + \tilde{s})} = 0. \quad (4.7)$$

Очевидным решением уравнения (4.6) является $\tilde{x} = 0$; тогда из уравнения (4.7) мы находим, что $\tilde{s} = s_R$. Это соответствует такому состоянию хеостата, когда клетки не введены в сосуд 2, так что концентрация субстрата в нем такая же, как и в сосуде 1, т. е. s_R . Другое решение этой системы уравнений:

$$\tilde{s} = K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right), \quad (4.8)$$

$$\tilde{x} = Y \left[s_R - K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right].$$

Из уравнений (4.8) видно, что при некотором значении D , назовем его D_c , выражение в квадратных скобках будет равно 0, т. е.

$$s_R - K_s \left(\frac{D_c}{\mu_m - D_c} \right) = 0,$$

или

$$D_c = \mu_m \left(\frac{s_R}{K_s + s_R} \right). \quad (4.9)$$

В этом случае уравнение (4.4) примет вид

$$\frac{dx}{dt} = \left(\frac{\mu_m s}{K_s + s} - \frac{\mu_m s_R}{K_s + s_R} \right) x. \quad (4.10)$$

Пока в хемостате существуют клетки, s меньше, чем s_R , потому что клетки используют некоторое количество субстрата; таким образом, из уравнения (4.10) мы видим, что, когда $D = D_c$, $dx/dt < 0$ до тех пор, пока при $s = s_R$ dx/dt не обратится в 0. Это соответствует решению $\bar{x} = 0$, $\bar{s} = s_R$. Следовательно, D_c есть критическая скорость разведения, при которой клетки не могут расти достаточно быстро для того, чтобы скомпенсировать выведение, и поэтому сосуд с культурой медленно, но неуклонно освобождается от клеток. Эта ситуация, а также условия, при которых происходит вымывание, были рассмотрены в интересном и информативном исследовании теории и экспериментального поведения клеток, растущих в хемостате, Хербертом, Элсвортом и Теллингом (Herbert, Ellsworth, Telling, 1956). Они обсудили также многие другие аспекты соотношений между теорией и экспериментом, выявив как соответствия, так и ряд несоответствий, которые помогают определить, какие допущения модели неверны. Несогласия теории эксперименту возникают главным образом при исследовании поведения системы в окрестности критической точки D_c . При высоких скоростях разбавления выживаемость клеток выше, чем это предсказывает теория; поэтому предположение о гомогенности, означающее, что смешивание новых объемов питательного вещества с культурой происходит мгновенно, по-видимому, неверно. Меньшую выживаемость клеток, чем ожидается при критической скорости разбавления, может объяснить именно гетерогенность. Конечно, при любом D большем, чем D_c клетки тем более будут удаляться.

Теперь мы можем исследовать устойчивость стационарных решений уравнений (4.4) и (4.5). Используем тот же метод, что и при изучении устойчивости стационарного решения системы уравнений (1.25). Сначала введем новые переменные, $x = \bar{x} + \xi$, $s = \bar{s} + \eta$, и допустим, что ξ и η малы, так что всеми членами, степень которых выше единицы, можно пренебречь. Тогда система уравнений примет вид

$$\begin{aligned} \frac{d\xi}{dt} &= \left\{ \frac{\mu_m (\bar{s} + \eta)}{K_s + (\bar{s} + \eta)} - D \right\} (\bar{x} + \xi) \simeq \\ &\simeq \left\{ \frac{\mu_m \bar{s}}{K_s + \bar{s}} + \frac{\mu_m K_s \eta}{(K_s + \bar{s})^2} - D \right\} (\bar{x} + \xi) \simeq \frac{\mu_m K_s \bar{x}}{(K_s + \bar{s})^2} \eta = a\eta, \end{aligned} \quad (4.11)$$

$$\begin{aligned} \frac{d\eta}{dt} &= D(s_R - \bar{s} - \eta) - \frac{\mu_m}{Y} \frac{(\bar{x} + \xi)(\bar{s} + \eta)}{K_s + \bar{s} + \eta} \simeq \\ &\simeq D(s_R - \bar{s} - \eta) - \frac{\mu_m}{Y} \left\{ \frac{\bar{x}\bar{s}}{K_s + \bar{s}} + \frac{\bar{s}}{K_s + \bar{s}} \xi + \frac{K_s \bar{x}}{(K_s + \bar{s})^2} \eta \right\} = \\ &= -D\eta - \frac{\mu_m}{Y(K_s + \bar{s})} \left\{ \bar{s}\xi + \frac{K_s \bar{x}}{K_s + \bar{s}} \eta \right\} = -b\xi - c\eta, \end{aligned} \quad (4.12)$$

где

$$a = \frac{\mu_m K_s \bar{s}}{(K_s + \bar{s})^2},$$

$$b = \frac{\mu_m \bar{s}}{Y(K_s + \bar{s})} \quad \text{и} \quad c = D + \frac{\mu_m K_s \bar{s}}{Y(K_s + \bar{s})^2}.$$

Характеристическое уравнение системы уравнений (4.11) и (4.12) есть

$$\begin{vmatrix} \lambda & -a \\ b & \lambda + c \end{vmatrix} = \lambda(\lambda + c) + ab = 0.$$

Его корни равны

$$\lambda = \frac{-c \pm \{c^2 - 4ab\}^{1/2}}{2}.$$

Поскольку a , b и c положительны, действительная часть корней отрицательна, и поэтому стационарное состояние для $\bar{x}$, $\bar{s} > 0$ устойчиво. Подставляя в выражение для c $D = \mu_m \bar{s} / (K_s + \bar{s})$ из уравнения (4.6), можно также показать, что $c^2 - 4ab > 0$, поэтому корни не имеют мнимых частей, и, следовательно, в работе хеостата не может существовать никакого овершута с затухающими колебаниями. Однако экспериментально это явление обнаружено, т. е. опять имеется несоответствие между теорией и экспериментом, требующее модификации модели. Этот случай был рассмотрен Мозером (Moser, 1958).

Если $D < D_c$, то можно показать, что решение $\bar{x} = 0$, $\bar{s} = s_R$ неустойчиво, подставляя эти значения в уравнения (4.11) и (4.12). В этом случае характеристическое уравнение имеет вид $(\lambda - \alpha)(\lambda + D) = 0$, где $\alpha = \mu_m s_R / (K_s + s_R) - D$, так что существует положительное собственное значение, дающее неустойчивость. Но если $D > D_c$, то решение $\bar{x} = 0$, $\bar{s} = s_R$ будет устойчиво. Выяснения влияния параметра D на поведение этой системы интересно с той точки зрения, что оно показывает зависимость устойчивости от выполнения некоторых ограничений, определяемых параметрами.

Адаптивное поведение хеостата

Полученный выше результат очень важен, потому что привлекает наше внимание к некоторым общим принципам адаптивного поведения, с которым мы уже сталкивались в связи с иерархической организацией метаболической и эпигенетической систем (гл. 1 и 2) и которое теперь может быть формализовано для хеостата. В уравнениях (4.4) и (4.5) мы использовали для описания состояния системы две переменные — x и s . Другие члены являются параметрами, которые или задаются

экспериментатором и поддерживаются постоянными в течение эксперимента, как, например, D и s_R , или присущи данному типу клеток, например μ_m , K_s и Y . Последние не находятся под контролем исследователя, если не считать возможности выбора другой клетки, а первые экспериментатор может менять по своему усмотрению. Предположим, что мы используем хеостат для получения некоторого биологического продукта, скажем витаминов, так что клетки, собранные в сосуде 3, составляют пул, из которого материал извлекается и соответствующим образом обрабатывается. Можно сконструировать хеостат так, чтобы объем в сосуде 3 всегда поддерживался на некотором определенном уровне, несмотря на изменение потребления; этого можно добиться, регулируя скорость потока f из сосуда 1 в соответствии с уровнем клеток в сосуде 3. Когда этот уровень падает ниже заданной величины L , на клапан подается сигнал, который открывает его, увеличивает f и, следовательно, скорость производства клеток. Этот сигнал действует аналогично петле отрицательной обратной связи, так как если уровень слишком низок, скорость потока увеличивается, и наоборот; точно так же работает ингибирование по типу обратной связи при регуляции скорости потока метаболитов в цепи образования конечного продукта. Аналогия здесь довольно очевидная, хотя соответствующие выражения, вообще говоря, различаются. Если сделать D в уравнениях (4.4) и (4.5) функцией уровня клеток, то в систему введется другая переменная, которая первоначально не учитывалась при выводе этих уравнений. Ясно, что существует много различных типов выражений, которые удовлетворяют главному требованию функциональной зависимости между уровнем, скоростью потока и потреблением, записанной в виде дифференциальных уравнений. При этом хеостат становится гомеостатом, поддерживающим относительно постоянный пул продукта, несмотря на изменения в его потреблении, так же как метаболический путь поддерживает постоянный пул конечного продукта при изменении физиологических потребностей.

Однако если потребление превышает определенную величину, так что соответствующее ей значение f приводит к значению $D = f/V > D_c$, то система несомненно разбалансируется. Что нужно сделать, чтобы система обладала гибкостью и приспособляемостью, необходимыми ей в таких ситуациях? Во власти конструктора находится еще один параметр — объем хеостата V . Увеличивая его, мы при фиксированном f уменьшаем D , поддерживая его, таким образом, на уровне, меньшем D_c . Чтобы включить эту регулировку, необходимо ввести новую цепь управления, которая регулировала бы V (скажем, поднимая или опуская подвижный сливной рукав, а не фиксируя его на опреде-

ленной высоте), когда отношение $\frac{f}{V}$ достигает критического значения.

Для того чтобы увидеть, какие принципы должны управлять функциональной зависимостью между f и V , полезно рассмотреть зависимость между $D\bar{x}$, являющейся мерой производительности хемостата, и D . Из уравнения (4.8) мы видим, что

$$D\bar{x} = DY \left\{ s_R - K_s \left(\frac{D}{\mu_m - D} \right) \right\}.$$

Этой зависимости соответствует кривая, приведенная на рис. 4.2. Она имеет максимум, который, как можно показать, достигается при

$$D = \mu_m \left[1 - \left(1 - \frac{s_R}{K_s + s_R} \right)^{1/2} \right],$$

так что оптимальная адаптивная система поддерживала бы V таким, что D при изменении f оставалось бы в окрестности этого максимума. Изменения величин $\bar{x}$ и $\bar{s}$, сопровождающие изменение V , были бы более медленными, чем изменения L , уровня продукта в сосуде 3 (рис. 4.1), в результате изменений f , что привело бы к существованию различных времен релаксации.

Изменения производительности системы в результате изменений V аналогичны изменениям, которые контролируются репрессией по типу обратной связи, где изменение потока в метаболическом пути достигается за счет изменения количества ферментов. Здесь опять работает тот же самый принцип: приспособляемость производительности достигается превращением параметров в переменные с определенной функциональной зависимостью от других переменных. Конечно, это всегда делает систему динамически более сложной. Но эту сложность можно поддерживать на уровне, поддающемся управлению, применяя принцип иерархии, которая зависит от временного масштаба: краткосрочные изменения управляются одним уровнем управления, более длительные и более обширные изменения — с помощью «более высокого» уровня управления. Первый уровень мы обычно называем гомеостатическим, а последний — адаптивным, хотя очевидно, что эта терминология относительная. Аналитически они разделяются в результате существования

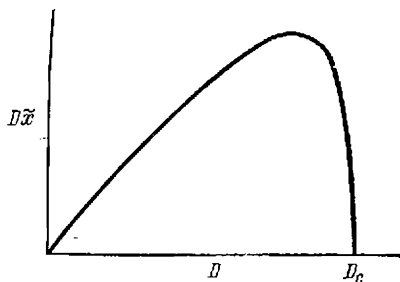


Рис. 4.2. Зависимость между $D\bar{x}$ и D для клеток, растущих в хемостате.

зависимости между переменными и медленно меняющимися («вековыми») параметрами в соответствии с временами релаксации этих уровней. Совершенно ясно, что теоретического предела числу уровней адаптивного действия, которое может иметь система, не существует.

Системы восстановления клеток

Хеомостат и его гомеостатические модификации дают простую модель некоторых типов физиологических процессов управления, работающих на уровне клеточных популяций. В предыдущей главе я рассмотрел возможную теорию гомеостаза эпидермиса, включающую и временную, и пространственную упорядоченность, обусловленную тем, что вдоль толщи ткани поддерживался градиент эпидермального кейлона. Существуют данные о том, что кейлоны участвуют также и в регуляции скорости образования циркулирующих в крови клеточных популяций, таких, как гранулоциты (Rytomäa, Kiviniemi, 1968), лейкоциты (Garcia-Giralt et al., 1970) и эритроциты (Kivilaakso, Rytomäa, 1971). Рассмотрим, как с помощью основных принципов управления можно объяснить регуляцию клеточной плотности в этих циркулирующих популяциях, и проведем сравнение с работой хеомостата.

Первый момент, который необходимо рассмотреть, состоит в следующем. Поскольку в крови существуют различные типы клеток и каждый тип может регулироваться независимо от других, то на каждую популяцию должно действовать свое специфическое средство управления. Теоретически это может осуществляться за счет наличия раздельных отсеков для роста ствольных клеток каждого типа; тогда скорость роста внутри каждого отсека можно было бы регулировать, изменяя поступления общего питательного вещества, например глюкозы, так же как в хеомостате. Однако различные типы кроветворных клеток совместно функционируют в одних и тех же органах, таких, как печень, селезенка и костный мозг. В тканях этих органов существует, конечно, гистологическая гетерогенность, отражающая частичное пространственное разделение различных типов предшественников или стволовых клеток, потомство которых дифференцируется в зрелые типы клеток, но данные о существовании раздельных систем циркуляции для этих различных клеток отсутствуют. Таким образом, управление осуществляется с помощью специфических сигналов, а не поступлением питательных веществ, как это происходит в хеомостате. На самом деле организм может управлять доставкой питательных веществ к любой ткани, регулируя кровоток, поэтому клапан, аналогичный действующему в хеомостате, все же существует. Однако при этом

нельзя получить точкой дискриминации в управлении, необходимой в том случае, если популяция клеток внутри камеры роста гетерогенна.

Такая дискриминация может возникнуть в том случае, если дифференцированные клетки выделяют белок, например кейлон или другое вещество, которое специфически подавляет рост их клеток-предшественников, как это показано Бэйтеменом (Bateman, 1974) и Бэйтеменом и Гудвином (Bateman, Goodwin, 1976) для лейкоцитов крови и эритроцитов в культурах костного мозга. Эти ингибиторы можно рассматривать как сигнал обратной связи от циркулирующей крови (аналогом которой на рис. 4.1 является сосуд 3) в кроветворные органы, содержащие различные типы клеток-предшественников (сосуд 2).

Скорости роста клеток-предшественников в сосуде 2 будут тогда функциями физиологического уровня клеток в сосуде 3 (этот уровень может измеряться с помощью концентрации соответствующего кейлона) и других специфических сигналов, которые влияют на скорость роста. Например, в случае предшественника эритроцита важную роль в стимуляции скорости деления в условиях, когда имеется физиологическая потребность в большей кислородной емкости крови, играет гормон эритропоэтин, и действие отрицательной обратной связи с помощью постулированного эритроцитарного кейлона дополняет действие этого гормона аналогично тому, как лактоза и катаболитный репрессор совместно регулируют активность *lac*-оперона. Совершенно ясно, что для того, чтобы получить модель поведения гемопоэтической и других систем восстановления клеток, нужно сильно модифицировать простые принципы работы хемостата. Гибкие и многосторонние подходы к такому моделированию можно найти в исследованиях Корна и др. (Korn et al., 1973) и Протеро и Тайлера (Prothero, Tyler, 1975). Мы остановимся теперь на другом, очень важном и интересном аспекте поведения клеточной популяции — явлении синхронизации клеток.

Синхронизация клеток

Анализируя рост популяции в хемостате, мы не учитывали того факта, что этот рост на уровне одной клетки есть периодический процесс. Как отмечалось в начале этой главы, существование цикла у каждого члена популяции может привести к возникновению цикличности на популяционном уровне. Один из факторов, который может вызвать такую цикличность, — это наличие внешнего периодического воздействия, период которого достаточно близок к среднему времени генерации клеток для того, чтобы вынудить клетки синхронизоваться с этим воздействием. В качестве примера можно привести исследования,

выполненные мною по синхронизации бактерий *E. coli*, растущих в хемостате, куда лимитирующий элемент питания, фосфат, добавлялся один раз за время удвоения (Goodwin, 1969a, b, c). При росте клеток в хемостате время удвоения определяется скоростью разбавления D , как это видно из уравнения (4.1), поскольку в стационарном состоянии $\mu = D$, и рост задается выражением

$$\frac{dx}{dt} = \mu x,$$

интегрирование которого дает обычную экспоненциальную функцию

$$x = x_0 e^{\mu t}.$$

Очевидно, что значение t , при котором плотность клеток удваивается, есть такое значение T , которое удовлетворяет соотношению

$$2x_0 = x_0 e^{\mu T},$$

или

$$\mu = \frac{\ln 2}{T}.$$

Таким образом, в стационарном состоянии $D = \ln 2/T$, что дает связь между скоростью разбавления и скоростью удвоения или временем генерации популяции T . В моих экспериментах бактерии выращивались на среде с дефицитом фосфата со скоростью роста, соответствующей среднему времени удвоения 90 мин, и каждые 90 мин добавлялось фиксированное количество фосфата. Результаты эксперимента представлены на рис. 4.3, где приведены изменения оптической плотности (D_{540}), числа клеток и активности ряда ферментов. При этих условиях достигается относительно высокая степень синхронности клеток — порядка 60%. Достичь более высокой синхронности трудно ввиду вариабельности процесса деления у бактерий. Изменение периода воздействия до значения, отличного от времени удвоения, как и следовало ожидать, заметно уменьшает синхронность.

Тот факт, что клеточное деление начинается сразу после импульсного добавления фосфата к культуре, предполагает, что фосфат необходим для завершения некоторых событий, связанных с образованием поперечной стенки и разделением клетки. Очевидно, внутриклеточный уровень фосфата падает слишком низко для того, чтобы эти процессы могли завершиться, хотя бактерии во время фазы дефицита фосфата продолжают расти, что видно из кривой роста, приведенной на рис. 4.4. Здесь переменные хемостата заменены на эквивалентные переменные непроточной культуры с помощью преобразования $X = xe^{Dt}$, где X обозначает переменную культуры, а x — переменную хемостата,

Представленная кривая относится к ферменту аспартаткарбамоилтрансферазе. Преобразование переменных делает очевидным тот факт, что остановки роста в хемостате между моментами введения фосфата не происходит. Ясно, что чувствительность разных процессов к уровню фосфата различна, и в действительности без таких различий было бы невозможно синхронизиро-

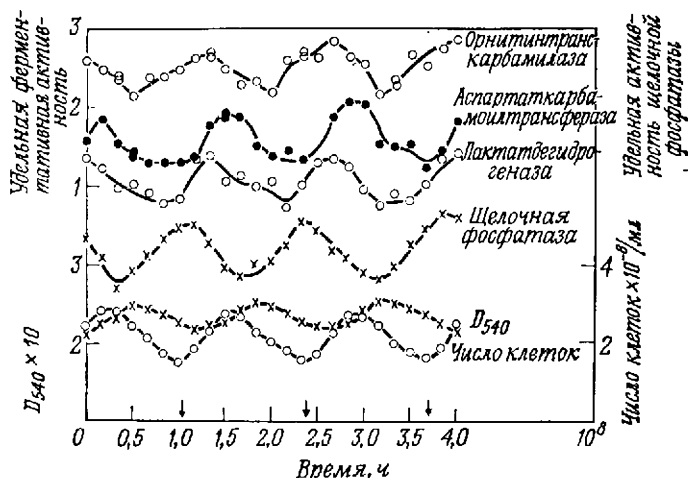


Рис. 4.3. Поведение ряда переменных бактериальной культуры, синхронизированной периодическими добавлениями лимитирующего элемента питания, фосфата.

вать клетки с помощью обычного питательного вещества, такого, как фосфат. То, что физиология бактерий при этих условиях заметно периодична во всех своих аспектах, очевидно из приведенных на рис. 4.3 кривых, описывающих поведение различных ферментов. Способы использования этой периодичности для исследования динамических аспектов физиологии бактерий рассмотрены в статье Гудвина (Goodwin, 1969b), в которой изучены характеристики ответов *lac*-оперона на различные возмущения.

Существует много примеров клеточных популяций как среди одноклеточных организмов, так и в тканях многоклеточных, для которых характерна периодичность по числу клеток, митотическому индексу или индексу включения тритисвой метки. Однако определить непосредственную причину синхронности не всегда удастся, так как ситуация весьма усложняется существованием клеточных часов, которые могут сами влиять на клеточный цикл. По-видимому, бактерии не обладают такими часами, и в этом случае ситуация упрощается. Многоклеточные, конечно, имеют

часы, но они обычно локализованы в специализированных органах или железах. Так, 24-часовой митотический ритм, скажем, в эпидермисе или эпителии желудка мыши задается, вероятно, 24-часовым циклом некоторого гормона, ритм колебаний концентрации которого может быть автономным, как ритмическая активность надпочечной железы у хомячка, или же индуциро-

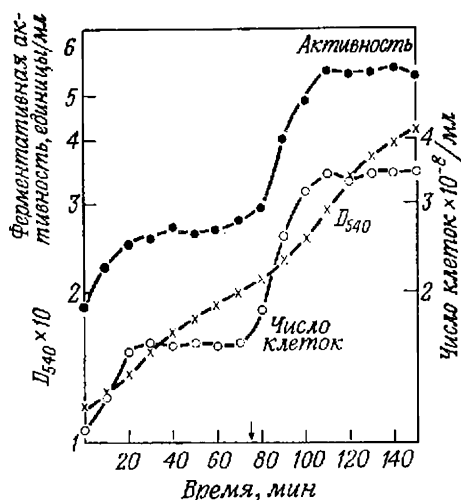


Рис. 4.4. Переменные хемостата, преобразованные в эквивалентные периодические переменные культуры для наглядного выявления синхронности делений.

ваться другим периодическим сигналом, возможно нервным, который испытывает автономные колебания. Наконец, наблюдаемая периодичность может быть обусловлена внешним фактором, например периодической сменой дня и ночи, без какого-либо участия внутренних часов организма. Рассмотрению этого очень интересного аспекта поведения биологических систем, на котором я подробно остановлюсь позже, были посвящены многие исследования. В данный момент мне хотелось бы кратко обсудить некоторые подходы к анализу периодичности популяции в условиях внешнего воздействия.

Здесь опять удобно начать с общей простой модели клеточного роста в хемостате, а частные случаи в деталях рассмотреть позже. Поскольку нас интересует динамика популяций, определяемая поведением отдельных клеток, необходимо прежде всего встроить в модель клеточный цикл. Это можно сделать следующим образом. Рассмотрим сначала клеточный цикл как одну стадию, по завершении которой клетка делится на две. По-

сколько, как обсуждалось в предыдущей главе, среди клеток, проходящих цикл, существует значительная вариабельность, нам нужна функция, которая задает вероятность того, что клетка, делящаяся в момент τ , разделится снова в малом интервале $(t, t + dt)$. Пусть эта функция будет $f(t - \tau)$; тогда вероятность того, что клетка, которая поделилась в момент τ , разделится снова в интервале $(t, t + dt)$, есть $f(t - \tau) d\tau$. Если плотность клеток в культуре равна $n(t)$, то число клеток, «рожденных» в прошлом в течение малого временного интервала $(\tau, \tau + d\tau)$, можно записать как $dn(\tau)$. Чтобы найти число клеток, делящихся в малом интервале в настоящем, $(t, t + dt)$, мы должны сложить все вклады от делений, происходивших в прошлом, взвешенные с помощью функции распределения вероятности $f(t - \tau)$, и затем умножить все на 2, так как мы предполагаем, что каждая клетка дает две дочерние клетки. В результате получаем соотношение

$$dn(t) = 2 \left[\sum_{r=1}^m f(t - \tau_r) dn(\tau_r) \right] dt,$$

где r относится к отдельным малым временным приращениям $d\tau$, в течение которых в прошлом клетки делились. Устремляя m к ∞ так, что приращения становятся бесконечно малыми величинами, мы получаем интеграл

$$\frac{dn(t)}{dt} = 2 \int_{-\infty}^t f(t - \tau) \frac{dn}{d\tau} d\tau,$$

где область интегрирования охватывает весь период развития культуры. Если эксперимент начался в нулевой момент времени, то интеграл можно записать в виде

$$\frac{dn(t)}{dt} = 2 \int_0^t f(t - \tau) \frac{dn}{d\tau} d\tau + \left(\frac{dn}{dt} \right)_0, \quad (4.13)$$

где $\left(\frac{dn}{dt} \right)_0$ является начальным условием. Это уравнение известно как уравнение возобновления. Оно может быть использовано для описания роста клосток в периодической культуре или скорости затухания синхронности как функции вариабельности времени удвоения клеток, которая выражается с помощью функции $f(t - \tau)$ — функции распределения времени удвоения. Хирш и Энглеберг (Hirsch, Engleberg, 1966) провели интересное исследование этого вопроса, показав, при каких условиях можно получить аналитические решения уравнения (4.13). Другая модель затухания клеточной синхронности, использующая температурную функцию для описания изменчивости времен

генерации, рассмотрена в статье Вули и Де Рокко (Woolley, De Rocco, 1973).

Чтобы распространить уравнение (4.13) на систему со стационарным ростом и возобновлением клеток, каковой является хеостат или живая система, например кровь, необходимо ввести члены, описывающие скорость выхода клеток из сосуда роста или из популяции стволовых клеток. Выведение клеток из сосуда со скоростью разбавления D является пуассоновским процессом, так как он зависит от некоторого случайного события. Вероятность выживания клеток в сосуде роста за период времени t задается членом e^{-Dt} , так что общая вероятность деления для клеток, «родившихся» в момент τ и все еще присутствующих в течение некоторого более позднего временного интервала $(t, t + dt)$, равна

$$e^{-D(t-\tau)} f(t - \tau) dt \quad (t > \tau).$$

Кроме того, нужно учесть также скорость выведения $-Dn$, которая аналогична члену $-Dx$ в уравнении (4.1). Таким образом, уравнение для роста клеток в хеостате, эквивалентное (4.13), имеет вид

$$\frac{dn}{dt} = 2 \int_0^t e^{-D(t-\tau)} f(t - \tau) \frac{dn}{d\tau} d\tau - Dn + \left(\frac{dn}{dt} \right)_0. \quad (4.14)$$

Очевидно, если $D = 0$, мы получим уравнение (4.13).

Следующий шаг состоит в том, чтобы подразделить всю цепь превращений, происходящих с системой, на стадии и ввести внешнюю периодичность, так чтобы она влияла на вероятность перехода из одной стадии в другую. Это можно сделать целым рядом способов. Ле Витт (Le Witt, 1972) использовал следующий метод. Он разделил клеточный цикл на три стадии и обозначил их W , U и V . На стадии W плотность клеток, которые ждут момента, чтобы перейти к следующей стадии клеточного цикла, равна g_w . Предполагается, что время ожидания зависит от концентрации лимитирующего субстрата s в хеостате и, это именно тот субстрат, который периодически добавляется в модельном машинном эксперименте Ле Витта. На стадиях U и V число клеток на единицу объема равно g_u и g_v соответственно, так что $g_w + g_v + g_u = n$, полному числу клеток на единицу объема хеостата. Прохождение клетками стадии U , предположительно состоящей из фаз S , G_2 и M , и стадии V , которая является частью фазы G_1 , определяется функциями распределения вероятностей $f_u(t - \tau)$ и $f_v(t - \tau)$, аналогичными соответствующей функции в уравнении (4.13). Эти две стадии были разделены для того, чтобы придать модели гибкость и вычислить

вероятность перехода из стадии U (т. е. скорость деления клеток), но во многих случаях их можно объединить и описывать одной функцией вероятности перехода, $f(t - \tau)$.

Ле Витт предположил, что стадия W — это пункт управления в клеточном цикле, соответствующий границе между периодами G_1 и S, и что прохождение через нее регулируется незаменяемой

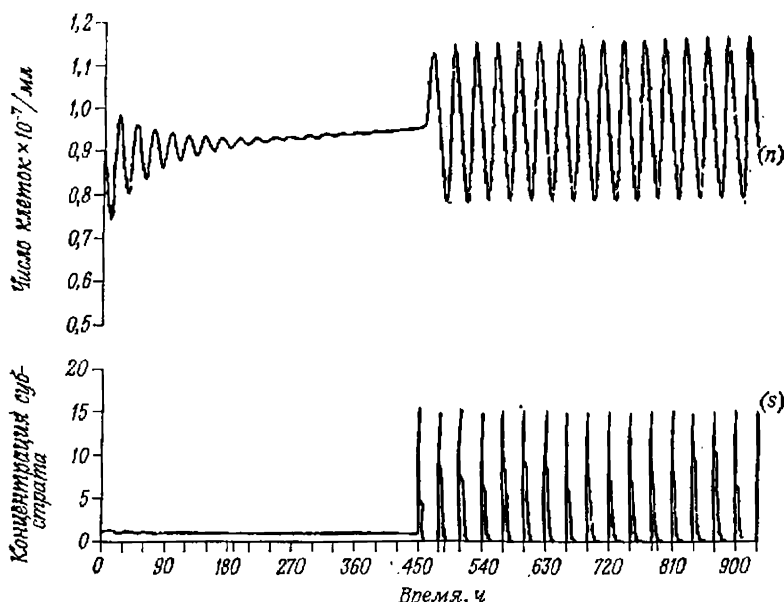


Рис. 4.5. Численное моделирование процесса синхронизации клеток LS в хе-мостате периодическим добавлением питательного вещества, контролирующего вхождение в S-фазу.

аминокислотой, которая определяет скорость синтеза белка — инициатора синтеза ДНК. Это предположение основано на том факте, что лишение клеток ткани китайского хомячка аргинина приводит к остановке развития культуры в некоторой точке фазы G_1 перед вступлением в S-фазу (Freed, Schatz, 1969). Однако очевидно, что модель можно интерпретировать самыми разными способами. Ле Витт обнаружил, что относительно высокую степень синхронности клеток можно получить, если концентрацию аминокислоты периодически менять так, чтобы период колебаний был равен времени генерации, как показано на рис. 4.5. На этом рисунке можно видеть затухание синхронности в первоначально синхронизированной культуре при помещении ее в окружающую среду с постоянным составом и затем появление синхронности в результате колебаний концентрации

аминокислоты. Синхронность этой системы — 55% — вполне сравнима со значением, полученным Гудвином (Goodwin, 1969) экспериментально в случае бактериальных культур в хемостате. Ле Витт использовал значения параметров — скорости потребления аминокислот ($K_s = 5,7 \times 10^{-5} \text{ M}$), времени генерации (30 ч), коэффициента вариации времени генерации (0,137), — соответ-

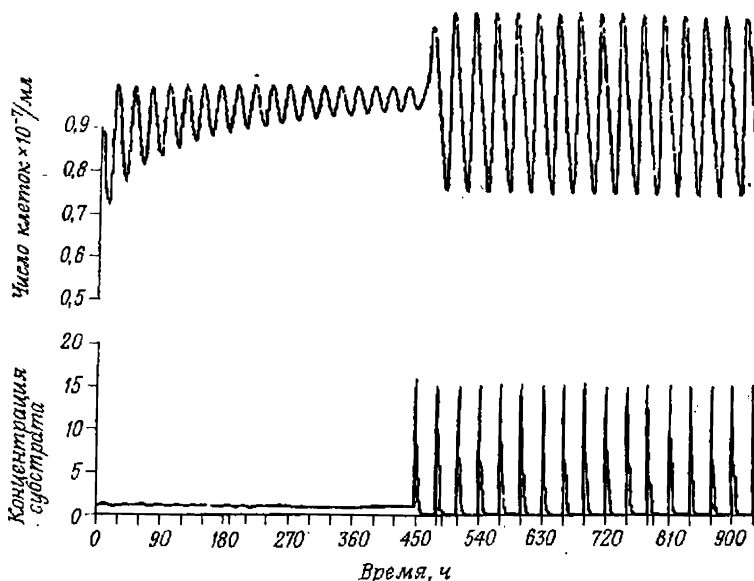


Рис. 4.6. Влияние уменьшения коэффициента вариации распределения времени удвоения клеток на степень синхронности моделируемой культуры клеток LS.

ствующие LS-клеткам (предшественникам соединительной ткани у мышей), поэтому полученные им положительные результаты о возможности индукции синхронности в модели подтвердили предположение о том, что клетки могут быть синхронизованы этим способом.

Влияние уменьшения шума или изменчивости клеточного цикла, измеряемого коэффициентом вариации (Ле Витт использовал вероятность перехода с распределением Гаусса), показано на рис. 4.6 (коэффициент вариации 0,1 вместо 0,137). Из рисунка видно, что исходная синхронность затухает медленнее, а уровень синхронизации после начала периодического введения аминокислоты повышается (синхронность становится равной 63,7%). Изменение других параметров, таких, как s_R (концент-

рации лимитирующей аминокислоты во втекающей среде), чувствительности синтеза белка-инициатора к этой лимитирующей аминокислоте и времени жизни белка-инициатора в довольно широких пределах мало влияет на степень синхронности. Однако эти параметры все же влияют на стационарное состояние

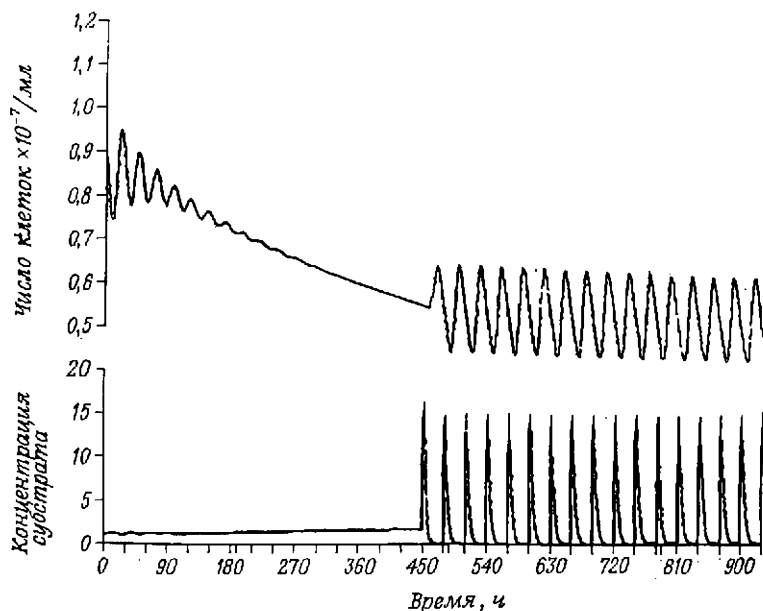


Рис. 4.7. Влияние уменьшения времени жизни белка — инициатора репликации ДНК на стационарное состояние и степень синхронности моделируемой культуры клеток LS.

клеточной популяции в хемостате, как это видно из рис. 4.7. Здесь время жизни белка-инициатора уменьшено до 2,5 ч по сравнению со стандартным значением 3 ч, поэтому средний уровень белка-инициатора в клетках понижен; клетки медленнее переходят в фазу синтеза ДНК, и стационарный уровень популяции в хемостате понижается. Однако степень синхронности снижается с 55% только до 54,6%. Ле Витт исследовал множество других интересных зависимостей такого рода, и его результаты являются веским доводом в пользу того, что клетки млекопитающих в культуре могут быть синхронизированы этим способом. Несколько иная разработка этой проблемы, основанная на другой системе гипотез, была предложена Франком (Franck, 1970).

Суточные ритмы деления клеток в тканях млекопитающих

Как упоминалось ранее, для тканей млекопитающих, особенно тканей эпидермиса, характерны отчетливые 24-часовые колебания митотического индекса и индекса включения тритиевой метки. Изучая именно это явление у мышей, Буллоу и Лоуренс (Bullough, Laugence, 1960, 1961) пришли к своим исследованиям кейлонов. Они обнаружили, что пик митотической активности в эпидермисе уха мыши наступает во время периодов отдыха, тогда как в состоянии бодрствования и активности митотический индекс низок, причем различались эти уровни почти в 4 раза. Тщательное исследование действия адреналина *in vivo* и *in vitro* и эффекта адреналэктомии на этот ритм подтверждает, что этот гормон стресса играет важную роль в индукции колебаний митозов. Адреналэктомизированные мыши обладали устойчиво повышенным митотическим индексом и никакого суточного ритма не имели, в то время как мыши, подверженные стрессу, или клетки, культивированные *in vitro* и чувствительные к адреналину, обладали пониженными индексами. Таким образом, адреналин, очевидно, ингибирует вступление клеток в митоз. Поскольку время генерации базальных клеток в эпидермисе уха равно 3—4 сут, а действие изменения уровня адреналина на митотический индекс проявляется в пределах нескольких часов, то, казалось бы, адреналин воздействует на события, довольно близкие к митозу. Однако другие исследователи (Pilgrim, Erb, Mauger, 1963; Pilgrim, 1967; Brown, Berry, 1968) показали, что наблюдается также отчетливый ритм включения тритиевой метки в тканях, у которых только фаза G_1 занимает несколько дней (например, базальные клетки эпителия пищевода). Поэтому вряд ли гормональный сигнал или сигналы любой природы действуют исключительно на предмитотические события, так как изменчивость длительной фазы G_1 приводила бы к отчетливой разнице в амплитуде ритмов митотического и тритиевого индексов вследствие затухания синхронности при прохождении стадии G_1 , что противоречит экспериментальным данным. Таким образом, наблюдаемые ритмы, вероятно, генерируются различными ритмическими физиологическими сигналами, действующими на разные части цикла. Один сигнал с периодом в 24 ч, действующий на разные фазы клеточного цикла, приводил бы к двухфазному поведению популяции, давая два пика активности, соответствующие двум субпопуляциям, которые сигнал застает в разные фазы, если только эти фазы не разделены интервалом, близким к 24 ч. Таким образом, если адреналин действует ближе к концу фаз G_2 и G_1 , ингибируя процессы в них обих, и если $S + G_2 = 24$, то получится суточный митотический ритм. Однако $S + G_2$ обычно значительно короче,

чем 24 ч (см. Pilgrim et al., 1963; Bruce, 1965), поэтому каковы физиологические источники этих ритмов — митотического и процесса синтеза ДНК, — неясно. Некоторые ткани к тому же не проявляют никаких колебаний митотического или тритиевого индекса и, вероятно, нечувствительны к колебаниям концентраций гормонов. То, что физиология млекопитающих организована на основе 24-часового цикла, следует из работ многих исследователей (Halberg, 1963, Richter, 1965), но адаптивное значение существования периодических режимов активности клеточного цикла различных тканей, вообще говоря, не понятно. Интересное со сравнительной и эволюционной точек зрения рассмотрение зависимости между ритмами клеточного цикла и колебаниями условий окружающей среды можно найти у Брюса (Bruce, 1965).

Из всего сказанного выше можно сделать вывод, что циклическая природа процесса роста и деления клеток позволяет им изменять степень синхронности с помощью внешних периодических сигналов и что этот тип поведения может объяснять в общих чертах суточные ритмы митотической активности и синтеза ДНК, наблюдаемые в тканях млекопитающих. Доказательств того, что клетки при этом поддерживают состояние синхронности популяции, взаимодействуя между собой, не существует. Скорее есть данные о том, что, какая бы степень синхронности ни наблюдалась, она является результатом воздействия внешних вынуждающих колебаний. Однако можно предположить, что при наличии сильного взаимодействия между клетками может появиться тенденция к развитию синхронности аналогично тому, как это имеет место в синцитиях, например у *Physarum polycephalum*, в раннем эмбриогенезе насекомых или в слившихся клетках, в которых возникает митотическая синхронность. То, что это не обязательно так, будет сейчас показано.

Контактное торможение

Давно известно, что при возрастании плотности нормальных клеток в культуре скорость их деления падает и в конце концов рост останавливается. Это происходит в тот момент, когда культура разрастается так, что каждая клетка оказывается полностью окруженной другими клетками и находится в контакте с ними. Явление контактного торможения представляет значительный физиологический интерес как способ управления ростом. Однако стволовые клетки, например базальные клетки эпидермиса, тоже находятся в контакте друг с другом и все же продолжают делиться, поэтому на первый взгляд не очевидно, что это явление указывает на наличие регулярного процесса, альтернативного или дополнительного простому механизму,

работающему по типу отрицательной обратной связи, который мы рассмотрели в предыдущей главе. Однако работа Ловенштейна (Lowenstein, 1967) осветила новую сторону этой проблемы. Оказалось, что многие типы нормальных клеток сообщаются друг с другом с помощью плотных контактов, через которые могут проходить молекулы с мол. весом вплоть до 5000. Как будет вести себя сопряженная популяция клеток, которые могут передавать сигналы, управляющие их движением по клеточному циклу, если использовать введенную ранее модель цикла с шумом и стохастическим или вероятностным элементом, вызывающим значительную изменчивость времени генерации? Приведет ли сопряжение к более однородному периодическому поведению, так что все клетки будут проходить свой цикл более регулярно, или изменчивость из-за процесса суммирования возрастет? И что можно сказать об амплитуде управляющих сигналов? Конечно, ответы на эти вопросы зависят от конкретных предположений, которые мы делаем об устойчивости динамических процессов, лежащих в основе клеточного цикла. Но при этом интересно отметить, что сопряжение может привести к уменьшению, а не увеличению упорядоченности целого; при этом сигналы управления будут обладать таким шумом и иметь такую маленькую среднюю амплитуду, что уже перестанут играть роль периодических регуляторов. Тогда сопряженная популяция заполнится своим совокупным шумом и клеточный цикл фактически исчезнет.

Это интересное предположение было высказано Бартоном (Burton, 1971) и довольно подробно рассмотрено в последней статье Бартона и Кэнхэма (Burton, Canham, 1973). Существенно, что эта модель основана на возможности разложения в ряд Фурье колебаний управляющих клеток и описании взаимодействия между клетками линейными членами. Таким образом, динамика всей сопряженной системы линейна и различные решения получаются суперпозицией. Если предположить, что циклы клеток имеют разные частоты, распределенные по Гауссу, то из этого непосредственно будет следовать, что сопряженная система действительно характеризуется большим шумом и что средняя амплитуда колебаний в любой клетке будет значительно меньше, чем когда она находится в свободном состоянии, так как несинхронные колебания компенсируют друг друга. Бартон и Кэнхэм показали, что в пределе, когда число клеток очень велико и каждая из них взаимодействует с n другими с константой сопряжения K , амплитуда колебаний в любой отдельной клетке уменьшается в $(1/n)/K$ раз. Конечно, амплитуда в результате случайных флуктуаций может достигнуть значения, превышающего пороговое, и тогда цикл сможет продолжаться, но это происходит редко, если только не сделаны

особые предположения. Ясно, что управляющий сигнал может быть или ингибиторного, или инициаторного типа, так как любой из них функционирует с помощью того или иного порогового механизма, который не работает, если амплитуда уменьшается достаточно сильно.

Эти данные можно объяснить не только с помощью модели, предложенной Бартоном и Кэнхэмом. Согласно Смиуту и Мартину (Smith, Martin, 1973), для представления поведения управляющего сигнала инициации или репрессии может быть использован осциллятор с репрессией по типу обратной связи, описанный в гл. 2, и динамикой, задаваемой системой уравнений (2.5). Поведение сопряженных осцилляторов такого типа я рассмотрел в моей книге «Временная организация клетки» (Goodwin, 1963).

Пусть имеется симметричное сопряжение, которое является результатом диффузионной связи; тогда в уравнении (24) для таландической энергии сопряженных осцилляторов на стр. 109 вышеупомянутой книги $k_{12} = k_{21}$; в этом случае отношение средней положительной амплитуды сопряженной системы к амплитуде несопряженной системы описывается выражением

$$\frac{(A_+)_{x_1}^c}{(A_+)_{x_1}} = \frac{\pi}{2} \frac{|H|^{1/2}/h_{12}}{[\sqrt{(h_{11}h_{22})/h_{12}} + 1] \operatorname{tg}^{-1} |H|^{1/2}/h_{12}} < 1, \quad (4.16)$$

где

$$0 < h_{12} < \sqrt{(h_{11}h_{22})}, \quad \text{а} \quad |H| = h_{11}h_{22} - h_{12}^2.$$

Таким образом, мы видим, что сопряжение нелинейных осцилляторов этого вида также приводит к уменьшению амплитуды колебаний, и можно показать, что чем сильнее сопряжены осцилляторы, тем больше это уменьшение. В этой модели не обязательно вводить распределение Гаусса для частот осциллятора, так как основной постулат теории состоит в появлении шума в системе. В статистическую механику он входит в виде параметра системы, названного таландической температурой («колебательной» температурой). Если сопряженные клетки идентичны во всех отношениях, кроме их мгновенного динамического состояния, то в уравнении (4.16) $h_{11} = h_{22}$. Ясно, что это не повлияет на результат.

Особенность обеих моделей, которая приводит к уменьшению амплитуды сопряженных осцилляторов, состоит в наличии слабой устойчивости одинакового типа; говоря специальным языком, они являются консервативными системами с орбитальной устойчивостью. Если взять осцилляторы с более сильным типом устойчивости, например с асимптотической орбитальной устойчивостью, характерной для предельных циклов, получится иной результат, так как осцилляторы будут стремиться

к синхронизации (Winfree, 1967). Вероятно, этим и объясняется синхронизация митозов у *Physarum*.

Это замечание возвращает нас к исходной проблеме контактного торможения и управления ростом. Очевидно, что последствия клеточных взаимодействий через плотные контакты в зависимости от их силы, характеристик устойчивости внутриклеточных осцилляторов и уровня шума молекулярных процессов в клетках могут быть самыми разными. Интересно было бы найти их диапазон, потому что это предопределяет самые разные судьбы клосток в зависимости от их исходных состояний. Существует еще одна степень свободы, связанная с тем, образуются или нет плотные контакты при взаимодействии клеток. Некоторые типы опухолевых клеток, например, не образуют таких каналов связи (Lowenstein, Kanno, 1967); в то же время другие типы клеток не испытывают контактного торможения даже при наличии плотных контактов (Azurnia, Lowenstein, 1971; Borek et al., 1969). С другой стороны, небольшие группы клеток, находясь в контакте, могут стать активнее — факт, обнаруженный Коном (Cope, 1969) и названный контактной помощью. Все это можно объяснить исходя из общей модели, рассматривающей внутриклеточные колебания с определенной динамикой, шум и некоторую форму внутриклеточного сопряжения. Кейлоны в рамках такого механизма могут функционировать, работая, скажем, на поверхности клеток и увеличивая их сродство и сферу действия плотных контактов, а также влияя, как это указано выше (или не влияя), на вероятности переходов между различными стадиями цикла.

Клеточные часы

Хотя цикл роста и деления клеток является периодическим процессом, он в действительности не обладает характеристиками часов. Дело здесь не в том, что цикл нестабилен при постоянных условиях (в этом случае он был бы просто ненадежным хронометром), а в том, что средний период клеточного цикла меняется при изменении внешних факторов, таких, как состав среды, освещение и температура ($Q_{10} > 1$). Конечно, не вызывает сомнений то, что в основе клеточных часов лежит процесс, скорость которого зависит от метаболических активностей, подверженных этим влияниям. Но поскольку функция часов — измерять определенные интервалы времени независимо от условий окружающей среды, в которой они находятся, то следует компенсировать эти влияния, т. е. должен быть временной гомеостат, поддерживающий постоянство периода. Проблема создания надежных хронометров была серьезным испытанием для изобретателей и мастеров XVI и XVII веков; от ее решения

зависела навигационная точность, имевшая большое значение в эту эпоху кругосветных путешествий. Для того чтобы на точность хода не влияла окружающая среда, хронометр изолировали: заключали его в водонепроницаемый футляр, подвешивали на карданном подвесе для предотвращения механических сотрясений и т. д. Труднее было компенсировать изменение температуры; только во второй половине XVIII в. француз Леруа удалось сконструировать компенсационные балансы, так что моменты инерции маятников не изменялись с температурой. Интересно отметить, что жители островов Полинезии, которые в пределах своего архипелага были вынуждены плавать на расстояния свыше 2000 миль, могли измерять время так же хорошо, как и капитан Кук, хотя у них не было механических хронометров и секстантов. Очевидно, они использовали свои собственные часы, а также обладали высокоразвитой способностью к распознаванию и ориентировке, приобретенной в результате длительной тренировки. Эта интересная проблема до сих пор не решена. Еще более удивительными являются навигационные способности мигрирующих птиц. Какова природа биологического процесса, дающего им эту свободу передвижения в пространстве с помощью точного восприятия времени? Связь между картами и часами — наиболее фундаментальная зависимость в биологии; мы убедимся в этом в следующей главе при рассмотрении эмбриогенеза. В данный же момент наши интересы связаны главным образом с хронометрией.

О существовании примерно 24-часового ритма активности различных типов в организмах, наблюдающегося независимо от любой внешней периодичности, известно уже давно. Такие ритмы сейчас называются циркадными (*circa diem*, примерно один день), и они являются наиболее интенсивно изучаемым проявлением внутренней системы контроля времени в организмах. Помимо этого имеются данные и о ритмах с другими периодами, такими, как приливо-отливные, недельные, месячные (лунные), сезонные, годовые и более длительные, также являющиеся элементами хронометрии у различных организмов. Здесь я ограничусь циркадными ритмами, а среди них только примерами, которые позволяют детально изучать это явление на клеточном уровне.

Один из наиболее интересных организмов для изучения циркадного режима — одноклеточная морская водоросль *Gonyaulax polyedra*. Это один из многих микроорганизмов, ответственных за свечение воды в океанах, причем интенсивность этого свечения достигает максимума к 11—12 ч ночи. Культуры *Gonyaulax* могут содержаться в лабораторных условиях, что позволяет подробно исследовать физиологию их циркадных ритмов. Исследования Суини и Гастингса (Sweeney, Hastings,

1958) показали, что периодичность характерна не только для самого процесса люминесценции, но и для ее яркости, которая достигает максимума приблизительно за два часа до конца периода темноты, а также для процесса клеточного деления с максимумом числа делящихся клеток, наступающим через полчаса после максимума яркости. Эти ритмы продолжают существовать в течение недель после того, как культуры, выдержанные в условиях чередования 12-часовых интервалов света (900 фут-свечей) и темноты (сокращенно СТ 12:12), помещают в условия постоянного слабого освещения (100 фут-свечей). При постоянной освещенности период ритма не равен в точности 24 ч, как при СТ 12:12, но близок к ним. При изменении температуры период ритма меняется слабо. Например, при 18°С он равен 22,9 ч, в то время как при 25°С — 24,7 ч. Таким образом, ритм имеет $Q_{10} < 1$, т. е. часы не просто скомпенсированы в их реакции на температуру, а перекомпенсированы! Однако главным моментом оказывается то, что этот период, несмотря на изменения температуры, сохраняется примерно равным 24 ч в отличие от времени генерации.

В режиме СТ 12:12 при 21,5°С культура *Gonyaulax polyedra*, исследуемая Суини и Гастингсом (Sweeney, Hastings, 1958), имела среднее время генерации 1,5 сут. Поскольку огромное большинство клеточных делений в любые сутки происходит перед самым рассветом, то очевидно, что клетки в основном делятся с чередующимся временем генерации в 1 и 2 дня, что приводит к среднему значению для популяции 1,5 сут. (В действительности времена генерации могут быть скомбинированы разными способами, например n 24-часовых времен генерации с m 24-часовыми временами генерации за $n + m$ суток. При этом $(n + m)/(n + mp) = \frac{2}{3}$, где n , m и p — целые числа, но случаи $n \neq m \neq 1$, $p \neq 2$ сравнительно маловероятны.) Особый интерес представляет то, что клеточный цикл в этом организме находится под управлением эндогенных или внутриклеточных часов, которые каким-то образом вынуждают или стробируют клеточный цикл, что в некотором смысле эквивалентно усилению синхронности между колеблющимися клетками и внешней периодичностью. Клетки со средними временами генерации, отличными от периода управляющих колебаний, во время их несинфазных циклов будут остановлены перед вступлением в деление (в предположении ингибиторного управления). При этой задержке общий рост будет продолжаться, так что они могут завершить следующий цикл быстрее. Таким образом, в срабатывании процессов синхронизации в этих двух случаях не существует разницы, за исключением происхождения синхронизи-

рующего сигнала, который в случае циркадных часов оказывается внутриклеточным.

Однако здесь возникает одна чрезвычайно интересная проблема — это вопрос о том, почему культуры *Gonyaulax polyedra* после того, как они синхронизованы ритмом СТ 12:12, остаются синхронными в течение недель при непрерывном слабом освещении без каких-либо признаков снижения амплитуды ритма в следующих циклах. Если культура содержится при непрерывном ярком освещении, то ритм быстро сбивается и культура становится полностью асинхронной, причем клетки делятся в любое время дня и ночи. По-видимому, при слабом освещении между клетками возможна какая-то связь, так что клетки остаются в фазе на протяжении всех циклов; природа этого взаимодействия неизвестна. Аналогичные данные были получены Эдмундсом (Edmunds, 1971) при исследовании ритмов клеточного деления у *Euglena gracilis*.

Физиология клеточных часов

Период интенсивного исследования природы клеточных часов совпал со становлением молекулярной биологии как основы аналитического мышления в биологии в конце пятидесятых и на протяжении всех шестидесятых годов. Поэтому большинство исследований опиралось на концепции этой науки. Естественным кандидатом на роль клеточного осциллятора, который мог бы лежать в основе работы часов, была одна из цепей отрицательной обратной связи, играющей, как было показано, центральную роль в клеточной физиологии. Однако относительная температурная независимость часов предполагает существование дополнительного звена помимо цепи управления, отдельные стадии которой регулируются метаболическими процессами, такими, как синтез макромолекул и ферментативный катализ, со значениями Q_{10} между 1 и 2. Предполагаемым кандидатом на роль нечувствительного к температуре процесса в часах была диффузия (Ehret, Trucco, 1967). Бактерии слишком малы для того, чтобы диффузия могла оказаться важным участником регуляции, но, к счастью, они исключаются из рассмотрения тем, что, по-видимому, не имеют циркадных ритмов. Таким образом, общая гипотеза, которая казалась наиболее приемлемой, состояла в следующем: макромолекулы, например мРНК, синтезируются в эукариотическом ядре, затем выводятся в цитоплазму и диффундируют к участкам взаимодействия с рибосомами, после чего синтезируются белки и тоже диффундируют к функциональным участкам, вызывая изменения в состоянии цитоплазмы. Эти цитоплазматические изменения затем передаются ядру и опять с помощью диффузии обеспечивают отрицательную

обратную связь, завершая таким образом цикл. Периоды этих процессов, вероятно, можно сделать равными 24 ч (см. Goodwin, 1963).

Очевидный способ проверки модели этого типа — попытаться остановить часы, затормозив ту или иную стадию цепи событий. Чтобы остановить синтез мРНК и белков, подавить ферментативный катализ и таким образом попытаться исследовать работу постулированных молекулярных осцилляторов в огромном множестве организмов, обладающих циркадными ритмами, были использованы соответственно актиномицин D, пуромицин или актидион и различные ингибиторы ферментов. Результаты многих таких экспериментов опубликованы в сборниках материалов симпозиумов по биологическим часам, например Cold Spring Harbor Symposium, 1960; Circadian Clocks (Aschoff, 1965); Cellular Aspects of Biorhythms (Mayersbach, 1969) и т. д. Несмотря на большое количество очень интересных данных, никакой четкой картины не возникло, и к концу 60-х годов стало ясно, что физиологические основы биологических часов почти так же мало понятны, как и десятилетием раньше. Эта ситуация хорошо описана в книге Бюннинга «Физиологические часы» (Bünning, The Physiological Clock, 1967), которая читается скорее как детективный рассказ, где каждый путь решения проблемы систематически изучается на основе представлений молекулярной биологии и каждый приводит к неубедительному результату, а сами часы постоянно ускользают от исследователя.

Основные трудности в этой области исследований, характерные и для многих других разделов биологии, связаны с проблемой идентификации первичной, а не вторичной или более поздней причины изучаемого процесса. Каракашьян и Гастингс (Karakashian, Hastings, 1962) показали, что актиномицин D в концентрации 0,2 мкг/мл подавляет ритм люминесценции у *Gonyaulax*. Поскольку рост в этих условиях тормозился только частично, то очевидно, что какие-то ДНК-зависимые события биосинтеза, связанные с периодической биолюминесцентной активностью, более чувствительны к антибиотику, чем другие, связанные с ростом. В той же статье было показано, что аналогичный результат получается при использовании пуромицина для остановки белкового синтеза. Эти наблюдения, конечно, предполагают, что необходимыми условиями для проявления периодического люминесцентного режима у *Gonyaulax* является синтез мРНК и белка. Исследования на других организмах показали, что проявлению циркадных ритмов обычно мешают ингибиторы дыхания. Это говорит о том, что для протекания процесса необходима энергия. Однако часто оказывалось, что когда организмы, подвергнувшиеся действию вещества в течение некото-

рого периода времени, затем возвращались в нормальные условия, то физиологическая периодичность начиналась снова с той самой фазы, которую она имела бы, если бы оставалась невозмущенной. Это выглядит так, как будто антиметаболит мешает не физиологическому ритму, лежащему в основе функции часов, а выражению некоторого физиологического процесса, который управляется часами, — точка зрения, неоднократно возникающая в анализе Бюннинга (Bünning, 1967). Сами часы, по-видимому, таким воздействием не затрагиваются.

Решающей проверкой первичности действия на сами часы было бы изменение их фазы. До самого недавнего времени единственным антиметаболитом, производящим такой эффект, был арсенит, который вызывал сдвиг фазы в колебаниях свечения у *Gonyaulax* (Hastings, 1960). Однако это давало слабое представление о механизме часов. Чтобы хоть как-то подойти к решению вопроса о природе физиологического процесса, лежащего в основе биологических ритмов или участвующего в нем, необходим препарат (или препараты), который имитирует сдвигающее фазу действие освещения и для которого известно место его действия в клетке. Такое вещество теперь найдено, и с его помощью изучение биологических часов вступило в новую фазу. Однако до того, как оно было обнаружено, исследования в этой области приводили к ряду парадоксов, единственное разрешение которых состояло в полном отказе от первоначальной системы представлений молекулярной биологии, которые имели такое значение для формирования общей картины в этой области, и принятии нового подхода. На самом деле это возвращало исследователей опять к классическому с точки зрения физиологии подходу. Рассмотрим, как мы приходим в этот кажущийся тупик, представляющийся в виде молекулярно-биологических парадоксов.

Роль ядра в генерации клеточных циркадных ритмов можно прямо исследовать на одноклеточной морской водоросли *Acetabularia*. Это замечательное растение имеет сплошную клеточную стенку и состоит из трех частей: ризоида, который вмещает ядро и прикрепляет растение к его субстрату, круглой шляпки диаметром около 1 см и «стебелька» длиной в несколько сантиметров, который соединяет их. Цитоплазма повсюду непрерывна и заключена в тонком цилиндре стебелька, окружая центральную вакуоль. Активный циклоз перемешивает цитоплазму, которая содержит хлоропласты, митохондрии, рибосомы и другие включения. В следующей главе я рассмотрю некоторые регенеративные и морфогенетические свойства этого организма.

Очень большой размер *Acetabularia* позволяет измерять физиологические активности отдельных клеток и выполнять эксперименты по пересаживанию ядер, которые практически

невозможны на других типах клеток. Ядро легко удалить, просто отрезав ризоид; на его место можно поместить другое ядро путем прививки другого ризоида к стебельку методом, разработанным Геммерлингом (Hämmerling, 1934). Существование циркадного ритма фотосинтетической активности в этом организме было установлено Суини и Хэко (Sweeney, Нахо, 1961) и Швейгером и др. (Schweiger et al., 1964). Последние исследователи показали, что ритм сохраняется в отсутствие ядра, а согласно Суини и др. (Sweeney et al., 1967), периодическая фотосинтетическая активность сохранялась в энуклеированных растениях даже в присутствии в среде актиномицина D, пуромицина и хлорамфеникола. Таким образом, ни ядро, ни белковый синтез не являются необходимыми для того, чтобы в *Acetabularia* работали циркадные часы. Однако если ядра перенесены или с ризоидами, или как отдельные органеллы из одного растения в другое и эти растения находятся в противофазе по отношению к режиму СТ, то через несколько дней культивирования при слабом непрерывном освещении фаза ритма определяется фазой ядра. Кроме того, добавление актиномицина D к растениям с ядрами приводит через несколько дней к исчезновению циркадного ритма фотосинтетической активности. Очевидно, ядро все же оказывает влияние на поведение цитоплазмы, но так же очевидно, что цитоплазма для проявления циркадного поведения не нуждается в ядре.

Химическим веществом, которое дало ключ к решению этой загадки, оказался ионофор валиномицин, который взаимодействует с мембраной, увеличивая скорость поступления K^+ в клетки. Бюннинг и Мозер (Bünning, Moser, 1972) обнаружили, что это вещество очень эффективно имитирует освещение в опытах по фазовым сдвигам движения листьев у *Phaseolus*. Этот факт немаленно обратил внимание на роль мембраны и на изменение ионных концентраций как возможную основу физиологических ритмов. Последние исследования циркадных ритмов у *Gonyaulax*, выполненные Ньюсом и др. (Njus, Sulzman, Hastings, 1974), а также Суини (Sweeney, 1974 a), подтвердили и дополнили эти данные. Авторы предложили мембранные модели, которые описывают возможный механизм часов.

Одна такая модель, выдвинутая Суини (Sweeney, 1974b) для объяснения парадокса у *Acetabularia*, состоит в следующем. Важным свойством хлоропластов *Acetabularia* оказалось изменение их объема в течение суток, что заставляет предположить наличие циркадного ритма проницаемости их мембраны. Суини постулировала, что для ядра также характерно ритмичное изменение состояния, связанное с изменением проницаемости мембраны, и что это обуславливает цикличность обмена веществ между ядром организма и цитоплазмой; эта цикличность ле-

жит в основе циркадных часов *Acetabularia*. Есть много способов реализации такого ритма или колебаний, но Суини предполагает, что существуют два метаболита относительно низкого молекулярного веса X и Y (не макромолекулы), причем X индуцируется только в цитоплазме с помощью Y , в то время как Y индуцируется в органеллах метаболитом X . Проницаемость органелл управляется концентрацией X внутри них, и оба вещества распадаются. Поскольку мы провели различие между молекулами в этих двух отсеках, давайте назовем их X_c , Y_c (цитоплазма) и X_o , Y_o (органеллы). Тогда модель Суини может быть представлена следующими уравнениями:

$$\frac{dX_c}{dt} = aY_c - bX_c + f(X_o)(X_o - X_c),$$

$$\frac{dY_c}{dt} = g(X_o)(Y_o - Y_c) - cY_c,$$

$$\frac{dX_o}{dt} = f(X_o)(X_c - X_o) - \alpha X_o,$$

$$\frac{dY_o}{dt} = \beta X_o + g(X_o)(Y_c - Y_o) - \gamma Y_o.$$

Здесь такие выражения, как $f(X_o)(X - X_c)$ и $g(X_o)(Y_o - Y_c)$, представляют скорость движения веществ X и Y через мембрану органеллы, проницаемость которой задана функциями f и g от X_o . Возможность существования колебательного решения этой системы обусловлена наличием функций проницаемости, которые могут быть существенно нелинейными. Тогда на плоскости (X_o, Y_o) мы получим следующую картину (рис. 4.8). Пазовым фазой 0 точку O , когда концентрация X_o достигает максимума, а проницаемость мембран органелл — минимума. В органеллах синтезируется Y_o , а концентрация X_o из-за распада уменьшается. При распаде X_o мембрана становится более проницаемой для Y_o , который выходит наружу, что приводит к уменьшению его уровня в органелле. Тогда X_o тоже быстро снизится, затем, когда Y в цитоплазме возрастет, Y_c индуцирует образование X_c , что приведет к медленному накоплению X_o внутри органеллы и цикл начнется снова. Для X_c и Y_c будет иметь место такой же, но инвертированный цикл.

Эта модель объясняет тот факт, что циркадный ритм фотосинтетической активности у *Acetabularia* не зависит от наличия ядра, мРНК и белкового синтеза при условии, что имеются ферменты и предшественники для образования X и Y . Она может также объяснить, каким образом такая большая органелла, как ядро, вызывает фазовый сдвиг цитоплазмы в данной фазе цикла. Но она не в состоянии объяснить затухания циркадного ритма в целых растениях под действием актиномицина

Д. Как отмечает Суинн, для этого нужно ввести дополнительное предположение о том, что в присутствии ядра цитоплазматические белки становятся неустойчивыми, тогда как в его отсутствие они устойчивы. Эффекты сдвига фазы циркадных часов, изменения освещения и температуры объясняются чувствительностью проницаемости мембраны органелл к этим воздействиям.

Интересная модель часов, которая подчеркивает роль метаболических отсеков как существенной особенности системы поддержания циркадного ритма, выдвинута Каммингсом (Cummings, 1975; 1976). Он использовал простую метаболическую цепь с петлей положительной обратной связи, которая, как мы видели, вызывает динамические неустойчивости. Метаболиты этой цепи расположены в цитоплазматическом отсеке (клеточная мембрана или кортекс), который медленно приходит в равновесие с цитоплаз-

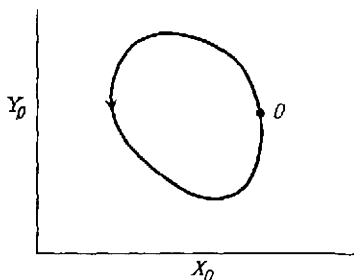


Рис. 4.8. Изображение предельного цикла на фазовой плоскости (X_0 и Y_0).

мой. Именно это медленное достижение равновесия обуславливает длительность периода циркадных колебаний. Уравнения Каммингса (Cummings, 1976) имеют следующий вид:

$$\dot{x} = A - k_1 x - S(y) x,$$

$$\dot{y} = S(y) x - k_2 y,$$

где $S(y)$ — сигмоидная функция, описывающая процесс положительной обратной связи, с помощью которой y ускоряет свой собственный синтез; k_1 и k_2 — константы, характеризующие установление равновесия между отсеком и цитоплазмой. Каммингс идентифицировал x как цАМФ, а y — как 5'-АМФ, фокусируя таким образом внимание на роли этих метаболитов в механизме циркадных часов. Используя линейную аппроксимацию $S(y)$ в окрестности стационарного состояния $(\bar{x}, \bar{y})$, Каммингс показал, что частота осциллятора есть

$$\omega = [\bar{y}/\bar{x} (k_2^2 - k_2 k_1) - k_1^2]^{1/4}.$$

Считая, что разность между k_1 и k_2 достаточно мала, можно легко получить период длительностью в день. Другой интересной особенностью этого осциллятора является очень малая скорость, с которой увеличивается его амплитуда, когда траектории

раскручиваются к предельному циклу изнутри, — вопрос, к которому мы вернемся позже при обсуждении некоторых экспериментальных данных о поведении часов. Эта модель предлагает много интересных экспериментов, особенно связанных с внутриклеточным распределением цАМФ и 5'-АМФ по отсекам. Для более глубокого ознакомления с физиологией часов я рекомендую читателю обратиться также к работе Эдмундса и Кирилло (Edmunds, Cirillo, 1974).

Как же быть с явлением температурной компенсации в биологических часах? Интересное объяснение этого факта было предложено в статье Ньюса и др. (Njus et al., 1974). Они рассматривают детальную модель мембраны на молекулярном уровне, в которой изменение активности ионного транспорта через мембрану обусловлено изменением в расположении и ориентации мембранных белков, четко представленных в жидкостной мозаичной модели Сингера и Никольсона (Singer, Nicolson, 1972). Регуляторами этих изменений активности и распределения мембранных белков выступают концентрации ионов вне мембраны, что снова приводит к основному механизму действия системы саморегулирующейся отрицательной обратной связи. Поскольку эти мембранные белки относительно устойчивы, модель нечувствительна к ингибиторам макромолекулярного синтеза и к ингибиторам ферментов. Представляется, что циркадная физиология клетки регулируется ионными изменениями, — предположение, которое стало общепризнанным из-за наличия большого числа гормонов, которые, по-видимому, действуют непосредственно на мембраны, и таким образом преобразование первичного, гормонального сигнала происходит с помощью ионных сигналов. Фоторецепторы в мембране влияют на каналы, через которые проходит K^+ , что объясняет световую чувствительность и замечательную быстроту, с которой световые сигналы индуцируют фазовые сдвиги.

Как полагают, температурная компенсация происходит в результате липидной адаптации. Это явление, которое имеет место во всех пойкилотермных организмах и включает изменения в липидном составе мембраны, постоянно поддерживающие мембрану в жидком состоянии в широком диапазоне температур (см., например, Varenska, Wlodaver, 1969). Ньюс и др. предположили, что основными кинетическими характеристиками механизма часов являются миграция белков и кооперативные взаимодействия между макромолекулами в мембране, а постоянство жидкостных свойств мембраны делает процесс относительно нечувствительным к температуре, за исключением экстремальных значений температур, где функционирование часов, как и многих других физиологических процессов, ухудшается. Эта модель имеет много интересных экспериментальных следствий, давая

при этом очень правдоподобное объяснение физиологического механизма контроля времени на молекулярном уровне.

Таким образом, представляется, что неуловимые биологические часы наконец-то обнаружены и главным их компонентом является мембрана. Модели, выдвинутые Суини (Sweeney, 1974), Ньюсом и др. (Njus et al., 1974) и Каммингсом (Cummings, 1975), идейно просты и изящны и основаны на физиологических принципах, которые не связаны с молекулярной биологией генного управления. Относительная изоляция механизма часов от общей физиологии клетки в теориях, описанных выше, есть результат подразделенности клетки на отсеки и локализации процессов в мембранах, а также независимости его от синтеза макромолекул. В связи с этим возникает интересная проблема изучения кинетических механизмов с большими временами релаксации, в основе которых могут лежать медленная диффузия или процесс установления равновесия, значительно расширяющие динамические возможности метаболической системы включением свойств ее фазовых границ. Это включение поведения мембраны во внутриклеточную динамику будет так же существенно при изучении пространственной упорядоченности, как и в анализе временного порядка.

Динамика часов, контролирующих вылупление личинок у *Drosophila*

Заканчивая эту главу, я бы хотел рассмотреть один из классических примеров часов у многоклеточных, который позволяет проиллюстрировать скрытые возможности некоторых мощных и одновременно простых аналитических концепций. Таким организмом является *Drosophila pseudo-obscura*, а циркадный ритм — это ритм выхода взрослых мушек из куколок, т. е. ритм вылупления. В нормальных условиях это происходит рано утром, перед самым рассветом. Популяция личинок *Drosophila* может быть синхронизована просто путем перемещения их одновременно из условий с постоянным освещением (СС) в темноту (ТТ). Затем личинки окукливаются, после чего вылупляются взрослые мухи, причем в группе вылупление происходит приблизительно каждые 24 ч в течение нескольких дней. Таким образом, этот ритм характерен для популяции в целом, так как каждая отдельная муха появляется только однажды. Однако, поразмыслив, можно понять, что такое поведение популяции объяснимо наличием часов внутри каждой мушки, которые стробируют вылупление так же, как циркадные часы *Gonyaulax* стробируют или регулируют разрешение начала клеточного деления (Pittendrigh, 1960, 1965, 1966; Engelmann, 1966, Chandrashekar, 1967). Мушка, готовая появиться на свет, может это сделать

только в определенное время дня. Очевидно, мы имеем здесь дело со взаимодействием между периодическим процессом, часами, и процессом развития, который протекает поступательно.

Исследования на *Drosophila* не могут ответить на вопросы, аналогичные поставленным выше, о природе молекулярных процессов, которые, возможно, участвуют в формировании циркадного режима (например, на вопрос о роли ядра или разных типов молекул в мембранах и т. д.). Однако можно задать некоторые вопросы поискового характера об устойчивости часов и размерности соответствующей динамической модели. До сих пор мы предполагали, что минимальное число переменных, которое необходимо для существования колебаний в биологической системе, равно двум (рис. 4.8 этой главы или рис. 2.8 в гл. 2). Однако, если говорить о размерности, имеются колебания даже более простого типа, названные обобщенными релаксационными колебаниями. Это периодическая функция времени, которая может иметь различные периоды, но практически не меняет амплитуды. Состояние такого осциллятора может быть задано с помощью только одной переменной — его фазы, т. е. осциллятор аналогичен обычным часам, которые могут быть установлены на любое время и затем пойдут с фиксированной скоростью, а единственным видимым показателем их состояния является положение стрелок. Часы показывают только время, или фазу, в интервалс от 0 и 24 ч, или 0 и 2π радиан. Исходя из всесторонних и остроумных исследований поведения биологических часов в ответ на различные типы возмущений, Питтендрай и Брюс (Pittendrigh, Bruce, 1957) построили модель, в которой предполагалось, что хронометром является осциллятор этого релаксационного типа, фазу которого можно мгновенно вновь установить освещением или другим сигналом, не затрагивая при этом амплитуды. Любое изменение в наблюдаемом ответе на сигнал рассматривается в этом случае как изменение в процессе, управляемом часами, с помощью которого проявляется их наличие. Эта модель используется широко и с большим успехом.

Как я упоминал выше, важное свойство биологических часов состоит в их способности реагировать на некоторые сигналы окружающей среды, являющиеся надежными индикаторами солнечного времени; наиболее важный из таких индикаторов — свет. Это просто пример явления синхронизации, рассмотренного выше. Действие синхронизирующего сигнала на периодический процесс будет, очевидно, зависеть от фазы этого процесса, так как в общем случае сигнал может как увеличивать, так и уменьшать фазу, т. е. переводить часы и вперед, и назад. Большое количество работ по биологическим часам посвящено

исследованию именно этого вопроса; получено много кривых фазового ответа, которые дают график фазового сдвига ($\Delta\varphi$), вызванного данным сигналом, приложенным в данное время или в данную фазу биологических часов. Для *Drosophila* этим сигналом может быть 15-минутное освещение белым светом популяции куколок в некоторый момент после того, как они были перемещены из СС в ТТ для синхронизации их часов. По

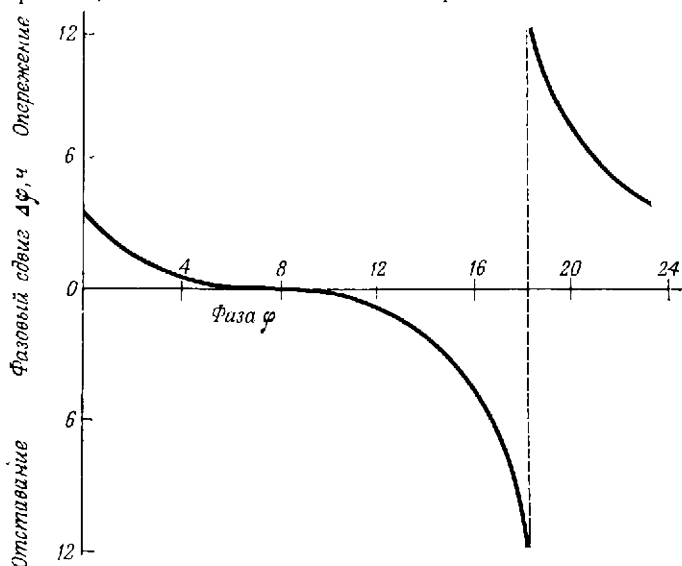


Рис. 4.9. Типичная кривая фазового ответа циркадных часов на сильный сигнал, изменяющий фазу.

сравнению с контрольной эта популяция начнет вылупление или раньше, или позже, или в то же самое время, и фазовый сдвиг будет тогда или положителен, или отрицателен, или равен нулю соответственно. Период ритма вылупления не затрагивается этим воздействием. Типичная кривая такого рода показана на рис. 4.9. Заместим, что кривая имеет разрыв в точке, где отставание по фазе, достигшее 12 ч, вдруг превращается в опережение в случае, когда световой сигнал на часы подан приблизительно в 18 ч. Вместо того чтобы сдвинуться назад на время, несколько большее, чем 12 ч, система световым сигналом внезапно продвигается вперед. Что это означает с точки зрения работы часов? На первый взгляд кажется, что в часах имеется пороговый механизм, за счет которого часы при освещении после примерно 18 ч передвигаются световым сигналом вперед, а до этого момента — назад. Однако Винфри (Winfree, 1970, 1971)

дал другое объяснение природе разрыва и этим положил начало новым представлениям о процессах, которые управляют периодическим режимом организмов.

Доводы Винфри основаны на чисто качественных, топологических аргументах о возможном поведении биохимического или физиологического осцилляторов и продуманном использовании принципа «бритвы Оккама» для сохранения максимально про-

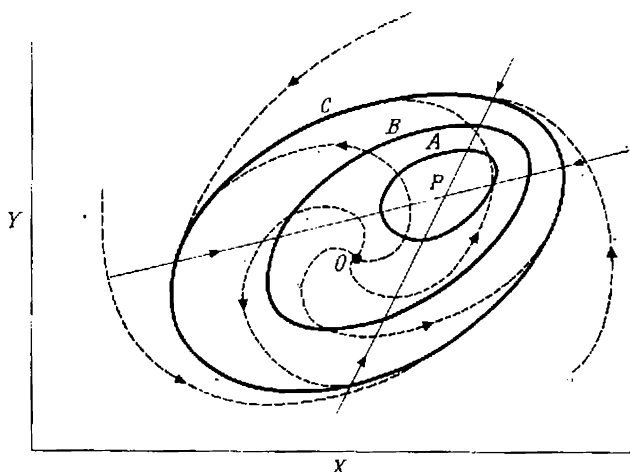


Рис. 4.10. Динамическое объяснение причины разрыва фазовой кривой ответа циркадных часов в терминах топологических свойств предельного цикла.

стой картины.¹ Показав сначала, что одномерный релаксационный осциллятор вышеописанного типа, который имеет постоянную амплитуду и переменную фазу, наверняка является идеализацией, он исследовал предполагаемое качественное поведение простейшего типа биологического осциллятора, т. е. осциллятора с двумя переменными — амплитудой и фазой (что эквивалентно двум переменным X и Y). Этот осциллятор исчезает при непрерывном освещении *Drosophila pseudoobscura*, так что динамика системы изменяется от динамики предельного цикла с траекториями, сходящимися к устойчивому замкнутому циклу, к динамике системы с устойчивой точкой, как показано

¹ «Бритвой Оккама» называют изречение английского философа Уильяма Оккама: «Сущности не следует умножать без необходимости». То есть все, что можно отсечь бритвой без ущерба для понимания природы явления, нужно отсекать. — Прим. перев.

на рис. 4.10. Предельный цикл отмечен на этом рисунке буквой C , а точка O — особенность внутри цикла, из которой исходят разветвляющиеся к циклу траектории. Это стационарное (неустойчивое) состояние системы в темноте. Точка P — это устойчивое стационарное состояние системы при освещении, когда нет колебаний. Любую точку на предельном цикле световой сигнал приведет в движение по направлению к P , и в зависимости от того, где на предельном цикле находится начальная точка, и от того, как силен сигнал, она в момент снятия сигнала оказывается где-то внутри предельного цикла, смещенной к точке P . Затем после выключения света она переместится к C , и то место, где она попадает на C по отношению к контрольной изображающей точке, постоянно перемещающейся по C , определит величину фазового сдвига, положительного или отрицательного (опережения или задержки). Каким же образом получается кривая с разрывом, аналогичная изображенной на рис. 4.9?

Винфри объясняет это следующим образом. Пусть мы имеем популяцию мух, часы которых распределены по предельному циклу C так, что все они находятся в разных фазах. Теперь, если дается световой сигнал, точки на C , представляющие состояния часов, будут перемещаться по направлению к P и в конце светового сигнала будут распределены по некоторой кривой, например кривой B на рис. 4.10. Затем точки снова продвигнутся к предельному циклу и возвратятся на него через некоторое время, зависящее от того, насколько далеко B находится от C . Каждая точка сдвинется по фазе по отношению к своей контрольной точке или вперед, или назад в зависимости от динамики возвращения к предельному циклу (грубо говоря, длины траектории возвращения). Но мы видим, что эти точки опять будут распределены по всему предельному циклу и сохраняют свои первоначальные взаимоотношения в некоторой окрестности. Это происходит потому, что каждая спиральная ветвь, исходящая из особой точки O , пересекает кривую B в одной и только одной точке.

Если, однако, дается более сильный световой стимул, так что точки, представляющие часы, попадут на замкнутую кривой A , более близкую к P , и будут находиться по одну сторону от точки O , ситуация в корне изменится. Теперь каждая спиральная траектория, раскручиваясь из O к C , пересечет кривую A или в двух точках, или ни в одной. Траектории, которые не пересекают A , определяют пустую часть конечного распределения точек на C , в то время как точки, которые первоначально находились на той части C , которая соответствует этому пустому сегменту, после возмущения вернутся к точкам на противоположной части цикла. В середине этой системы существует точка

разрыва, где происходит резкий переход от 12-часового опережения по фазе к 12-часовому отставанию. Этот анализ показывает, что сильные и слабые возмущения биологических часов должны приводить к совершенно разным кривым фазового ответа, так как разрыв имеет место только в первом случае. Винфри предсказал это явление, а затем обнаружил литературные данные о том, что действительно слабые световые сигналы дают фазовые кривые без разрывов. Кроме того, других типов поведения обнаружено не было, и это подтверждает правильность предположения о том, что динамику системы качественно можно представить так, как это сделано на рис. 4.10.

Окрыленный успехом, Винфри продолжал использовать этот вид топологического представления. Он рассудил, что если существует такая особая точка, как O , то можно было бы найти световой сигнал, который, будучи приложенным к куколкам в данную фазу цикла, приведет их в эту точку. Поскольку это стационарное состояние, то часы здесь будут остановлены и популяция станет разновременной, аритмичной. О количественных аспектах динамики этой системы ничего не было известно, поэтому поиск критического сигнала или стимула такого типа был подобен поискам иголки в стоге сена.

Замечательно то, что Винфри (Winfree, 1970, 1971) обнаружил его, искусно построив эксперимент, что позволило ему просмотреть тысячи *Drosophila* и определить критический стимул. Им оказался 50-секундный импульс белого света, поданный в 6,8 ч циркадной фазы. По-видимому, это подтверждало правильность предложенной динамической схемы. Однако возникала новая проблема: вместо того чтобы раскручиваться снова к предельному циклу, часы, по-видимому, резко останавливались в точке O . Это можно объяснить, предположив, что возвращение из O к предельному циклу идет очень медленно и выплывание происходит до начала функционирования часов.

Фактически Винфри (Winfree, 1973) показал, что можно воздействовать на амплитуду часов, задающих ритм выплывания, световыми импульсами, так что осциллятор будет продолжать идти по своему циклу, но по меньшей траектории, практически не изменив периода. Это требует модификации фазового портрета рис. 4.10. Можно было бы, как упоминалось выше, нарисовать траектории, медленно раскручивающиеся из особой точки O , в соответствии с моделью Камингса (Cummings, 1976), характеризующейся точно таким поведением. Объяснение такого типа было также предложено Олдриджем и Павлидисом (Aldridge, Pavlidis, 1976). Однако Винфри (Winfree, 1975) пошел другим путем, выдвинув идею о том, что организм имеет целую популяцию часов и определяет время согласно степси их коллективной синхронности. Световые стимулы могут разрушать

эту синхронизацию и давать плохо организованную популяцию с низкой средней амплитудой. Это вводит новый уровень сложности в рассмотрение измерения времени и требует применения новых методов анализа. Аналитические модели для этого типа коллективного поведения ритмических популяций будут рассмотрены в гл. 7. В заключение этой главы я просто хочу подчеркнуть, что красота подхода к биологическим колебаниям, принятого и использованного Винфри, наглядно показывает, что общий качественный анализ может оказаться полезным и мощным способом планирования экспериментов.

МОРФОГЕНЕЗ: ОДНОМЕРНАЯ АПЕРИОДИЧЕСКАЯ УПОРЯДОЧЕННОСТЬ

Введение

Я останавлиюсь в этой главе на образовании одномерной осевой упорядоченности в организмах и ее связи с процессами, рассмотренными нами ранее. Исследуя мир гомеостаза, находящегося вне времени и пространства, где основное внимание уделяется устойчивости в гомогенных системах, и обнаружив, что механизмы отрицательной обратной связи и аллостерической регуляции, используемые для достижения устойчивости и дискриминации, обуславливают возможность существования коллоидального режима и, следовательно, временной организации, мы подошли к вопросу о том, как из нелинейной кинетики и временной упорядоченности возникает пространственная структура. Этот вопрос уже затрагивался в гл. 3 в связи со структурным гомеостазом эпидермиса. Мы увидели, что временная упорядоченность процессов дифференцировки, связанная с перемещением клеток из базального слоя эпидермиса, дает модель, объясняющую устойчивость тканевой структуры к таким воздействиям, как нанесение раны или кратковременная аппликация канцерогена. Эта глобальная устойчивость была обусловлена пространственным распределением молекулярного управляющего вещества — эпидермального кейлона. Этот белок, как предполагалось, воздействует на состояние дифференцировки клеток и на скорость прохождения клеточного цикла благодаря перекрестному взаимодействию между процессами клеточного цикла и клеточной дифференцировки (см. рис. 3.8). В данной главе мы всюду будем считать, что любые молекулы, неравномерно распределенные по пространству в пределах развивающейся системы и ответственные за возникающие изменения формы, а следовательно, действующие как морфоген, функционируют аналогично кейлону. Таким образом, предполагается, что морфоген воздействует прямо или косвенно на молекулярный управляющий аппарат клеток и влияет на скорость синтеза различных веществ, которые связаны с процессом дифференцировки. Никакого разрыва при движении от гомеостаза и устойчивости к временной организации и наконец к временной и пространственной упорядоченности не существует. На протяжении всего этого анализа продолжают работать нерархические принципы, поэтому так называемые системы более высоких уровней включают в свою работу все соответствующие активности систем более низких уровней. При рассмотрении механизмов,

с помощью которых достигается упорядоченная гетерогенность молекулярной активности в развивающихся и регенерирующих системах, молекулярные процессы по-прежнему будут играть большую роль.

Начнем анализ пространственной упорядоченности с извлечения из модели гомеостаза эпидермиса некоторых общих принципов. Устойчивость и пространственная организация ткани, согласно этой модели, определяются дифференциальным рас-

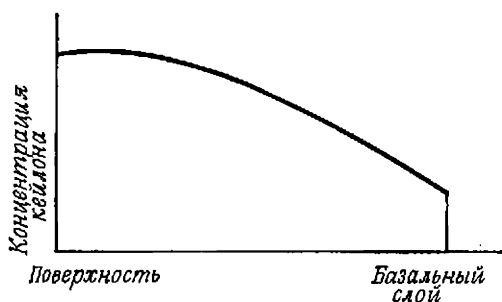


Рис. 5.1. Качественное изображение профиля концентрации кейлона Gl в эпидермисе.

предлением скорости образования диффундирующих молекул — эпидермального кейлона и наличием границы, действующей как сток, т. е. базальной мембраны вместе с системой кровообращения. Верхняя граница сформировавшейся ткани образована непроницаемыми кератинизированными чешуйками, которые задерживают выход кейлона и, следовательно, приводят к его накоплению в этой области. Предполагаемое распределение концентрации кейлона от поверхности кожи до базального слоя выглядит приблизительно так, как показано на рис. 5.1. В этой модели каждая клетка служит источником кейлона, а также может быть стоком, если блок разрушается, а сами клетки мигрируют от базального слоя к поверхности. Точная форма градиента определяется скоростями образования и разрушения кейлона в клетке в различных областях, проницаемостью клеточных мембран для кейлона, скоростью его диффузии, скоростью выхода через базальную мембрану и скоростью дистального движения клеток. Вся система находится в динамическом равновесии. Детали процессов неизвестны, поэтому построить точную модель не удастся. Однако можно рассмотреть общий класс систем, частным случаем которого является эта модель, и обсудить данные о разных экспериментальных системах как разные варианты в пределах одного класса. Во всех этих системах в качестве основных особенностей процес-

сов, упорядочивающих пространство, выступают метаболические градиенты, диффузия и движение клеток. Таким образом, нам необходимо переключиться с исследования проблем, связанных с устойчивостью в гомогенных системах, на анализ динамических полей и их пространственную устойчивость.

Полярность и осевые градиенты

В основе модели эпидермального гомеостаза лежит представление о наличии градиента вещества вдоль оси организации, которая перпендикулярна базальной мембране (рис. 5.1). Таким образом, можно сказать, что ткань поляризована в направлении этой оси пространственной организации: проксимальные клетки, примыкающие к базальной мембране, находятся в другом состоянии, чем дистальные (у поверхности эпидермиса), все остальные клетки плавно распределены по состояниям, промежуточным между этими двумя. Говоря более абстрактно, образование полярной оси обусловлено существованием исходной точки или поверхности, определяющей начало и направление, в котором вдоль этой оси ведется измерение. Что именно измеряется и как эта информация воздействует на состояние клеток — вопрос, который для большинства развивающихся систем составляет главный предмет исследования. Но полярность в том или ином виде — почти универсальное свойство и многоклеточных, и одноклеточных организмов. Я рассмотрю природу этой упорядоченности лишь у некоторых примитивных многоклеточных; они широко используются в качестве объекта для исследования, потому что их организация в принципе одномерна, несмотря на то, что необходимые основания существования у них полярной устойчивости остаются предметом постоянного изучения. Итак, рассмотрим гидроиды *Hydra* и *Tubularia*. *Hydra* имеет крайне простую структуру; это в своей основе трубка с устьем (гипостомом), окруженным кольцом щупалец на дистальном конце, и с прикрепляющейся подошвой (базальным диском) на другом. Ее тканевая структура также очень проста и состоит из двух эпителиальных пластов, известных как эктодерма (внешний) и гастродерма (внутренний), прикрепленных к мезоглее, тонкому мембранному слою, содержащему коллагеноподобный материал. Размеры этого организма — от 1 до 2 см в длину (в зависимости от вида) и около 1 мм в диаметре, когда животное вытянуто. Фотография *Hydra littoralis* показана на рис. 5.2.

Эти организмы обладают поразительной способностью к регенерации целого из маленьких частей и восстановлению из отдельных фрагментов. Если отрезать сегмент центрального участка тела, то новая голова (гипостом и щупальцы)

регенерирует дистально, а новая подошва — проксимально, и первоначальная полярность ткани сохраняется. Эту полярность можно изменить на обратную различными воздействиями, например с помощью электрического поля [как показано Ландом

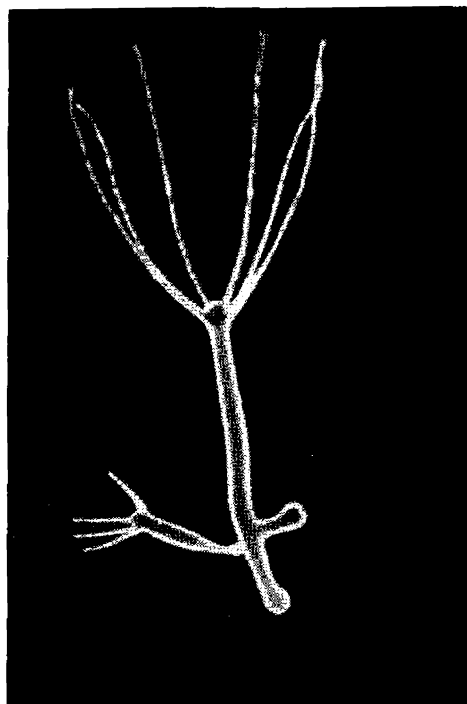


Рис. 5.2. Фотография *Hydra littoralis*, на которой видны щупальца и гипостом, желудочная область, зона почкования с одной растущей почкой и одной дифференцированной гидрой, готовой отделиться от родительского организма, а также базальный диск (с любезного разрешения д-ра А. Хорнбрух).

(Lund, 1921) на *Obelia* и Роузом (Rose, 1963) на *Tubularia*] или пересаживанием гипостома на проксимальный конец и последующим удалением его через несколько дней (Wilby, Webster, 1970). Однако если сегмент очень короткий, то головы могут образоваться на обоих концах, т. е. полярность может быть обратимой; таким образом, существуют условия, при которых первоначальная осевая упорядоченность у *Tubularia* и *Obelia* теряет устойчивость.

Большое число ранних исследований метаболического происхождения полярности у гидроидов было выполнено С. Чайл-

дом, который развил концепцию метаболических градиентов, в частности окислительного метаболизма, как основной причины осевой упорядоченности. Его исследования с ингибиторами и красителями наводили на мысль, что метаболическая активность наиболее велика в гипостоме и уменьшается по направлению к базальному диску. Теория метаболических градиентов, тщательно разработанная Чайлдом (Child, 1941), крайне плодотворна как руководство при исследовании и построении теорий, несмотря на противоречивые данные о существовании градиента окислительного метаболизма. Идси Чайлда о роли диффузионных градиентов (для которых нужны метаболические градиенты того или иного типа), электрических полей и внутриклеточного сообщения в общем виде остаются основой многих представлений о динамической природе полярной упорядоченности в развивающихся системах. Ясный обзор развития этой области дан Вебстером (Webster, 1971).

Поскольку первой из участков средней части желудка гидроидов всегда регенерирует именно голова, а другие части дифференцируются позже, то, по-видимому, наиболее дистальная часть действует как организатор остальной системы и поэтому определяет начало полярной оси. В широком диапазоне размеров регенерирующего участка приблизительные размеры частей выросшего организма — гипостом, шупальцы, пищеварительная зона и подошва — остаются постоянными, т. е. организм способен не только регенерировать свои части, но и соизмерять их. Однако когда регенерирующие участки очень малы, это свойство масштабирования у *Tubularia* и *Corymorpha* нарушается — головные части оказываются значительно больше других. Общая стратегия регенерации состоит в том, чтобы сначала вырастить функциональную голову, а затем образовать из оставшейся ткани другие части, привлекая в той или иной степени взаимодействия, приводящие к масштабированию или регуляции. Таким образом, гипостом в соответствии с постулатом Чайлда действует как доминирующая или организующая область. Далее встает вопрос о природе организующей активности. Некоторые исследователи предполагают, что существует гипостомный индуктор, производимый дистально, и что его градиент определяет область образования головы. Имеются некоторые данные в пользу существования такого вещества, являющегося, по мнению ряда исследователей, полипептидом (Lentz, 1965; Schaller, 1973). Можно было бы предположить, что оно действует в какой-то степени аналогично кейлону при индукции точной дифференцировки в эпидермисе, однако устойчивость осевой упорядоченности в эпидермисе зависит от двух других факторов: существования локализованной зоны роста в базальном слое и стока кейлона через базальную мембрану. Для

Hydra нет данных ни о наличии локальной зоны роста (Campbell, 1967), ни о том, что базальный диск действует как сток для гипостомного индуктора. Однако ясно, что гипостом и подошва во многих отношениях антагонистичны, так как пересадка подошвы в дистальную часть регенерирующего сегмента препятствует регенерации гипостома в этом месте и вызывает изменение полярности. Это может быть обусловлено или тем, что подошва действует как сток (т. е. разрушает гипостомный индуктор), или тем, что она производит антагонист — инактиватор или ингибитор гипостомного индуктора, или, наконец, тем, что в ней образуется собственный индуктор. Последнее доказано Ньюманом (Newman, 1974); им же рассмотрены все альтернативные возможности. Остановимся теперь на различных подходах к решению вопроса о природе осевой упорядоченности такого типа.

До последнего времени развитие аналитических моделей в этой области находилось под сильным влиянием идей и экспериментальных данных Волперта и его группы, которая работала главным образом с *Hydra* и цыпленком. Общий анализ проблем образования структур и морфогенеза развивающихся систем и выявление понятий, необходимых для решения этих вопросов, был сделан Волпертом (Wolpert, 1969). Основой этого анализа были концепция позиционной информации и интересный постулат, состоящий в том, что, какими бы ни были физиологические процессы, которые участвуют в генерации пространственно распределенной информации (например, градиента особого вещества), они универсальны для всего животного, а возможно, и растительного царства. Волперт утверждает, что в регулирующих системах, таких, как морской еж или эмбрион амфибии, для установления оси, вдоль которой клетки дифференцируются в соответствии со своим местоположением, требуется: 1) исходная точка, с которой начинается отсчет; 2) направление для измерения вдоль этой оси и 3) механизм регулирования масштаба, который может менять единицы измерения вдоль оси так, что общее число единиц остается инвариантным при изменениях длины оси. По терминологии Волперта, это: 1) исходная клетка или область, α_0 ; 2) полярность, служащая направлением, в котором измеряется позиционная информация, и 3) вторая контрольная клетка или область, обозначенная α'_0 , на противоположном от α_0 конце оси. Предполагается, что значения градиента в α_0 и α'_0 устанавливаются некоторым способом, не зависящим от длины оси, так что получается регулирующий градиент. При наличии такой оси клетки будут иметь информацию, специфичную для их местоположения на ней, и смогут дифференцироваться согласно некоторому «коду», интерпретирующему позиционную информацию.

Различие между позиционной информацией и ее интерпретацией оказывается очень важным моментом в анализе Волперта, и именно благодаря этому предположение об универсальности представляется возможным. Согласно его теории, разные виды могут использовать разные коды для интерпретации позиционной информации, задаваемой осями, которые одинаковы или подобны у всех видов организмов, достигая таким путем разнообразия фенотипов при сохранении основного эпигенетического механизма. Однако нельзя слишком уповать на процесс интерпретации, поскольку это означало бы просто перенесение проблемы из одной области в другую. Волперт оказывается в опасной близости от такой ситуации, утверждая что концепция позиционной информации позволяет обходиться без предположения о существовании какой-нибудь обязательной связи между структурой или предструктурой морфогенетического поля и пространственной упорядоченностью, которая становится очевидной, когда поле выражено (Wolpert, 1972). Так, он убежден, что один и тот же (линейный) градиент в одном организме может производить структуру, такую, скажем, как французский флаг, а в другом — как звездно-полосатый флаг США. Это очень экономично в плане механизмов позиционной информации, но, как мне кажется, обошлось бы крайне дорого при построении механизма интерпретации. С точки зрения Уоддингтона (Waddington, 1972) поиски универсальности морфогенетических механизмов являются, вероятно, иллюзорными и в развивающихся организмах работает ряд отчетливо различающихся процессов. Как будет видно из этой или двух последующих глав, я, как и Волперт, придерживаюсь в основном универсалистской точки зрения, но мне представляется, что организм работает скорее как аналоговая, чем как цифровая вычислительная машина, и, следовательно, я не разделяю его убежденности в способности развивающихся систем интерпретировать монотонный градиент как мозаичную периодическую структуру, структуру с круговой симметрией или любой другой формой, когда единственное ограничение — это ограничение, накладываемое на информационную размерность поля и результирующей структуры.

Волпертовский анализ образования структуры был умышленно представлен в абстрактных терминах, чтобы не связывать себя с той или иной моделью и невольно не попасть под ее влияние. Именно эта нейтральность и общность представлений стимулировали построение моделей, удовлетворяющих основным описанным требованиям, и экспериментальную проверку вытекающих из них следствий. Позже в данной главе я рассмотрю модель образования морфогенетического поля, которая свободна от последнего требования Волперта, поскольку регуляция в ней осуществляется без участия как механизма,

контролирующего масштаб, так и второй контрольной точки в системе, упрощая таким образом основную аксиоматику, необходимую для формирования поля позиционной информации. Ценой, уплаченной за это упрощение, оказывается то, что если ось меньше некоторой критической длины, то регуляция вдоль нее не происходит полностью. Однако именно это и наблюдается в таких организмах, как *Tubularia* и *Corymorpha*, поэтому кажется, что условие (3) лежит за пределами требований, вытекающих из экспериментальных данных. Новые исследования лаборатории Волперта по развитию конечности цыпленка привели к модели, совершенно отличной от той, которая была построена при изучении регенерации у *Hydra*. Эта модель несколько более динамична, чем использованная при описании феноменологии *Hydra*; она включает процесс роста и механизм временной дифференцировки, но концепция позиционной информации сохраняется за счет некоторой неопределенности интерпретации. В следующей главе мы рассмотрим эту модель, а также альтернативную ей, которая описывает с единых позиций оба типа процессов.

На данном этапе полезно рассмотреть математическую теорию, представленную Гирером и Мейнартом (Gierer, Meinhardt, 1972), которая описывает свойства довольно широкого класса процессов, соответствующих, как правило, поведению аксиально-упорядоченных систем. Эти авторы предполагают, что в таких системах протекают два различных процесса, взаимодействие между которыми приводит к плавному распределению клеток по состояниям. Один из них способен активировать небольшую область, что характерно для индукции, когда положительное влияние передается от одной клетки или группы клеток ее соседям, и вклад в индуцирование структуры дают лишь соседние ткани. Так происходит, например, когда субгипостомная ткань трансплантируется в среднежелудочковую область *Hydra* и здесь индуцируется гипостом. Это влияние близкодействующее, потому что затрагиваются только соседние с трансплантатом клетки. Вторым процессом, по их предположению, является ингибирование большой области, что выявляется, например, подавлением образования гипостома в дистальном положении в присутствии гипостома, трансплантированного проксимально, причем ингибитор действует на расстоянии в несколько сот клеток. Предполагается, что различия между этими типами действия обусловлены разными скоростями диффузии специфических веществ, активатора и ингибитора, хотя не исключаются и другие пути возникновения близко- и далекодействующих взаимодействий (см. далее). Гирер и Мейнарт предполагают также, что для этих веществ существует плавное распределение плотностей источников и (или) стоков, что дает начало полярности

ткани. Кроме того, как считают авторы, плотности источников и стоков отличаются от распределения концентраций самих веществ и управляются процессами, которые характеризуются большими временами релаксации, чем для активатора и ингибитора, в соответствии с данными, полученными на гидроидах. Таким образом, модель применима к событиям, происходящим в пределах нескольких (скажем, от 4 до 12) часов после любого экспериментального возмущения; это время необходимо для того, чтобы установить начальный градиент. Такие постулаты приводят к следующим дифференциальным уравнениям:

$$\begin{aligned}\frac{da}{dt} &= \rho(x) + f(a, h) - \mu a + D_a \frac{\partial^2 a}{\partial x^2}, \\ \frac{dh}{dt} &= \rho'(x) + g(a, h) - \nu h + D_h \frac{\partial^2 h}{\partial x^2},\end{aligned}\tag{5.1}$$

где x — координата вдоль оси. В этой системе a — активатор; h — ингибитор; $\rho(x)$ — распределение источников активатора, $\rho'(x)$ — то же для ингибитора; члены $f(a, h)$ и $g(a, h)$ описывают влияние a и h на соответствующие скорости их синтеза; μ и ν — константы распада первого порядка, а D_a и D_h — коэффициенты диффузии, причем предполагается, что $D_h \gg D_a$. Вид функций $f(a, h)$ и $g(a, h)$ зависит от предположений, сделанных о кинетике рассматриваемого процесса (например, взаимодействие конкурентного или неконкурентного типа между a и h), и стехиометрии реакций. В общем случае это нелинейные функции, описывающие активность ферментов с кооперативной кинетикой и аллостерическими свойствами (гл. 1). Именно присутствие этих функций в системе уравнений (5.1) придает ей свойства, необходимые для образования устойчивых градиентов из соответствующих начальных условий, наложенных на функции ρ и ρ' . Эта система уравнений принадлежит к общей категории уравнений, описывающих реакционно-диффузионные системы с диффузией, причем первым примером их использования для описания морфогенеза является теперь уже классическая работа А. Тьюринга (Turing, 1952), показавшего возможность генерации периодических волн концентрации морфогена в ткани. Мейнарт и Гирер (Meinhardt, Gierer, 1974) применили свою модель к описанию *Hydra* и других развивающихся систем и показали, что она удовлетворяет многим требуемым свойствам. Вопросы о связи между концентрациями активатора и ингибитора, действующими как морфогены, и о их действии на дифференцировку клеток при этом подходе, конечно, не рассматриваются, а критерием для различения двух процессов являются их времена релаксации. Как отмечают авторы, совпадение с экспериментом не позволяет сделать никаких выводов об адекватности модели. Данные, необходимые для выяснения деталей рассматриваемых

молекулярных механизмов, могут дать только биохимические и физиологические исследования. Однако данная модель представляет определенную ценность, поскольку показывает, что общей схеме соответствует целый ряд механизмов различного типа, что обеспечивает основу для классификации довольно разнообразного набора моделей. Они применяются не только к описанию гидроидов и плоских червей, но и к любой развивающейся системе с аксиальной структурой и полярной упорядоченностью.

Главным недостатком этой модели представляется то, что она не объясняет регуляции, так как при изменении линейных размеров системы мы получаем градиент, который имеет другую позиционную информацию в пределах новой длины. Это показано в первой статье Гирера и Мейнхарта (Gierer, Meinhardt, 1972). Перед тем как искать модель, обладающую таким свойством, обратимся к организму, развитие которого нельзя объяснить на основании статических градиентов типа рассматривавшихся до сих пор при описании механизмов, упорядочивающих пространство. Это приведет нас к рассмотрению способа образования градиента, довольно сильно отличающегося от всех рассмотренных ранее.

Пейскееры и волны активности

Среди огромного разнообразия доступных для исследования организмов имеются такие, которые воплощают в особенно простой форме примеры организации, рассматриваемой как основа или прототип некоторых процессов, связанных с развитием. Такими объектами при изучении аксиальной организации и регенерации у млекопитающих представляются гидроиды; при исследовании синхронности ядер и митотического цикла — миксомицеты *Physarum polycephalum*; при рассмотрении тканевого гомеостаза эту роль играет эпидермис. При выборе идеальных экспериментальных моделей процессов, которые в действительности осуществляются в целом ряде форм, исследователя может подвести его мировоззрение, но, поскольку мы осознаем это, такой подход представляется полезным. Здесь мы рассмотрим организм, представляющийся идеальным объектом с точки зрения перехода от пространственной и временной неупорядоченности к четырехмерной организации, характерной для процесса развития. Это миксомицет *Dictyostelium discoideum*. Из его исследования мы узнали о типе связи между клетками, не встречавшемся нам ранее, который может играть важную роль в морфогенезе.

В миксомицетах фаза роста резко отличается от фазы развития и дифференцировки. Пока в изобилии имеются бактерии, которыми миксомицеты питаются, организм представлен попу-

лящей миксамеб, которые передвигаются, заглатывая бактерии, с места на место с помощью псевдоподий, образующихся при движении в любой части клеточной поверхности. Следовательно, эти вегетативные амебы неполярны. Время клеточных генераций равно примерно 3 ч, и каждая амeba ведет себя совершенно независимо от соседей. Никаких указаний на какую-либо пространственную или временную упорядоченность популяции, помимо той, которая может быть обусловлена пространственным распределением источника пищи или особенностями геометрии поверхности, не существует. При исчерпании источника пищи рост прекращается, клетки становятся менее подвижными и клеточные деления происходят значительно реже, хотя эпизодически и наблюдаются. После периода длительностью около 8 ч, известного как интерфаза, при достаточно высокой плотности амeб выявляется новая форма поведения. Отдельные клетки, распределенные случайно по всей популяции, начинают периодически выделять химическое соединение, названное первоначально акразином, которое распространяется от клетки к клетке, так как клетки, получившие сигнал, сами стимулируются к выделению этого химического соединения (Schaffer, 1962). Сопутствующая появлению сигнализации среди клеток полярность проявляется в развитии у амeб переднего и заднего концов. По-видимому, это необходимое условие эффективного хемотаксиса. Таким образом, восприятие сигнала клеткой приводит к двойственному ответу: выделению акразина, с помощью которого сигнал передается соседним клеткам, и хемотаксису, в результате которого клетки перемещаются к источнику сигнала с помощью амeбоидного движения.

Сейчас акразин идентифицирован: это циклический 3',5'-АМФ (Kopijn et al., 1968), с которым мы уже встречались как с сигналом глюкозного истощения у бактерий, лишенных источника углерода. По-видимому, голодающие амeбы *D. discoideum* имеют подобную метаболическую систему, которую они использовали для выработки системы передачи сигналов между клетками в отсутствие пищи. Время между последовательными сигналами отдельных клеток изменяется от 3 до 7 мин; среднее значение составляет примерно 5 мин. Это именно те периоды, которые мы обычно ожидаем для колебаний в метаболической системе, и Гольдбетером (Goldbeter, 1975) была построена интересная модель генерации этих колебаний, основанная на принципах аллостерического управления, описанных в гл. 1. Генетически эти клетки такие же, как и все остальные; все дело просто в случайном распределении клеточных состояний в первоначально дезорганизованной популяции.

Важным аспектом передачи сигнала является то, что после выделения порции цАМФ амeбы вступают в рефрактерную фазу

нечувствительности длительностью от 2 до 7 мин в зависимости от возраста. Кроме того, цАМФ быстро разрушается внеклеточной фосфодиэстеразой, секретируемой амебами (Bonner et al., 1969). Таким образом, динамика распространения сигнала совершенно аналогична соответствующим процессам в нейронах, где нейропередающее вещество (медиатор), например ацетилхолин, выделяется в нервных окончаниях и здесь же быстро разрушается ацетилхолинэстеразой, обеспечивая таким образом возможность повторения сигнала. Рефрактерный период обуславливает односторонность распространения сигнала, а также устанавливает вполне определенные границы между пейсмекерами, конкурирующими за амеб, так что никакая амеба не может одновременно служить двум хозяевам. Динамика конкурентного взаимодействия между пейсмекерами определяется как рефрактерным периодом амеб, так и относительными частотами, причем более «быстрый» пейсмекер имеет преимущество. Эти взаимодействия приводят к довольно равномерному разделению исходной популяции амеб между некоторым количеством пейсмекеров с вполне определенными областями доминирования между ними (Cohen, Robertson, 1971a, b). Рядом исследователей в этой области сняты цейтраферной съемкой прекрасные фильмы процесса агрегации, в которых видны волны амебоидного движения, распространяющиеся от пейсмекеров, и установление границ между ними. Волны могут иметь вид концентрических окружностей или спиралей, динамика которых описана и проанализирована Дарстоном (Durstun, 1973).

Во время процесса агрегации амебы сливаются, вступая в контакты друг с другом в тот момент, когда они достигают пейсмекерной клетки. Затем образуется сплошная масса клеток, собирающихся в кучу с пейсмекерной клеткой наверху, куда последняя вытесняется вновь прибывающими амебами (Gerisch, 1968). Это скопление опрокидывается и превращается в вытянутую в форме сосиски массу клеток, находящихся теперь в тесном контакте; получившееся образование называется слизевиком. Пульсирующие волны сокращения продолжают распространяться от передних участков слизевика к задним и могут быть связаны с его движением, которое представляет собой беспорядочную миграцию и продолжается в течение нескольких часов. Затем слизевик прекращает движение в горизонтальном направлении и изменяет его на вертикальное перемещение, направляя вверх стебель и формируя на верхушке стебля конус спор. Периодическое движение наблюдается на протяжении всего развития. В результате возникает плодовое тело, состоящее из стебельковых и спорных клеток, причем соотношение между ними (1:2) в широком диапазоне размеров остается постоянным. Однако очень маленькие плодовые тела имеют непро-

порционально большое число спор, подобно тому как очень маленькие гидриды имеют непропорционально большие головы или гидранты. Результатом полного процесса развития, который занимает в целом 30—40 ч, оказывается превращение неорганизованной популяции несоблюдающих амёб в пространственно организованные, дифференцированные плодовые тела.

Особенностью этого процесса, который привлекает наше внимание к важному морфогенетическому механизму, не рассматриваемому статическими градиентными моделями, является периодическая сигнализация, которая имеет место на протяжении всего развития *D. discoideum*. Это наиболее простой способ собрать вместе амёб, рассеянных по пространству. Поскольку сигнал активно распространяется клетками, расстояние, на которое он может передаваться, фактически неограниченно в отличие от жестких пространственных ограничений, которые накладывались бы, если бы клетка-источник привлекала соседей, поддерживая статический градиент хемотактического вещества. Однако возможен другой механизм: клетки могут подавать сигналы непрерывно, а не периодически, так что каждая из них является и источником, и стоком; в результате процесс становится в какой-то степени аналогичным процессу, описываемому моделью Гирера и Мейнарта (Gierer, Meinhardt, 1972). Этот макроподход к клеточной агрегации развит Келлером и Сегелем (Keller, Segel, 1970) (см. также Segel, 1972), которые анализируют процесс в терминах, описывающих непрерывное поле, в отличие от микроскопической точки зрения, принятой здесь и в статьях Коэна и Робертсона (Cohen, Robertson, 1971, 1972). Имеется работа (Nanjundian, 1974), где проведен интересный анализ этих альтернативных подходов к проблеме агрегации и морфологии у слизевика. В ней показано, что для *D. discoideum* значения величин, определяющих относительную эффективность двух вариантов (константа диффузии, величина импульса цАМФ, пороговый уровень ответа и период сигнализации), таковы, что пульсирующий механизм оказывается значительно более эффективным.

Система из элементов, способная к распространению периодических волн этого типа, имеет свойства возбудимой среды. Тогда возникает вопрос: не являются ли вообще развивающиеся системы возбудимыми в этом смысле и каковы последствия таких свойств для их пространственной и временной организации. Можно ли выработать единую точку зрения на морфогенез, объединяя особенности поведения *D. discoideum* с аспектами, полученными из анализа поведения гидридов, и затем построить общую теорию, которая могла бы объяснить происхождение полярной упорядоченности и периодических явлений, одновременно объясняя возникновение, регуляцию и стабилизацию градиентов? Цель такого обобщения состоит, очевидно, в

создании более или менее универсального подхода, позволяющего затем приступить к исследованию трудных и многоплановых проблем морфогенеза у высших организмов и в особенности к проблемам нейроэмбриологии. Но прежде чем пытаться строить такую теорию, нужно принять во внимание очень важную особенность морфогенеза, состоящую в том, что некоторые одноклеточные организмы способны осуществлять морфогенетические превращения, регенерацию и регуляцию способами, неотличимыми от способов, используемых многоклеточными. Кроме того, существуют фазы развития многоклеточных (например, ранние стадии развития насекомых), где морфогенез происходит в отсутствие деления клеток.

Итак, если мы хотим, чтобы наша морфогенетическая теория была хоть в какой-то степени универсальной, она не должна зависеть от взаимодействий между клетками. Совершенно аналогично тому, как решение вопроса о механизме биологических часов нужно искать в процессах, происходящих внутри отдельных клеток, основы морфогенетических процессов могут быть найдены во внутриклеточной организации. Тогда многоклеточность становится стратегией для увеличения размеров организмов и для создания тонких деталей дифференцировки в тканях и органах, а не для самого морфогенеза.

Морфогенез одноклеточных

Организмами, которые внесли наибольший вклад в доказательство того, что пространственную организацию единичных клеток обуславливают по существу такие же градиенты и поля, как и те, которые имеют место у многоклеточных, оказались зеленые морские водоросли, имеющие общее название *Siphonales*, и реснитчатые простейшие. В пользу универсалистской точки зрения, которую мы сейчас стремимся выработать, говорит то, что различия между растениями и животными в этой ситуации стираются, как это уже имело место при сопоставлении гидроидов и Acrasinae в плане морфогенеза многоклеточных и при рассмотрении биологических часов в предыдущей главе. Водорослью, которая дает наилучшее представление о типе моделей, необходимых для понимания пространственной упорядоченности в единичных клетках, опять оказалась *Acetabularia*. И точно так же, как этот организм привел нас к механизмам, контролируемым мембраной как к вероятным кандидатам на роль генераторов биологических часов, он теперь обращает наше внимание на мембрану как структуру, ответственную за начальную генерацию формы. Таким образом, измерение времени и пространства оказывается тесно связанным со свойствами биологических поверхностей.

Acetabularia является идеальным объектом для изучения морфогенетических механизмов из-за ее больших размеров, способности к регенерации и легкости, с которой можно удалить ядро или пересадить его от одного вида с характерной морфологией другому. Кроме того, четкая дифференциация клетки на шляпку, стебелек и ризоид может использоваться для исследования определяющих морфогенетических факторов (см. рис. 5.3). Самой первой работой, которая сделала *Acetabularia* крайне важным в экспериментальном отношении объектом, была работа Геммерлинга (Hämmerling, 1934; 1963). Он показал, что не только стебелек регенерирует шляпку после ампутации, но что регенерация происходит и после того, как отрезан ризоид, содержащий ядро. Регенерация может происходить даже спустя много недель после удаления ядра, причем время регенерации контролируется светом (в темноте никакой регенерации не происходит). Удаление ядра из очень молодых растений провоцирует преждевременное образование шляпки; поэтому очевидно, что информация, необходимая для морфогенеза, присутствует уже на ранних стадиях роста, даже если она не проявляется в целом растении до тех пор, пока оно не достигнет определенных размеров (2—3 см). Такие данные указывают на то, что ядро не связано с морфогенезом непосредственно, точно так же как оно не является обязательным для функционирования биологических часов. Однако Геммерлинг обнаружил, что пересаживание стебелеков и ризоидов разных видов, имеющих отчетливо различающиеся типы структур шляпки, может привести к конфликту между двумя типами морфогенетической информации. Если, например, стебелек *Acetabularia mediterranea*, у которой удалены шляпка и ризоид, пересажен на ризоид *A. crenulata*, то регенерируется шляпка *A. mediterranea*. Однако если эту шляпку опять удалить и дать возможность вырасти второй, то она начнет приобретать морфологические особенности, соответствующие привитому ядру, *A. crenulata*. Если и эту вторую шляпку ампутировать, то следующая будет совершенно точно соответствовать типу ядра. Этот эксперимент является морфогенетическим аналогом эксперимента с часами, в котором объединяются стебелек с находящимся в противофазе ризоидом и его ядром, в результате чего после нескольких циклов начинает доминировать фаза ядра. Такие факты говорят нам, что хотя цитоплазматические механизмы, как создающие морфогенетическую карту (градиснтную систему), так и обеспечивающие работу часов, могут функционировать независимо от ядра, они все же чувствительны к ядерным воздействиям. Очевидно, что организуют события в пространстве или во времени именно цитоплазма и ее органеллы.

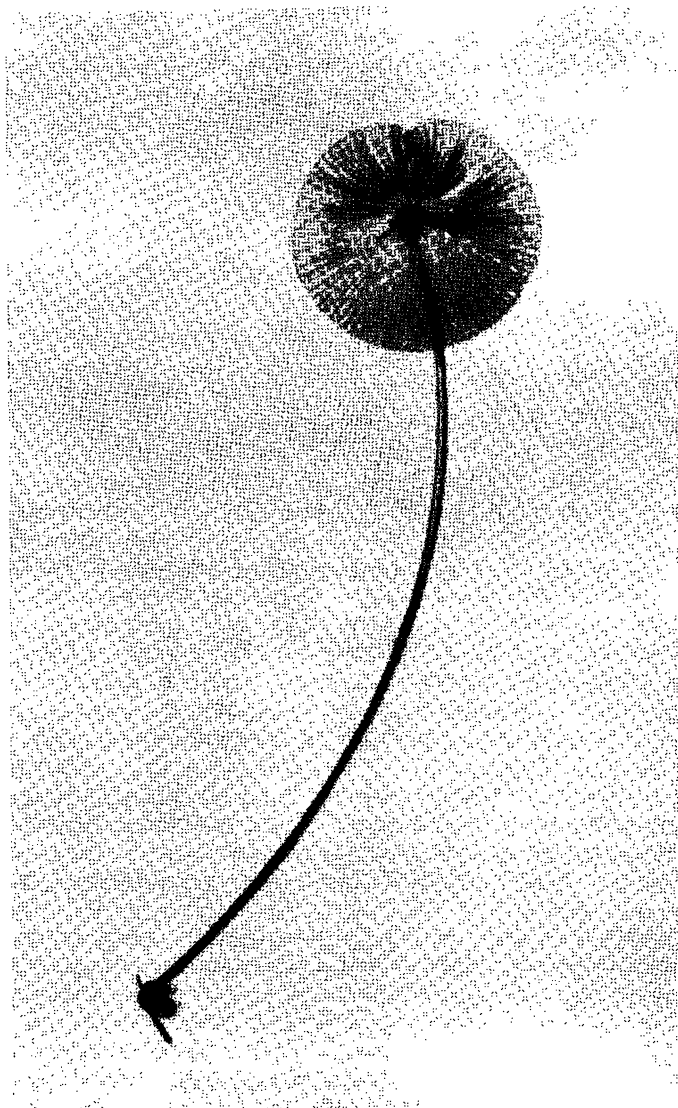


Рис. 5.3. Фотография *Acetabularia mediterranea*, на которой видны сформировавшаяся шляпка, стебелек и ризоид, который содержит ядро.

Обширные исследования некоторых биохимических аспектов морфогенеза *Acetabularia*, проведенные Браше и его коллегами (см. Brachet, 1964; Brachet, Bonnotto, 1970), показали, что вещество, необходимос для формирования апикальной шляпки, чувствительно к ультрафиолетовому облучению и рибонуклазе и что его появление может быть ингибировано актиномицином D. Эти данные убедительно указывают на участие в морфогенетическом процессе РНК, как и ожидалось. Кроме того, авторы также установили, что верхушка является главным центром синтеза цитоплазматических белков и что полирибосомы чаще всего встречаются именно в этой области, хотя синтез белков идет во всей цитоплазме и продолжается даже в тех частях растения, которые не регенерируют шляпки. Проблема пространственной организации эпигенетических процессов усложняется еще и тем, что существует активное движение протоплазмы, или циклоз, которое эффективно перемешивает содержимое цитоплазмы во всем растении от верхушки до основания, и все же распределение морфогенетической информации образует устойчивый градиент. Этот градиент сохраняется даже при центрифугировании растения, в ходе которого цитоплазма временно перераспределяется, и при осторожном удалении цитоплазмы из стебелькового сегмента и ее замене той же самой или другой цитоплазмой (Сандахчиев и др., 1972). Очевидно, градиент локализован на структурах, которые не нарушаются при этих обработках, например на мембранах или кортексе, примыкающем к полисахаридной клеточной стенке, и именно инфузории дают нам дальнейшие доказательства роли клеточной поверхности в морфогенезе.

Некоторые относительно крупные инфузории, такие, как *Stentor*, *Tetrahymena*, *Paramecium*, *Euplotes*, *Blepharisma*, *Spirostomum*, были изучены достаточно детально, когда ученые пытались выяснить особенности механизмов, управляющих регенерацией и морфогенезом не клеточных систем. Их пространственная структура бывает очень сложной и включает ротовые структуры, внутренние органеллы и кортикальные структуры, такие, как реснички, флагеллы, трихоцисты и т. д., образующие весьма характерный узор. Небольшие фрагменты организма способны к восстановлению целого, и в то же время существуют особые области, которые оказывают доминирующее организующее влияние на остальную клетку, вызывая согласованную пространственную упорядоченность даже после серьезного хирургического вмешательства. Эти области названы «организационными зонами» (Jerka-Dziadosz, 1964). Нарушая хирургическим путем ориентации и связи между участками кортекса ресниччатых и изучая устойчивость наследуемых аномальных структур кортекса, некоторым исследователям, работающим в этой области

(Sonneborn, 1963; Tartar, 1967; Nanney, 1968), удалось построить интересную картину, показывающую значение кортекса в морфогенезе и его связь с информацией, содержащейся в ядре. Сравнительно недавно опубликованный обзор Френкеля (Frankel, 1974) и подробный анализ морфогенетических механизмов в *Chilodonella cucullulus*, выполненный Качановской (Kaczanowska, 1974), убедительно указывают на то, что принципы пространственной организации у реснитчатых по существу идентичны принципам организации многоклеточных и что основные механизмы действуют в кортексе.

Это положение не ново, оно было высказано и четко сформулировано Дришем еще в 1908 г. и позднее Стумпфом (Stumpf, 1968). Френкель показывает, как постулат о градиентах, исходящих из ротовых зачатков, которые являются организующими центрами, объясняет данные о нарушениях ресничных и около-ротовых структур в результате трансплантации и вырезания участков, а также результаты экспериментов, связанных с выяснением влияния ядра на эти структуры. И опять оказывается, что центром, ответственным за пространственную организацию, чувствительным к специфической ядерной информации, но действующим независимо от нее, является цитоплазма и, в частности, ее поверхностная структура, связанная с кортексом. Посмотрим теперь, можно ли объяснить такое поведение, опираясь на простые общие свойства биологических поверхностей, с тем чтобы выяснить возможность создания универсального фундамента, лежащего в основе первичных событий морфогенеза как у одноклеточных организмов, так и у многоклеточных.

Мембраны и морфогенез

В настоящее время твердо установлено, что биологические мембраны — это нечто большее, чем просто фазовые границы между органеллами и цитоплазмой или между цитоплазмой и внешней средой. В основе наших представлений о структуре мембраны до сих пор лежит классическая липопротеидная модель Давсона и Даниэлли (Davson, Danielli, 1952) с липидным бислоем, покрытым с обеих сторон белком. Однако теперь мы знаем о мембранах гораздо больше благодаря работам Бретшера (Bretscher, 1971), обнаружившего белки, которые «прошивают» мембрану, и исследованиям, показывающим, что многие ферменты, например аденозинтрифосфатаза, дегидрогеназа и аденилатциклаза, связаны с мембраной и наиболее эффективно функционируют в этом состоянии (см., например, Porcellati, di Jeso, 1971; Siekevitz, 1972). Таким образом, помимо известных свойств: возбудимости и избирательной ионной проницаемости, мембрана обладает еще одной особенностью — с ней связана

значительная метаболическая активность. Электрическая возбудимость — хорошо известное свойство многих биологических мембран, но его нужно рассматривать только как одну из форм возбудимости, которая включает также метаболическую активность. Тем самым подразумевается, что присутствие аллостерических ферментов, которые способны активироваться и ингибироваться диффундирующими лигандами, может привести к появлению в мембранах волн активности, аналогичных распространяющимся потенциалам действия, но не обязательно сопровождающихся деполяризацией мембраны и потоком ионов через нее.

Рассмотрим простую модель метаболически возбудимой мембраны, на основе которой можно объединить морфогенетические

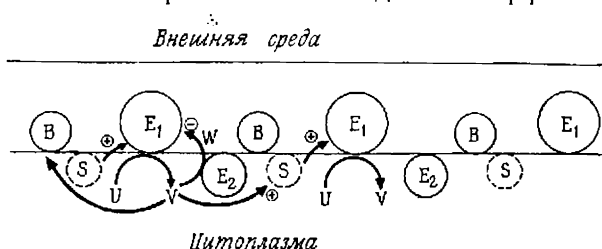


Рис. 5.4. Схема взаимодействий молекулярных процессов в мембране или кортикальном слое, которые могут привести к образованию градиента метаболита V, связанного с белками B.

явления, уже описанные в этой главе, и которую мы сможем затем использовать для анализа более сложных морфогенетических систем, рассматриваемых позже.

Предположим, что имеется фермент E_1 , который связан с мембраной или кортикальным слоем клетки, и активные центры этого фермента обращены во внутриклеточное пространство (рис. 5.4). Он катализирует превращение метаболита U в другой метаболит V. Второй фермент, E_2 , который может быть, а может и не быть связан с мембраной, катализирует реакцию превращения V в W. Предположим, что метаболит V вызывает увеличение концентрации активатора фермента E_1 (на рисунке он обозначен через S). Этот активатор может высвобождаться из центров связывания с помощью V или, если это ион, скажем K^+ , его концентрация может увеличиться в результате изменения проницаемости мембраны с помощью метаболита V или за счет другого изменения локального ионного равновесия. Активация E_1 приводит к образованию петли положительной обратной связи: чем больше производится V, тем больше появляется свободного S и тем больше будет активация E_1 , что приведет к образованию еще большего количества V. Это может вызвать

метаболическое возбуждение, так как если свободный S кратко-временно появится в некоторой точке мембраны, то волна активации E_1 из этой точки сможет распространяться вдоль мембраны. Для стабилизации процесса нужно предположить, что W — это ингибитор E_1 . Легко видеть, что структура системы управления качественно аналогична той, которая рассматривалась в гл. 1 в связи с гликолитическим осциллятором (рис. 1.10), и что система, описанная выше, может вызвать колебания концентраций метаболитов, т. е. волна возбуждения способна спонтанно возникнуть вновь в том же месте. Если один из лигандов, участвующих в управлении, оказывается ионом, то волна сопровождается электрическим сигналом; в противном случае это электрически нейтральный метаболический процесс.

Следующий вопрос — как получается перераспределение вещества при прохождении волны активности, приводящее к образованию устойчивого градиента связанного метаболита, который дает пространственно упорядоченный «след» волны. Предположим, что на мембране существуют центры связывания метаболита V , обозначенные на рис. 5.4 через B , и что эти центры активируются веществом W ; тогда после прохождения волны связанный метаболит V каким-то образом распределится по мембране. Для того чтобы гарантировать, что морфоген, в нашем случае вещество V , связанное с центрами B в мембране или кортексе, будет иметь максимальную концентрацию в источнике волн, а в других местах его концентрация будет монотонно уменьшаться, нужно сделать некоторые очень простые предположения. Например, можно допустить, что существует некая задержка между образованием метаболита V и активацией центров B ; в этом случае мы будем иметь монотонный градиент, что показано в приложении. Эту задержку получить очень просто, предположив, что превращение V в W происходит медленно и что для активации центров существует пороговое значение W . Другой вариант — это предположить, что S действует как ингибитор B и как активатор E_1 . Тогда по мере распространения волны вещество S (которое, согласно предположению, является ионом) будет почти равномерно накапливаться в системе из-за большой константы диффузии и постепенно ингибировать реакцию связывания. Степень ингибирования в любой момент времени, а следовательно для любой пространственной локализации волны активности, зависит от объема системы, так как S накапливается со скоростью, обратно пропорциональной объему, в котором он диффундирует (предполагая, что границы замкнуты). Это обуславливает чувствительность механизма к размерам. Поведение таких систем сейчас интенсивно изучается; это позволит лучше понять их регулирующие свойства, на которых подробнее мы остановимся ниже.

Вообще говоря, одна волна активности не создаст устойчивого морфогенетического градиента. Для этого требуется регулярное повторение волн, периодически исходящих из некоторого источника. Наличие этой периодичности в активности источника, который теперь действует как пейскекер или организационный центр систем, в действительности предполагалось при описании основной кинетической схемы, представленной на рис. 5.4. Мы отмечали, что структура обратных связей процессов управления, действующих на E_1 , такова, что изменение переменных может носить колебательный характер, причем период колебаний определяется главным образом скоростью исчезновения ингибитора W в результате деградаци и диффузии. Поскольку связанный метаболит тоже высвобождается с конечной скоростью, из этой более общей модели видно, что градиент на мембране будет поддерживаться в результате установления равновесия между образованием метаболита в результате прохождения волн, которые распространяются из источника, и его высвобождением из комплекса с мембранным белком. Такая система, конечно, лабильна и пластична и может или сохранять свою собственную структуру в отсутствие внешних воздействий, или отвечать на эти воздействия, изменяя пространственную упорядоченность.

Рассмотренная здесь волновая модель относится к категории систем, для которых существует решение в виде распространяющейся волны, аналогично тому, как это имеет место для уравнений реакций с учетом диффузии типа уравнений (5.1). В настоящее время эта область бурно развивается, и вполне возможно, что экспериментальное исследование волновых режимов в развивающихся системах вместе с аналитическим изучением модельных систем приведут к созданию нового интересного подхода к пониманию эмбриологических процессов. Модель мембраны рассматривалась нами здесь чисто феноменологически, поскольку мы заранее предположили возможность распространения волны в мембране и затем использовали это положение для анализа образования градиента. Сейчас в литературе имеется достаточно много примеров как экспериментальных, так и теоретических систем, обладающих свойствами распространения волн, чтобы считать это свойство твердо установленным для химических и биохимических систем. Ряд таких примеров можно найти в сравнительно недавно вышедшем сборнике материалов симпозиума Фарадеевского общества (Faraday Society Symposium, 1974), который представляет собой свосвременный обзор работ в этой очень интересной области исследований.

Посмотрим теперь, как явление распространения волн и его связь с образованием градиентов согласуются с данными, известными для некоторых развивающихся систем, дающих пред-

ставление о самых ранних событиях, которые связаны с образованием полярной упорядоченности.

Литоральные водоросли, *Fucus* и *Pelvetia*, обладают сферическими яйцеклетками диаметром около 70 мкм, которые оплодотворяются крошечными спермиями после выбрасывания в море. В яйцеклетках в это время нет никаких признаков существования полярной оси. После оплодотворения яйцеклетки погружаются в воду и прикрепляются к любому доступному основанию (обычно к камням) с помощью клейкого мукополисахарида, который они выделяют. Оплодотворение или партеногенетическая активация этих яйцеклеток легко осуществляются в лаборатории. Первый признак асимметрии появляется примерно через 15 ч после оплодотворения — у одного полюса яйцеклетки образуется нарост. Яйцеклетка становится грушевидной и затем делится под прямым углом к продольной оси, давая маленькую, ризоидную клетку, которая включает нарост, и большую, талломическую. Первая развивается в корневище (ризоид) растения, а последняя — в листья (пластинки).

К появлению этой полярной оси может привести целый ряд воздействий. Так, Лунд (Lund, 1923) обнаружил влияние на этот процесс электрического поля, а Вайтейкер (Whitaker, 1938) выявил зависимость от градиента рН. В число таких стимулов входят температурный градиент и освещение. Согласно другим работам (Jaffe, 1966, 1968), ризоидный полюс становится отрицательно заряженным по отношению к таллону, т. е. через яйцеклетку идет ток. Автор полагает, что это и есть первоначальная поляризирующая сила, которая образует градиент вещества в яйцеклетке с помощью процесса внутреннего катафореза; при этом электрически заряженные молекулы пространственно распределяются внутри яйцеклетки. Есть веские данные, что центром начальной полярной упорядоченности является именно мембрана.

Волновая модель, описанная выше, может легко объяснить эти факты. Так, для объяснения электроотрицательности ризоида, можно предположить, что связанный метаболит V обладает деполяризующим действием на мембрану, и считать, что волна возникает в той части яйцеклетки, которая приводит к образованию ризоида, так что в этой точке уровень связанного V максимален. Это находится в соответствии с данными, показывающими, что если яйцеклетки помещены в градиент KCl, то ризоид развивается по направлению к максимуму градиента, и согласуется с фактом влияния электрических полей и градиентов рН. Действие света не объяснено, хотя можно предположить, что световые рецепторы вызывают в мембране гиперполяризацию, так как ризоид растет в противоположную от света сторону.

Интересными являются данные о регистрации спонтанного потенциала действия в развивающихся яйцеклетках *Pelvetia*,

который периодически повторяется, возникая в ризоиде (Nucitelli, Jaffe, 1974). Подобный потенциал действия имеет место и в регенерирующих сегментах *Acetabularia* (Novak, Bentrup, 1972), причем электрический сигнал возникает у верхушки. Импульсная активность появляется почти через 12 ч после декапитации и имеет довольно нерегулярную периодичность, примерно 1 импульс в 1 ч, а во время регенерации период уменьшается примерно до 10—20 мин. Экспериментальных доказательств того, что эти электрические волны каким-либо образом связаны с установлением градиентов вещества в развивающихся системах, пока нет, но мы сейчас занимаемся исследованиями этого вопроса. Совершенно ясно, что между поведением *Pelvetia* и *Acetabularia* и свойствами, предсказываемыми волновой моделью образования градиентов, имеется соответствие.

Посмотрим теперь, как можно применить эту модель, соответствующим образом модифицировав ее, к поведению миксамеб *Dictyostelium discoideum*. Предположим, что $S = K^+$ и что одним из изменений в состоянии клетки в условиях голодания оказывается появление возбудимости мембраны вследствие увеличения в ней концентрации E_1 или изменения отношения K^+/Na^+ внутри клетки. Допустим, что цАМФ, сигнал хемотаксиса, обладает способностью тем или иным образом инициировать волну активности, например изменяя проницаемость мембраны для иона, который влияет на содержание свободного K^+ внутри клетки. Тогда результатом действия цАМФ будет увеличение концентрации свободных ионов калия внутри клетки.

Волна активности в миксамебе должна распространяться быстрее, чем идет процесс диффузии хемотактического сигнала, скорость которого, по оценкам, равна примерно $40 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$ (Gerisch, 1968), поскольку в противном случае все участки мембраны амобы будут активироваться диффундирующим сигналом, прежде чем распространится волна и успеет установиться градиент, и тогда не будет источника волн¹. Мейнарт и Гирер (Meinhardt, Gierer, 1974) не учли этого при обсуждении приложения их модели к амебам *Dictyostelium*. Волна активности, распространяющаяся со скоростью, большей чем $40 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$, может быть аналогична волне, вызывающей активацию фермента в мембране, но скорее всего она является по своей природе чисто ионной, классического электрохимического типа, как в нейроне. Чтобы получить градиент в результате прохождения такой волны, можно предположить, что связанные мембраной белки В (рис. 5.4) способны повышать уровень натрия, который затем играет роль диффундирующего метаболита V. Таким

¹ Я благодарен Стивену Ладлоу за то, что он обратил мое внимание на этот момент.

образом, по мере распространения волны деполяризации вдоль мембраны от места, где впервые была получена свёрхпороговая концентрация цАМФ, за ней будет оставаться «след» в виде связанного с мембраной градиента концентрации натрия. Кроме того, связанный с мембраной градиент натрия может сам отвечать за полярность амёб, так как псевдоподии чаще образуются в частично деполяризованных областях мембраны (повышение внутриклеточной концентрации натрия вызывает деполяризацию). Или наоборот, связанные с мембраной ионы натрия могут оказывать на образование псевдоподий опосредованное влияние с помощью некоторой системы взаимодействий внутри мембраны, приводящей к ослаблению связей между структурными элементами с последующим перетеканием цитоплазмы в псевдоподии. В любом случае мы имеем поляризованную амёбу, которая будет стремиться двигаться по направлению к источнику цАМФ. Механизм поляризации достаточно лабилен, и его существование определяется устойчивостью градиента на мембране, так что реполяризация в ответ на сигнал может произойти сразу, как только амёба отклонится от курса.

Между моментом присма амёбой сигнала цАМФ и импульсным выделением цАМФ из клетки существует задержка около 15 с. Какие процессы управляют генерацией импульса — внутриклеточный синтез цАМФ или механизмы высвобождения, включающие разрыв везикул, содержащих вещество, как это имеет место в процессе нейротрансмиссии в нейронах, не ясно.

На более поздних стадиях агрегации образуются межклеточные контакты. Они необходимы для формирования и развития слизевика (Beug et al., 1973), и из поведения отдельных амёб во время агрегации видно, что одной из причин существования у них полярности оказывается дифференциальное распределение адгезивных участков по всей клетке, причём устойчивый контакт образуется, как правило, между передней частью одной клетки и задней другой. Таким образом, ещё одним следствием существования градиента, который, как постулировано, образуется внутри отдельных клеток, должно быть полярное распределение мембранных белков, действующих как адгезивные единицы на клеточной поверхности. Как только клетки образовали контакт, волны могут распространяться непрерывно от клетки к клетке, поскольку система благодаря наличию щелевых контактов оказывает слабое сопротивление проходящим по ней ионным сигналам. Если бы соединение V могло диффундировать через эти контакты, градиент мог бы образоваться на протяжении всего организма. Периодический режим сохранялся бы во всем слизевике, а доминирующую роль играла бы верхушка, которая, согласно Рубину и Робертсону (Rubin, Robertson, 1975), действует как организатор. Модель, использующая полярное

распределение «контакт-чувствительных» молекул на мембранах амёб как основу для образования градиента цАМФ на протяжении всего слизевика, предложена Мак-Мэйхоном (McMahon, 1973). Слабость этой модели — в ее неспособности объяснить регуляцию после разрезания слизевика пополам и в необходимости вводить довольно специальные начальные условия для того, чтобы получить такое же отношение споры : стебель (2 : 1), как в нормальных слизевиках.

Регуляция и устойчивость

Какова же биохимическая природа молекул, фигурирующих в волновой модели? Наиболее интересной из них является V — молекула, которая, будучи связана с активными центрами на мембране, играет роль неуловимого морфогена. Поскольку мы предположили, что эта молекула влияет на ионное равновесие и, следовательно, причастна к управлению свойствами мембран, нам нужно рассмотреть те метаболиты, которые могут оказывать такое действие. Трудность состоит в том, что таких метаболитов очень много. Однако наш выбор несколько ограничивается требованием, предъявляемым к модели, — она должна быть достаточно универсальной. Интересным кандидатом на роль V представляется сам циклический АМФ; в этом случае E_1 будет аденилатциклазой, которая, как известно, в значительной степени связана с мембранными фракциями, а E_2 — фосфодиэстеразой, растворимым ферментом. Вместо того чтобы действовать прямо на проницаемость мембраны, цАМФ сначала будет активировать протеинкиназы и таким образом создаст на мембране вторичный градиент ковалентно связанного фосфата. Это приведет к двум важным следствиям. Первое — в результате фосфорилирования и последующего электростатического взаимодействия и образования водородных связей между составными частями мембраны возрастет устойчивость распределения белков в мембране. Это уменьшит подвижность мембранных белков и стабилизирует градиент против диффузионного размывания, согласно жидкой мозаичной модели мембраны (Frye, Edidin, 1970; Nicolson, Singer, 1971; Gitler, 1972). Второе — фосфатные группы на связанных с мембраной белках будут стремиться связать двухвалентные катионы, такие, как Ca^{2+} , которые в свою очередь могут вызвать открывание каналов, по которым через мембраны проходят Na^+ или K^+ , с помощью механизма, аналогичного механизму действия родопсина в колбочках сетчатки (Hagins, 1972) и тропонина в мышце (Bremel, Weber, 1972; Hitchcock, 1973). Сейчас метаболическими последствиями локальных изменений ионных концентраций, вызванных связанными с мем-

браной белками, придается большое значение, так как это, по видимому, один из первичных актов действия гормонов.

Циклический АМФ является только одним из возможных кандидатов на роль вещества V; другие кандидаты — циклический ГМФ, серотонин (5-окситриптамин), γ -аминобутират и т. д. Все они — простые метаболиты, которые могут играть важную морфогенетическую роль в качестве модуляторов мембран и, следовательно, воздействовать на локальный метаболизм специфическими способами, приводящими к упорядоченной физиологической и структурной гетерогенности в клетках или развивающихся тканях. Это элементы универсального языка формирования структур в организмах.

Особенность данной модели, предположительно обладающей регулируемыми свойствами, состоит в том, что процессы, участвующие в образовании градиента, являются по существу локальными, т. е. метаболит V диффундирует из центра образования на связанных с мембраной ферментах E_1 и захватывается белками B, расположенными в мембране по соседству. Как только волновой фронт уйдет на некоторое расстояние от любой данной области мембраны, так сразу в этой области будет захватываться очень мало диффундирующего метаболита, потому что центры связывания релаксируют к исходному неактивному состоянию. Таким образом, можно предположить, что, как только волна удалится на некоторое расстояние, уровень морфогена в источнике приблизится к своему максимальному значению. Это будет, конечно, зависеть от значений v и D ; чем меньше D , тем более локальным будет процесс.

Важным моментом для всего процесса является природа функции захвата, описывающей, на каком расстоянии активируются центры связывания, а затем релаксируют к неактивному состоянию. В приложении, используя функцию

$$f(z) = ze^{-\alpha z}, \quad z \geq 0 \\ = 0, \quad z < 0,$$

где α такова, что процесс связывания достигает максимума в 20 мкм позади того места, где начинается активация B, и затем спадает экспоненциально, мы покажем, что при $v = 5 \text{ мкм} \cdot \text{с}^{-1}$ и задержке между возникновением волны и захватом в 4,5 с уровень морфогена достигает 96% своего максимального значения в точке, являющейся источником волны, после того как волна ушла на 60 мкм. Произвольно предположив, что 96% нормального диапазона значений уровня морфогена функционально эквивалентны всему диапазону, можно сделать вывод, что в волновой модели для приведенных выше значений параметров все осевые расстояния больше 60 мкм будут иметь одинаковый эф-

фективный диапазон значений уровня морфогена. Меньшие расстояния будут недостаточными, т. е. регуляции не произойдет. Для разных организмов характерные значения параметров будут, конечно, различаться, так что расстояние, на котором нарушается независимость от размера, для них тоже будет разным. Мы видим, что волновая модель дает нам регуляцию как подарок: для того чтобы получить это биологически важное свойство, к основным постулатам не нужно добавлять никаких специальных предположений. Таким образом, в классе моделей, описываемых уравнениями (5.1), модель, основанная на процессах распространения волн, имеет то преимущество, что регуляция получается как естественное следствие основных постулатов. Кроме того, мембранная волновая модель объясняет, почему информация морфогенетического поля устойчива к возмущениям (центрифугированию цитоплазмы, удалению, гомогенизации и замне цитоплазмы) и каким образом на это поле можно воздействовать поворотом или трансплантацией сегментов кортикального слоя. Объяснить все эти данные с помощью моделей, включающих ферментативную активность и диффузию метаболитов в объеме типа модели Тьюринга (Turing, 1952) или Гирера и Мейнарта (Gierer, Meinhardt, 1972), довольно трудно.

Обратимся теперь к вопросу применения волновой модели к процессу морфогенеза гидроидов.

Периодические режимы у гидроидов

Два аспекта общей теории, развиваемой здесь применительно к морфогенетическим процессам, поддаются четкой экспериментальной проверке. Один из них — это предположение, что мембрана является главным центром первичных морфогенетических процессов, так что изучение свойств биологических поверхностей — их электрической возбудимости, чувствительности к целому ряду мембранно-активных агентов и изменению в составе мембран, обусловленных, скажем, ковалентным связыванием фосфатных групп с мембранными белками, — позволяет подойти к исследованиям раннего морфогенеза. Другой аспект — это предположение о том, что важным моментом формообразующих процессов в развивающихся системах являются повторяющиеся периодические процессы, вероятно связанные с ионными потоками и, следовательно, с электрическими сигналами. Как мы видим, у *Dictyostelium discoideum* наблюдается четкая периодичность процесса агрегации, а у *Pelvetia* и *Acetabularia* зарегистрированы повторяющиеся потенциалы действия, коррелирующие с ранними стадиями морфогенеза. Есть ли аналогичные данные для гидроидов?

Фильмы о регенерации *Tubularia*, снятые цейтраферной съемкой Дж. Куком и Г. Вебстером на морской биологической станции в Неаполе, выявили следующую последовательность событий в ходе этого процесса. После отрезания гидранта вначале начинается дистальная миграция клеток, и у них появляется тенденция сгущаться в области, находящейся в непосредственной близости от места среза. Эта фаза продолжится почти 5 ч. Затем начинается фаза нерегулярных периодических сокращений; волны сокращения вначале распространяются из разных центров в зоне сгущения, а затем сокращения приобретают характер организованных периодических волн, исходящих из одной пейсмекерной области с периодом от 8 до 10 мин. Это продолжается в течение примерно 8,5 ч, вслед за чем довольно резко наступает фаза неподвижности продолжительностью около 4,5 ч, в течение которой происходит дальнейшая конденсация клеток в предполагаемой области образования щупалец и точек начала морфогенеза. Пейсмекерная область теперь совпадает с центром этой конденсированной зоны. Затем начинается вторая фаза периодических сокращений и распространения волн, которая продолжается около 5 ч с последующим периодом покоя. К сожалению, фильм был не полон — отсутствовала часть о периоде развития с этого момента вплоть до полной дифференцировки гидранта. Последняя фаза регенерации состоит из более быстрых сокращений (с периодом в 4—5 мин) и заканчивается пульсирующим появлением готового гидранта из перисарка с активными движениями щупалец после выхода. Сходные явления были зарегистрированы Белоусовым и др. (Белоусов и др., 1972) на *Obelia*. Жаль, что таким способом не удастся исследовать регенерацию *Hydra* — у нее каждые несколько минут происходят энергичные сокращения тела, маскирующие все морфогенетические движения. Можно предположить, что периодические режимы типа наблюдаемых у *Tubularia* сопровождают морфогенез, происходящий на основе модели распространения волн, прототипом которого служит агрегация *Dictyosielium discoideum*. Однако важно понимать, что метаболическая периодичность совсем не обязательно будет приводить к таким движениям клеток в развивающихся системах, которые удастся зарегистрировать, и может оказаться, что выявить предлагаемую периодичность метаболической активности на мембране будет очень трудно.

Другой подход к экспериментальному изучению периодичностей в развивающихся системах основан на возмущении системы каким-либо периодическим сигналом. Эта методика использовалась на *Hydra littoralis* следующим образом. У больших, откормленных животных отрезали гипостом, затем делали второй разрез дистально к зоне развития (чтобы избежать осложнений,

связанных с образованием почек). Полученные отрезки желудочной части организма нанизывали затем на платиновую проволоку диаметром 40 мкм, которая была изолирована по всей длине, кроме концевой участка в 4 мм. Проволоку пропускали по диаметру через организм (теперь полый цилиндр), располагая ее либо дистально, вблизи разреза, которым был удален гипостом, либо проксимально, вблизи области, где уже была зона почкообразования. На одну и ту же проволоку, которая служила одним из электродов цепи стимуляции, накальывали от 2 до 4 животных. Вторым электродом являлся другой кусочек платиновой проволоки, который помещали примерно в 1 см от проколотых животных; всю эту систему погружали в среду обитания *Hydra*, которая по составу близка к озерной или речной воде. Проволочки присоединяли к клеммам стимулятора фирмы Grass, генерирующего импульсы постоянного тока, напряжение и длительность которых можно было менять. Оказалось, что изолированные участки желудка сокращались в ответ на короткий (100 мс) импульс напряжения с амплитудой 4—5 В, но более слабые импульсы не приводили к заметным сокращениям. Поскольку сокращения нужно было исключить, выбрали напряжение 1,5 В, которое, как оказалось, при попадании частот следования импульсов в определенный диапазон вызывает значительное возмущение морфогенеза. Частота задавалась измерителем временных интервалов фирмы Crouzet, который с заданной периодичностью включал стимулятор. Длительность импульса составляла 150 мс, так как оказалось, что импульсы длительностью до 100 мс менее эффективны для генерации морфологических нарушений, тогда как импульсы длительностью от 100 мс до 3 с — наибольшей из испытанных длительностей — по своему действию были одинаковыми. Импульсацию начинали в течение первого часа после нанизывания и продолжали в течение 24 ч. В конце этого периода животных снимали с проволоки и переносили в отдельную посуду. Эксперименты проводились при температуре 21—24 °C.

Было сделано три типа контролей: (1) отрезкам средней части желудка предоставляли возможность регенерировать без возмущения; (2) отрезки в течение 24 ч были наколоты, но не стимулировались; (3) отрезки непрерывно стимулировали при напряжении 1,5 В в течение периода времени, равного суммарной длительности стимуляции за 24 ч, а затем предоставляли им возможность регенерировать без воздействий. Таким образом, если частота следования импульсов в опыте составляла один импульс каждые 2 мин, то постоянная стимуляция, используемая в контроле (3), продолжалась

$$\left(\frac{24 \times 60}{2} \times 0,15 \right) = 108 \text{ с.}$$

Пребывание животных в течение 24 ч в наколотом состоянии никак не влияло на регенерацию, за исключением того, что приводило к задержке в 12—16 ч (измеренной до появления щупалец); однако эта задержка находится в нормальном диапазоне изменчивости. Животные, стимулированные непрерывно в течение 108 с или дольше (максимум 3 мин), не регенерировали.

Морфогенетическое нарушение, которое было следствием проксимальной стимуляции с периодом около 0,5 мин, иллю-

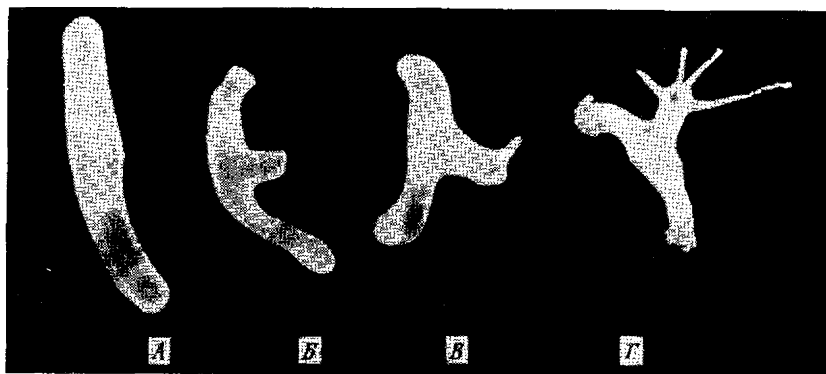


Рис. 5.5. Появление медиального гипостома в проксимально стимулированной *Hydra*. Показано одно и то же животное (при разном увеличении) на 2, 3, 4 и 5-й день после стимуляции.

стрируется рис. 5.5, Г. Животное имеет двойную ножку и медиальный гипостом. Картинки последовательно показывают одно и то же животное (фотографии сделаны при разном увеличении) на 2, 3, 4 и 5-й день после окончания 24-часового периода стимуляции. Когда подобно воздействию производилось дистально, частота появления аномалии была значительно меньше. Спонтанная частота возникновения таких нарушений, прослеженная в контроле, составляла 1,5%. Результаты опытов, демонстрирующие ответы на стимуляцию с разными частотами, даны в табл. 5.1. Из всех организмов, считавшихся аномальными, были и такие, которые отличались по внешнему виду от изображенного на рис. 5.5, Г, но все они имели две ножки и один медиальный гипостом. Частотная характеристика ответа проксимально стимулированных животных представлена на рис. 5.6. Максимальное число медиальных гипостомов получается при частоте 1 имп каждые 2,5 мин.

Интерпретация этих результатов в рамках волновой модели очевидна: периодический стимул инициирует волну активности и поэтому вызывает образование градиента вдоль оси организма.

Таблица 5.1

Проксимальная стимуляция				Дистальная стимуляция		
Частота, мин ⁻¹	Общее число исследованных животных	Число животных с медиальным гипостомом	%	Общее число исследованных животных	Число животных с медиальным гипостомом	%
$\frac{1}{5}$	19	1	5,3	14	0	0
$\frac{1}{3}$	18	0	0	20	0	0
$\frac{1}{2,5}$	42	13	32	38	2	5
$\frac{1}{2}$	22	5	23	36	1	3
$\frac{1}{1,75}$	22	2	9,1	22	0	0
$\frac{1}{1,5}$	18	2	11,1	16	0	0
$\frac{1}{1,25}$	11	0	0	10	0	0

Частота спонтанного появления двойных ножек и медиальных гипостомов, наблюдаемая в контроле, равна 3 из 200, т. е. 1,5%.

Тот факт, что при дистальной стимуляции аномальные животные довольно редки, в то время как при проксимальной стимуляции их возникает значительно больше, является следствием того, что дистальная стимуляция «усиливает» нормальный градиент от гипостома к подошве, а проксимальная нарушает его. Полученные результаты очень похожи на данные Вилби и Вебстера (Wilby, Webster, 1970), полученные в опытах по пересадкам гипостома к проксимальным концам изолированных пищеварительных зон. Такие пересадки гипостома на 48—72 ч с последующим его удалением также приводили к образованию животных с двойными ножками и медиальным гипостомом. Проксимальные прививки гипостома на срок, больший чем 72 ч, вызывают более полное изменение полярности у животных. В экспериментах с электрической стимуляцией животные, стимулированные более 36 ч, повреждались так сильно, что их регенерация носила ярко выраженный аномальный характер или не происходила совсем. Это свидетельствует о том, что электрическая стимуляция является очень грубым, обладающим разрушительной силой стимулом и что в качестве модели пейсмейкера она плоха. Однако наличие довольно острого максимума на частотной характеристике при $1/2,5$ мин⁻¹ и относительная эффективность

проксимальной стимуляции по сравнению с дистальной наводят на мысль, что большую роль в этих опытах играют период и расположение мест стимуляции, а следовательно, у *Hydra* имеется некий пейсмейкер. Этот тип экспериментов, будучи усовершен-

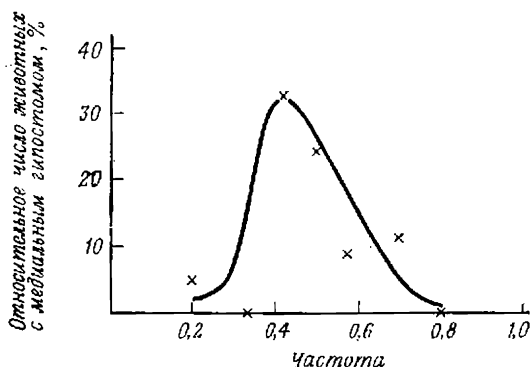


Рис. 5.6. Частотная характеристика генерации медиального гипостома в ответ на проксимальную стимуляцию.

ствованным, мог бы дать представление о расположении и природе пейсмейкерных центров в развивающихся организмах. Прекрасный пример использования периодического химического сигнала для управления морфогенезом дают эксперименты Робертсона, Дрейджа и Коэна (Robertson, Drage, Cohen, 1972), в которых воздействие периодических импульсов цАМФ на свободных амеб приводило к их агрегации вокруг этого искусственного пейсмейкера.

Очевидно, периодическая модель рассматриваемого нами типа может использоваться как для анализа отчетливо периодических во времени морфогенетических процессов, так и для процессов, у которых видимая периодичность отсутствует. Продолжать описание развивающихся систем, в которых временные периодичности того или иного рода уже обнаружены, только для того, чтобы представить данные в их пользу, не имеет большого смысла. Ценность теории состоит не в детальном соответствии ее современным экспериментальным данным — такое соответствие почти всегда можно получить тем или иным способом; гораздо ценнее ее интеллектуальная мощь, ее простота и, следовательно, способность давать представление об основных принципах, скрывающихся за разнообразием процессов, отдельные свойства которых маскируют общую картину. В заключение следует признать, что высшим арбитром здесь является организм; он выбирает стратегию развития согласно своим собственным потребностям, а не в соответствии с тем, что нам кажется проще.

МОРФОГЕНЕЗ: ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ПЕРИОДИЧНОСТИ И МНОГОМЕРНАЯ УПОРЯДОЧЕННОСТЬ

Пространственная периодичность — это замечательное свойство биологической структуры и морфогенеза, и именно при объяснении ее природы была построена одна из наиболее ранних аналитических моделей морфогенетических процессов. Это модель А. Тьюринга, показавшая возникновение неустойчивости в реагирующих системах с диффузионной связью (Turing, 1952); о ней уже упоминалось в предыдущей главе в связи с уравнениями, предложенными Гирером и Мейнартом для объяснения полярности в *Hydra*, которая принадлежит к этому общему классу систем. Тип биологических явлений, которые Тьюринг стремился объяснить, — это возникновение системы пятен на *Dalmatium*, периодическая сегментация кольчатых червей и образование венчика щупалец у гидроидов. Пятнистость у *Dalmatium* носит двумерный характер, в то время как для двух других явлений свойственна периодичность вдоль отрезка или окружности.

В предположении, что биохимические процессы, лежащие в основе образования структуры, включают взаимодействия двух типов молекул X и Y , которые могут диффундировать в некотором объеме, уравнения, описывающие изменения концентраций X и Y как функций пространственных и временных координат, будут иметь вид

$$\begin{aligned}\frac{\partial X}{\partial t} &= f(X, Y) + D_X \nabla^2 X, \\ \frac{\partial Y}{\partial t} &= g(X, Y) + D_Y \nabla^2 Y.\end{aligned}\tag{6.1}$$

Здесь D_X и D_Y — константы диффузии молекул X и Y , ∇^2 — оператор дифференцирования $\left(\frac{\partial^2}{\partial x^2} + \frac{\partial^2}{\partial y^2} + \frac{\partial^2}{\partial z^2}\right)$, описывающий диффузионный процесс, а x , y , z — пространственные координаты.

Тьюринг показал, что существуют функции $f(X, Y)$ и $g(X, Y)$, при которых однородное по пространству стационарное состояние неустойчиво. Он получил этот результат, линеаризуя функции в окрестности стационарной точки и предполагая, что

система разделена на клетки, расположенные по окружности или поверхности сферы. Неустойчивость означает, что небольшие флуктуации в системе заставят ее отклоняться все больше и больше от состояния пространственной однородности. Как показал Тьюринг, в этом случае в системе возникнет волнообразное распределение концентраций соединений X и Y , но он не показал, что система обязательно эволюционирует к устойчивому неоднородному стационарному состоянию с определенной пространственной периодичностью. Дело в том, что систему уравнений (6.1) с нелинейными функциями f и g нельзя решить аналитически вне окрестности однородной стационарной точки; для этого необходимы численные методы. Хотя сам Тьюринг принимал активное участие в идейном развитии этих методов и по его имени названа логическая реализация анализа рекурсивных процессов — универсальная машина Тьюринга, вычислительные устройства были тогда совсем не так доступны, как теперь.

Полные решения уравнений (6.1) для некоторых функций взаимодействия f и g удалось найти лишь недавно, и они полностью подтверждают выводы Тьюринга. В частности, Мартинес (Martinez, 1972), используя функции

$$\begin{aligned} f(X, Y) &= a + X^2Y - (b + 1)X, \\ g(X, Y) &= bX - X^2Y, \end{aligned}$$

которые исходно были предложены Пригожиным (Prigogine, 1969), показал, что для линейного расположения клеток получаются устойчивые пространственно-периодические решения X и Y . Согласно Тьюрингу, длина волны пространственной периодичности для данных параметров, вообще говоря, обычно постоянна, так что чем больше линейные размеры системы, тем больше наблюдается пространственных периодов. К такому же выводу пришел и Мартинес, который, кроме того, показал, что амплитуда волн есть функция всех линейных размеров. Другое численное исследование системы такого типа было сделано Бэрдом и Лаудером (Bard, Lauder, 1974) и подтвердило сделанные выше выводы, а также показало, что полученные структуры невоспроизводимы: небольшие изменения начальных условий приводят к значительным изменениям числа и расположения максимумов. Таким образом, системы с пространственными неоднородностями, возникающими в результате работы механизма Тьюринга, неустойчивы при генерации пространственной упорядоченности и не регулируются. Для многих морфогенетических процессов, таких, например, как образование щупальцев у гидроидов, это вполне удовлетворительная модель, так как число щупальцев увеличивается с ростом диаметра тела. Одна-

ко для применения модели к периодическим системам, которые обладают способностью к регуляции (например, пальцы конечностей позвоночных), ее нужно модифицировать таким образом, чтобы число периодов и значение амплитуды оставались постоянными, с тем чтобы достичь надежности и неизменности информации о положении. Интересный анализ этой проблемы сделан Мэйнардом Смитом (Maynard Smith, 1960). Регулирование требует изменений в параметрах модели, зависящих от длины, что предполагает существование какого-то вспомогательного механизма, чувствительного к размерам.

Распространение волн и пространственные периодичности

Рассмотрим теперь, как найти обобщенный вариант модели распространения волн (гл. 5), который дает пространственную периодичность. Один путь решения этой проблемы состоит во введении предположения о том, что вдоль одного или нескольких измерений в ткани (в зависимости от природы рассматриваемой периодической структуры) регулярно расположены точки, в которых, согласно некоторым вполне определенным правилам, генерируются источники или центры образования морфогена, так что имеет место периодическое распределение морфогена. В рамках волновой модели это означает существование источников волн, которые регулярно расположены вдоль оси (если рассматривать случай одномерной периодичности). По-видимому, проще всего получить такую картину следующим образом.

Предположим, что по всей развивающейся ткани распространяется волна компетентности в отношении свойства возбудимости, так что только после прохождения этой волны ткань становится способной к передаче волны активности типа описанной в предыдущей главе (см. последовательность реакций рис. 5.4). Следовательно, предполагается, что развивающаяся ткань уже имеет ось, которая определяет направление движения этой волны. Развитие такого типа возбудимости трактуется аналитически в следующей главе как фазовый переход, а условия, управляющие этим переходом, описаны здесь. По существу речь идет об управлении синтезом фермента E_1 и его встраиванием в мембрану, поэтому мы рассматриваем волну эпигенетической индукции, которая перемещается по всей ткани.

Предположим далее, что морфоген, когда его уровень выше данного порогового значения, ингибирует распространение волны, например мешая работе фермента E_1 . Это значит, что мы рассматриваем такую модель, в которой одной волны активности достаточно для установления соответствующего градиента (смотри приложение). Обусловлено это тем, что, как только прошла

волна и образовался градиент морфогена, все части мембраны, несущие сверхпороговые значения концентрации морфогена, будут ингибированы и не смогут активно участвовать в распространении волны. Мы также предполагаем, что морфоген (BV-комплекс) очень устойчив, т. е. обладает достаточно большим временем жизни.

Эти предположения приводят к периодическому пространственному распределению морфогена. Волна возбудимости распространяется по всей ткани, и на равных расстояниях друг от друга образуются последовательные источники волн морфоген-производящей активности, оставляя градиенты морфогена на мембранах или в кортексе. Точная пространственная форма волн градиентов морфогена будет зависеть от деталей модели, но в принципе распределение относительно максимумов будет асимметричным, так как волны активности не могут распространяться «в обратном направлении» — в область, содержащую морфоген. Следовательно, волна морфогена имеет крутой задний фронт и пологий передний, направленный в сторону новых волновых источников, причем волна активности распространяется вперед в ткань, оставшуюся возбудимой после процесса индукции. Таким образом, ткань стремится обрести отчетливую полярность своей организации, наложенную на пространственную периодичность максимальных значений концентрации морфогена, как это имеет место в сегментах насекомых или сегментирующихся сомитах позвоночных.

Для того чтобы получить регулирование в такой модели, как это было сделано при описании сомитогенеза (Cooke, 1975a), необходимо привести в соответствие с полным размером ткани расстояния между максимумами концентрации морфогена. Вообще говоря, для этого необходимо ввести некоторый механизм, чувствительный к размерам, который подстраивал бы параметр, подобный степени ингибирования E_1 морфогеном, в зависимости от общих размеров ткани. Чем больше размеры, тем сильнее должно быть ингибирование, так чтобы расстояние между источниками морфоген-производящих волн было больше. Достичь этого можно опять-таки разными способами, например предположив, что регулятором служит некая устойчивая, малая, быстро диффундирующая молекула, которая первоначально выделяла ось во всей ткани. В рамках волновой модели это может быть вещество, аналогичное W , связанное с первичной волной, задающей ось (следовательно, отличной от волны, которая генерирует периодически распределенный морфоген). Концентрация этого вещества в клетках ткани будет изменяться обратно пропорционально полному объему области, если предположить, что оно может диффундировать от клетки к клетке в пределах области, но не через ее границы. Если это вещество противодействует

ингибированию E_1 морфогеном, то чем меньше размер области, тем выше будет его концентрация и, следовательно, тем меньше область ингибирования источника морфогенпроизводящих волн; следовательно, максимумы концентрации морфогена будут расположены теснее. Этот тип модели в принципе аналогичен моделям, предложенным Вигглсвортом (Wigglesworth, 1959) для описания распределения щетинок насекомых, и Торнли (Thornley, 1975) для описания распределения почек листьев в фило-тактическом процессе. Отличительной особенностью предлагаемого режима является использование в качестве источников морфогена распространяющихся волн, а не стационарных центров.

Простой и изящный способ решения вопроса о получении регуляции процесса, генерирующего пространственную периодичность, предложен Зиманом (Zeeman, 1974). Он основан на введении взаимодействия между исходно существующим регуляторным монотонным градиентом во всей системе, которая должна быть поделена на повторяющиеся единицы, и появляющимися в какой-то момент глобальными колебаниями некоторой переменной в системе. Оба эти условия легко выполняются с помощью механизмов, описанных в предыдущих главах. Основное допущение в модели Зимана очень просто и состоит в том, что скорость изменения дифференцирующихся клеток есть функция среднего значения градиента внутри клетки и колеблющейся переменной. Таким образом, например, клетки, находящиеся в зоне более высокого градиента, предположительно дифференцируются быстрее, чем клетки в зоне низких значений; во время одной фазы колебаний эта скорость изменения увеличивается, а другой — уменьшается. Давайте предположим далее, что у процесса дифференцировки существует пороговая точка, определяемая критической концентрацией какого-то метаболита, который инициирует триггерное переключение состояния клетки. Такое свойство могло бы быть обусловлено кооперативностью мультимерного белка (гл. 1) или кооперативными взаимодействиями более сложного характера, рассмотренными, например, в гл. 7. Клетки, которые прошли точку переключения, предположительно дифференцируются иначе, чем непереключенные клетки. Итак, мы имеем все составные части процесса, определяющего пространственную периодичность и действующего следующим образом.

Клетки, находящиеся в зоне максимума градиента, дифференцируются быстрее, чем все остальные клетки ткани, и поэтому достигают пороговой точки первыми. Глобальные колебания в некоторой точке при этом оказываются в фазе, которая замедляет движение к порогу, и для простоты мы можем предположить, что процесс фактически останавливается. Однако это не

должно влиять на судьбу тех клеток, которые уже прошли порог. В результате некоторая группа клеток, ближайших к высшей точке градиента, пройдет пороговую точку, в то время как все другие клетки будут остановлены. Клетки, прошедшие порог, будут затем развиваться в соответствии с новым состоянием; это может быть изменение их формы, вращение, как при образовании сомитов, или усиление некоторого рода адгезивной и коммуникационной связи, которая, возможно, лежит в основе сегментации у насекомых. Когда глобальные колебания уступают в фазу, которая позволяет клеткам снова двигаться по направлению к пороговой точке, клетки, ближайшие к тем, которые уже прошли порог, будут изменяться наиболее быстро и к моменту, когда колебания еще раз остановят движение, перейдут порог. Затем эта группа клеток будет дифференцироваться аналогично первой, но, возможно, останется пространственно отличной от нее благодаря временной разнице перехода в новое состояние. Волна сегментации, таким образом, распространится вниз по системе, отрезая блоки клеток, которые проходят один и тот же процесс дифференцировки, но в разное время. Это очень похоже на то, что происходит во время сомитогенеза у позвоночных. Такой подход был бы применим к большему числу разнообразных пространственных периодических явлений, если бы существовала некая волна дифференцировки, сопровождающая процесс. Такая волна оказывается существенной чертой данной модели, отличающей ее от стоячей волны тьюринговского типа; она инициируется не источником, а распространяющейся волной, которая генерирует связанный с мембраной периодический градиент, если только волна в последнем процессе не очень медленная. Поскольку волна дифференцировки в модели Зимана связана с начальным градиентом, возмущение градиента изменит волну и пространственные периоды, генерируемые ею при взаимодействии с осциллятором. Этот факт можно использовать для разработки конкретных экспериментов по проверке модели.

Регуляция в модели Зимана имеет место в том случае, если регулируется начальный градиент в ткани, т. е. если его максимальное и минимальное значения остаются одними и теми же независимо от размеров ткани. Так как последовательные группы клеток проходят пороговую точку в соответствии со скоростью дифференцировки, которая определяется значением их градиента, то поддержание граничных значений этого градиента постоянными гарантирует образование одного и того же числа периодически повторяющихся единиц; при этом размер каждой единицы будет изменяться в соответствии с полным размером ткани. Кроме того, при условии, что скорость дифференцировки и частота глобальных колебаний одинаково зависят от факто-

ров, определяющих скорость, например от температуры, пространственная периодичность не будет затронута, даже если общая скорость изменится.

Исследования сомитогенеза у зародышей амфибий, выполненные недавно Куком (Cooke, 1975a, b) и Элсдэйлом и др. (Elsdale et al., 1976), подтвердили адекватность основных свойств этой модели генерации пространственных периодичностей. Кук наглядно показал наличие регуляции в системе образования сомитов у эмбриона *Xenopus laevis* и получил интересные данные об участии в этом процессе похожего на часы осциллятора, используя тяжелую воду, D_2O , которая приводит к образованию значительно меньшего числа сомитов по сравнению с контролем. Известно, что тяжелая вода замедляет ход биологических часов, но механизм ее действия при сомитогенезе может быть и не связан с этим эффектом. Элсдэйл и др. показали, что первичная волна изменения клеточного состояния, которая предшествует морфогенезу, может быть локально возмущена кратковременным температурным воздействием, так что несколько сомитов окажутся гистологически повреждены тепловым ударом, но волна сомитогенеза возвратится снова к той же фазе, что и в контролях, и последующие сомиты окажутся нормально расположенными и нормальными гистологически. Эти результаты показывают, что предположения о глобальном контроле регуляции скорости движения распространяющейся волны при изменении временной периодичности вполне реальны и позволяют развить крайне интересный новый подход к изучению пространственных периодичностей в развивающихся системах, что и было сделано Куком (Cooke, 1975).

Эпидермис насекомых

Перейдем теперь от рассмотрения более или менее абстрактных проблем к анализу вопросов, которые, по мнению биологов, ближе к реальности и имеют под собой более прочную экспериментальную основу, чем те, на которых базировались наши представления о пространственных периодичностях. Интересный материал для изучения морфогенетических полей дал в течение последних нескольких лет эпидермис насекомых. В нем имеются индикаторы полярности ткани, ориентацию которых можно точно определить как при нормальных условиях развития, так и при наличии какого-либо воздействия. Имеются очень интересные группы данных о нарушении эпикутиккулярных складок, вызванных авто- и гомотрансплантацией с поворотом трансплантата у *Rhodnius* (Locke, 1959, 1966), о нарушении ориентации чешуск у *Galleria* (Piepho, 1955), ориентации щетинок и волосков у *Oncopeltus* (Lawrence, 1966, 1970), пространственной

структуры клеточной дифференцировки у *Galleria* (Marcus, 1962; Stumpf, 1968) и устойчивости ориентации нитей кутикулы у жука *Tenebrio molitor* (Caveney, 1973). Такие данные достаточно достоверны, чтобы количественно проверить адекватность градиентных моделей.

Прекрасный пример такой проверки можно найти в статье Лоуренса, Крика и Манро (Lawrence, Crick, Munro, 1972), где определяется применимость двух разных моделей для объяснения характера наблюдаемых релаксационных структур, полученных Локке (Locke, 1959). Эксперимент состоит в следующем: из определенного места в данном сегменте куколки или личинки вырезают небольшой квадрат, поворачивают его на 90° и возвращают на место. Повернутый кусочек оболочки приживается и развивается вместе с организмом, и затем у взрослой особи изучаются нарушения полярности эпидермиса в повернутом кусочке и в его окружении. В этих экспериментах оболочка рассматривается как ткань с одномерной упорядоченностью, поскольку наблюдаются просто нарушения передне-задней полярности, что показывают любые полярные маркеры, которые несет ткань. У *Rhodnius* маркерами служат складчатые структуры взрослой эпикуткулы, которые в норме располагаются на ткани медио-латерально. Поворот трансплантата на 90° вносит противоречие между полярностью трансплантата и полярностью окружающей ткани, приводя к нарушению характера волнистости в трансплантате и его окрестностях. При полной релаксации складки шли бы параллельно структуре складок окружающей ткани, в то время как в отсутствие релаксации складки были бы расположены под углом 90° друг к другу. На самом деле наблюдается нечто среднее; степень релаксации зависит от момента развития, в который выполняется поворот трансплантата, а следовательно, от длительности периода, во время которого может произойти релаксация. Хотя далее мы будем проводить все рассуждения так, как если бы задача была одномерной, позже мы увидим, что в действительности это двумерная задача. Следует также иметь в виду, что эпидермис насекомых является периодической структурой, причем в продольном направлении он разделен на несколько сегментов, не совсем идентичных друг другу и возникающих в процессе развития с помощью некоторого периодического процесса, измеряющего пространство. Однако здесь мы остановимся на проблеме поля информации и возникновения полярности в пределах лишь одного сегмента.

Модели, использованные Лоуренсом и др. (Lawrence et al., 1972), были основаны на предположении о наличии в ткани пространственно распределенных источников и стоков, которые поддерживают в ней градиент диффундирующего метаболита (морфогена). Согласно первой модели, источник располагается на

передней границе сегмента, а сток — на задний, задавая линейный градиент морфогена в ткани. Поворот трансплантата или его замена в этом случае приведут к локальному нарушению градиента, который будет понижаться со скоростью, определяемой скоростью потока морфогена через ткань, т. е. константой диффузии и константами скоростей для источника и стока. Эта модель была численно рассчитана для ряда значений параметров и начальных условий; график зависимости концентраций морфогена от времени сравнивали с экспериментальными данными по определению формы контуров в центре трансплантата, что обеспечивало точное измерение степени релаксации. Было показано, что эта модель не дает хорошего согласия с экспериментом; в соответствии с ней пики и впадины структуры с нарушением должны давать большую релаксацию, чем наблюдалось экспериментально. Это означает, что трансплантат был более устойчив к релаксации, чем ожидалось на основании чисто диффузионного процесса типа рассмотренного первоначально. Это очень интересный и ценный результат.

Существует несколько способов, с помощью которых можно изменить систему, чтобы сделать ее «жестче» в смысле противодействия диффузионному расплыванию. Лоуренс и др. (Lawrence et al., 1972) предположили, что каждая клетка в ткани действует как гомеостат, стремясь поддерживать внутри себя данный уровень морфогена. Как этот уровень должен определяться, не указывается, но предполагается, что во время процесса развития вплоть до образования наружного покрова клетки оказываются «запрограммированными» (вероятно, с помощью предшествующего поля позиционной информации) и поддерживают концентрацию морфогена на заданном уровне согласно их положению в поле. Тогда каждая клетка становится источником или стоком. Эти распределенные источники и стоки наряду с диффузией создают градиент морфогена в ткани. «Жесткость» системы в смысле противодействия диффузионной релаксации определяется тогда способностью гомеостата сохранять уровень морфогена, несмотря на действие диффузионных сил, вызывающих его повышение или понижение. Было показано, что при некоторых значениях параметров эта модель очень хорошо соответствует экспериментальным данным.

Для объяснения других фактов было введено еще одно предположение. Оно основывалось на данных о том, что если у насекомого затягивали линьку на какое-то время сверх нормального, то нарушенная структура в трансплантате релаксировала даже быстрее. По-видимому, между числом линек, имевших место в промежутке времени от пересаживания трансплантата до наблюдения, и степенью релаксации структуры существует определенная корреляция. Так как цикл линьки включает клеточное

деление, то можно предположить, что релаксация складчатой структуры коррелирует с некоторыми характеристиками клеточного цикла; возможно, например, что клетки восстанавливают свой гомеостаз, «считывая» информацию поля (уровень морфогена в их непосредственной близости) на некоторой стадии клеточного цикла. Эта особенность напоминает постулат квантующего митоза, рассмотренный в гл. 3. Введя это свойство в свою модель, Лоуренс и др. получили хорошее соответствие с характером релаксации, наблюдаемой после ряда линек.

Численный анализ конкретной градиентной модели поля информации в развивающейся ткани представляет значительную ценность, особенно в том плане, что он обращает наше внимание на необходимость объяснения «жесткости» ткани, т. е. ее способности сохранять градиент после поворота, и на роль клеточного цикла в процессах релаксации. Эти особенности в дальнейшем были изучены экспериментально Кэйвини (Cavey, 1973) на *Tenebrio molitor*. Он четко показал, что с процессом релаксации коррелирует само клеточное деление. Кроме того, оказалось, что в повернутых трансплантатах у насекомых характер релаксации в передних областях заметно отличался от такового в задних областях; отсюда следует, что некоторые составляющие процесса являются нелинейными — вывод, к которому ранее пришел Локке (Locke, 1959), изучая трансплантаты у *Rhodnius*, повернутые на 180°, которые также обладают передне-задней асимметрией. Для объяснения этих данных в модель Лоуренса, Крика и Манро необходимо ввести предположение о независимости размещения источников и стоков.

Предположение о том, что градиент в ткани поддерживается клетками, действующими как гомеостаты, требует, чтобы клетки могли переключать устройства, регулирующие внутренний метаболизм, в любое из нескольких (скажем, пяти) различных состояний. При обсуждении вопросов клеточной регуляции по типу обратной связи в предыдущих главах мы не сталкивались с такой мультистабильностью (т. е. свойством системы обладать несколькими устойчивыми стационарными состояниями), и ее не так-то просто получить, когда клетки находятся в колебательном состоянии, даже предполагая сложное аллостерическое поведение. Мультистабильность, несомненно, характерна для развивающихся систем, но я не знаю экспериментальных указаний на то, что таким свойством обладают какие-либо молекулы в отдельной клетке¹. Требование, чтобы источники и стоки могли образовываться независимо друг от друга, вводит в модель

¹ Примером мультистабильности является поведение одиночных каналов, образуемых антибиотиками в бислойной фосфолипидной мембране. — *Прим. ред.*

еще один уровень сложности. Кроме того, данные Кэйвини (Cavey, 1973) по клеточному делению вновь показывают, что органеллой, определяющей локальную полярность и играющей большую роль в общих процессах релаксации, является мембрана. Конечно, можно было бы допустить, что мембраны участвуют в гомеостазе и в определении полярности, но это значило бы ввести предположение *ad hoc*. Таким образом, интересно посмотреть, могут ли принципы, лежащие в основе волновой модели, использоваться для объяснения данных, полученных на эпидермисе насекомых, и можно ли распространить этот подход на другие системы.

Мембрана и эпидермис насекомых

При описании волновой модели в предыдущей главе мы предположили, что центры связывания метаболита V на мембране простые, т.е. что на молекулу белка приходится один центр. Однако вполне возможно, что связывающий белок — это мультимер с n центрами и что кинетика связывания носит кооперативный характер. В этом случае зависимость между X , концентрацией свободного V , и количеством связанного метаболита Y графически будет изображаться кривой, представленной на рис. 6.1, которая похожа на кривую рис. 1.8. Теперь градиент, возникающий в соответствии с волновой моделью, вообще говоря, нелинеен, а если функция связывания имеет характеристики, определяемые кооперативной кинетикой, то градиент, конечно, будет совсем далек от линейного. В общем случае он имеет форму, изображенную на рис. 6.2. Можно предположить, что именно таков градиент морфогена у сегмента развивающейся оболочки в тот момент, когда осуществляется поворот трансплантата. Предположим, что волновая активность остановлена на стадии, ответственной за генерацию градиентов в пределах сегментов, путем периодической модификации волновой модели. Тогда поворот трансплантата будет сопровождаться нарушениями клеточных мембран во время вырезания и заживления; в результате некоторое количество V перейдет из связанного состояния в свободное, что приведет к увеличению X . В ходе локальной диффузии часть его снова свяжется с незанятыми центрами мембранного белка. Во время цикла линьки мембранные белки в процессе деления разрушатся, выделится некоторое количество V и опять произойдет связывание его незанятыми центрами, что приведет к релаксации.

«Жесткость» модели, соответствующая наличию у клеток гомеостатических свойств в модели Лоуренса и др. (Lawrence et al., 1972), обусловлена нелинейным кооперативным связыванием мультимерных белков в мембране, которая работает как

некая запасающая система, противодействующая диффузионному релаксационному процессу. В то же время нелинейности этой модели объясняют, что по той же самой причине существует асимметрия релаксации, отмеченная Локке (Locke, 1959) и Кэйвини (Caveney, 1973). Соответствие между этими моделями и экспериментальными данными исследуется в настоящее время с помощью численного моделирования.

Полученные в последнее время экспериментальные данные (Bohn, 1974; Lawrence, 1974; Nübler-Jung, 1974) заставляют нас пересмотреть большинство представлений о поле информации, обсуждавшихся до сих пор в связи с эпидермисом насекомых. Было показано, что релаксация возмущенных структур в экспериментах с поворотом трансплантата может повлечь за собой не просто изменение значения поля информации для клеток, но и истинное движение эпидермальных клеток к новым позициям

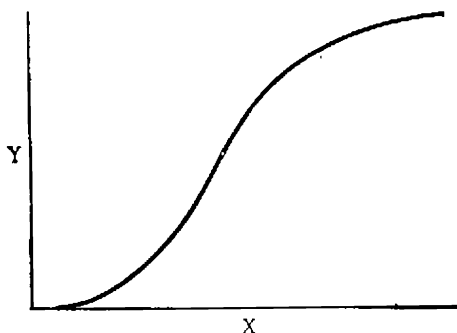


Рис. 6.1. Зависимость между концентрациями диффундирующего метаболита (X) и связанного морфогена (Y) в волновой модели в случае, когда связывающий белок является мультимером с кооперативной кинетикой.

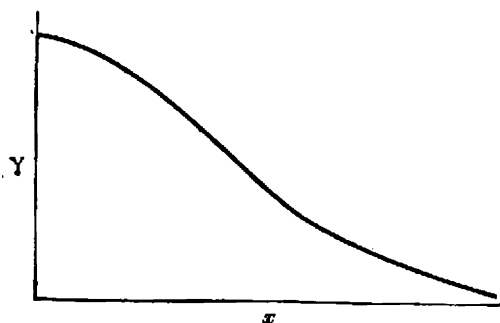


Рис. 6.2. Концентрация морфогена Y как функция расстояния x согласно волновой модели.

в поле хозяина. Более того, эти упорядоченные движения двумерны, так что клетки, возможно, имеют две информационные оси, вдоль которых они движутся, отыскивая «правильные» позиции относительно своих соседей. До сих пор мы рассматривали только одномерную задачу, так как антерио-постериальное направление есть главная полярная ось оболочки, хотя ясно, что с таким же успехом у нее может быть и медио-латеральная ось организации. Однако эти новые данные требуют представления новых аргументов в дополнение к приведенным выше, чтобы рассматривать клеточное движение как аспект процесса релаксации. Как это можно сделать, мы обсудим позже, когда перейдем к картированию сетчатки в зрительной системе, где рост и движение клеточного волокна оказываются основными чертами процесса развития. Но, прежде чем переходить к этой проблеме, рассмотрим морфогенетический процесс, который, по видимому, протекает с помощью механизмов, весьма далеких от рассматриваемых до сих пор морфаллактических по своей сути механизмов, когда морфогенез практически не сопровождался ростом развивающейся системы. Там, где рост является существенной особенностью процесса, для описания морфогенетической трансформации был введен термин эпиморфоз. Рассмотрим пример такого процесса.

Эпиморфоз: крыло цыпленка

Развитие крыла цыпленка начинается с появления на боковой стороне эмбриона «языка» ткани, вырастающего в плавникообразную почку конечности, которая вытягивается и постепенно превращается в характерную суставчатую структуру крыла. Сондерс (Saunders, 1948) показал, что скелетные компоненты дифференцируются в проксимально-дистальной последовательности; он также установил значение апикального эктодермального гребня в этом временном морфогенетическом процессе. С помощью определения митотического индекса и включения ^3H -тимидина (Summerbell, Lewis, 1975) было показано, что между этой самой дистальной полоской эктодермы и лежащей под ней недифференцированной мезенхимой существует определенное взаимодействие (Zwilling, 1961). Оно имеет место почти до стадии 28, когда все элементы крыла уже заложены. Эта активно делящаяся мезенхимальная область размером около 300 мкм была названа Саммербелом, Льюисом и Волпертом (Summerbell, Lewis, Wolpert, 1973) зоной развития. Авторы построили простую модель для объяснения результатов проведенных ими детальных наблюдений за последствиями удаления апикального гребня и зоны развития в различные моменты дифференцировки конечности и за последствиями трансплантаций

отдельных участков крыльев цыпленка, взятых на разных стадиях развития (Wolpert, Lewis, Summerbell, 1975). Сущность их гипотезы состоит в том, что положение клетки определяет ее способность к дифференцировке, которая постепенно изменяется во времени до тех пор, пока клетка находится в зоне развития, но, как только клетка покидает эту зону, ее способность к дифференцировке быстро фиксируется или детерминируется. Поскольку между временем пребывания в зоне развития и полным числом циклов деления, которое испытывает клетка, существует корреляция, естественно объяснить изменение состояния клетки на основе представлений типа гипотезы квантующего митоза, что и сделали Волперт и др. (Wolpert et al., 1975). Эту гипотезу необходимо видоизменить так, чтобы совместить данные, описанные в гл. 3, с представлениями Хольцера о митозе и клеточной дифференцировке. Нужно также иметь в виду, что клеточные деления происходят в развивающемся крыле цыпленка и вне зоны развития и дифференциальный рост является важным аспектом морфогенеза конечности. Таким образом, при анализе нужна некоторая осторожность, чтобы не слишком упростить связи между клеточным циклом и состоянием клеток в конечности цыпленка.

Поскольку зона развития перемещается от боковой стороны эмбриона, оставляя после себя «след» клеток, которые по мере увеличения расстояния от боковой поверхности претерпевают постепенно все большее число клеточных делений в зоне развития, ясно, что модель дает проксимально-дистальную упорядоченность клеточных состояний, которая определяет ось «позиционной информации» вдоль конечности. Никакие градиенты диффундирующего вещества в таком процессе не участвуют, клетки просто «запоминают» свое состояние в момент, когда они покидают зону развития, с помощью некоторого детерминирующего процесса. Трудность, с которой мы сталкиваемся при построении этой модели, связана с тем, что элементы конечности цыпленка обладают некоторой регулирующей способностью, тогда как в соответствии с моделью, если клетки становятся детерминированными в тот момент, когда они оставляют зону развития, их дальнейшая судьба считается четко определенной. Волперт и др. (Wolpert et al., 1975) учли это, отметив, что, вероятно, между клетками вне зоны развития имеется слабое взаимодействие, обеспечивающее локальную регуляцию, однако возможность существования значительной регуляции авторы отрицают, хотя на это указывают результаты исследований Хэмпэ (Hampé, 1959) и Кайни (Kieny, 1964).

Передне-задняя ось крыла цыпленка определяется областью клеток в задней части дистальной почки конечности, известной как зона поляризующей активности (Saunders, Gosseling, 1968).

Если клетки из этой области пересадить ближе к передней части почки, то элементы конечности окажутся зеркально-симметричными. Таким образом, клетки этой зоны можно рассматривать как источник вещества, диффузия которого, согласно Волперту и др. (Wolpert et al., 1975), приводит к установлению градиента; направление этого градиента определяет передне-заднюю ось, а значение — локальную позиционную информацию. Тогда в крыле цыпленка имеется два совершенно разных морфогенетических механизма: механизм эпиморфоза, вызывающий рост совместно со считающим механизмом для создания проксимально-дистальной оси, и обычный процесс диффузии от источника к стоку для морфаллаксиса вдоль передне-задней оси. Относительно дорсо-вентральной оси почти ничего не известно.

Возникает естественный вопрос: можно ли описать эти явно разные типы морфогенетического процесса в рамках модели одного типа. Конечно, совсем не обязательно принимать такую точку зрения, даже если в ее пользу есть данные, но в плане простоты и универсальности она очень привлекательна. К тому же, приняв модель, одинаково хорошо применимую к обоим типам морфогенеза, мы приходим к идейной ясности и общности, поскольку суть такого понятия, как позиционная информация в пределах поля, границы которого постоянно меняются, не совсем ясна. Имеет смысл ввести несколько более динамичную и гибкую связь между процессом генерации поля и упорядочиваемой областью, а это, как мне кажется, обеспечивается основными принципами волновой модели, рассмотренной в предыдущей главе. Применим теперь эту модель к описанию возникновения проксимально-дистальной оси в крыле цыпленка.

Волновая модель и эпиморфоз

Поскольку зона развития играет особую роль в морфогенезе конечности, естественно расположить источник распространяющейся волны активности именно в этой области развивающейся конечности. Тогда волна будет распространяться в направлении от дистального конца к проксимальному, причем ионные и низкомолекулярные элементы волны через зону щелевого контакта будут перемещаться от клетки к клетке и установится градиент связанного морфогена с максимальным значением в зоне развития. Направление градиента в этом случае противоположно получаемому из модели Волперта и др., но это несущественно, так как ось возникает при градиенте, имеющем любое направление. Для того чтобы значение концентрации морфогена в зоне развития росло со временем, измеряемым клеточными делениями, мы можем предположить, что волна инициируется

один раз за клеточный цикл (или с некоторой определенной частотой), так что с каждым последующим ее повторением количество связанного с мембраной морфогена увеличивается. В конце концов наступает насыщение, значение которого, как считается, определяет большинство дистальных элементов крыла.

Чтобы объяснить, почему концентрация морфогена в клетках, которые покинули зону развития, перестает возрастать, можно предположить, что возбудимость мембраны клеток, расположенных вне этой зоны, падает, поэтому волна не распространяется дальше некоторого определенного расстояния. Тогда роль апикального эктодермального гребня заключается в том, чтобы поддерживать основные клетки мезенхимы, расположенные под ним, в состоянии непрерывного клеточного деления, а их мембраны — в состоянии способности к возбуждению при распространении волны активности, т. е. поддерживать состояние высокой неустойчивости и активности, характерное для области организатора. Теперь мы имеем все основные компоненты модели, которая обладает необходимыми свойствами для объяснения явлений, связанных с образованием проксимально-дистальной оси в крыле цыпленка. Любые уровни регуляции можно объяснить, исходя из понятий возбудимости клеток и расстояния, на которое может распространиться волна. Например, если в результате пересадки почки конечности на место ампутированной конечности клетки во время процесса заживления станут возбудимыми, так что волны смогут распространяться вне зоны развития дальше нормальных пределов, то произойдет сглаживание градиента и начнется регуляция развития.

Адекватность модели можно проверить экспериментально. При киносъемке развивающейся почки крыла удастся обнаружить появление волн активности. Если периодически вводить в определенные участки почки конечности специфическое соединение, например цАМФ, который участвует в образовании градиента, можно нарушить нормальный морфогенез. Такие опыты аналогичны импульсным экспериментам Робертсона и др. (Robertson et al., 1972) по агрегации миксомицетов. Применяя другие агенты, такие, как калиевые и кальциевые ионофоры, можно помешать процессу распространения волны и избирательно нарушить морфогенез. Несмотря на ряд технических трудностей, можно провести интересные электрофизиологические исследования, чтобы попытаться зарегистрировать волны спонтанной активности.

Образование второй оси с помощью процесса распространения волн не сложнее, чем первой. Необходимо только иметь область пейсмекера, образованную в случае передне-задней оси крыла цыпленка зоной поляризующей активности, и метаболиты

ческий процесс на мембране с такими же общими характеристиками, как описанные в предыдущей главе. Некоторые метаболиты могут оказаться общими для разных волн активности, генерирующих разные оси; в этом случае удастся определить структуру взаимодействия между осями. Несколько подробнее мы обсудим эти вопросы ниже, при рассмотрении проблем нейробиологии. Здесь же достаточно отметить, что видимые различия между эпиморфическими и морфаллактическими процессами развития не обязательно скрывают под собой разную природу процесса, генерирующего поле, и что волновая модель может быть легко приспособлена к любому случаю.

Теперь позвольте мне напомнить замечание, сделанное в гл. 3, о противоположности механизмов, предложенных в этой книге для образования морфогенетических полей во время морфогенеза, механизмам, поддерживающим тканевой гомеостаз у взрослых. В последнем случае речь шла о механизме, в основе которого лежала отрицательная обратная связь, обусловленная диффузией управляющих молекул из дифференцирующихся клеток (ксилонная модель). Стремясь понять образование морфогенетического поля у самых разных организмов, мы пришли в предыдущей главе к выводу, что для этого необходима несколько более динамичная модель, вероятно связанная с мембранами и поэтому применимая и к одноклеточным, и к многоклеточным организмам. Легко понять существование обоих этих процессов у многоклеточных, где управление клеточным делением является крайне важной особенностью органогенеза и дифференцировки. Они действуют в каком-то смысле комплементарно друг другу, причем волновой процесс генерирует глобальные градиенты, организующие ширококомасштабные или полевые аспекты морфогенеза, в то время как локальная обратная связь стабилизирует структуру ткани, регулируя процессы клеточного деления и дифференцировки. Один процесс может постепенно уступать место другому, причем исчезновение процесса, генерирующего глобальные градиенты, возможно, приведет к потере возбудимости клеток и, следовательно, потере способности к распространению волны активности. Способность ткани или органа к регенерации определяется в этом случае деталями их регенеративной стратегии. Разница между крысой и тритоном в отношении регенерации конечности может быть обусловлена различиями в возбудимости клеток ампутированной конечности и их способности генерировать морфогенетическое поле в новой ткани. В связи со сказанным выше очень интересными представляются выполненные Бекером (Becker, 1972) исследования способности слабых электрических токов стимулировать образование почки и частичную регенерацию конечности у крыс. Однако, по-видимому, бывают случаи, когда регенерация конеч-

ности определяется практически только закономерностями локального взаимодействия между клетками, т.е. старая ткань определяет граничные значения поля, которое должно быть реконструировано при росте новой ткани; это может осуществляться почти таким же образом, как и в предложенной модели регенерации кожи. Но конечность имеет трехмерную упорядоченность, а кожа только одномерную, поэтому необходимо рассмотреть, каким образом может образовываться эта более сложная организация.

Локальная и глобальная упорядоченность: имагинальный диск и конечность таракана

В качестве примера развивающейся системы рассмотрим конечность насекомого. Эмбриологически она происходит из имагинального диска конечности, который образуется в поздней эмбриональной или ранней личиночной стадии в результате утолщения эпидермиса. У личинки имагинальные диски конечностей и других органов в результате деления клеток растут и инвагинируют, принимая у зрелой личинки характерную мешкообразную форму. В ходе метаморфоза складчатый эпителий диска разворачивается и клетки изменяют форму, дифференцируясь в компоненты взрослой структуры, в случае конечности — в сегментированный отросток.

Если взять вырезанный из личинки имагинальный диск, разрезать его на две части и кусочки приживить к брюшку взрослого насекомого, то один кусочек будет регенерировать так, что в ответ на индукцию дифференцировки при метаморфозе хозяина даст образование всех структур нормального отростка, в то время как другой после дифференцировки удвоится и даст зеркальное подобие самого себя. Подробные исследования этого свойства диска конечности, проведенные Шубигером (Schubiger, 1971), и диска крыла — Брайантом (Bryant, 1975a), выявили все типы поведения, которое можно ожидать от любого кусочка диска. Брайант (Bryant, 1971, 1975b) объяснял эти данные, исходя из представлений о существовании одномерного градиента способности к развитию, но, как отмечалось Френчем, Брайантом и Брайантом (French, Bryant, Bryant, 1976), при анализе структурной регуляции имагинального диска крыла *Drosophila* и конечностей таракана и амфибии этот подход не может объяснить некоторых результатов. Это ясно видно из анализа рис. 6.3. На нем изображен диск крыла *Drosophila*; *C* — точка, которая, как установил Брайант (Bryant, 1975a), обладает в каком-то смысле максимальной способностью к дифференцировке, так как если диск разрезать на две части по любой прямой, скажем ①, то кусочек, на котором находится точка *C*,

будет регенерировать, а другая часть — удваиваться. Однако если разрез сделать по кривой ②, то получившиеся два кусочка будут вести себя не так, как предсказывает модель: верхняя часть будет регенерировать, а нижняя, с точкой *C*, удваиваться. Формальная модель, объясняющая этот факт, предложена в статье Френча, Брайанта и Брайанта (French, Bryant, Bryant 1976). Авторы считают, что диск пространственно организован в соответствии с полярной системой координат; полюс ее находится в точке *C*, а остальные участки диска организованы по контуру в соответствии со значением угловой переменной, которая меняется вдоль этого контура от 1 до 12, как на циферблате. При этом принимается, что $12 = 0$, и, следовательно, разрыва значений этой переменной в начале координат не существует. Теперь легко выявить правила, управляющие поведением кусочков диска. Где бы ни был сделан разрез, поверхности разреза соединяются вместе (в соответствии с экспериментальными данными) и вдоль линии объединения происходят клеточные деления. Новым клеткам будут соответствовать значения угловой переменной, равные средним арифметическим переменных их соседей, вычисленные по следующему правилу: эти значения равны недостающим значениям, замыкающим контур самым коротким из всех возможных путей. Таким образом, участки 2 и 10 кусочка, лежащего выше линии разреза ① на рис. 6.3, войдут в соприкосновение после соединения вдоль линии разреза, и между этими значениями будет происходить рост до тех пор, пока не будет восстановлен ряд значений угловой координаты — 11, 12/0, 1. Это, очевидно, приведет к удвоению. Другой кусочек будет регенерировать, так как самый короткий путь по контуру между значениями 10 и 2 на линии разреза есть 11, 12/0, 1, а не 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3. Таким образом, восстановится полный набор значений угловой переменной и образуется нормальная структура. Значения поля, которые принимают клетки, расположенные внутри области, усредняются по тому же правилу, как и в рассмотренном случае угловых переменных, только применительно к радиальным переменным. В результате всегда получается гладкая двумерная карта ткани, но

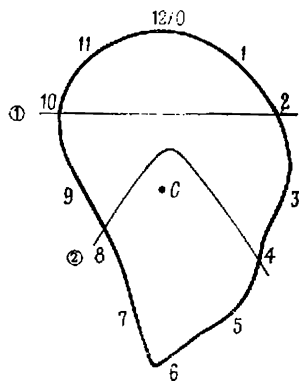


Рис. 6.3. Схематическое представление имагинального диска крыла *Drosophila* со значениями угловой координаты, введенными Френчем и др. (French et al., 1976) для объяснения результатов экспериментов по регенерации и удвоению.

в случаях удвоения карта вырождается, так как две разные точки имеют одинаковые значения угловой координаты и зеркально симметричны относительно некоторой линии.

Если разрез сделан вдоль кривой ②, то, согласно установленным выше правилам, кусочек, лежащий выше разреза, регенерирует, а ниже — удвоится, что согласуется с экспериментом. Френч и Булльер (French, Bullière, 1975a, b) показали, что эти правила определяют регенеративное поведение конечности таракана при самых разнообразных способах разрезания, при трансплантации и повороте трансплантата. Это чрезвычайно убедительный результат. Тем самым мы имеем простой и ясный метод, с помощью которого можно предсказать результат любой операции на конечности таракана, включающей простые хирургические манипуляции. Этому типу операций посвящено большое число работ в области эмбриологии, и очень интересно посмотреть, как широко можно пользоваться одной-единственной формальной моделью этого класса. Первый шаг в этом направлении — данные Френча и др. (French et al., 1976) о том, что правила, применимые к конечности таракана, применимы также к имагинальным дискам *Drosophila*. Однако нас сейчас интересует вопрос о том, какой морфогенетический процесс, генерирующий поле, может привести к периферической организации, характерной для полярной системы координат (рис. 6.3), и объяснить правила роста, усреднения и установления кратчайшего пути по контуру, которые так изящно описывают экспериментальные данные. Попытаемся решить этот интересный вопрос.

На рис. 6.4, А схематически представлен контур поперечного сечения развивающейся структуры, такой, как имагинальный диск, конечность таракана или конечность амфибии. Для облегчения сравнения со схемой Френча и др. (French et al., 1976) изображено двенадцать координатных позиций, но теперь каждой из них приписана пара значений поля $f_{\text{Ⓢ}}$ и $g_{\text{Ⓢ}}$, где индекс относится к значению координаты. Значения поля $f_{\text{Ⓢ}}$ образуют градиент вдоль дорсо-вентральной оси, симметричный относительно передне-задней оси, в то время как значения $g_{\text{Ⓢ}}$ образуют передне-задний градиент другого вещества или активности с дорсо-вентральной симметрией. Такая система двойного градиента находится в согласии с большинством классических работ, показывающих, что передне-задняя и дорсо-вентральная оси закладываются отдельно, в разные моменты развития конечностей. Такая же ситуация имеет место и в других тканях, например сетчатке, о чем речь пойдет позже. Трудность работы с такой схемой состоит в том, что насколько легко объяснить, как должны восстанавливаться недостающие значения (скажем,

между 1 и 5) с помощью процесса усреднения, который продолжается до тех пор, пока все отсутствующие значения не будут восстановлены, настолько же не ясно, каким образом регенерировать точку экстремума (1 или 7), если она удалена. Такие экстремумы подобны граничным значениям, и до сих пор нет ни одной модели, которая давала бы одновременно и рецепт

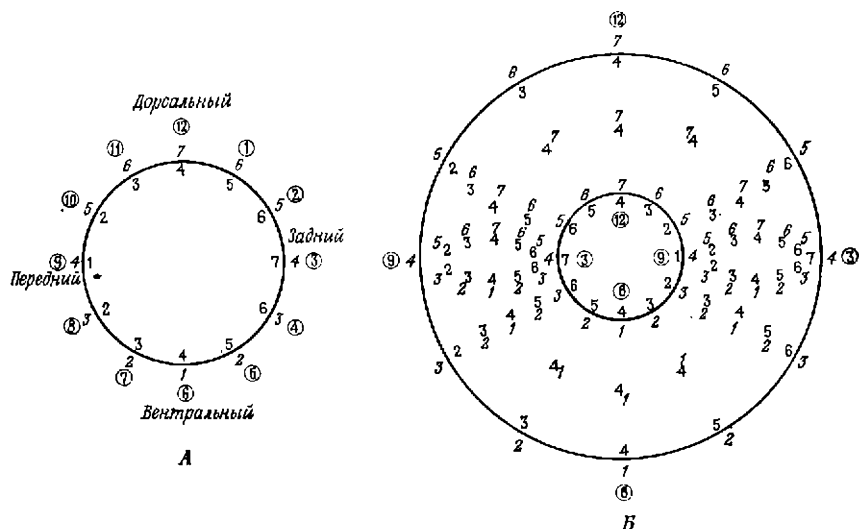


Рис. 6.4. А Схематическое изображение поля угловых координат для конечности, где дорсо-вентральный градиент значений поля $f_{\text{дв}}$ изображен курсивом по внешней стороне окружности, а передне-задний градиент $g_{\text{пз}}$ — обычными числами внутри окружности. Б. Равновесное поле, получающееся в результате применения правил генерации, описанных в тексте, к случаю приживления трансплантата правой конечности (внутренняя окружность) на культю левой (внешняя окружность); показаны позиции и ориентации лишних конечностей.

восстановления граничных значений, и возникновение усредненных промежуточных значений поля. Однако совершенно ясно, что, пока мы не в состоянии объяснить эти два процесса, мы не можем считать, что построили модель, описывающую динамику поля развития. Сформулируем простые правила, которые дают такое поведение. Мы определили их в результате исследований, выполненных совместно с д-ром Каммингсом и д-ром Протеро. Полное рассмотрение этого обобщенного полевого подхода, дающего правила получения граничных значений и определения внутренних значений поля для целого ряда процессов, которые формируют структуры (включая регенерацию гидроидов, сомитогенез, образование структуры пера, филлотаксис и регене-

рацию конечности), находится в процессе подготовки к публикации.

Рассмотрим вначале процесс интеркалярного роста, т.е. появление новой ткани, когда соединяются две отрезанные поверхности с разными значениями поля. Суть этого процесса на языке полевых чисел рис. 6.4, А состоит в том, что всякий раз, когда при разрыве поля наклон набора значений поля получается больше 1, начинается рост. (Наклон поля f в координатной позиции n определяется как

$$Df_{\oplus} = \frac{f_{n+1} - f_{n-1}}{2};$$

подобное же соотношение имеет место и для g . Координаты пронумерованы от 1 до 12.) Значения поля присваиваются новой ткани в соответствии со следующими правилами (смысл их вскоре станет очевидным).

1. Если $Df_{\oplus} \geq 1$, то новое значение поля в координатной позиции n равно

$$f'_{\oplus} = f_{\oplus} - C(f_{\oplus} - \bar{f}_{\oplus}), \quad (6.2)$$

где C — константа, $\bar{f}_{\oplus}$ — среднее по пространству, т.е.

$$\frac{f_{n-1} + f_{n+1}}{2}.$$

2. Если $Df_{\oplus} < 1$, то

$$f'_{\oplus} = f_{\oplus} + K(f_{\oplus} - 4), \quad (6.3)$$

где K — константа. Отсюда получается, что если $f_{\oplus} > 4$, то $f'_{\oplus} > f_{\oplus}$, а если $f_{\oplus} < 4$, то $f'_{\oplus} < f_{\oplus}$. Таким образом, значения поля постепенно расходятся до тех пор, пока не будет достигнут либо максимум (7), либо минимум (1). Аналогичные правила применяются и к другому параметру, g . Следовательно, наклон определяет, какое значение поля примет новая ткань — в соответствии с правилом дивергенции, дающим экстремум, или с правилом усреднения. Образно говоря, эти правила означают, что клеткам «нравится» находиться в морфогенетическом поле с наклоном 1, что ведет к уменьшению наклона, если он больше 1, и к увеличению, если он меньше. Число 4 в выражении (6.3) — постоянный параметр, заданный генетически.

Посмотрим, как эти правила объясняют результаты различных операций. Предположим, что значения поля старой ткани остаются неизменными. Пусть разрез, делящий структуру на две части, сделан между координатными позициями ⑥, ⑦ и ⑨, ⑩. Рассмотрим вначале меньшую часть; мы видим, что значения поля (2, 3 и 4,1) сведены вместе на поверхности раз-

дела. Наклоны при этом больше 1, поэтому для присвоения значений поля новой ткани используется усреднение (6.2). Приняв для удобства $C=1$, мы получим, что новые значения поля равны

$$\frac{1}{2}(f_{\textcircled{7}} + f_{\textcircled{9}}) = \frac{1}{2}(2 + 4) = 3$$

$$\frac{1}{2}(g_{\textcircled{7}} + g_{\textcircled{9}}) = \frac{1}{2}(3 + 1) = 2$$

Эти значения устойчивы, поэтому в результате операции меньшая часть удвоится, что и наблюдается в эксперименте.

В большей части ткани наложатся значения поля (1, 4) и (5, 2). Тогда произойдет рост, и новой ткани в позиции $\textcircled{8}$ будут приписаны путем усреднения значения поля (3, 3). Наклон в f между новой и старой тканью все еще больше 1, поэтому происходит дальнейший рост и продолжается усреднение. Новые значения поля в позициях $\textcircled{7}$ и $\textcircled{9}$ равны

$$f_{\textcircled{7}} = \frac{1}{2}(f_{\textcircled{9}} + f_{\textcircled{8}}) = \frac{1}{2}(1 + 3) = 2$$

$$f_{\textcircled{9}} = \frac{1}{2}(f_{\textcircled{8}} + f_{\textcircled{10}}) = \frac{1}{2}(3 + 5) = 4.$$

При восстановлении это дает ряд 2, 3, 4, который устойчив. Значения другой переменной равны

$$g_{\textcircled{7}} = \frac{1}{2}(g_{\textcircled{9}} + g_{\textcircled{8}}) = \frac{1}{2}(4 + 3) = 3,5$$

$$g_{\textcircled{9}} = \frac{1}{2}(g_{\textcircled{8}} + g_{\textcircled{10}}) = \frac{1}{2}(3 + 2) = 2,5$$

Здесь образуется ряд 2,5; 3; 3,5, наклон которого меньше 1 в каждой позиции, поэтому необходимо воспользоваться моделью дивергенции (6.3). Приняв $K=1$, мы получим

$$g'_{\textcircled{7}} = 3,5 + (3,5 - 4) = 3$$

$$g'_{\textcircled{8}} = 3,0 + (3,0 - 4) = 2$$

$$g'_{\textcircled{9}} = 2,5 + (2,5 - 4) = 1$$

Теперь это тоже устойчивый ряд, и в результате мы имеем восстановление недостающих значений большей части, что и требуется. На этом примере видно, как дивергентная модель дает экстремум (в данном случае минимум). Если бы при разрезе

удалился максимум, он был бы восстановлен с помощью того же правила.

Рассмотрим следующий тип эксперимента по трансплантации, который приводит к образованию лишних конечностей. Предсказав результаты этих опытов, мы получим веские доводы в пользу адекватности схемы, разработанной Френчем и др. Если регенерируемую почку конечности амфибии или таракана пересадить на место ампутированной конечности, расположенной с противоположной стороны, так что дорсо-вентральные оси при этом совместятся, а передне-задние окажутся противоположно направленными, то получится трансплантат, из которого разовьются две лишние конечности с той же самой передне-задней полярностью, что и у культи. Эта ситуация схематически показана на рис. 6.4, Б, где наружный круг изображает культи, а внутренний — трансплантат. Как было показано, применение правил образования значений поля дает числовые ряды, приводящие к требуемым результатам, так как предполагается, что, где бы ни возник законченный периферический ряд значений поля, в этом месте образуется новая конечность. Например, между координатной позицией культи ② и позицией трансплантата ⑩ значения поля (5, 6) и (5, 2) соприкасаются друг с другом. Различие между 6 и 2 приводит к интеркалярному росту и задает значения поля новой ткани в соответствии с правилом усреднения, в результате чего образуется устойчивый ряд 6, 5, 4, 3, 2. Другая пара значений поля равна (5, 5) с наклоном, меньшим 1, поэтому используется правило дивергенции и получается ряд 5, 6, 7, 6, 5, дающий максимум. Это справедливо для всех рядов значений поля $f_{\text{в}}$ в верхней половине трансплантата, в то время как в нижней половине повсюду получается другое экстремальное значение, 1. В точках, где совмещены значения поля (4, 4), равновесие неустойчиво, поскольку новые значения поля равны старым:

$$f'_{\text{в}} = 4 + (4 - 4) = 4,$$

однако любое сколь угодно малое возмущение этих значений в сторону увеличения приведет к дивергенции к 7, а в сторону уменьшения — к 1. Поскольку ткань выше горизонтали движется к 7, то естественно предположить, что это возмущает смежную область ткани и образуется ряд 4, 5, 6, 7, 6, 5, 4; ниже горизонтали происходит дивергенция в противоположном направлении, давая ряд 4, 3, 2, 1, 2, 3, 4. Так образуются периферические последовательности, дающие избыточное число конечностей.

Применяя эти правила к другим типам трансплантации, нужно помнить о возможности получения артефактов; это может

быть связано с грубостью числовых рядов и некорректным выбором параметров, таких, как C и K в выражениях (6.2) и (6.3), которые мы считали равными 1 просто для наглядности. В действительности значения поля, естественно, будут более непрерывными, т. е., оперируя числами от 1 до 70, мы получили бы гораздо более правдоподобный результат, чем с числами от 1 до 7; параметры же должны выбираться, исходя из экспериментальных данных.

Некоторые свойства схемы, описанной в общих чертах выше, стоит обсудить отдельно. Система двойного градиента представляется довольно очевидным способом упорядочения периферического поля и поэтому является общепризнанным решением проблемы. Однако, чтобы воспроизвести экспериментальные данные, необходимо ввести правила, с помощью которых образуются экстремальные значения поля. Они требуют физиологической интерпретации. Переключение с дивергентного на конвергентное (усредняющее) поведение в ответ на изменение наклона поля можно представить себе как мембранозависимый процесс, включающий фазовый переход между состояниями возбудимости и невозбудимости, такого типа, как рассмотренный в следующей главе, в связи с мембранной волновой моделью, приводящей к режиму генерации градиента или режиму усреднения соответственно. Неясна также природа процесса, измеряющего наклон поля, но вполне возможно, что протыпывание ближайших клеточных поверхностей с помощью филоподий приводит к появлению сил, действующих как переключатели. Хотя предложенные правила генерации никоим образом не единственны, кажется очевидным, что в организации периферического поля обязательно участвуют какие-то процессы переключения дивергенция/конвергенция, связанные с клеточной поверхностью. Понимание принципиальной основы поведения позволяет нам сосредоточиться на выяснении природы физиологических процессов на клеточном уровне.

Из этих примеров ясно, что необходимо проводить четкое различие между понятиями «значение координаты», обозначающим позицию в ткани согласно некоторой удобной схеме, и «значение поля», связанным с состоянием клетки или слоя клеток. Первое устанавливается по договоренности, а последнее изменяется согласно определенным правилам или динамическим ограничениям. Использование термина «позиционное значение» путает их и приводит к двусмысленности.

Интересно отметить, что усредняющее выражение (6.2) представляет собой дискретный вариант уравнения

$$\frac{\partial V}{\partial t} = \nabla^2 V(x, t),$$

стационарные решения которого есть решения уравнения Лапласа

$$\nabla^2 V(x) = 0,$$

где $V(x)$ — значение поля в позиции x . Таким образом, мы, имея дело с полем, сталкиваемся с тем же типом поведения, что и в случае простого диффузионного процесса. Однако совсем не обязательно рассматривать лежащие в основе процесса механизмы как механизмы химической диффузии. При этом мы освобождаемся от ограничения, связанного с представлением полей развития в терминах схем, включающих химические превращения и диффузию, что приводит к значительному упрощению аналитического описания процессов, генерирующих поле. Диффузионно-химические системы продолжают оставаться полезными при детальном изучении отдельных процессов, но сложность и зависимость от произвольных параметров делают их неподходящими для построения общей теории развития. Дивергентная форма (6.3) расширяет классическое описание поля, рассматривая образование граничных или экстремальных значений. Таким образом, предложенная модель приводит к крайне простому и обладающему описательной силой обобщению теории поля.

Ретино-текतालная проекция в зрительной системе амфибий

Остановимся теперь на процессе развития, который не просто создает упорядоченность клеток на плоскости, но и производит однозначное отображение одной двумерной поверхности на другую, — на процессе, который привлекал внимание ряда весьма компетентных и наделенных богатым воображением исследователей и о котором, следовательно, имеется очень много интересных данных. Этот процесс состоит в объединении зрительных волокон, идущих от ганглиозных клеток сетчатки, в единый зрительный нерв, который проходит к контрлатеральному зрительному тектуму, где зрительные волокна устанавливают строго упорядоченные связи с нейронами тектума. Главный вопрос, интересующий исследователей этого явления, состоит в следующем: каким образом волокна сетчатки, образующие зрительный нерв, находят топографически правильные позиции в зрительном тектуме и устанавливают здесь функциональные связи, так что световое раздражение данной области сетчатки приводит к возбуждению нейронов в определенных областях тектума. Топография этих связей была изучена самыми разнообразными методами, включая операции на сетчатке, на тектуме или на обеих структурах с последующим поведенческим, гистологическим и электрофизиологическим анализом. Кусочки сетчатки или тектума можно удалять, поворачивать, соединять с кусочка-

ми других сетчаток, зрительный нерв можно заставить достигать тектума другим путем или направить к инсультальному тектуму; можно разными способами комбинировать эти методы. Образующуюся при наличии таких воздействий проекцию нейронных сетчаток на тектум регистрируют тем или иным способом (лучше всего для этого подходит электрофизиологическая регистрация ответов поверхности зрительных бугров на стимуляцию сетчатки световым пятном), а затем анализируют любые значительные отклонения от нормальной картины. Ранние работы Стоуна (Stone, 1948) и Зекели (Szekely, 1957) по изучению последствий хирургического вмешательства и анализ поведения животного показали, что поворот глаза в эмбриональном периоде позже стадии 36 у *Ambystoma* или стадии 22 у *Triturus* приводит к эквивалентному повороту зрительного поля. Таким образом, если левый глаз на стадии эмбриона аксолотля повернут по часовой стрелке на 90° , то после метаморфозы взрослый аксолотль будет пытаться схватить муху или приманку прямо перед собой, в то время как она находится в поле зрения слева, и никогда не научится исправлять этот дефект поведения. Однако если поворот сделан в более раннем периоде развития, до стадии 34, взрослое животное ведет себя совершенно нормально. Далее исследования Зекели показали, что назо-темпоральная (передне-задняя) ось глаза у *Triturus* устанавливается раньше дорсо-вентральной. Якобсон (Jacobson, 1968a), определяя электрофизиологическими методами проекцию в тектуме у *Xenopus*, подтвердил эти данные: если поворот на 180° у эмбриона *Xenopus* сделан на стадии 30, то одна ось (назо-темпоральная) обращается, а другая остается без изменений. Это говорит нам о том, что оси в сетчатке устанавливаются или детерминируются в определенные периоды развития. Якобсон (Jacobson, 1968b) обнаружил также корреляцию между этой фиксацией и прекращением репликации ДНК в центральной области сетчатки и предположил, что между лабильностью поля и клеточным циклом существует причинная связь того же рода, что и в эпидермисе насекомых. Поскольку на стадии фиксации осей сетчатка значительно меньше своего окончательного размера, а рост происходит путем добавления клеток к периферии (ресничному кружку), эксперименты с поворотами показывают, что после стадии 32 новые клетки сетчатки получают морфогенетическую информацию в соответствии с полем, детерминированным внутри сетчатки, а не в соответствии с осями тела. Возможно, сетчатка на этой стадии утрачивает свои связи с окружающими клетками и становится автономной. В динамическом процессе, связанном с распространяющейся волной, установление максимума градиента в клетках, добавленных к полю в результате роста, происходит естественно: максимум

градиента распространится во вновь добавленные клетки потому, что мембрана, которая распределяется между дочерними клетками, содержит морфоген, и непрерывная волновая активность сохраняется, продвигая максимум градиента в новые клетки. Такое поведение характерно также для модели полярного насоса, предложенной Уилби и Уэбстером (Wilby, Webster, 1970), но в случае, когда размерность пространства больше единицы, этот механизм перестает работать, поскольку нужно направленно накачивать различные вещества под прямым углом друг к другу в пределах одной и той же клетки.

Отсутствие способности к регуляции в системе зрения взрослой амфибии, впервые обнаруженное Сперри (Sperry, 1944), указывало на то, что имеется некий жесткий механизм, с помощью которого зрительные волокна соединяются с нейронами тектума после того, как оси в этих двух тканях фиксируются. Сперри (Sperry, 1951; 1955; 1963) предположил, что это достигается с помощью специфической комплементарной маркировки клеточной поверхности нейронов сетчатки и тектума согласно их положению в ткани, так что волокна сетчатки образуют функциональные соединения с соответствующими клетками зрительных бугров. Эта гипотеза была названа гипотезой «нейронной специфичности». Ее проверке посвящены многие работы, использующие электрофизиологические методы картирования ретино-тектальной проекции. Однако даже высокого разрешения этих методов по эмбриологическим нормам недостаточно — при уровне дискриминации, меньшем чем примерно 1000 клеток, метод не позволяет сделать никаких заключений о специфичности соединений клетки с клеткой. Эксперименты по вырезанию и повторной имплантации некоторых участков тектума, проведенные Левиным и Якобсоном (Levine, Jacobson, 1974), имеют, по-видимому, гораздо более высокую точность определения мишени волокон сетчатки, около 5 клеточных диаметров (Jacobson, 1975). Необходимо иметь в виду, что при достижении своего места назначения в тектуме зрительное волокно широко разветвляется и поэтому образует функциональный контакт со многими нейронами тектума. Кроме того, многие ганглионарные клетки в сетчатке с помощью своих волокон находятся в функциональном контакте со многими нейронами тектума. Данные, полученные в основном Гейзом с коллегами (Gaze, Jacobson, Szekely, 1963, 1965; Gaze, Keating, Straznicky, 1970; Gaze, Keating, 1972), решительно указывают на то, что взаимодействия между волокнами сетчатки и нейронами тектума не специфичны в том смысле, как это первоначально понимал Сперри. Специфичность этих взаимодействий такова, что достигается только *относительная* упорядоченность волокон по

двум осям тектума. Основные черты ретино-тектальной проекции представлены на рис. 6.5.

При воссоздании карты электрофизиологическими методами тектум условно разбивают на сеть маркированных участков и в один из них вводят электрод. Затем световое пятно двигают по сетчатке, локализуя его в пределах рамки, представляющей поле зрения; точка сетчатки, которая дает максимальный ответ на тектуме, регистрируется как соответствующий участок на карте. Поскольку тектальная поверхность в латеральной области вентрально изгибается, ввести электрод в латеральные точки

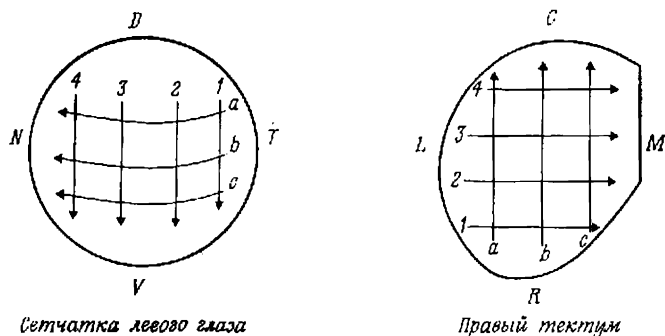


Рис. 6.5. Схема ретино-тектальной проекции *Xenopus laevis*.

очень трудно (электрод вводится в дорсальном направлении), так как обычно тектум открывается удалением дорсальной части черепа. Поэтому латеральные области, как правило, не картируются и часть поля зрения, соответствующая на карте латеральной части зрительных бугров, остается незаполненной. Поскольку на сетчатке вследствие свойств хрусталика формируется перевернутое изображение поля зрения, точки нижней его части приходятся на дорсальную часть сетчатки. Таким образом, как видно из рис. 6.5, при электрофизиологических исследованиях не картируется именно дорсальная часть сетчатки. Однако из экспериментов, в которых специальными методами картировалась латеральная часть тектума, следует, что возникающая проекция непрерывна. В литературе карты обычно представляют в виде проекции полей зрения на зрительные тектумы в соответствии с тем, как поставлен эксперимент. Однако на рис. 6.5 карта дается в виде соотношений между сетчаткой и тектумом, так как наибольший интерес для нас представляют эпигенетические зависимости между этими двумя тканями.

Интересно отметить, что направление стрелок *a*, *b* и *c* на сетчатке и тектуме, обозначающих оси, которые идут параллельно передне-задней оси эмбриона (у зародыша *Xenopus* глаза

расположены по бокам и бинокулярного перекрытия практически нет), противоположно направлению оси тела. Некоторые предположения по этому вопросу высказаны в работах Якобсона (Jacobson, 1959), выполненных на презумптивных церебральных областях нервной пластинки аксолотля. В этих работах показано, что зачаток глаза, соединенный с помощью презумптивной хиазмы, лежит впереди презумптивного зрительного тектума. Пейсмекерный центр, расположенный на стадии 14—15 в центральной части переднего участка нервной пластинки между презумптивным промежуточным и средним мозгом, может устанавливать в пределах этих областей, простирающихся в противоположных направлениях, противоположно направленные градиенты, поскольку зачатки сетчатки и тектума соединяются в контралатеральные пары. Эти оси не будут, однако, параллельны главной оси тела, их выравнивание могут осуществить только морфогенетические перемещения, сопровождающие развитие сетчатки и тектума из зачатков. Что касается другого направления, то определяется ли оно в обеих этих тканях одной и той же осью тела — точно не ясно, поскольку вторая ось в сетчатке первоначально дорсо-вентральная, в то время как в тектуме она медио-латеральная. Однако на изогнутой поверхности, которой является эмбрион, медио-латеральная и дорсо-вентральная оси могут оказаться частью единой оси. Эта проблема может быть решена только в экспериментах по трансплантации сетчатки в ткани с различными медио-латеральными ориентациями с последующим выявлением образующегося направления оси.

У *Xenopus laevis* зрительный нерв взрослого животного состоит примерно из 50 000 волокон, идущих от ганглиозных клеток сетчатки и направляющихся после полного перекреста в области хиазмы к соответствующему числу нейронов и контралатеральном зрительном тектуме. Нервные волокна растут из сетчатки по направлению к вентральной поверхности таламуса, пересекают среднюю линию, образуя перекрест, а затем идут дорсально к соответствующему тектуму. Зрительные нервы расщепляются на медиальный и латеральный тракты непосредственно перед роstralной частью тектума, которые в свою очередь делятся на волокна, соответствующие определенным областям тектума. Таким образом, в зрительном нерве волокна уже рассортированы и разветвление происходит в соответствии с их местом назначения. Очевидно, эти волокна «очень хорошо знают, к чему они стремятся». Пересечение средней линии и образование хиазмы — очень интересная проблема направленного роста, а выяснение механизма расщепления на два пучка — еще более увлекательная задача, но я не буду рассматривать эти вопросы детально. Замечу только, что зрительный

нерв можно отклонить от его нормального курса и заставить расти к каудальной поверхности тектума по пути глазодвигательного нерва, но и после этого волокна картируются на тектуме в правильном топографическом порядке. Поэтому мы не можем считать нормальное ростральное проникновение волокон сетчатки в тектум важным фактором процесса картирования; мы не можем также использовать период развития как один из элементов картирования, так как оно происходит совершенно нормально и в случае перерезки зрительных нервов у взрослого животного, после чего наступает полноценная регенерация. Наконец следует обратить внимание на то, что зрительный нерв можно отклонить к ипсилатеральному зрительному бугру, и там тоже волокна будут проектироваться нормально, так что внутренней информации, позволяющей различать правое и левое, не существует. Это придает процессу пересечения нормальной хиазмы некую загадочность, но мы сейчас на нем останавливаться не будем и рассмотрим процесс картирования волокон сетчатки на поверхности зрительного тектума.

Механизм образования двумерной проекции

Предположим, что вдоль первичных осей сетчатки и тектума, а именно назо-темпоральной и ростро-каудальной соответственно, существуют дополнительные градиенты адгезивных маркеров и адгезивности; например градиенты связанного с мембраной морфогена вдоль этих осей (назовем эти морфогены M_1^C и M_1^T для сетчатки и тектума соответственно) могут индуцировать включение гликопротенов или других маркеров в клеточные поверхности таким образом, что эти молекулы будут плавно распределены по сетчатке и тектуму. Предположим, что в тектуме максимум адгезивности приходится на ростральную часть, а в сетчатке максимум адгезивных маркеров (которые могут быть отличными от маркеров тектума) имеет место в темпоральной части. Будем считать далее, что волокна, вырастающие из нейронов сетчатки, несут эти маркеры в тех же самых относительных концентрациях, что и тела их нейронов. Такие монотонные распределения дадут одномерно упорядоченное соответствие между двумя поверхностями.

Как быть со вторыми осями сетчатки и тектума? Пусть вдоль них существуют градиенты других морфогенов, M_2^C и M_2^T , которые приводят к появлению спонтанной деполяризации мембран с некоторой частотой; эта деполяризация индуцирует конформационные изменения, в результате которых белки-маркеры на клеточной поверхности становятся гораздо менее доступными, чем в отсутствие деполяризации. В результате возникнут

колебания адгезивности волокон сетчатки с частотой, характерной для их местоположения вдоль дорсо-вентральной оси, и максимумом, скажем, в вентральной части сетчатки. Соответствующий градиент частоты будет существовать и вдоль медио-латеральной оси тектума, с максимумом в медиальной части. Эти свойства обеспечивают картирование волокон сетчатки на нейроны тектума и установление максимального устойчивых контактов в случае, когда два градиента правильно упорядочены друг относительно друга. Кроме того, как мы сейчас увидим, эта упорядоченность относительна, а не абсолютна.

Рассмотрим, что происходит, когда зрительный нерв у эмбриона или у взрослого животного при регенерации нерва тем или иным путем достигает тектума. Филоподии, распространяющиеся из конуса роста волокон сетчатки, исследуют поверхность тектума в радиусе 100 мкм или больше и образуют контакты с любыми доступными адгезивными участками. При этом филоподии спонтанно выбрасываются и втягиваются, так что волокна всегда стремятся двигаться в направлении, обеспечивающем образование наибольшего числа контактов между филоподиями и нейронами тектума. Наибольшее число контактов образуется там, где волокна и тектальные нейроны имеют одинаковую частоту и фазу и где больше всего потенциальных адгезивных контактов. Фазовое соответствие возникает в результате спонтанных изменений сдвига фаз между клетками, происходящих до тех пор, пока фазы, а также и частоты не совпадут, что приведет к образованию максимального адгезивного контакта вдоль медио-латеральной оси тектума. Вдоль росто-каудальной оси отростки отталкивают друг друга, и филоподии, образуя и разрушая контакты с нейронами тектума, конкурируют за доступные адгезивные участки. Волокна с наивысшей плотностью участков стремятся установить самые прочные контакты с ростральными нейронами тектума, которые имеют наивысшую плотность комплементарных участков, замещая филоподии, образующие более слабые контакты. Волокна случайным образом блуждают вдоль обеих осей, распространяясь в результате по всей доступной им поверхности. Полученная таким образом проекция не является абсолютной, так как любое волокно сетчатки может образовать адгезивные соединения с любой областью тектума в росто-каудальном направлении; вдоль медио-латеральной оси карта тоже относительна, поскольку некоторая адгезия, вообще говоря, возможна и без соответствия частот. Таким образом, между волокнами сетчатки имеют место конкурентные взаимодействия, а между нейронами тектума и волокнами сетчатки — кооперативные взаимодействия; это приводит к картированию всей доступной поверхности зрительного тектума. На существование такого относительного картирования

или процесса «установления соответствия» в зрительной системе указывает большое количество экспериментальных данных, убедительно представленных Гейзом и Китингом (Gaze, Keating, 1972). Описанная выше модель — лишь одна из реализаций целого класса механизмов, обеспечивающих проекцию с такими характеристиками. Конечно, приведенное описание чисто словесное и требует математического обоснования.

До сих пор мы игнорировали тот факт, что ретино-текстальная проекция имеет третье измерение — для достижения правильных мест назначения волокна сетчатки погружаются в тектум и упорядоченное ветвление происходит в глубине. Чтобы объяснить такое поведение, предположим, что после достижения частотного и фазового соответствия и образования устойчивых контактов с адгезивными маркерами на поверхности тектума конус роста, теперь относительно прочно закрепленный на поверхности тектума, начинает спонтанно исследовать третье измерение тектума. В результате установления устойчивых контактов на поверхности могут образовываться и щелевые контакты, так что волокна сетчатки и нейроны тектума вступают в динамическое взаимодействие. В конце концов функциональной задачей волокон сетчатки будет передача пачек потенциалов действия к нейронам тектума в ответ на сенсорную стимуляцию сетчатки, поэтому между волокнами сетчатки и нейронами тектума должен быть установлен функциональный контакт. Но, поскольку экспериментальных данных о природе глубинной организации тектума очень мало, мы не знаем, какие эпигенетические проблемы необходимо решить. Отметим лишь, что описанная модель имеет характеристики, удовлетворяющие общим требованиям процесса ретино-текстального картирования и к тому же предсказывающие специфически нейронные свойства системы, например появление частот спонтанной активности, которые используются в самом процессе картирования. Мне кажется, что эти частоты относительно низки по сравнению с частотой импульсации сформировавшихся нейронов (равной нескольким импульсам в секунду), поскольку в этом случае мы все еще имеем дело с процессами развития, включающими метаболические процессы. Они скорее попадают на временную шкалу событий, связанных с промежуточной памятью, и с точки зрения их связи с процессом картирования, который включает установление контактов между нейронами и образование функциональных синапсов, они вполне могут оказаться непосредственно связанными с такими процессами в сформировавшейся нервной системе, как поддержание целостности и специализация эмбриологических механизмов.

Модель, представленная здесь для описания двумерной организации в слое клеток, ни в коем случае не претендует на то,

чтобы полностью разрешить проблему ретино-текतालного картирования, и еще меньше — проблему сортировки клеток в двух измерениях. Ее цель состоит в том, чтобы попытаться представить суть этих проблем и посмотреть, каким образом динамические (колебательные) режимы работы мембран могут служить альтернативой градиенту статической адгезии. Вопрос о специфичности адгезивных маркеров еще не рассматривался, хотя данные Бербера, Мэрчейза и Рота (Barbera, Marchase, Roth, 1973) дают основания думать, что на медиальном и латеральном концах тектума цыпленка имеются качественно различные адгезивные участки, а комплементарные им участки находятся на вентральных и дорсальных нейронах сетчатки. Аналогичных данных для мозга и глаза амфибий пока нет. Такая специфичность может быть результатом существования двойного градиента маркеров вдоль этих осей — ситуация, которая может возникнуть в результате действия одного исходного градиента морфогена, активирующего один из ферментов, используемых в синтезе поверхностного маркера, и ингибирующего другой. Двойной градиент специфических адгезивных участков такого рода тоже давал бы относительную, а не абсолютную карту (Prestige, Willshaw, 1975). Возвратившись несколько назад, к данным Бона (Bohn, 1974), Луоренса (Lawrence, 1974) и Нублер-Янга (Nübler-Jung, 1974), которые исследовали движения клеток в эпидермисе насекомых, мы увидим, что этот процесс можно объяснить исходя из тех же принципов — образования филоподий и исследования возможности образования максимально устойчивых адгезивных контактов, как это происходит в процессе ретино-текतालного картирования, с той лишь разницей, что здесь имеется одна популяция клеток.

Некоторые данные о чрезвычайно пластичном и динамичном характере карты тектума получены в недавних экспериментах Чанга и Кука (Chung, Cooke, 1975). Они изучали ретино-тектальные проекции, возникающие в результате поворотов на 180° презумптивных областей среднего мозга у эмбрионов *Xenopus* на стадиях 21—24 и 37, и получили данные, показывающие, что область в промежуточном мозге действует как организатор карты тектума, определяя ее полярность. Значение этого факта состоит в том, что вплоть до стадии 37 клетки тектума не приобретают фиксированных позиционных маркеров. Это соответствует или модели типа модели фазового сдвига, или рассмотренной выше волновой модели с модификацией, заключающейся в том, что пейсмекер расположен в ткани промежуточного мозга и продолжает оставаться активным до стадии 37. Исследования поворотов и трансплантации на ткани мозга взрослых животных (Yoon, 1973; Levine, Jacobson, 1974; Jacobson, Levine, 1975) дают неоднозначную картину способности дифференцированных

клеток мозга помнить их предыдущие позиции, так что вопрос о состоянии позиционных маркеров в зрелом мозге остается открытым. Очевидно, при подходе к этой проблеме нужна известная гибкость. Динамические модели, обсуждавшиеся выше, предусматривают переход от лабильного состояния к фиксированному на любой стадии развития.

В заключение я хотел бы рискнуть высказать предположение, что в ближайшие несколько лет биология развития станет свидетелем появления новых динамических моделей и экспериментальных данных, характерной чертой которых будут периодичности и волны. Представление о статических диффузионных градиентах, упорядочивающих пространственные зоны, служит биологам в течение многих лет, но такие модели просто не обладают гибкостью и динамической многосторонностью, необходимыми для описания морфогенеза и образования структур. Диапазон скоростей распространения волн активности в развивающихся организмах может быть очень широким в зависимости от того, являются ли затронутые при этом процессы главным образом электрохимическими, метаболическими или эпигенетическими. Здесь мы опять сталкиваемся с иерархией времен релаксации, которую изучали в первых двух главах книги, но теперь к временному измерению добавилось пространственное. Организм представляется нам как система, пространственная и временная упорядоченность которой возникает в результате распространения волн из определенных организующих центров, обладающая наряду с этим часами (локальными или глобальными), которые генерируют пространственные и временные периодичности. Эта динамическая картина влечет за собой замену несколько искусственной позиционной дихотомии информация/интерпретация более непрерывной моделью пространственно-временного развертывания с бифуркациями, являющимися частью упорядоченного возникновения структуры и формы. Вопрос о том, как это можно представить аналитически, рассмотрен в следующей главе.

ОРГАНИЗМ КАК ПОЗНАЮЩАЯ
И КООПЕРАТИВНАЯ СИСТЕМА

В этой последней главе мы попытаемся найти подход к анализу клеток, эмбрионов и организмов, который может объединить и обобщить некоторые из высказанных ранее идей. Этот подход основывается на точке зрения, согласно которой организм — это по существу познающая и кооперативная система: познающая, поскольку она функционирует и эволюционирует на основе того, что она узнает о самой себе и об окружающей среде; кооперативная, поскольку под динамическими формами функционирования биологических систем (ростом, дифференцировкой, ритмической активностью и т. д.) должно пониматься кооперативное (коррелированное) поведение отдельных процессов. Вторая часть этого утверждения относительно бесспорна, она просто констатирует тот факт, что в основе довольно резких изменений состояния, которые испытывают биологические системы не только во время эмбрионального развития, где они очень заметны, лежат процессы, аналогичные фазовым переходам. Эти резкие изменения представляются важным аспектом любого биологического процесса. Таким образом, переход от нерастущего к растущему состоянию в клетке, появление возбудимости в мембране, возникновение пейсмекерного центра в развивающемся организме — все это можно описать как развитие в системе определенной коллективной упорядоченности и примеры таких процессов трактовать аналитически. Эти представления возникают как довольно естественное продолжение идей, развитых в предыдущих главах.

Однако взгляд на организмы как на познающие системы не вытекает автоматически из всего рассмотренного нами ранее. Я покажу, что этот взгляд полностью согласуется с вышеизложенным анализом и оказывается в каком-то смысле следствием отдельных предположений о биологической организации, неявно сделанных ранее. До сих пор мы не касались особенностей биологических процессов, которые заставляют нас признавать их отличие от процессов неживой природы, хотя существование такого отличия неявно предполагалось. Нужно отметить, что все представленные модели являются химическими или физическими, но подразумевается, что они функционируют в биологи-

ческом смысле. Теперь необходимо остановиться на этом более подробно. На достаточно высоком уровне биологической упорядоченности выявить особенности, отличающие живые системы от неживых, не составляет труда: это сложное целеустремленное поведение, способность обучаться, использование систем символов, например языка и т. д. Характеризуя организм как познающую систему, я для определения области существования биологического процесса умышленно выбираю свойства высокого уровня упорядоченности. Поступая так, я просто распространяю идеи теории познания на биологию — подход, который в последнее десятилетие применяется все шире и шире.

Рассмотрим, например, положение, принятое Хомски (Chomsky, 1968; 1972) при анализе языка, особенно наглядно демонстрируемое с помощью концепции лингвистической компетентности. Это положение подразумевает инстинктивную, не выработанную способность правильно строить предложения или синтаксис, — способность, которая возникает в процессе эволюции человека. Процессы, порождающие внешнюю структуру предложений из их глубинной структуры, например структурно-зависимые операции при преобразовании предложения, определяются правилами и ограничениями, которые составляют лингвистическую компетентность. Знание этих правил, т. е. знание структурных (анатомических) и функциональных (физиологических) ограничений, которые являются их воплощением, означает, что мы знаем, как правильно строить предложения. Это знание не приобретено, а является врожденным, унаследованным как один из элементов фенотипа человека. Таким образом, предположение, что у человека существуют врожденные структуры, обеспечивающие его лингвистической компетентностью, означает, что определенный вид знаний наследуется. Более спорной частью этого утверждения оказывается не то, что лингвистическая способность врожденна, а то, что структуры и функции, воплощающие правила для построения правильной речи, составляют знание. Хомски (Chomsky, 1972) заходит так далеко, что утверждает: «Знание языка возникает в результате взаимодействий, в которых участвуют первоначально заданные структуры разума, процессы роста и окружающая среда». Таким образом, считается, что врожденные структуры составляют элементы знания. Я просто буду использовать это предположение в более общем виде, считая, что основной особенностью живых организмов является то, что они обладают знанием о различных сторонах мира, — знанием, позволяющим им выживать и воспроизводиться в окружающей среде, к которой они приспособились или которую они знают.

Принять эту точку зрения побуждают несколько причин. Первой причиной можно считать то, что в последние годы

возникла тенденция, согласно которой представления лингвистики, анализа зрительного восприятия и области искусственного интеллекта вообще применяются к биологическим процессам в относительно свободной, основанной на аналогиях манере. Я думаю, что сравнительные исследования такого рода очень важны и плодотворны, но что их необходимо проводить несколько более строго, если мы хотим, чтобы они помогали нам понять положение вещей, а не запутывали еще больше. Основное условие, нужное для достижения ясности, заключается в том, чтобы иметь рабочее определение знания, которое применялось бы как к более высоким познавательным активностям, так и к биологическому процессу. Я попытаюсь сформулировать такое определение и рассмотреть примеры его применения.

Вторая причина принятия этого подхода вытекает из первой и состоит в том, что при этом области биологических и гуманитарных наук можно рассматривать с единых позиций. Тогда при объединении этих областей в рамках общего процесса познания не происходит никакого сведения одного уровня к другому. Важные различия, например, между сферами психологии и физиологии сохраняются, но теперь они описываются не в терминах знания, а исходя из таких понятий, как способность к обучению, тип рассматриваемого обучения и характерное время, в течение которого оно имеет место. Таким образом, я принимаю точку зрения, никоим образом не оригинальную, что процесс эволюции включает в себя некое обучение, но что при этом работают механизмы, отличные от тех, которые используются в процессе обучения в организмах, причем первые оказываются как более расточительными, так и более медленными.

Третий довод в пользу принятия точки зрения, рассматривающей биологический процесс в плане познания, состоит в том, что такой подход дает ясные различия между живыми и неживыми формами организации, между областями живого и неживого. Это различие относится и к человеку и его созданиям, включая компьютеры и программы, которые, как оказывается, исходя из определения, приведенного ниже, не представляют собой познающих систем. Объясняется это тем, что знание, которое они несомненно содержат, не направлено у них на себя, оно не способствует их собственной устойчивости в мире (их способности выживать, воспроизводиться и развиваться).

Еще одно следствие этого подхода к упорядоченности организмов состоит в возможности по-другому посмотреть на эволюционный процесс и Природу в целом. Эти явления представляются тогда как процесс проявления интеллекта, а организмы оказываются результатом действия системы интеллекта. Для сторонников редукционистского подхода в биологии это предположение может звучать наивно антропоморфично, но оно проис-

текает непосредственно из концепции, согласно которой биологический процесс определяется как система высокого уровня и дает, с моей точки зрения, внутренне непротиворечивую и строгую альтернативу редукционистской позиции, которая сталкивается с огромнейшими трудностями, рассматривая более высокие области познания. Для рассматриваемой нами точки зрения ситуация как раз обратная, и я попытаюсь это показать.

Связь между познавательными и кооперативными аспектами анализа возникает в результате того, что динамические формы, которые выражают развитые стратегии поведения организмов, оторваны друг от друга, так что для их связного описания необходимо привлекать теорию бифуркаций. Появление таких дискретных форм очень легко понять в терминах кооперативного или коллективного поведения, когда система за точкой бифуркации приобретает качественно новые свойства. Разные динамические формы проявляют разные стратегии поведения, разные стороны знания организма о мире.

Общее направление данной главы заключается в том, чтобы проследить эту аргументацию при рассмотрении конкретных математических моделей, которые ограничивают предположения строгими рамками. Однако модели — это лишь некий шаг на пути к истине, а не окончательное решение проблемы. Поэтому глава имеет вид наброска, плана дальнейших исследований.

Функциональная иерархия

Основой анализа биологических систем, представленного в этой книге, является идентификация уровней организации исходя из времен релаксации процессов, участвующих в проявлении отдельных типов поведения. Так, в гл. 1 метаболическая система клетки идентифицировалась по времени релаксации метаболических превращений, катализируемых ферментами, при этом считалось, что концентрации ферментов постоянны. В гл. 2 эпигенетическая система идентифицировалась по характерному времени синтеза макромолекул и времени взаимодействий; в то же время в гл. 3 было дано определение генетической системы, хотя никакого анализа ее поведения проведено не было. Такой анализ можно было бы расширить в любом направлении. Помимо метаболической системы существует, например, система, которую можно назвать электрохимической, или ионной. Она связана главным образом с мембранами, и в ней имеются потоки ионов, аналогичные тем, которые сопровождают распространение потенциала действия в аксоне. Время релаксации этой системы порядка нескольких миллисекунд. Тесная связь упомянутых явлений с энергозависимыми метаболическими процессами, такими, как активация АТФазы, связанной с мембраной,

делает точное временное разделение электрохимических и метаболических процессов при некоторых условиях несколько искусственным, но, вообще говоря, такое разделение полезно и служит для идентификации различий в характерных временах, которые разграничивают процессы, изучаемые нейрофизиологами, и процессы, изучаемые, например, биохимиками. Кроме того, хотя мы ограничились рассмотрением простых организмов, следует отметить, что физиология сложных многоклеточных требует деления эпигенетической системы на подсистемы для того, чтобы правильно отразить различия в характерных временах, на которых такие организмы работают. Чтобы получить представление об этом спектре характерных времен, мы вынуждены рассмотреть только такие очевидные примеры, как приливо-отливные, суточные, недельные, лунные и сезонные «часы» (Bünning, 1967; Iberall, 1969; Richter, 1965), и не затрагивать другие процессы, например регенерацию, заживление ран, мышечную адаптацию и т. д.

Представление упорядоченности организмов в виде функциональной иерархии, которая включает параметрическое управление одного уровня поведения процессами, происходящими на следующем уровне, как, в частности, описано в гл. 4 при рассмотрении хеостата как адаптивной системы, можно интерпретировать исходя из концепции об иерархии операторов, в которой каждый оператор выполняет наблюдения, проводя усреднение по времени за периоды, значительно большие, чем время релаксации системы, расположенной «ниже» него, и дает ответы, соответствующие своим наблюдениям. Такая точка зрения неявно присутствует в анализе, представленном в предыдущих главах. Например, медленные изменения в эпигенетической системе бактерии, которые являются результатом устойчивых изменений состояния метаболической системы (скажем, подавления ферментов биосинтеза аргинина в результате восстановления уровня аргинина или введения его экзогенно), обусловлены действием высоко специфичных макромолекулярных «наблюдателей» (например, пермеаз, репрессоров, полимераз и т. д.). Популяция «наблюдателей», участвующих в управлении такой физиологической цепью, регулирует скорости отдельных процессов (основной из которых в данном случае — транскрипция генов) в соответствии со значениями концентраций отдельных метаболитов (индукторов, корепрессоров и т. д.), усредненных за время до многих минут. Флуктуации уровня метаболитов, имеющие период $< 10^2$ с, не отражаются на динамике эпигенетической системы, время срабатывания которой гораздо больше (у бактерий — вплоть до 1 ч). Посмотрим, каким образом мы можем описать действие такого биологического процесса управления, исходя из гипотезы познания.

Познающая система — это система, которая функционирует на основе знания о себе и своем окружении. Знание, как я его понимаю, означает полезное для системы описание какой-то стороны мира (самой системы или окружающей ее среды). Говоря об описании, мы подразумеваем, что существует некоторый код или набор кодов, который связывает описание с рассматриваемым процессом, а полезность в данном контексте связана со способностью выживать, воспроизводиться и развиваться.

Применим эти понятия к какому-нибудь процессу, например к индукции *lac*-оперона лактозой в бактерии, чтобы посмотреть, как разумно представить себе это явление в рамках гипотезы познания. Пусть, например, нас интересует, в каком смысле о бактерии, обладающей функциональной цепью управления катаболизмом лактозы, можно сказать, что она работает, основываясь на процессе познания. Специфической особенностью окружающей среды в этом случае оказывается присутствие в питательной среде лактозы и одновременное отсутствие глюкозы. Бактерия сначала узнает об этом с помощью специфических рецепторов на клеточной мембране — молекул пермеазы лактозы; некоторое количество этих молекул всегда присутствует из-за шумовых эффектов в цепи управления. Они переносят лактозу внутрь клетки, где она подвергается метаболическим превращениям при помощи β -галактозидазы (тоже всегда присутствующей в базальных слоях), и в результате образуется алло-лактоза, которая является специфическим индуктором. Алло-лактоза взаимодействует с репрессором, инактивирующим ее, и при условии, что уровень цАМФ достаточно высок, с *lac*-оперона снимается репрессия. Мы видим здесь работу канала связи между мембраной и ДНК, по которому в закодированном виде передается первоначальный сигнал, что приводит к активации специфической части хранилища клеточной памяти (ДНК). Из этого хранилища «выделяется» специфически закодированная информация (мРНК), которая затем транслируется в белки. Белки (пермеаза, ацетилаза, β -галактозидаза) диффундируют к мембранам и здесь собираются в структуры, результатом активности которых оказывается транспорт и катаболизм лактозы.

Выработка правила сборки ансамблей молекул на мембранах или других органеллах представляется частью поиска операционной реализации всего процесса, т.е. система должна «понять» методом проб и ошибок, какие правила сборки или взаимодействия белков с мембранами и цитоплазматическими элементами дают желаемый результат — превращение лактозы, чтобы обеспечить энергией и строительными блоками процессы биосинтеза. Этот процесс «обучения» в настоящее время

рассматривается исходя из представлений о случайных изменениях в хранилище памяти — молекуле ДНК, а также об изменениях в метастабильных наследуемых клеточных структурах, например мембранах и органеллах, с последующим отбором тех состояний, которые обеспечивают наибольшую биологическую устойчивость. Эвристические правила в действительности работают на всех стадиях эпигенетического ответа, так как все события узнавания с помощью макромолекул, кодирования, передачи и т. д. формируются через процесс отбора.

Однозначных решений этих проблем оптимизации не существует, поэтому выработанные правила случайны и до некоторой степени произвольны. Например, в *E. coli* три структурных гена *lac*-оперона транскрибируются совместно, тогда как в другом организме они могут находиться в разных участках генома и регулироваться множеством связей, как ферменты биосинтеза аргинина. Различные способы кодирования, передачи, декодирования и правила взаимодействия, которые составляют полный функциональный *lac*-оперон в *E. coli*, представляют полезное описание одной из сторон мира, состоящее в данном случае в том, что лактоза — это молекула, которую можно превратить в более простые молекулы с сопутствующим выделением энергии. Эти сведения предположительно содержатся в причинных зависимостях между элементами, которые составляют цепь управления лактозой, как описано на рис. 2.3, и они выявляются, когда лактоза присутствует в окружающей среде, а главные сахара, например глюкоза, отсутствуют. Таким образом, мы можем рассматривать эту цепь как познающую единицу.

Все аспекты работы такой единицы находятся в согласии с физическими и химическими законами. Причина, по которой разумно рассматривать ее в терминах познания, заключается в том, что способ описания, используемый такой единицей, не уникален: это только один из многих возможных способов. Например, дрожжевая клетка тоже может катаболизировать лактозу и имеет цепь управления, поведение которой в принципе аналогично поведению системы, действующей в *E. coli*. Однако детали кодирования, передачи, декодирования, правил взаимодействия и сборки при этом иные. Функционально системы одинаковы, но способы описания у них разные. Это основная особенность знания: его можно выразить разными способами. Знание о структуре дома, например, можно выразить с помощью набора двумерных проекций трехмерной структуры; то же самое можно сделать и с помощью трехмерной модели, которую в свою очередь также можно построить разными способами, и т. д. Это разнообразие способов возможных описаний одного и того же набора ограничений, определяющего соответствующий аспект мира, есть источник огромного культурного разно-

образия на антропологическом уровне. Говоря о клеточной организации, эти функциональные описания можно рассматривать с точки зрения перспектив познания в качестве главного источника разнообразия структуры организмов и их поведения. Большая произвольность (*a priori*) описаний сильно затрудняет раскрытие общих законов биологической организации, которые должны охватывать все частные случаи. Организмы, исходя из введенного определения, становятся системами, использующими знание, и как таковые резко отличаются от небιологических систем. Последние также могут иметь описания некоторых сторон окружающей среды; например, ископаемые окаменелости содержат описание вида вымершего организма, но для окаменелости это описание не имеет никакого применения, и поэтому ее нельзя назвать познающей системой. Насколько нам известно, полезные описания некоторых сторон своего мира для достижения устойчивости в этом мире используют только живые организмы.

Знание, заложенное в *lac*-опероне, включает некоторые очень сложные операции кодирования и декодирования; они обусловлены различными функциональными потребностями, которые вид стремится удовлетворить оптимальным способом путем эволюции. Главное при этом — необходимость стабилизировать хранилище филогенетической памяти, которая закодирована в ДНК, и одновременно иметь механизм для передачи этой памяти потомству. Информацию, символически закодированную в ДНК, можно рассматривать в этом смысле как набор теорий или гипотез о разных сторонах мира. Такие гипотезы в ответ на воздействие специфических сигналов порождают активности (путем синтеза белков), и эти активности проверяют обоснованность гипотез [см. также обсуждение этой точки зрения у Гудвина (Goodwin, 1972)]. Эти процессы составляют весьма сложное сплетение молекулярных взаимодействий, за которым трудно распознать любое простое описание, имеющееся у организма, скажем о доступности и полезности лактозы как источника питания. Нам нужно научиться расшифровывать описание точно так же, как мы поступаем, когда учим новый язык.

Биологический процесс, который значительно легче расшифровать, чем процесс, выраженный в виде цепи управления типа описанной выше, — это биологические ритмы, рассмотренные в гл. 4. Организм, обладающий циркадным ритмом, очевидно, имеет какой-то осциллятор, период колебаний которого равен примерно 24 ч. Такая периодичность очевидным образом дает описание солнечного цикла. Природа описания в этом случае значительно яснее, чем в предыдущем примере, поскольку между периодичностью солнечного дня и периодичностью осциллятора есть прямая аналоговая связь, причем число

«символических» или участвующих в кодировании элементов очень невелико. Однако и здесь есть эвристические правила, которые определяют детали ритмической физиологической и поведенческой активности любого организма, устанавливающие оптимальную связь между внутренними процессами и внешней периодичностью. Так, клеточное деление, фотосинтетическая активность, набухание хлоропластов, дыхание, фототаксис и другие свойства клеток оптимальным образом изменяются во времени относительно 24-часового цикла окружающей среды и друг друга и обеспечивают легко прослеживаемую динамическую упорядоченность и гармоничность внутриклеточного содержимого, которые являются результатом эволюции в периодически изменяющемся мире.

Различие между знанием и информацией становится ясным при рассмотрении этих понятий исходя из определения, данного выше. Информация — всегда аспект знания, так как последнее неизменно включает выбор небольшого класса событий из гораздо большего их числа (например, пермеаза лактозы способна отвечать на небольшой набор стерически подобных молекул). В техническом определении информации отсутствует даже упоминание о ее значении или важности для поведения системы, несущей информацию. Цепь управления, например, это нечто большее, чем канал информации с кодирующими и декодирующими элементами. Она использует эту закодированную информацию для выполнения полезных операций и следовательно, особым образом интерпретирует информацию. Этот процесс интерпретации всегда включает полезную активность в реальной пространственно-временной ситуации, например транспорт веществ через мембрану, каталитическое превращение молекулы, скажем лактозы, синтез и сборку белков и т. д. Смысл сигнала или сообщения, несущих информацию, раскрывается, таким образом, в процессе интерпретации, и это имеет место в пределах определенной ситуации или при некоторых условиях внешней среды, которые включают действие специфических сил. Таким образом, мы можем сказать, что знание действует в том случае, когда информация интерпретируется в особой пространственно-временной ситуации.

Это в равной степени справедливо и для организмов, использующих символы, например людей, для которых информация может быть закодирована в символах, пространственно-временная структура которых не несет вообще никакой очевидной связи с элементами поля действий, к которому они относятся. Процесс интерпретации, который служит посредником между символом и задаваемым им действием, может тогда использовать для установления соответствия специально выработанные зависимости, некие правила или соглашения, которые должны быть вы-

учены. В таком случае различие между сигналом и символом состоит главным образом в том, что последний имеет дополнительную степень свободы, появляющуюся в результате связи с процессом обучения, тогда как первый вызывает инстинктивную, автоматическую интерпретацию, как, например, метаболический ответ на «сигнал глюкозного истощения», цАМФ, в голодающих бактериях, рассмотренный в гл. 2.

Обратные предельные системы

Функциональная иерархия, которая была использована для описания биологической организации, теперь, как можно видеть, представляется как иерархия познавательных процессов, причем каждый из этих процессов функционирует на основании знания о некотором аспекте мира. Каждый уровень иерархии предусматривает соответствующее поведение только для событий, происходящих в течение данного периода времени, причем этот временной отбор проводится по характерному времени разных стадий ответа. Таким образом, мы можем сказать, что каждый уровень иерархии важен только в процессах, происходящих с данной скоростью или в пределах данного диапазона частот. Мы можем формализовать отношения между этими уровнями следующим образом.

Обозначим само событие через E , а различные функциональные уровни организма, которые могут отвечать на него, через $C_0, C_1, \dots C_n, \dots$. Эти уровни поведения связаны друг с другом операциями, которые включают усреднение, в том смысле, что C_{n-1} «видит» и реагирует на усредненный по времени вариант того, что «видит» и на что отвечает C_n . Например, если событие E представляет собой понижение уровня экзогенного аргинина в бактериальной культуре, то C_{n-1} может представлять собой эпигенетический уровень аргининовой системы управления, отвечающий на усредненную по времени версию того, на что реагирует C_n , метаболический уровень системы. Все системы управления синтезом аргинина вместе образуют познающую единицу.

Установить соответствие между событием и разными уровнями ответа на него можно способом, представленным на рис. 7.1. Здесь F_{ns} — преобразования (включающие операции усреднения), устанавливающие соответствие между C_n , так что C_0 — самое грубое временное описание E , а C_n — самое тонкое из представленных на рисунке. Хотя мы рассматриваем лишь временной аспект иерархических отношений, подобный анализ с таким же успехом применим и к пространственному описанию. Тогда с помощью функции F_n будет проводиться усреднение по пространству так же, как оно производится по времени. В дальнейшем однако, мы ограничимся рассмотрением только

временного аспекта. Хотя мы применим подробный анализ иерархических связей только к очень простым организмам, таким, как бактерии, этот подход распространяется и на более сложные системы со многими уровнями ответа.

Если существует правило получения отображений F_n , такое, что C_n ставится в соответствие C_m ($n > m$) с помощью сложного отображения

$$F_{n,m} = F_m \circ \dots \circ F_{n-1} \circ F_n$$

и задан единичный элемент, то вышеприведенный ряд называется обратной предельной последовательностью (Eilenberg, Steen-

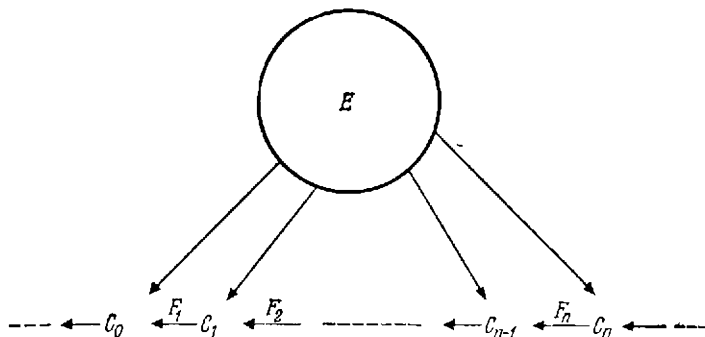


Рис. 7.1. Описание иерархической организации организмов в терминах обратных предельных систем.

rod, 1952; Hocking, Joung, 1961). Чтобы было понятнее, рассмотрим пример, в котором $F_n s$ — чистые операторы усреднения по времени. Пусть $X(t)$ — зависящая от времени переменная, например концентрация какого-либо питательного вещества в бактериальной культуре или освещенность поверхности водоема. Пусть время, в течение которого переменная является входом для некоторого оператора усреднения (обозначенного i) в организме, равно τ_i , а время, в течение которого существует ответ оператора, равно t_i . Запишем

$$s_i = t_i - \tau_i;$$

тогда

$$X(\tau_i) = X(t_i - s_i).$$

Определим среднее по времени значение переменной X , которое дает этот оператор:

$$\langle X \rangle_i(t_i) \equiv \int_0^{\infty} \omega_i(s_i) X(t_i - s_i) ds_i. \quad (7.1)$$

Это уравнение того же типа, что и уравнение, описывающее процесс клеточного восстановления (гл. 4). Здесь функция $\omega_i(s_i)$ характеризует природу усредняющей операции, выполненной рассматриваемой единицей, например цепью управления. Для выполнения требований, предъявляемых к процессу усреднения, необходимо, чтобы

$$\omega_i(s_i) \geq 0 \quad \text{для} \quad s_i \geq 0$$

и

$$\int_0^{\infty} \omega_i(s_i) ds_i = 1.$$

Определение операции усреднения взято из интересной работы Корнекера (Kornacker, 1972), рассмотревшего процессы измерения в живых системах и использовавшего их при формулировке положений обобщенной статистической механики. Разница состоит лишь в том, что нижний предел интегрирования взят здесь равным 0, а не $-\infty$, так как $s_i > 0$.

Предположим, что два разных оператора усреднения i и j действуют последовательно на $X(t)$. Тогда мы получаем

$$\langle\langle X \rangle_t\rangle_j(t) = \int_0^{\infty} \omega_j(s_j) \langle X \rangle_i(t - s_j) ds_j.$$

Но

$$\langle X \rangle_i(t - s_j) = \int_0^{\infty} \omega_i(s_i) X(t - s_j - s_i) ds_i,$$

и поэтому мы имеем

$$\langle\langle X \rangle_t\rangle_j(t) = \int_0^{\infty} \omega_j(s_j) ds_j \int_0^{\infty} \omega_i(s_i) X(t - s_j - s_i) ds_i.$$

Этот двойной интеграл называется двойной сверткой. Обобщая полученный результат на случай последовательности операций усреднения, находим, что

$$\begin{aligned} \langle \dots \langle\langle X \rangle_m \rangle_{m+1} \dots \rangle_n(t_n) &= \int_0^{\infty} \omega_n(s_n) ds_n \int_0^{\infty} \omega_{n-1}(s_{n-1}) ds_{n-1} \dots \\ &\dots \int_0^{\infty} \omega_m(s_m) X(t_n - s_n - s_{n-1} \dots - s_m) ds_m \quad (n > m). \end{aligned}$$

Таким образом, мы получили пример правила составления последовательных операторов F_n в схеме, представленной на рис. 7.1.

Полезно посмотреть, как анализ динамического поведения молекулярных управляющих цепей, выполненный в предыдущих главах, соотносится с общей схемой описания, основанной на применении операторов усреднения. Рассмотрим цепь управления метаболизмом, описанную в гл. 1, с ингибированием конечным продуктом, со стехиометрией n . Пусть конечный продукт, скажем аминокислота, присутствует в питательной среде в концентрации $z_i(t)$. Его концентрация будет флуктуировать, характеризуясь неким спектром (распределением амплитуд и частот флуктуаций), т. е. $z_i(t)$ — стохастическая (случайная) переменная. Аминокислота будет транспортироваться в клетку и давать свой вклад во внутриклеточный пул конечного продукта y_i , и, таким образом, флуктуации в z_i будут сообщаться пулу. Назначение цепи управления состоит в том, чтобы поддерживать y_i на относительно постоянном уровне и таким образом противодействовать флуктуациям, идущим от z_i . Это и достигается с помощью цепи отрицательной обратной связи при условии, что время релаксации этой системы управления соответствует частоте флуктуаций в z_i . Посмотрим, как это происходит.

Возьмем простейший случай одностадийной цепи отрицательной обратной связи, в которой продукт ингибирует каталитическую активность фермента. Тогда динамику цепи управления можно охарактеризовать уравнением

$$\frac{dy_i}{dt} = \frac{a_i}{b_i + y_i^n} + c_i z_i - d_i y_i, \quad (7.2)$$

где первый член в правой части, напоминающий соответствующий член уравнения Хилла, описывает управление; $c_i z_i$ — скорость транспорта в клетку аминокислоты, а y_i — внутриклеточная концентрация аминокислоты, которая потребляется для биосинтетических целей со скоростью $d_i y_i$. Рассмотрим поведение этой цепи управления в окрестности стационарного состояния $\bar{y}_i$, считая, как обычно, что отклонения от этого состояния малы. Тогда уравнение можно линеаризовать, что даст следующее уравнение для малой величины $x_i = y_i - \bar{y}_i$:

$$\frac{dx_i}{dt} = c_i z_i - \gamma_i x_i, \quad (7.3)$$

где $\gamma_i = \alpha_i + d_i$ а α_i — наклон функции управления $a_i/(b_i + y_i^n)$ в стационарной точке $\bar{y}_i$. Как показано в гл. 1, важным фактором в определении значения этой величины является стехиометрия реакции ингибирования n .

Уравнение (7.3) можно теперь решить следующим образом. Перепишем его в виде

$$\frac{dx_i}{dt} + \gamma_i x_i = c_i z_i.$$

Заметим, что

$$\frac{d}{dt}(x_i e^{\gamma_i t}) = e^{\gamma_i t} \left(\frac{dx_i}{dt} + \gamma_i x_i \right);$$

тогда уравнение можно переписать так:

$$\frac{d}{dt}(x_i e^{\gamma_i t}) = c_i e^{\gamma_i t} z_i(t).$$

Интегрируя, находим

$$x_i e^{\gamma_i t} = \int_0^t c_i e^{\gamma_i \tau} z_i(\tau) d\tau + C,$$

где C — постоянная интегрирования. Она равна

$$C = \int_{-\infty}^0 c_i e^{\gamma_i \tau} z_i(\tau) d\tau,$$

что отражает «историю» процесса вплоть до нулевого момента времени, и решение принимает вид

$$x_i(t) = e^{-\gamma_i t} \int_{-\infty}^t c_i e^{\gamma_i \tau} z_i(\tau) d\tau = c_i \int_{-\infty}^t e^{-\gamma_i(t-\tau)} z_i(\tau) d\tau.$$

Записав $t - \tau = s$, получим

$$x_i(t) = c_i \int_0^{\infty} e^{-\gamma_i s} z_i(t-s) ds. \quad (7.4)$$

Положив

$$\omega_i(s_i) = A c_i e^{-\gamma_i s},$$

мы получим выражение, совершенно аналогичное (7.1). Здесь A — нормировочный множитель, необходимый для выполнения условия

$$\int_0^{\infty} \omega_i(s_i) ds_i = 1.$$

Это дает нам

$$A \int_0^{\infty} c_i e^{-\gamma_i s} ds = 1,$$

откуда

$$\frac{A c_i}{\gamma_i} = 1$$

$$A = \frac{\gamma_i}{c_i}.$$

Этот результат показывает, что для обыкновенного линейного дифференциального уравнения типа (7.3) оператор усреднения есть

$$\omega_i(s) = \gamma_i e^{-\gamma_i s}, \quad \text{где} \quad \gamma_i = \alpha_i + d_i.$$

Очевидно, свойства этой функции зависят от α_i и d_i , значения которых определяются характеристиками цепи управления и константой скорости утилизации соответственно. Для метаболического процесса, описываемого уравнением типа (7.2), γ по оценкам, основанным на данных гл. 1, равна примерно 10^{-2} с^{-1} . Цепь управления с таким временем релаксации будет, конечно, сглаживать флуктуации $z_i(t)$, которые попадают в ее частотный диапазон. Прибегая к языку нашей теории познания, можно сказать, что цепь управления с некоторым временем релаксации предполагает, что существуют флуктуации окружающих условий с определенным диапазоном частот. Познавательная мощность цепи определяется ее способностью гасить эти флуктуации. Определенная цепь управления вырабатывается в соответствии с конкретными предположениями относительно свойств z_i , и успех ее работы зависит от того, насколько хорошо соответствие между предполагаемым и ожидаемым поведением. Весь анализ был проделан нами только для линейной системы, однако из него ясны принципы, лежащие в основе использования операторов $\omega_i(s_i)$ в уравнении (7.1).

Формальная область интегрирования в уравнении (7.4) — это $(0, \infty)$, но имеется такое эффективное время усреднения, определяемое величиной γ_i и, следовательно, характерным временем ответа системы управления, что при увеличении времени сверх него среднее существенно не меняется. Обозначим это время T_m . Тогда

$$x_i(t) = c_i \int_0^{T_m} e^{-\gamma_i s} z_i(t-s) ds = c_i \langle z_i \rangle_{T_m}(t). \quad (7.5)$$

В параметр c_i входит концентрация любой пермеазы, поставляющей клетке экзогенный метаболит, а в γ_i — концентрация ферментов. В интервале $(0, T_m)$ их можно считать постоянными. Однако $x_i(t)$ теперь становится входом для эпигенетической системы, и изменения в $c_i(t)$ и $\gamma_i(t)$ должны учитываться в течение больших времен, чем T_m . Это приводит к появлению кросс-корреляционных членов $\langle c_i(t) \langle z_i \rangle_{T_m}(t) \rangle_{T_e}$ в выражениях для средних по времени значений переменных эпигенетических процессов, где T_e — время релаксации эпигенетической системы. Именно из таких выражений можно получить доказательства согласованного динамического поведения, отражающего способ-

ность системы резонировать с флуктуациями и таким образом функционировать с высокой эффективностью. На это свойство иерархически организованных систем неоднократно указывал Корнекер (Kornacker, 1969 a; 1969 b; 1972), который считает его главным источником динамической упорядоченности биологических систем и описывает процессы познания в терминах корреляционного анализа. Мак-Клар (McClare, 1971; 1972) представил убедительные аргументы в пользу точки зрения, согласно которой динамические корреляции и резонанс являются источником необычайно высокой эффективности миграции энергии в биологических системах, и предложил подход к биологической энергетике, основанный на резонансных формах взаимодействия.

В то время как более низкие уровни иерархии порождают входы для более высоких уровней, последние определяют динамические ограничения или параметры для первых. Это ясно видно из уравнения (7.5), где $c_i(t)$ выступает в роли параметра для метаболической переменной $x_i(t)$. На эпигенетическом уровне необходимо рассматривать не только кросс-корреляции между $c_i(t)$ и $\langle z_i \rangle_{t_m}(t)$, но и корреляции со входами из окружающей среды, приходящими непосредственно на этот уровень, что отображено на рис. 7.1 стрелкой от E к C_{n-1} . Примером такого влияния представляется суточный цикл свет — темнота, который может действовать прямо на активность генов путем изменения температуры, концентрации водородных ионов и т.д. Следовательно, динамические сопряжения в сложной системе включают корреляции между входами от более низких уровней и входами из окружающей среды с внутренней динамикой данного уровня. Эти зависимости скорее коррелятивные, чем причинные, так как каждый уровень и каждая компонента в пределах уровня относительно автономны. Основываясь на этих взаимодействиях и корреляциях, можно, очевидно, получить значительно более сложное и интересное поведение, чем простое гашение флуктуаций окружающей среды, осуществляемое через соответствие между временами релаксации и частотой флуктуаций. Рассматривая организм с циркадной организацией с позиций теории познания, мы можем сказать, что система предполагает существование примерно 24-часового ритма одной или более переменных окружающей среды и мера ее познавательного успеха задается кросс-корреляцией или функцией согласованности переменных системы и внешней периодичности. Тот же самый подход можно использовать и при анализе организации событий во время клеточного цикла. Здесь рассматривается устойчивость частотных и фазовых соотношений между активностями составных частей системы, такими, как инициация репликации ДНК, почкообразование (скажем, в дрожжах), миграция ядер

и клеточное деление. Процесс почкообразования, который у отдельных мутантов происходит независимо от репликации ДНК (Hartwell et al., 1974), характеризуется определенной вероятностью по отношению к процессам репликации хромосом, митоза и миграции ядер, и наоборот. Познавательная способность, проявленная системой в целом, задается кросс-корреляцией между этими процессами, которая оценивает эту согласованность.

Когда наряду с временными факторами рассматриваются и пространственные, ситуация усложняется, но в принципе подход остается тем же самым. Очевидный пример ответа на сигнал с пространственным распределением энергии представляет собой узнавание белками различных молекул. Познавательный успех этого распознавания зависит от сложного резонансного соответствия между частотами пространственно-временных колебаний в белке и в молекуле, с которой он взаимодействует. Резонансное соответствие между белком и лигандом возможно из-за существования определенных инвариантов молекулярной структуры и активности; эти свойства используются для инициации специфических изменений состояния в комплексе белок — лиганд, которые вносят свой вклад в общую устойчивость организма. Таким образом, можно сказать, что белок имеет полезное описание молекулы, с которой он взаимодействует.

Итак, при подходе к организму как к познающей системе организм представляют в виде совокупности частей, каждая из которых функционирует исходя из описания определенных свойств самой системы и (или) ее окружения. Наиболее очевидным примером молекулы с полезным описанием самой себя является двойная спираль ДНК. Составные части познающей системы имеют некоторую автопомность, но целое восстанавливается только при рассмотрении сопряжений или взаимодействий между переменными (сигналами), которые приводят к координированному поведению, оцениваемому с помощью кросс-корреляций. Таким образом, популяция частично автономных наблюдателей и операторов становится единым целым.

Как установлено выше, в общем случае операторы F_n будут более сложными, чем простые операторы усреднения типа оператора (7.1). В общем случае можно считать, что описания S_n являются категориями, а F_n — функторами (McLane, 1971). Тогда каждая категория представляет частное описание события E и организм использует некоторый конечный набор этих описаний $\{S_n\}$. Расширив последовательность, изображенную на рис. 7.1, неограниченно в обе стороны, мы получим формальную схему для создания потенциального набора описаний любого события и, следовательно, набора, из которого организмы могут делать свой выбор согласно истории своего эволюционного раз-

вития. Мы видим, что никакой конечный набор $\{C_n\}$ не дает полного знания о E ; его можно получить только исходя из пространства, задаваемого набором всех последовательностей $(\dots C_{n-1}, C_n, C_{n+1} \dots)$, где c_n — точка пространства C_n , называемого пространством произведений и обозначаемого как

$$\prod_{n=1}^{\infty} C_n.$$

Это так называемое обратное предельное пространство, и именно с его свойствами связана топология обратных предельных систем. В рассмотренном выше примере отображение F_n — функционал, а именно выражение (7.1), которое отображает функции времени $X(t)$ на другие функции времени. Эти последние образуют пространства интегрируемых по Лебегу функций — бесконечномерные банаховы пространства.

Причина использования обратных предельных систем для формализации соотношений между уровнями функциональной иерархии, применяемой при анализе биологической организации, состоит в том, что это позволяет выявить два момента. Первое — показать, что в рамках теории познания любой организм функционирует на основе ограниченного набора описаний мира, выбирая некоторый поднабор из обратного предельного пространства, которое, можно сказать, содержит все возможные описания. Всеобщность схемы, полученной при использовании категорий C_n и функторов F_n , несомненно, очень велика, и вряд ли она имеет большую ценность при рассмотрении физиологической организации, в которой главные ограничения, действующие при упорядочении иерархии, сводятся к пространственным и временным ограничениям, рассмотренным выше. Однако, когда мы подходим к вопросам, касающимся поведения и психологии, особенно последней, где вступают в действие символические описания мира и отношения между описанием и сферой действия становятся все более и более неуловимыми, уровень абстракции, необходимый для идентификации природы соответствий или отображений между уровнями, вероятно, нуждается в математической структуре именно такого высокого порядка. Чтобы избежать тривиального сведения анализа круга вопросов, которыми занимается психология, к рассмотрению физиологических принципов и при этом сохранить принцип основных структурных и функциональных соответствий между психологией и физиологией, нужна потенциальная мощь подхода, основанного на обратной предельной системе. На этом уровне описание системы, представленное рис. 7.1, становится сетью взаимодействий произвольно высокой размерности и функциональной упорядоченности.

Вторая причина обращения к общей топологической модели, типа обратной предельной системы, для представления

иерархии уровней в организме связана с возможностью использовать математическую структуру этой теории для изучения некоторых основных свойств процессов познания, определенных здесь. Я не достаточно компетентен в этом вопросе, чтобы обсуждать его, однако хочу остановиться на одном интересном аспекте топологии, который, по-видимому, относится к изучению организмов с точки зрения теории познания. Это представление, так же как и предложение использовать обратные предельные системы к кругу вопросов, упомянутому выше, принадлежит д-ру Питеру Антонелли¹.

Существует область топологии, названная теорией гомотопий Чеха, с помощью которой, грубо говоря, можно построить минимальные поверхности для пространств или категорий S_n . Эти минимальные поверхности дают простейшую характеристику рассматриваемой топологической системы, так что методом гомотопий Чеха можно выявить основу структуры описания. Метод представляет собой операцию минимизации на множестве описаний, состоящую в выборе того описания, которое при данных условиях проще или, образно говоря, изящнее. В плане теории познания такой метод представляет глубокий интерес, так как с его помощью мы можем получить точный подход к проблеме оценки описания с точки зрения максимальной простоты или изящества. Чтобы выяснить ценность этого подхода для биологов, необходимы гораздо более глубокие исследования, однако это, по-видимому, многообещающее направление; с его помощью можно подойти к вопросам, связанным с творчеством и интуицией, часто рассматриваемым как не подлежащие точному определению.

Кооперативные взаимодействия и фазовые переходы в познающих системах

Любой уровень организации, представленный на рис. 7.1 как категория S_n , является, вообще говоря, очень сложным функциональным пространством. Однако замечательное свойство организмов заключается в том, что из этой сложности возникает относительно простое упорядоченное поведение. Можно описать появление согласованности и простого поведения из многочисленных взаимодействий, которые имеют место на данном уровне организации, используя представление о кооперативных процессах или коллективных явлениях. Мы уже рассмотрели очень простой случай кооперативного поведения при изучении взаимодействия субъединиц в мультимерном белке в гл. 1. Теперь я опишу несколько более сложный и интересный пример

¹ Канада, Альберта, Эдмонтон, Университет штата Альберта, отделение математики.

кооперативного процесса, который иллюстрирует, как взаимодействия между единицами могут приводить к скачкообразным изменениям состояния, известным как фазовые переходы. Это послужит естественным введением к более общему описанию таких разрывов, известному под названием теории катастроф, которая была построена математиком Рене Томом и применяется для описания биологических процессов, особенно морфогенеза. Включение этой теории в общие рамки описания с помощью обратных предельных систем и процессов познания позволяет весьма полно рассмотреть процессы, протекающие в организмах. Конечная цель нашего анализа — понять суть процессов регенерации, в результате которых упорядоченные в пространстве и времени системы появляются в правильной последовательности из значительно более простых систем, обладающих потенциальной возможностью развития (например, развитие головастика из икринки). Эта возможность воплощена в полезных описаниях себя и окружающей среды, — описаниях, проявляющихся в пространстве и во времени при развитии.

Процесс, который я рассмотрю как пример фазового перехода, — это развитие возбудимости в биологических мембранах. Чтобы сделать пример конкретным и связать его с материалом, обсуждавшимся ранее, я остановлюсь на развитии метаболической возбудимости в мембране, аналогичной рассмотренной в волновой модели. (Этот вопрос исследован в работе Goodwin, 1974.) Из рис. 5.4 видно, что если плотность фермента E_1 слишком низка, волна активности не сможет распространяться, поскольку активности одной молекулы фермента будет недостаточно для возбуждения своих соседей. Точные соотношения между ферментами зависят от стехиометрии метаболической реакции, в ходе которой V превращается в U , от влияния V на равновесие между связанными и свободными ионами, от концентрации ионов, температуры и т. д. Плотность ферментов в мембране зависит от равновесия между скоростью их включения в структуру мембраны и скоростью деградации или разбавления (если формируется новая мембрана). Мы можем представить все эти факторы с помощью химического потенциала μ , так что плотность фермента будет определяться этой величиной.

Предположим, что в мембране имеются центры связывания фермента E_1 и что среднее их число на единицу площади постоянно. О природе таких центров и их распределении мы знаем очень мало. Как они расположены — упорядоченным образом, определяемым другими структурами в мембране, или случайно, — неизвестно. По-видимому, на самом деле центры расположены неким промежуточным образом между этими двумя крайними случаями: не случайно, но и не строго упорядоченно.

Такие соображения не влияют на качественную модель, которую мы строим, но они определяют геометрию распространения волны по возбудимой мембране, например влияют на то, как будут распространяться волны от точки возбуждения — в виде концентрических окружностей или в виде спиралей. Эти альтернативные следствия здесь не будут рассматриваться.

Для обозначения состояния участка мембраны i используем бинарную переменную e_i . Эта переменная принимает значения 0 или 1 в зависимости от того, свободен участок или занят соответственно. Модель аналогична известному в физике описанию конденсации решеточного газа, которое в свою очередь основано на модели ферромагнетизма Изинга, использующей приближение среднего поля. Это предполагает, что каждая единица в рассматриваемой системе (в нашем случае — фермент) находится в усредненном поле сил, обусловленном присутствием других единиц, и сущность метода заключается в том, чтобы найти уравнение, которое описывает это поле через его собственные компоненты (уравнение самосогласованного поля). Рассматриваемое нами поле обусловлено взаимодействиями, которые, как предполагается, имеют место между ферментами, связанными с мембраной, и ферментами, встраивающимися в нее, так как присутствие фермента на некотором участке способствует встраиванию другой молекулы фермента в мембрану на соседнем участке. Введем величину $\rho = \langle e_i \rangle$ — усредненную по всем центрам занятость центра. Пусть общее число занятых центров, т.е. молекул фермента в мембране, равно N , так что

$$\sum_{i=1}^S e_i = N,$$

т.е. сумма по всем центрам. И наконец, пусть взаимодействие между двумя ферментами E_i и E_j есть u_{ij} .

При определении средних значений в такой системе удобно использовать большое каноническое распределение, которое учитывает вариации и N , общего числа активных молекул фермента на мембране, и энергии системы, определяемой взаимодействиями. Для ознакомления с этими вопросами читатель может обратиться к книгам, рассматривающим модель Изинга и решеточный газ (например, Brout, 1965; Huang, 1963), где показано, что гамильтониан этой системы имеет вид

$$H = \frac{1}{2} \sum u_{ij} e_i e_j - N\mu. \quad (7.6)$$

Самосогласованное уравнение для ρ , которое получается из этого выражения с помощью большого канонического распределения, есть

$$(2\rho - 1) = \text{th} [\beta/2 (\rho u(0) + \mu)], \quad (7.7)$$

где $u(0)$ — преобразование Фурье суммы $\sum u_{ij}$, взятое в точке 0. Здесь сделано допущение, что поле взаимодействий везде одинаково, т. е. $u_{ij}(R)$ инвариантно относительно трансляции. Параметр β есть $1/kT$, где k — постоянная Больцмана, а T — абсолютная температура. Он входит в уравнение из-за принятого допущения, что средняя энергия постоянна, а следовательно, система находится при определенной температуре. Именно это допущение означает, что здесь мы имеем дело с системой, которая относительно рассматриваемых процессов равновесна. Таким образом, хотя известно, что мембраны в живых системах поддерживаются в нативном состоянии активным потоком энергии, мы тем не менее игнорируем это и трактуем процессы ассоциации и диссоциации ферментов с мембраной и взаимодействия между ферментами так, как если бы эти процессы были простыми химическими реакциями, характеризующимися определенным химическим потенциалом и тем, что члены, описывающие взаимодействия, постоянны. Таким образом, мы рассматриваем весь процесс с точки зрения химического равновесия. При условии, что потоки в системе достаточно малы, это приближение вполне приемлемо.

Остановимся теперь на следствиях, вытекающих из этой модели. Можно ли исходя из нее получить довольно резкий переход от состояния невозбудимости к состоянию возбудимости при данных значениях температуры T и химического потенциала μ , который определяет плотность молекул фермента на мембране? Пример перехода этого типа в развивающейся системе дают регенерирующие растения *Acetabularia*. Исследуя их электрофизиологическими методами, Новак и Бентрап (Novak, Bentrap, 1972) обнаружили, что спустя приблизительно 8—10 ч после начала процесса появляются спонтанные потенциалы действия, которые существуют затем на протяжении всего периода регенерации. Это проявление некой возбудимости в системе, хотя такая возбудимость может отличаться от описанной здесь.

Область на диаграмме состояния, описываемой уравнением (7.7), которая представляет интерес при изучении переходов такого типа между состояниями, известна под названием области сосуществования фаз. В газах это область, где может происходить переход от газа к жидкости, а в ферромагнетиках — где может появляться спонтанное намагничивание. Значение потенциала, при котором возможен переход в нашем случае, равно $\mu = -u(0)/2$. Поскольку μ определяется с точностью до произвольной постоянной, отрицательный знак здесь не существен. Это значение при подстановке в (7.7) дает нам уравнение

$$(2\rho - 1) = \tanh[\beta u(0)(2\rho - 1)]. \quad (7.8)$$

Если β достаточно велико (T достаточно мало), то это уравнение

имеет три корня, а при малых β оно имеет единственный корень, который является тривиальным решением, $2\rho - 1 = 0$, т. е. $\rho = 1/2$. Это ясно из рис. 7.2, где прямая $y = 2\rho - 1$ и кривая $y = \text{th} [1/4 \beta u(0) (2\rho - 1)]$ построены в одних и тех же координатах. Для кривой I значение β , которое определяет наклон гиперболического тангенса, при $\rho = 1/2$ больше 2, в то время как для кривой II ситуация обратная. Критическое значение β (назовем его $\beta_{кр}$, а соответствующее значение $T - T_{кр}$) дает значение наклона в этой точке, равное 2.

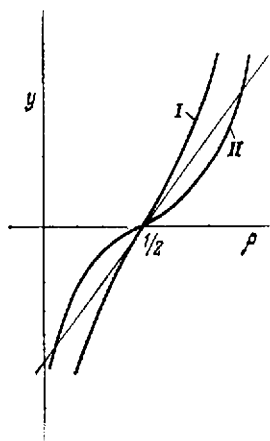


Рис. 7.2. Графики функций $y = 2\rho - 1$ и $y = \text{th} [1/4 \beta u(0) (2\rho - 1)]$, показывающие, как изменения β вызывают появление множественных решений для ρ согласно уравнению (7.8).

Если теперь мы отложим ρ как функцию T , то получим кривую, показанную на рис. 7.3. Выше критической температуры $T_{кр}$ существует только один корень $\rho = 1/2$, который представляет неопре-

деленное состояние мембраны: ни возбудимое, ни невозбудимое. А ниже $T_{кр}$ состояние мембраны может изменяться от возбудимого до невозбудимого в зависимости от ρ , среднего поля взаимодействия. Таким образом, если система вначале находится в точке P в невозбудимой области и ρ увеличивается (с мембраной связывается все больше молекул фермента), то система окажется в точке P' на кривой фазового равновесия. Это неустойчивая точка, и система быстро перейдет в Q' , оказавшись при этом в области возбудимости. Когда температура уменьшается, переход от невозбудимости к возбудимости

совершается при все меньших и меньших значениях ρ среднего поля возбудимости, т. е. тепловой шум все меньше и меньше влияет на процессы, приводящие к возбуждению.

Ясно, что в биологической системе имеется также и нижняя температурная граница зоны возбудимости, т. е. кривая фазового равновесия должна быть замкнутой, если процесс потери возбудимости тоже является фазовым переходом. Это можно смоделировать, вводя дополнительные предположения, скажем о зависимости величин $u(0)$ и μ от температуры при низких значениях T , однако большого смысла в этом нет, поскольку экспериментальные данные по таким переходам в биологических системах весьма немногочисленны; возможно, здесь начинают играть роль факторы совершенно иной природы, чем рассмотренные выше. В действительности мы не знаем, можно ли считать спонтанное появление потенциалов действия в *Acetabularia*

laria фазовым переходом, так как температурная зависимость процесса, насколько мне известно, не изучена. Такое исследование было бы очень интересно провести. Однако главная цель построения модели состоит в том, чтобы проиллюстрировать, каким образом в системах, состоящих из многих взаимодействующих единиц, могут происходить скачкообразные изменения

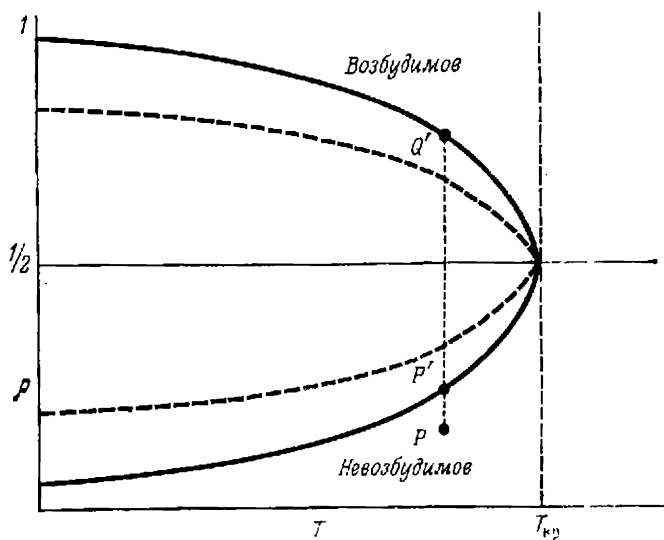


Рис. 7.3. Кривая фазового равновесия для невозбудимого и возбудимого состояний мембраны ниже критической температуры $T_{кр}$ согласно модели, описанной в тексте.

состояния и как их можно исследовать аналитически. Концепция среднего поля дает особенно простой способ демонстрации того, каким образом кооперативные взаимодействия (в данном случае ансамбля белковых молекул в мембранах) могут приводить к резким изменениям режима работы, имеющим биологическое значение. Основной вывод, который можно сделать из этого рассмотрения, состоит в том, что многие из наиболее значительных изменений состояния, происходящих в биологических системах, относятся именно к этому общему типу: морфогенез и свойства биологических систем характеризуются скачкообразными изменениями, и эти изменения в известной степени управляемы и упорядоченны. Разрывы возникают как динамическое изменение состояния устойчивой в целом и регулируемой системы, стабилизируемой более непрерывными гомеостатическими механизмами, чем ранее рассмотренные в этой книге. Резкие изменения состояния, происходящие в рамках отдельного уровня

иерархии C_n , приведут на этом уровне к образованию новых коллективных переменных, так что «сигналы», переданные с помощью функции F_n , изменятся. В рассмотренном выше примере до появления у мембраны возбудимости в системе не может распространяться никаких метаболических волн и, следовательно, на языке волновой модели гл. 5 не образуется никаких градиентов. Таким образом, до тех пор, пока не произойдет этот фазовый переход, в системе не может генерироваться никакого пространственно-упорядоченного сигнала, и в ней существует только некое пространственное распределение, соответствующее изначально имеющемуся в системе распределению сигнала. Это распределение может быть весьма существенным, но оно носит мозаичный характер и не сможет осуществлять регуляцию. Однако, когда мембраны становятся возбудимыми, поведение метаболической системы становится качественно иным — в ней распространяется метаболическая волна, несущая регулируемую пространственно-упорядоченную информацию в форме связанных с мембраной градиентов, которая способна управлять изменениями эпигенетического состояния. Итак, теперь понятно, каким образом фазовые переходы могут сформировать важную особенность генеративного процесса, который мы называем развитием, и как они вписываются в рамки схемы рис.7.1: это переходы между дискретными состояниями в пределах отдельных уровней или всей иерархии, что в результате кооперативных взаимодействий между единицами приводит к упрощению динамики.

Фазовые переходы и теория катастроф

Описанная выше модель перехода от невозбудимого состояния мембраны к возбудимому по существу идентична модели, используемой для описания конденсации газа. Она дает простейшее «микроскопическое» описание этого процесса. Существует более феноменологический, или макроскопический, подход к этой проблеме, основанный на законе Ван-дер-Ваальса для неидеального газа, где вводится малый поправочный член для учета несжимаемости молекул газа. Уравнение состояния для неидеального газа имеет вид

$$\left(p + \frac{a}{V^2}\right)(V - b) - NkT = 0. \quad (7.9)$$

Зависимости p от V при различных значениях T графически представлены на рис. 7.4. При некотором значении T , названном критической температурой $T_{кр}$, наклон кривой в точке перегиба равен нулю. Выше этой температуры существует однозначная зависимость между p и V , а ниже ее для любого заданного в некоторой области значения p существуют три значе-

ния V . Это область конденсации, в которой газ при постоянных давлении и температуре внезапно переходит в жидкость с быстрым изменением объема. Правило, используемое для определения точки фазового перехода, известно под названием соглашения, или правила Максвелла. Оно состоит в том, что через

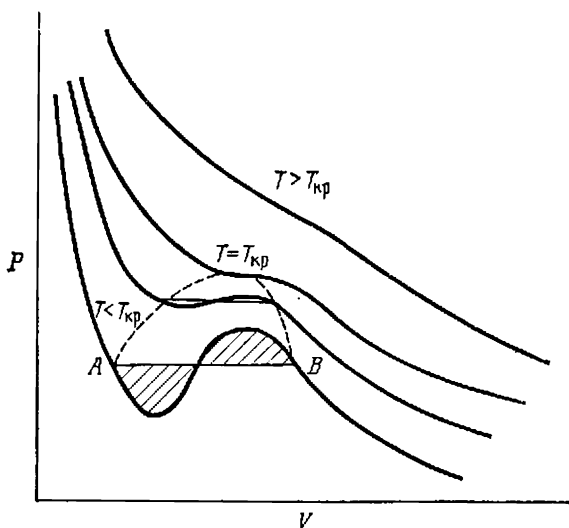


Рис. 7.4. Зависимости давления неидеального газа от объема, иллюстрирующие использование правила Максвелла для определения области конденсации.

кубическую параболу проводится прямая так, чтобы отсекаемые ею сверху и снизу площади были равны. На рис. 7.4 это прямая AB . Она определяет давление p , при котором происходит конденсация газа для данной кривой (т. е. для данной температуры). Кривая, соединяющая точки, в которых такие прямые пересекают все семейство кривых p, V , есть кривая фазового равновесия; она показана пунктиром на рис. 7.4 и имеет тот же вид, что и на рис. 7.3. Связь между этими кривыми станет очевиднее, если рассмотреть трехмерную поверхность в координатах p, V, T (рис. 7.5). Эта поверхность имеет складку, которая начинается при критической температуре $T_{кр}$. Кривая фазового равновесия показана пунктиром, а проекция этой кривой на плоскость T, V имеет совершенно такую же форму, как и кривая, изображенная на рис. 7.4. При описании конденсации решеточного газа переменная p означала плотность, которая обратно пропорциональна V , поэтому форма кривой остается по существу такой же, что и на проекции в плоскости T, V . Этот вопрос обсуждается в любом учебнике, где рассматриваются

фазовые переходы, но наиболее полно это сделано в работе Стенли (Stanley, 1971).

Поверхность, изображенная на рис. 7.5, принадлежит семейству поверхностей, которые могут быть описаны уравнением

$$x^3 + u_1 x + u_2 = 0, \quad (7.10)$$

где u_1 и u_2 — параметры, которые могут принимать различные значения. Уравнение Ван-дер-Ваальса, записанное через пере-

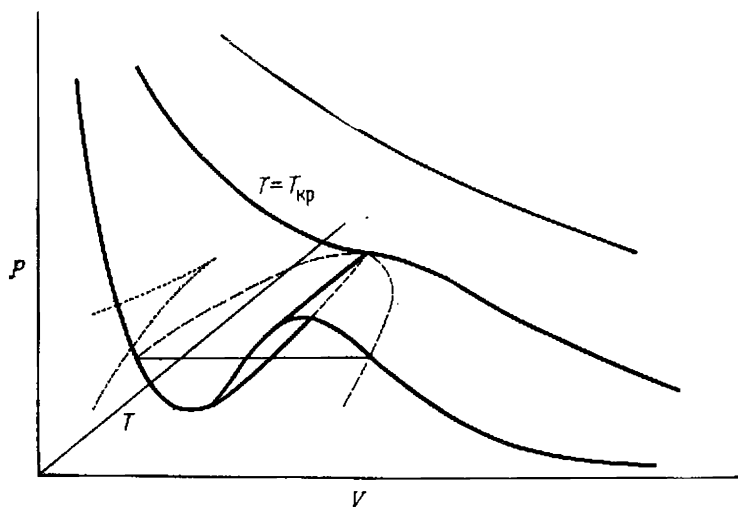


Рис. 7.5. Поверхность в координатах (P, V, T) для газа вблизи критической температуры; показана кривая фазового равновесия, ограничивающая зону множественных корней.

менные, начало координат которых лежит в критической точке поверхности $(p_{кр}, T_{кр}, V_{кр})$, имеет вид

$$x^3 + \frac{1}{3} (8t + y) x + \frac{1}{3} (8t - 2y) = 0,$$

где $y = p - p_{кр}$, $x = 1/V - 1/V_{кр}$, $t = T - T_{кр}$. Впервые в таком виде уравнение Ван-дер-Ваальса было записано Фаулером (Fowler, 1972), когда он анализировал его с точки зрения теории катастроф. Здесь

$$u_1 = \frac{1}{3} (8t + y) \quad \text{и} \quad u_2 = \frac{1}{3} (8t - 2y).$$

Если уравнение (7.10) проинтегрировать относительно переменной x , мы получим выражение

$$V(x) = \frac{x^4}{4} + \frac{u_1 x^2}{2} + u_2 x, \quad (7.11)$$

считая, что постоянная интегрирования равна нулю. Эта функция была названа Томом (Thom, 1970, b) универсальной деформацией сборки или катастрофой Римана—Гюгонио, зародыш или организующий центр которой равен $x^4/4$. В теории Тома существуют семь элементарных катастроф; каждая из них определяется в терминах потенциальной функции, аналогичной функции V в уравнении (7.11), и приводит к своей особой поверхности. Основное утверждение этой теории сводится к тому, что определенные биологические процессы могут быть описаны в терминах работы сил, приводящих систему к минимуму потенциальной поверхности, как это обычно делается в физике. Поверхность, изображенная на рис. 7.5, представляет собой поверхность, по которой «движется» газ при изменении параметров, т. е. на этой поверхности газ находится в состоянии равновесия. При изменении одной из переменных другие меняются согласно уравнению (7.10), полученному из уравнения (7.11) дифференцированием по x и приравниванием этой производной нулю для определения экстремумов

$$\frac{dV}{dx} = x^3 + u_1x + u_2 = 0,$$

что возвращает нас к уравнению (7.10). Таким образом, Том представляет динамический процесс, например поведение газа при различных значениях давления, объема и температуры, как процесс, описываемый поверхностью, полученной из универсальной деформации элементарной катастрофы. Все приведенные выше рассуждения были не более чем описанием известных в физике фактов в новых математических терминах. Мы увидели, что на поверхностях состояний существуют некие представляющие особый интерес области, такие, которые определяют зоны сосуществования критических явлений, например зоны фазовых переходов. Это области, где имеются множественные корни (в данном случае три). Математически они определяются экстремумами поверхности, изображенной на рис. 7.5. Существование множественных корней V имеет место везде, где p и T лежат в области сборки, которая получается при проецировании экстремумов поверхности на плоскость p, T , как это показано на рис. 7.5. Это область, в пределах которой могут происходить фазовые переходы типа ударной волны согласно терминологии Тома. Такие ударные волны он рассматривает как необходимую основу формообразования, точно так же как фазовый переход газ — жидкость описывает изменение в морфологии газа.

Одной из проблем этой теории является вопрос о том, как интерпретировать поведение системы в окрестности математической особой точки. Мы уже видели подобный пример — правило Максвелла, но известны и другие рассмотренные Фаулером

(Fowler, 1972) примеры. Том (Thom, 1970 a) также обсуждает правило Максвелла, его недостатки и возможность другой физической интерпретации математических особенностей. Им рассмотрен вопрос о флуктуациях и об их представлении в терминах теории катастроф. Весьма интересная работа о чисто динамической интерпретации теории катастроф опубликована Зиманом (Zeeman, 1972). Однако наибольшая трудность в приложении теории катастроф к морфогенетическим процессам, мне кажется, состоит в проблеме интерпретации не динамических аспектов теории, а ее пространственных результатов. Том (Thom, 1970 b) дает и пространственную, и временную интерпретации элементарных катастроф. Они основаны на предположении, что пространственные переменные входят в параметры, описывающие деформацию, характерную для данной катастрофы. При этом не вводится никаких правил интерпретации и существует полная свобода выбора, хотя сама пространственная интерпретация подразумевает некоторые ограничения на способ, которым пространственные переменные включаются в функции. Так, например, Том (Thom, 1970 b) использует катастрофу ласточкина хвоста для описания процесса гастрюляции у амфибий, однако можно показать, что в этом случае для описания процесса вполне достаточна катастрофа сборки, развертывающаяся в рамках определенной пространственной геометрии. Именно это и было показано позже Зиманом (Zeeman, 1974).

Я думаю, что единственный способ подойти к решению этой проблемы состоит в том, чтобы применить теорию катастроф к некоторым биологическим процессам и посмотреть, действительно ли они дают полезные описания (т. е. посмотреть, помогают ли они нашей собственной познавательной деятельности). Тогда оценка ситуации, в которой они используются, может дать соответствующие правила их интерпретации. Отметим, что название «теория катастроф» не очень удачно; оно отражает небιологические последствия динамических разрывов, а все дело в том, что разрывы приводят к беспорядку, а не сопутствуют увеличению упорядоченности. В инженерном смысле это название кажется вполне уместным, что и показали очень интересные исследования Томпсона (Thompson, 1975), но в биологии разрывы состояния, лежащие в основе морфогенеза, ни в каком смысле не являются катастрофическими. До тех пор пока биологи будут применять теории, являющиеся результатом небιологических исследований, они будут испытывать эти терминологические неудобства. Те же замечания относятся и к теории диссипативных структур, разработанной Глансдорфом и Пригожиным (Glansdorff, Prigogine, 1971). Термин «диссипативный» возник в результате применения термодинамического подхода, для ко-

торого объектом исследования является замкнутая система, к открытой, далекой от равновесия системе, для которой необходимо «диссипативное» описание. Все реальные системы в действительности открытые; замкнутость — это удобный способ описания, а биологические системы не только открытые, но и упорядоченные. Диссипация энергии — аксиоматическое свойство открытой системы, но оно не дает понимания причин биологической упорядоченности. Я надеюсь, что при построении теории процессов генерации в познающих системах удастся найти более подходящий язык для описания биологической организации и освободиться от нечеткой терминологии теории катастроф и диссипативных структур.

Коллективные моды в ритмических процессах

Рассмотрим способы описания некоторых видов временной упорядоченности, которые уже анализировались в предыдущих главах с помощью потенциальных функций, относящихся к семействам элементарных катастроф. Пусть мы имеем непрерывную культуру бактерий, растущую в хемостате и синхронизированную с помощью периодического добавления фосфата (гл. 4). Синхронность в такой культуре (Goodwin, 1969 c) контролируется интенсивностью периодического стимула, которую можно охарактеризовать параметром λ . Суть этого процесса состоит в том, что при некотором значении параметра клеточные деления в системе начинают происходить синхронно, и эта синхронность растет с увеличением λ . Частота синхронных изменений числа клеток определяется условиями роста в хемостате, генетическими характеристиками клеток и частотой периодической вынуждающей функции. Для описания появления периодичности в популяции воспользуемся потенциальной функцией одной переменной, которая задает амплитуду коллективных мод колебаний в культуре, т.е. среднюю амплитуду вынужденных колебаний. Такая функция имеет вид

$$\phi(r) = -a(\lambda - \lambda_{кр})r^2 + br^4, \quad (7.12)$$

где r — амплитуда моды, $\lambda_{кр}$ — критическое значение вынуждающего параметра, а a и b — положительные константы. Эта потенциальная функция была использована для описания появления коллективной моды в лазере в ответ на воздействие внешнего источника энергии — лампы накачки (Graham, 1973¹), — процесс, совершенно аналогичный рассматриваемому. Из урав-

¹ Я весьма обязан д-ру Мануэлю Берондо из Института физики Национального автономного университета Мехико за ознакомление меня с этой работой.

нения потенциальной функции (7.12) мы можем получить динамику r , амплитуды синхронных колебаний, обычным методом получения дифференциальных уравнений с помощью потенциальных функций, а именно

$$\frac{dr}{dt} = -\frac{\partial \phi}{\partial r} = 2a(\lambda - \lambda_{кр})r - 4br^3 = 2r[a(\lambda - \lambda_{кр}) - 2br^2].$$

Очевидно, если $\lambda \leq \lambda_{кр}$, устойчивым стационарным решением будет $r = 0$; в этом случае никакой макроскопической, характерной для всей популяции амплитуды не существует. Но если $\lambda > \lambda_{кр}$, устойчивое решение есть

$$r = \sqrt{\frac{a(\lambda - \lambda_{кр})}{2b}}.$$

Для описания колебаний нам нужны две переменные; в качестве второй можно взять частоту ω . Поскольку она не входит в потенциальную функцию, мы имеем

$$\frac{d\omega}{dt} = -\frac{\partial \phi}{\partial \omega} = 0,$$

откуда ω есть константа, определяемая факторами, описанными выше. Уравнение (7.12) относится к тому же семейству, что и уравнение, используемое для описания конденсации газа (7.11), и характеризуется катастрофой сборки, или Римана — Гюгонио, с той лишь разницей, что из соображений симметрии в отношении колебаний один из параметров деформации, u_2 , необходимо принять равным 0. В результате потенциальная функция описывает не ударную волну, а только бифуркацию, определяемую параметром u_1 и интерпретируемую как фазовый переход.

Динамическое описание системы можно сделать более общим, что позволит включить в процесс случайные флуктуации, если просто ввести в уравнение потенциальной функции (7.12) член ci^2 (где $i = dr/dt$), в котором c — параметр, определяющий размеры флуктуаций. Можно также вывести функцию распределения вероятности для этой системы, которая является решением уравнения Фоккера — Планка, при условии, что процесс удовлетворяет некоторым требованиям. Этот метод описан Грэхэмом (Graham, 1973), я же хочу только отметить, что равновесная функция распределения, аналогичная используемой в статистической механике, имеет хорошо знакомый вид

$$P = Ne^{-\phi}, \quad (7.13)$$

где N — нормировочная константа. С помощью этой функции можно получить любые необходимые статистические характеристики процесса синхронизации. Сходство между этим методом и подходом, принятым в статистической механике, теперь

очевидно, хотя мы имеем дело с системой, далекой от термодинамического равновесия. В этой трактовке обобщенная функция $\phi(r, \dot{r})$, очевидно, играет роль гамильтониана. Заметим, что макроскопическая переменная, аналогичная температуре, которая входит в уравнение (7.8) в виде $\beta = 1/kT$, здесь отсутствует вследствие предположения, что переход мембраны из невозбужденного состояния в возбужденное является равновесным процессом. При выводе уравнения (7.13) для системы, которая далека от термодинамического равновесия, можно обойтись без этого ограничения, хотя другие требования, связанные с марковской природой флуктуаций и стационарностью значений параметров, должны быть удовлетворены. Мне кажется, что возможность использования потенциальных функций теории катастроф в рамках этого обобщенного динамического подхода имеет большое значение, поскольку позволяет построить макроскопическое описание биологических процессов, обладающее многими свойствами равновесной термодинамики, но при этом строго применимое к поведению открытых систем. Основной слабостью трактовки неравновесных процессов Гландорфа — Пригожина является, на мой взгляд, именно отсутствие наглядных потенциальных функций, что превращает ее по существу в применение теории устойчивости для описания сложных биологических процессов.

Способ описания, использующий уравнение потенциальной функции (7.12) или его стохастический вариант, применим и к другим популяционным ритмам, таким, как суточный ритм митотической активности в эпидермисе млекопитающих, где в качестве синхронизирующего периодического сигнала выступает концентрация адреналина (Bullough, Laurence, 1964), или появление циркадного ритма в популяции в результате захвата периодической внешней силой, т. е. пейсмекером (водителем ритма). Во всех таких ситуациях имеется внешний параметр, управляющий возникновением коллективного ритма, частота которого определяется целым рядом факторов, включая и частоту вынуждающей функции. Интересно выяснить, как следует модифицировать это описание при рассмотрении цикла клеточного роста и деления отдельных клеток. В этом случае рост также управляется внешним параметром, например концентрацией скорость-лимитирующего компонента питания в среде культивирования, но при этом частота клеточного цикла не определяется только периодической вынуждающей функцией, а задается динамикой всей системы. Попытаемся описать это феноменологически.

Допустим, что переход отдельной клетки от нерастущего состояния к растущему вызывает появление коллективной или кооперативной периодичности среди различных функциональных

цепей управления или познающих единиц растущей клетки, причем этот переход происходит в тот момент, когда концентрация скорость-лимитирующего компонента питания поднимается выше некоторого порогового значения. При этом мы не будем рассматривать никаких деталей микроскопической или молекулярной динамики взаимодействующих процессов, которые лежат в основе появления этой макроскопической периодичности, проявляемой как рост и деление клетки и ее потомства. Как и прежде, для описания динамического фазового перехода будет использоваться потенциальная функция, которая зависит от двух переменных — амплитуды моды r и частоты ω . Амплитуда характеризует когерентность коллективных колебаний, в то время как ω — их частоту, причем в этом случае нужны обе переменные. Это заставляет нас рассматривать потенциальные функции Тома с двумя переменными, названными омбилическими. Первая из этих функций — гиперболическая омбилическая точка с потенциальной функцией

$$\phi(r, \omega) = r^3 + \omega^3 - \lambda r \omega - ur - v \omega, \quad (7.14)$$

что дает следующие уравнения, описывающие динамику системы:

$$\begin{aligned} \frac{dr}{dt} &= -\frac{\partial \phi}{\partial r} = -3r^2 + \lambda \omega + u, \\ \frac{d\omega}{dt} &= -\frac{\partial \phi}{\partial \omega} = -3\omega^2 + \lambda r + v. \end{aligned} \quad (7.15)$$

Эти уравнения можно использовать для описания предельного цикла с амплитудой r и частотой ω , причем и амплитуда, и частота устойчивы к возмущению. Удобно принять $u=0$ и считать λ управляющим параметром, который является функцией концентрации лимитирующего компонента питания. Соображения, высказанные в гл. 4, относящиеся к росту клеток в управляемых условиях, приводят к выражению

$$\lambda(s) = \frac{\mu_m s}{K_m + s} - k, \quad (7.16)$$

где первый член — хорошо знакомое выражение Моно для роста клеток на лимитирующем субстрате s , а константа k определяет критическое значение s (назовем его $s_{кр}$), при котором начинается рост. Это значение является корнем уравнения $\lambda(s)=0$, откуда

$$s_{кр} = \frac{kK_m}{\mu_m - k}.$$

Стационарные значения r и ω определяются из системы

$$\left. \begin{aligned} -3r^2 + \lambda \bar{\omega} &= 0, \\ -3\bar{\omega}^2 + \lambda \bar{r} + v &= 0. \end{aligned} \right\} \quad (7.17)$$

Очевидно, если $\lambda = 0$, то $\bar{r} = 0$; это означает, что в системе не существует коллективных или когерентных колебаний, так как нет роста. Для $\lambda < 0$ действительных решений не существует, поэтому справедлива та же самая интерпретация. Колебания в отдельных цепях управления в нерастущей клетке могут при этом продолжаться, но характер взаимодействий будет таков, что никаких коллективных колебаний во всей клетке не будет. Интересное следствие, вытекающее из этой точки зрения на переход от покоя к росту, заключается в том, что у некоторых эпигенетических или метаболических переменных могут существовать характерные частоты, не совместимые с коллективным периодическим поведением целой клетки, так что, воздействуя на внутриклеточные переменные с определенными частотами (скажем, периодически изменяя pH в культуре), можно рассогласовать динамику процессов и остановить рост.

Ясно, что скорость роста клетки будет прямо пропорциональна частоте коллективных колебаний в цепях управления; поэтому мы примем

$$\mu = C\omega, \quad (7.18)$$

где μ — скорость роста, а C — константа. Точно так же, как это было сделано выше, можно получить стохастическое описание феноменологических процессов, введя в потенциальную функцию члены $c\dot{r}^2$ и $d\dot{\omega}^2$, где c и d — постоянные, и получить распределение вероятности, которое позволяет определить статистические свойства системы. Тогда можно вычислить средние и дисперсии переменных системы, а также, если потребуются, и более высокие моменты. Средние значения r и ω будут равны их стационарным значениям; поэтому из уравнения (7.18) мы находим, что

$$\bar{\mu} = C\bar{\omega}.$$

Теперь, если положить $v = 0$, мы найдем, что $\bar{\omega} = \lambda/3$, так что

$$\bar{\mu} = \frac{C\lambda}{3} = C' \left(\frac{\mu_m s}{K_m + s} - k \right). \quad (7.19)$$

Эмпирическое соотношение, которое используется для описания роста клеток в хемостате, есть

$$\mu = Y(Q - M), \quad (7.20)$$

где Y — константа выхода, определенная в гл. 4, Q — скорость потребления лимитирующего компонента питания, а M — постоянная поддержания, т. е. количество этого компонента питания, необходимое в единицу времени для поддержания клетки в жизнеспособном состоянии без роста. Эта величина в гл. 4 не рассматривалась, поскольку она дает лишь малую поправку,

но она необходима для точного описания процесса роста. Члены уравнения (7.19) легко идентифицировать с помощью (7.20), так что используемая модель приводит к известному выражению. Это обусловлено определением λ как параметра деформации потенциальной функции, а также характером зависимости этого параметра от концентрации лимитирующего компонента питания.

Если рассматривать клеточную синхронизацию, с одной стороны, и процесс роста — с другой, как фазовые переходы, описываемые феноменологическими потенциальными функциями, то важной особенностью последнего процесса окажется трактовка амплитуды и частоты как переменных с устойчивой динамикой, которая определяется уравнениями (7.15). Эти уравнения обладают свойствами, необходимыми для описания системы с предельным циклом, так как возмущение, которое увеличивает амплитуду по сравнению со стационарным значением, приводит к появлению отрицательной скорости изменения амплитуды и положительной скорости изменения частоты и наоборот. Именно этот тип устойчивости следует из экспериментов Кауфмана и Вилле (Kauffman, Wille, 1975) по анализу митотического цикла у *Physarum* и подобных им исследований. Переменные r и ω , использованные выше, при этом оказываются средними для полного цикла значениями радиальной координаты и угловой скорости $d\theta/dt$.

Чтобы распространить анализ на случай, когда взаимодействия между растущими клетками приводят к спонтанной синхронизации, необходимо ввести члены, описывающие это взаимодействие. Предположим, что динамика каждой клетки описывается такой же потенциальной функцией $\phi_i(r_i\omega_i)$, как в уравнении (7.14), где индекс относится к i -й клетке популяции. Кроме того, между клетками существуют взаимодействия, которые приводят к следующей потенциальной функции для популяции:

$$\begin{aligned} & \phi(r_1, r_2, \dots, r_n; \omega_1, \omega_2, \dots, \omega_n) = \\ & = \sum_{i=1}^n (r_i^3 + \omega_i^3 - \lambda_i r_i \omega_i - u_i v_i - v_i \omega_i) - \frac{1}{2} \sum a_{ij} \cos(\omega_i - \omega_j). \quad (7.21) \\ & [a_{ij} = a_{ji}]. \end{aligned}$$

Это дает динамические уравнения

$$\begin{aligned} \frac{dr_i}{dt} &= -3r_i^2 + \lambda_i \omega_i + u_i, \\ \frac{d\omega_i}{dt} &= -3\omega_i^2 + \lambda_i r_i + v_i - \sum_{j=1}^n a_{ij} \sin(\omega_i - \omega_j). \end{aligned}$$

Взаимодействие стремится привести клетки в состояние синхронности, когда $\omega_i = \omega_j$. Обобщая динамику системы обычным способом, т.е. включая в рассмотрение флуктуации, можно описать синхронные колебания популяции при наличии шумов.

Эти примеры иллюстрируют ценность феноменологических потенциальных функций при описании нелинейных сложных процессов в биологических системах, проявляющих коллективные или кооперативные свойства. В описанных выше примерах временной организации никаких скачкообразных изменений состояния, аналогичных процессу конденсации газа или переходу из невозбудимого состояния в возбудимое, не рассматривалось, так что зоны появления «ударных волн» в соответствующих потенциальных функциях отсутствуют. Однако эти функции, вообще говоря, пригодны для описания скачкообразных переходов из одного стационарного состояния в другое в соответствии с некоторыми правилами, скажем, правилом Максвелла. Пример поведения такого типа дает развитие *Dictyostelium discoideum*, где частота пейсмекера изменяется довольно резко примерно от 1 имп/10 мин до 1 имп/5 мин (Durstion, 1974). Такой разрыв частоты можно описать, воспользовавшись понятием области деформации типа складки в уравнении потенциальной функции (7.14), приводящей к скачку с одного участка поверхности на другой при движении вдоль оси частоты, как это происходит в случае конденсации газа при движении вдоль оси V . Временные разрывы такого типа для процесса развития до сих пор не известны, но они, конечно, представляют важное свойство системы, аналогичное внезапному изменению частоты, связанному с изменениями режима работы, например при переходе от ходьбы к бегу. Некоторые данные о связи между процессами, лежащими в основе эмбриогенеза и поведения, будут рассмотрены ниже.

Разрывы состояния вдоль пространственной оси возникают таким же образом, как и разрывы во времени, но в этом случае один из параметров деформации потенциальной функции представляет пространство. Зиман (Zeeman, 1974) дал исчерпывающее описание этого метода применительно к гастрюляции амфибий и к кульминации у миксомицетов, используя катастрофу сборки. Вдоль пространственной оси состояние клеток изменяется монотонно в соответствии с градиентом морфогена, так что аналогом критической температуры в этом случае является критическое значение концентрации морфогена в какой-то точке пространства, за которой может произойти скачкообразное изменение состояния клетки. Тогда между этими двумя областями возникает граница, по разные стороны которой клетки находятся в разных состояниях, и образуются пространственно организованные дифференцированные зоны; эта граница аналогична

той, которая отделяет презумптивную мезодерму от эктодермы или хрящ от мышцы. Особенно интересным моментом в подходе Зимана является его вывод о том, каким образом волны изменения состояния перемещаются по развивающейся ткани в области, где возникает разрыв, останавливаясь на границах, которые определяются градиентом морфогена. Функции, используемые для описания этих разрывов, могут дать некоторую информацию о геометрии разрывов, но ничего не говорят об общих свойствах ткани, где возникает такая управляемая разрывность, поэтому ограничения метода очевидны. Для полного описания процессов нужна подлинно общая теория генерации формы в живых системах, которая требует, на мой взгляд, совершенно иного подхода к биологической упорядоченности, в корне отличающегося от современного, где основное внимание уделяется локальным взаимодействиям и межмолекулярным силам, с которыми мы и имели дело в этой книге. Однако математическое описание сложных переходов между состояниями и включение этого описания в теорию неравновесных динамических процессов с макроскопическими функциями распределения вероятностей очень полезно — оно помогает нам правильно трактовать основные качественные особенности эпигенетических и морфогенетических процессов. Кроме того, можно обобщить эти методы путем включения в описание распространения волн активности, рассматриваемого как процесс перемещения разрывов, в результате чего общую картину эмбриогенеза, представленную в гл. 5 и 6, удастся описать и проанализировать математически. Тогда этот подход можно будет встроить в общую структуру обратных предельных систем, описанных в начале главы, что позволит выявить познавательный смысл всего процесса развития. Заканчивая главу, я хотел бы рассмотреть некоторые наиболее общие выводы из этого подхода.

Процессы генерации в познающих системах

Наличие коллективных динамических мод и пространственных разрывов в сложной системе, обусловленных наличием определенной схемы взаимодействий между элементами на некотором уровне организации и описываемых как фазовые переходы, весьма упрощает язык, которым пользуется система, информируя себя о своем собственном состоянии и определяя последующие превращения. Эти моды являются мерой познавательной способности, поскольку они сигнализируют о появлении полезной упорядоченности в системе, которая выражается в коррелированном поведении, и действуют вместе или по отдельности как входы и/или ограничения для дальнейшего развития. Тогда эмбриогенез можно рассматривать как постепенное упорядочен-

ное проявление знания, заложенного в яйце. Это знание окружающих условий и самого себя приводит к появлению жизнеспособного организма. Таким образом, обратная предельная система, изображенная на рис. 7.1, возникает по мере развития одного уровня за другим и по мере того, как взаимодействия между уровнями и внутри них приводят с помощью управляемого появления фазовых переходов к пространственной и временной организации, что обуславливает упорядоченность клеточных состояний в пространстве и коллективное ритмическое поведение во времени. Конечно, эти процессы необходимо рассматривать не сами по себе, а во взаимосвязи. Например, в волновой модели фазовый переход к возбудимому состоянию мембраны (пространство) генерирует ритмические распространяющиеся волны активности (время и пространство), образующие градиент (пространство), который определяет скорость клеточной дифференцировки (время), что приводит к возникновению упорядоченных пространственных разрывов. Ясно, что при таком описании любое разделение понятий позиционной информации и явлений, возникающих при ее интерпретации, является искусственным, так как на самом деле имеет место непрерывный процесс, разворачивающийся в четырехмерном пространстве. Нужны модели, которые охватывают эту четырехмерность эмбриогенеза и в то же время учитывают тот факт, что развивающийся организм подвергается превращениям, которые ограничиваются филогенетической историей вида и необходимостью генерировать динамическую структуру, способную к выживанию и воспроизведению при данных условиях окружающей среды. Эти ограничения определяют знание или полезные описания, содержащиеся в структуре самого эмбриона в виде гомеостатических цепей управления, мембран, которые могут становиться возбудимыми, кинетических взаимодействий, которые приводят к когерентной ритмической активности и распространяющимся волнам, цепей управления генами, которые работают как переключатели, и т.д. Язык познания развивающегося организма есть набор команд, упорядочивающих эти процессы в пространстве и времени. Эти команды обычно представляют собой концентрации веществ, на которые система отвечает или непрерывным изменением, как это имеет место в цепях управления, или скачкообразным переходом из одного состояния в другое. Последнее происходит в тот момент, когда концентрации превышают пороговые значения, определяемые критическими значениями некоторых управляющих параметров, или параметров деформации, что приводит к инициации специфических фазовых переходов.

Аналогично взаимодействиям между единицами, находящимися на одном уровне разворачивающейся иерархии, будут

существовать взаимодействия и между разными уровнями в обоих направлениях, усредняющие и коррелирующие в одном и контролирующие и ограничивающие в другом. Эта картина самоорганизующейся системы с непрерывной, в целом устойчивой динамикой, в пределах которой происходят управляемые, упорядоченные в пространстве и времени разрывы, уже близка к системе, удовлетворяющей требованиям аналого-цифровой или синтетически-аналитической двойственности, которая, как мне кажется (Goodwin, 1968, 1970), должна быть непременно присуща любой адекватной модели биологических процессов. Позже Патти (Pattee, 1974) высказал мнение, что свойства непрерывности и дискретности или динамичности и символичности биологических систем могут быть причиной разумного поведения, т. е. сделал предположение, весьма близкое точке зрения на организмы как на познающие системы.

Помимо взаимодействий в самом организме, о которых шла речь выше, необходимо учитывать также его взаимодействия с внешним миром, все более разносторонние по мере развития эмбриона. С формированием у животного органов чувств в системе появляются специфические переменные, которые действуют как регуляторы поведения, инициируя переключения и переходы модальности, аналогично тому, как это происходит в процессе развития. Именно на данном этапе возникает важная особенность описания организмов как познающих систем. Эта концепция неявно полагает, что принципы организации развития и поведения представляют собой нечто единое. Последнее обычно рассматривается как часть сферы познания, так как в основе любых действий взрослых организмов, согласно общепринятой точке зрения, лежит знание, либо приобретенное, либо врожденное. При этом поведение может быть (да в сущности и было) описано как неразрывно связанное с более высокой познавательной активностью, к сфере которой относятся такие виды деятельности, как творчество, решение определенных задач, речь и т. д. Таким образом, данная точка зрения на активность организмов в действительности предполагает непрерывность структурных и функциональных принципов, охватывающую все уровни органической материи и объединяющую живую природу и разум в некий континуум. Такое следствие естественным образом вытекает из взглядов, изложенных в этой главе, и мы его сейчас вкратце рассмотрим. В других своих работах (Goodwin, 1973, 1975) я указывал, какое значение оно может иметь применительно к поведению.

Вернемся еще раз к некоторым экспериментальным данным, описанным в гл. 5. При развитии *Dictyostellium* из пейсмейкерных центров распространяются периодические волны выделения акразина, которые лежат в основе механизма, управляющего

агрегацией клеток, первой стадией развития организма. После завершения агрегации и образования слизевика пейсмеркерные клетки продолжают оставаться активными, функционируя теперь как передний конец мигрирующего слизевика и управляя его движением (Cohen, Robertson, 1972). Во время последней фазы процесса развития — выпрямления плодового тела — снова наблюдается периодическое, направленное вверх движение плодоножки, по-видимому управляемое теми же клетками, действующими как организующий центр. В каждом из этих трех процессов одна и та же активность приводит к трем разным фазам процесса развития, причем различия обусловлены изменением ситуации, в которой проявляется активность. Сначала имеются разобщенные амобы, затем сплошная масса амоб, обладающая межклеточными контактами и активно синтезирующая полисахаридную оболочку вокруг этой массы клеток, и, наконец, клетки, организованные пространственно в два типа: клетки стебля и споры, причем первый тип клеток подвергается превращению в вакуолизированные клетки с жесткой стенкой. Механизмы, действующие на этих стадиях, далеко не ясны, но мне хочется выделить одну особенность — чувствительность процессов развития к ситуации: одинаковые события, происходящие в разных ситуациях, приводят к совершенно разным морфологическим результатам.

Примеры такого поведения в развивающихся системах весьма многочисленны, но особенно интересны эксперименты с *Tubularia*, описанные в гл. 5. У этого организма после отрезания гидранта в области, непосредственно прилегающей к месту среза (из которой затем разовьется новый гидрант), наблюдаются серии чередующихся стадий покоя и пульсаций; во время стадий пульсации регистрируются периодические распространяющиеся волны сокращений с периодами порядка 8—10 мин. Конечная фаза регенерации этого организма представляет собой пульсирующее появление полностью дифференцированного гидранта из перисарка с последующими энергичными движениями щупалец; эти движения являются способом введения пищи в гипостом. В этом случае периодическая активность организатора развития с более высокой частотой продолжается, по-видимому, во взрослом организме предположительно из специализированных клеток; эта активность выступает теперь в роли организатора движений, обеспечивающих питание. Это предположение подтверждается данными Пассано и Мак-Калло (Passano, McCullough, 1965), полученными при изучении системы пейсмеркеров, которые управляют поведенческими движениями у гидры. Они расположены в различных частях тела животного: в гипостоме, у основания щупалец, на подошве и т. д. Пейсмеркеры развития играют роль генераторов эмбриологических полей

и организаторов морфогенетических превращений. Поведенческие пейсмекеры организуют и координируют движения взрослого организма. Поле развития заменяется полем поведения, функция которого состоит не в морфологических изменениях организма, а в изменении отношений между организмом и его окружением (например, при движении к новому местожительству или переносе пищи внутрь организма). Это изменение активности происходит в результате изменения ситуации, в которой действует пейсмейкер, а также изменений в его собственной структуре. Нервная сеть гидроидов действует как коммуникационная сеть и относительно специализированные клетки, из которых она устроена, проводят волны активности, не образуя пространственных градиентов морфогена. Это требует наличия некоего простого механизма молекулярного разобщения процессов поведения и образования градиентов во время дифференцировки и некоторой специализации мембраны для быстрого проведения волн активности, а также более высокой частоты пейсмейкерной активности (1—10 в 1 мин у гидры). Однако любые структурные изменения, необходимые для осуществления поведенческих реакций, такие, как изменения в сети соединений, сопровождающих обучение, можно объяснить исходя из эволюционных процессов сопряжения волн активности и формирования градиента. По-видимому, у гидроидов этого не происходит, но вполне возможно, что такой механизм как-то связан с обучением и памятью у высших организмов.

Примеры, иллюстрирующие рекурсивные свойства и непрерывность развития и поведения, такие, как описанные ранее данные о поведении *Dictyostelium* и *Tubularia*, можно приводить и дальше, направляясь вверх по филогенетической шкале. Однако, как мне кажется, моя точка зрения ясна, и поэтому целесообразнее посмотреть непрерывность некоторых принципов организации на всем протяжении от процессов эволюции и развития до поведения взрослого организма. Особый интерес представляет концепция активности, чувствительной к ситуации, отмеченная выше при рассмотрении некоторых аспектов эмбриогенеза. Используемая при изучении языка связь с контекстом имеет тот же самый смысл. Рассмотрим, например, предложение «I saw the dog»¹. Контекст подсказывает нам значение слова saw, и мы вовсе не думаем, что кто-то распиливает собаку. Интересная особенность лингвистики состоит в использовании понятия «значение». Обычно мы не говорим, что значение сигнала агрегации состоит в собирании амёб для образования слизевика, хотя это был бы совершенно последовательный способ

¹ Русский аналог — «я скосил глаза». Из контекста ясно значение слова «скосил», и мы не считаем, что глаза косят, как траву. — *Прим. перев.*

изложения его смысла. Просто не принято, говоря об агрегации миксомицетов, прибегать к семантическим понятиям, хотя эта форма широко используется, когда речь идет о процессах познания на физиологическом уровне. Значение в этом случае оказывается смыслом слова, который определяется характером взаимодействий слова с другими словами в предложении, точно так же, как характер взаимодействий между цАМФ и клетками миксомицетов определяет характер активности и, следовательно, смысл этого сигнала.

Мы знаем, что в языке могут быть грамматически (синтаксически) правильные предложения, которые не имеют никакого значения в области реализуемых ситуаций; например, предложение «яблоко ест мальчика» лишено всякого смысла, потому что в рамках наших представлений о мире не соответствует ситуации, которая может реализоваться. То же самое может происходить и в процессах развития. Например, явление экзогаструляции в эмбрионе амфибий вполне согласуется со всеми локальными ограничениями развития (синтаксическими правилами), управляющими гастрულიей, такими, как движение эктодермальных клеток в губе бластопора, полярность бокаловидных клеток, которые инициируют гастрულიю, тангенциальные сокращения клеток в области серого серпа и т. д. Но экзогаструляция эволюционно бессмысленна, ее нельзя встроить в набор событий, которые составляют нормальное развитие: это тупик. Данный пример подчеркивает тот факт, что значение слова относительно и связано с областью реализуемых событий, т. е. с тем, что можно назвать нормальным экспериментом, включающим только возможные процессы. Дополнительная свобода, которой обладает язык по сравнению с процессами развития, состоит в том, что лингвистические формулировки могут относиться как к предполагаемым, так и к действительным событиям, т. е. к воображимым возможностям. Эмбрион не может делать этого, так как он должен точно реализовывать любой познавательный процесс, который ему присущ, и не имеет символической области действий, отделенной от реальных реализаций. Все формулировки на языке развития — это команды или алгоритмы. Именно эту точку зрения развивал Уоддингтон (Waddington, 1972), который сказал: «Для биолога язык есть набор символов, организованных с помощью определенной грамматики генерации; эта грамматика позволяет сформулировать более или менее точные команды к действию, направленному на то, чтобы повлиять на окружающие единицы, которые посылают и воспринимают команды... Язык в этом смысле — не простое средство передачи праздной информации, и я полагаю, что он может стать образцом для теории Общей Биологии». Эти команды постоянно работают в системе, подчиненной

необходимости выжить, сохранить свою упорядоченность и организацию: эволюционный процесс требует, чтобы организмы были практичными, соответствующими «действительности». Исходя из определения познающей системы, введенного в начале этой главы, язык функционирует познавательно и является способом передачи знания лишь в той степени, в какой он дает полезные описания некоторых сторон организма или его окружающей среды. Тогда он является частью эволюционного процесса.

Одним плодотворным результатом, который может быть получен из такого сопоставления эмбриогенеза и языка, является прояснение биологических причин процессов генерации. В лингвистике цель генеративной грамматики сравнительно скромна: разработать набор операций, с помощью которых правильно образуется пространственная структура языка. В эпигенезе генеративная теория должна дать некоторые предписания, на основе которых из яйца постепенно развивается взрослый организм. Значение знания, содержащегося внутри яйца, постепенно реализуется в ходе развития до тех пор, пока не сформируются окончательные детали структуры его поверхности и организм не войдет в контакт со своим окружением. Упорядоченный, подчиняющийся соответствующим правилам эмбриологический процесс оказывается аналогом генеративной грамматики, но в данном случае процесс и начинается из своего собственного источника; зародыш организма, яйцо, обладает своим запасом потенциального знания. А что является зародышем предложения, действия, мифа? Каков порядок его развития? Конечно, язык и символические системы вообще имеют особые ограничения, определяющие многие аспекты их внешней структуры, и они заметно отличаются от тех, которые имеют место в эмбрионе. Но в таком сопоставлении намечается возможность рассматривать все эти системы как примеры процессов познания, генерирующих свою собственную особую морфологию, — эмбриологическую, поведенческую, лингвистическую, мифологическую или еще какую-нибудь. Все они могут обладать сходными основными динамическими свойствами и быть в своей основе изоморфными, так что сравнительные их исследования могут оказаться взаимно обогащающими. Тогда действительно удастся получить основу для создания теоретической биологии, объединяющей эти области исследования, встроенные в единый процесс эволюции.

И, наконец, я хочу затронуть вопрос о природе эволюционного процесса с позиций теории познания. Основываясь на этом подходе, разумно предположить, что процесс, способный давать полезные описания некоторых сторон мира и запасать их в доступной ему форме, проявляет интеллект, способность к обучению. Например, можно сказать, что когда кто-то решает ту или

иную проблему, он производит полезное описание той части мира, которая ограничивается данной проблемой, и его умение создавать это описание и запастись его в доступной форме (запоминать его) есть мера его интеллекта. Согласно этому определению эволюционный процесс проявляет интеллект. Мне кажется несомненным, что продукты этого процесса, организмы, действительно являются результатом действия разумной системы, и вышеприведенное определение интеллекта дает формально ясный и внутренне непротиворечивый способ формулировки этих интуитивных соображений. Сами организмы, конечно, не обязаны быть разумными: познающая система действует на основании полезных описаний неких сторон мира, но не обязана обладать способностью производить и запастись такие описания. Ясно, что миксомицеты, например, не разумны, что они не могут учиться. Эта способность возникает на некотором уровне биологической организации, и тогда организмы разделяют с эволюционным процессом свойство интеллекта, хотя детали механизмов, которые они примесняют при проявлении этого свойства, совершенно различны. В эволюционном процессе узнавания используется метод проб и ошибок, который включает в себя мутации и рекомбинации наследственных элементов и естественный отбор; это процесс, для реализации которого необходимо много поколений. В организме же создание полезных описаний предусматривает рекомбинацию элементов поведенческих стратегий и их испытание в данных условиях — процесс, который происходит в пределах собственного времени жизни организма.

Кратко изложенные здесь интересные соображения, касающиеся связи между эволюционными процессами и процессами, протекающими в организме, несомненно требуют подробного изучения и построения точных моделей, позволяющих выявить возможности их существования и полезность. В той же степени, в какой неверные аналогии могут привести к неверным выводам и ввести в заблуждение, подлинные гомологии и изоморфизмы могут оказаться чрезвычайно полезными, если учесть возможность взаимного обогащения областей, которые в настоящее время изолированы друг от друга. Пожалуй, возможность понять эволюционный процесс в целом имеет даже большее значение; в таком подходе все аспекты природы и культуры выступают как составные части, как этапы развития познания, которое основывается на работе интеллекта. Тогда мы можем попытаться найти путь сквозь подобный лабиринту сад ветвящихся троп, который творит разум в процессе образования форм, испытываемых в пространстве и во времени.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Некоторые основные черты волновой модели, построенной для анализа образования морфогенетического градиента, даны в этом приложении в виде результатов численных расчетов на частной реализации модели. Проведен анализ пространственно-одномерной системы двух дифференциальных уравнений вида

$$\begin{aligned}\frac{\partial X}{\partial t} &= D \frac{\partial^2 X}{\partial x^2} (x, t) + \beta Y (x, t) + M\delta(vt - x) - \\ &\quad - f(vt - v\sigma - x) X (x, t) - kX (x, t), \\ \frac{\partial Y}{\partial t} &= -\beta Y (x, t) + f(vt - v\sigma - x) X (x, t),\end{aligned}$$

где $X(x, t)$ — концентрация диффундирующего метаболита V (см. гл. 5), а $Y(x, t)$ — концентрация комплекса BV, который, как считается, представляет собой недиффундирующий морфоген. Другие параметры и функции в системе уравнений имеют следующий смысл: D — константа диффузии метаболита V; β — постоянная распада морфогена BV; $M\delta(vt - x)$ — дельта-функция, умноженная на константу (этот член описывает распространение фронта волны метаболической активности, движущейся со скоростью v , где t — время, а x — расстояние вдоль оси); $f(vt - v\sigma - x)$ — функция, характеризующая процесс захвата, который распространяется позади волнового фронта (с той же скоростью, но с задержкой σ); k — константа распада метаболита V, описывающая в модели скорость превращения V в W. При расчетах дельта-функция была представлена узким распределением Гаусса, описывающим мгновенное «включение» фермента E_1 и образование V при распространении волны активности. Вычисления проводились в безразмерных переменных, так что D , t и x — это относительные величины. Волна распространяется в обоих направлениях, но вследствие симметрии процесса относительно источника можно рассматривать лишь одно направление.

На рис. П.1 показаны кривые распределения морфогена после прохождения единичной волны для разных времен задержки σ . Скорость волны всюду была равна 5 мкм·с⁻¹. Функция за-

хвата имела вид

$$f(z) = ze^{-\alpha z} \quad z \geq 0, \\ = 0 \quad z < 0,$$

где $z = vt - v\sigma - x$, а α выбиралась так, чтобы максимум функции находился на расстоянии 20 мкм от источника. В этих расчетах β полагали равной нулю. Разные кривые показывают

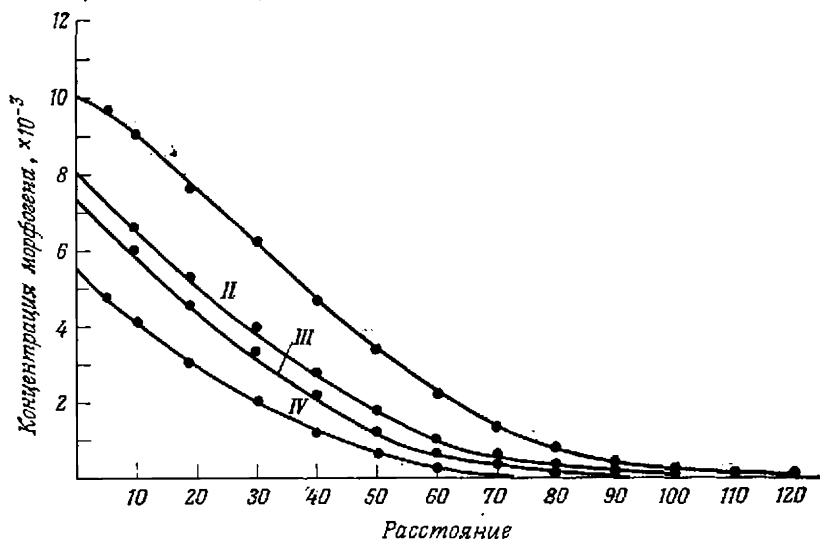


Рис. П.1. Пространственное распределение морфогена, вычисленное исходя из волновой модели, описанной в тексте, для разных времен задержки σ . Время задержки для кривых I, II, III и IV составляет 2,5; 4,0; 4,5 и 5,5 с соответственно.

распределение морфогена через данное время после инициации волны для разных времен задержки σ . По мере увеличения времени задержки количество V , захваченного и превращенного в связанный комплекс, уменьшается, так как V постоянно разрушается. Для всех кривых значения концентрации морфогена в источнике стационарны или близки к ним. Это обусловлено особенностью, иллюстрируемой рис. П. 2 на частном случае кривой III с временем задержки 4,5 с. Из рис. П. 2 видно, что через 12 с после инициации процесса захвата концентрация морфогена в источнике достигает примерно 96% своего асимптотического значения. То же самое справедливо и для других кривых. Именно эта особенность модели делает ее нечувствительной к размерам вдоль оси, если они больше некоторого минимального значения. Это значение задается параметрами, так что существует длина, определяющая независимые или регулирующие свойства модели.

Не составляет труда описать основные особенности волновой модели, приводящие к таким результатам. Вдоль мембраны или

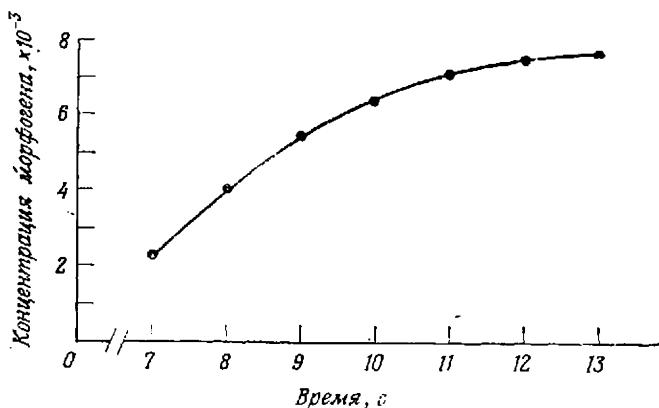


Рис. П.2. Зависимость концентрации морфогена в источнике от времени, прошедшего после инициации процесса захвата.

кортекса распространяется волна активности — движущийся источник, образующий с постоянной скоростью диффундирующий метаболит. Концентрация этого метаболита сначала всюду возрастает за счет диффузии, но затем начинает падать, поскольку мы предположили, что идет разрушение метаболита ферментом E_2 , который равномерно распределен в пространстве; уменьшение концентрации продолжается все время, пока скорость деградации превышает скорость образования. Помимо распространения волны активности, идет распространение процесса захвата, в результате которого V превращается в BV в соответствии с кинетикой, описываемой в модели функцией $f(z)$, и получается пространственное распределение $Y(x, t)$. Если задержка между инициацией волны и началом процесса захвата относительно велика, то V будет сравнительно быстро разрушаться (сток, более мощный, чем источник, так как первый увеличивается по мере распространения волны, а второй не меняется) и получается кривая IV. Если задержка мала, мы получаем кривую I.

Конечно, существует много других способов реализации главных принципов волновой модели типа описанной в гл. 5; некоторые из них сейчас интенсивно исследуются. Вообще говоря, процесс в своей основе прост и ясен и обладает весьма ценными свойствами, такими, как описанная выше способность к регуляции¹.

¹ Я благодарен д-ру П. Каннингхэму за расчеты, приведенные в этом приложении.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adler H. I., Fisher W. D., Cohen A., Hardigree A. A. Miniature *Escherichia coli* cells deficient in DNA. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. **57**, 321 (1967).
- Aldridge J. F., Pavlidis T. Clocklike behaviour of biological clocks. Nature, Lond. **259**, 343 (1976).
- Apter M. J. Cybernetics and Development, Pergamon Press, Oxford, 1966. (Аптер М. Дж., Кибернетика и развитие, изд-во «Мир», М., 1970.)
- Aschoff J. (ed.) Circadian Clocks, North-Holland, Amsterdam, 1965.
- Atkinson D. E., Hathaway J. A., Smith E. C. Kinetic order of the yeast diphosphopyridine nucleotide isocitrate dehydrogenase reaction and a model for the reaction. J. biol. Chem. **240**, 2682 (1965).
- Azurnia R., Lowenstein W. R. Intercellular communication and tissue growth. V. A cancer cell strain that fails to make permeable membrane junctions with normal cells. J. Membr. Biol. **6**, 368 (1971).
- Barbera A. J., Marchase R. B., Roth S. Adhesive recognition and retinotectal specificity. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 2482 (1973).
- Bard J., Lauder I. How well does Turing's theory of morphogenesis work? J. theor. Biol. **45**, 501 (1974).
- Barenska J., Wlodaver P. Influence of temperature on the composition of fatty acids and on lipogenesis in frog tissues. Comp. Biochem. Physiol. **28**, 553 (1969).
- Bateman A. E. Cell specificity of chalone-type inhibitors of DNA synthesis released by blood leucocytes and erythrocytes. Cell. Tiss. Kinet. **7**, 451 (1974).
- Bateman A. E., Goodwin B. C. Erythrocyte chalone; demonstration of an inhibitor of DNA synthesis in erythrocyte-conditioned medium, action on foetal erythroblasts, and its separation from haemoglobin. Biomedicine (in the press).
- Becker R. O. Stimulation of partial limb regeneration in rats. Nature, Lond. **235**, 109 (1972).
- Beckworth J. R. Regulation of the lac operon. Science, N. Y. **156**, 597 (1967).
- Белоусов Л. В., Баденко Л. А., Качурин А. Л., Кунило Л. Ф. Cell movements in morphogenesis of hydroid polyps. J. Embryol. exp. Morph. **27**, 317 (1972).
- Berridge M. J. The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the control of cellular activity. Adv. Cyclic. Nucleotide Res. **6**, 1 (1975).
- Bertalanffy von, L. Problems of Life, C. A. Watts, London, 1952.
- Beug H., Katz F. E., Stern A., Gerisch G. Membrane sites in aggregating *D. discoideum* cells by use of tritiated univalent antibody. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. **70**, 3150 (1973).
- Bohn H. Pattern reconstitution in abdominal segment of *Leucophaea maderae* (Blattaria). Nature, Lond. **248**, 608 (1974).
- Bonner J. T., Barkley D. S., Hall E. M., Konijn T. M., Mason J. W., O'Keefe G., White B. P. Acrasin, acrasinase, and the sensitivity to acrasin in *Dictyoselium discoideum*. Devl Biol. **20**, 72 (1969).

- Borek C., Higashira S., Lowenstein W. R. Intercellular communication and tissue growth. IV. Conductance of membrane junctions of normal and cancerous cells in culture. *J. Membr. Biol.* 1, 274 (1969).
- Brachet J. The role of nucleic acids and sulphydryl groups in morphogenesis (amphibian egg development, regeneration in *Acetabularia*). In «Advances in Morphogenesis» (eds. M. Abercrombie and J. Brachet), Vol. 3, p. 247, Academic Press, New York and London (1964).
- Brachet J., Bonotto S. *Biology of Acetabularia*, Academic Press, New York and London (1970).
- Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R. Control of cell division by very lysine-rich Histone (F1) phosphorylation. *Nature, Lond.* 247, 257 (1974a).
- Bradbury E. M., Inglis R. J., Matthews H. R., Langam T. A. Molecular basis of control of mitotic cell division in eukaryotes. *Nature, Lond.* 249, 553 (1974b).
- Bremel R. D., Weber A. Co-operation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. *Nature, New Biology* 238, 97 (1972).
- Bretscher M. S. Principal glycoprotein on the surface extends into the interior in human erythrocytes. *Nature, New Biology* 231, 229 (1971).
- Brewer E. N., Rusch H. P. Effect of elevated temperature shocks on mitosis and on the initiation of DNA replication in *Physarum polycephalum*. *Exptl Cell. Res.* 49, 79 (1968).
- Britten R. J., Davidson E. H. Gene regulation for higher cells: a theory. *Science*, N. Y. 165, 349 (1969).
- Brout R. *Phase Transitions*, Benjamin, New York, 1965. (Браут Р., Фазовые переходы, изд-во «Мир», М., 1967.)
- Brown J. M., Berry R. F. The relationship between diurnal variation of the number of cells in mitosis and of the number of cells synthesizing DNA in the epithelium of the hamster cheek pouch. *Cell Tiss. Kinet.* 1, 23 (1968).
- Bruce V. Cell division rhythms and the circadian clock. In «Circadian Clocks» (ed. J. Aschoff), p. 125. North-Holland, Amsterdam (1965).
- Bryant P. J. Regeneration and duplication following operations in situ on the imaginal disc of *Drosophila melanogaster*. *Devl Biol.* 26, 637 (1971).
- Bryant P. J. Pattern formation in the imaginal wing disc of *Drosophila melanogaster* fate map, regeneration, and duplication. *J. exp. Zool.* 193, 49 (1975a).
- Bryant P. J. Regeneration and duplication in imaginal discs. In «Cell Patterning» (eds R. Porter and J. Rivers), Ciba Foundation Symposium, Vol. 29, p. 71, Elsevier, Amsterdam (1975b).
- Bullough W. S. The control of mitotic activity in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* 37, 307 (1962).
- Bullough W. S. Mitotic control in adult mammalian tissues. *Biol. Rev.* 50, 99 (1975a).
- Bullough W. S. Chalones and cancer. In «Host Defense against Cancer and its Potentiation», (eds D. Mizano et al.), p. 317, University of Tokyo Press, Tokyo/University Park Press, Baltimore, U. S. A. (1975b).
- Bullough W. S., Laurence E. B. The control of epidermal mitotic activity in the mouse. *Proc. R. Soc. B.* 151, 517 (1960).
- Bullough W. S., Laurence E. B. Stress and adrenaline in relation to the diurnal cycle of epidermal mitotic activity in adult male mice. *Proc. R. Soc. B.* 154, 540 (1961).
- Bullough W. S., Laurence E. B. Mitotic control by an internal secretion: the role of the chalone-adrenaline complex. *Exptl Cell Res.* 33, 176 (1964).
- Bullough W. S., Laurence E. B. Epidermal chalone and mitotic control in the VX2 epidermal tumour. *Nature, Lond.* 220, 134 (1968).
- Bünning E. *The Physiological Clock*, Springer-Verlag, New York and Heidelberg (1967).

- Bünning E., Moser I. Influence of valinomycin on circadian leaf movements of *Phaseolus*. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. **69**, 2732 (1972).
- Burstein C., Cohn M., Kepes A., Monod J. Rôle du lactose et de ses produits métaboliques dans l'induction de l'opéron lactose chez *Escherichia coli*. Biochim. biophys. Acta **95**, 634 (1965).
- Burton A. C. Cellular communication, contact inhibition, cell clocks, and cancer: the impact of the work and ideas of W. R. Lowenstein. Perspect. Biol. Med. **14**, 301 (1971).
- Burton A. C., Canham P. B. The behaviour of coupled biochemical oscillations as a model of contact inhibition of cellular division. J. theor. Biol. **34**, 555 (1973).
- Campbell R. D. Tissue dynamics of steady state growth in *Hydra littoralis*: I. Patterns of cell division. Devl Biol. **15**, 487 (1967); II. Patterns of tissue movement. J. Morph. **121**, 19 (1967).
- Cashel M., Gallant J. Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. Nature, Lond. **221**, 838 (1969).
- Caveney S. Stability of polarity in the epidermis of a beetle, *Tenebrio molitor* L. Devl Biol. **30**, 321 (1973).
- Chandrasekaran M. K. Studies on phase-shifts in endogenous rhythms. Z. vergl. Physiol. **56**, 154 (1967).
- Changeux J.-P. Allosteric interactions on biosynthetic L-threonine deaminase from *E. coli* K 12. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. **28**, 497 (1963).
- Child C. M. Patterns and Problems of Development, Chicago University Press (1941).
- Chomsky N. Language and Mind, Harcourt Brace, New York, 1968. (Хомский Н., Язык и мышление, изд-во Моск. унив. М., 1972.)
- Chomsky N. Problems of Knowledge and Freedom, p. 26, Fontana/Collins, 1972.
- Chung Shin-Ho, Cooke J. Polarity of structure and of ordered nerve connections in the developing amphibian brain. Nature, Lond., **258**, 126 (1975).
- Cohen M. H. Models of clocks and maps in developing organisms. In «Lectures on Mathematics in the Life Sciences» (ed. J. D. Cowan) Vol. III, p. 3, American Mathematical Society, Providence, Rhode Island (1972).
- Cohen M. H., Robertson A. Wave propagation in the early stages of aggregation in cellular slime molds. J. theor. Biol. **31**, 101 (1971a).
- Cohen M. H., Robertson A. Chemotaxis and the early stages of aggregation in cellular slime molds. J. theor. Biol. **31**, 119 (1971b).
- Cohen M. H., Robertson A. Differentiation for aggregation in the cellular slime molds. In «Proceedings of the First International Conference on Cell Differentiation» (eds R. Harris and D. Viza), p. 35, Munksgaard, Copenhagen (1972).
- Cohlberg J. A., Piget V. P., Schackman H. K. Structure and arrangement of the regulatory subunits in aspartate transcarbamylase. Biochemistry, N. Y. **11**, 3396 (1972).
- Cohn M., Torriani A. M. Immunochemical studies with the β -galactosidase and structurally related proteins of *Escherichia coli*. J. Immun. **69**, 471 (1952). Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. **25**. Biological Clocks (1960). (Биологические часы, изд-во «Мир», М., 1964.)
- Cone C. D. Some theoretical aspects of intercellular bridges as a potential mechanism of cancerous proliferation. J. theor. Biol. **22**, 365 (1969).
- Cooke J. Properties of the primary organization field in the embryo of *Xenopus laevis*:
I. Autonomy of cell behaviour at the site of initial organizer function. J. Embryol. exp. Morph. **28**, 13 (1972);
II. Positional information for axial organization in embryos with two head organizers. J. Embryol. exp. Morph. **28**, 27 (1972);
III. Retention of polarity in cell groups excised from the region of the early organizer. J. Embryol. exp. Morph. **28**, 47 (1972).

- Cooke J. Morphogenesis and regulation in spite of continued mitotic inhibition in *Xenopus* embryos. *Nature, Lond.* **242**, 5392 (1973).
- Cooke J. Control of somite number during morphogenesis of a vertebrate, *Xenopus laevis*. *Nature, Lond.* **254**, 196 (1975a).
- Cooke J. Experimental analysis and a model of the control of somite formation in *Xenopus laevis*. In «Developmental Biology» (U.C.L.A., Squaw Valley Winter Conference), Walter Benjamin, Menlo Park, California (1975b).
- Crick F. H. C. General model for the chromosomes of higher organisms. *Nature, Lond.* **234**, 25 (1971).
- Crombrugghe de, B., Chero B., Gotterman M., Paston I., Varmus H. E., Emmer M., Perlman R. L. Regulation of lac mRNA synthesis in a soluble cell-free system. *Nature, New Biology* **230**, 37 (1971).
- Cummings F. W. A biochemical model of the circadian clock. *J. theor. Biol.* **55**, 455 (1975).
- Cummings F. W. On the metabolic origins of the circadian period. (to be submitted for publication) (1976).
- David C. N., Campbell R. D. Cell cycle kinetics and development of *Hydra attenuata*. *J. Cell Sci.* **11**, 557 (1972).
- Davson H., Danielli J. F. The Permeability of Natural Membranes, Cambridge University Press, 1952.
- Degn H., Meyer D. Theory of oscillations in peroxidase catalyzed oxidation reactions in open systems. *Biochim. biophys. Acta* **180**, 291 (1969).
- Denbigh K. G., Hicks M., Page F. M. The kinetics of open reaction systems. *Trans. Faraday Soc.* **44**, 479 (1948).
- Donachie W. D., Begg K. J. Growth of the bacterial cell. *Nature, Lond.* **227**, 1220 (1970).
- Donachie W. D., Jones N. C., Teather R. The bacterial cell cycle. *Symp. Soc. gen. Microbiol.* **23**, 9 (1973).
- Driesch H. Science and Philosophy of the Organism, A. and C. Black, London (1908).
- Duclaux E. *Traité de Microbiologie*, Masson et Cie, Paris (1899).
- Durston A. J., *Dictyostelium discoideum* aggregation fields as excitable media. *J. theor. Biol.* **42**, 483 (1973).
- Durston A. J. Pacemaker activity during aggregation in *Dictyostelium discoideum*. *Devl Biol.* **37**, 225 (1974).
- Duysens L. N. M., Ames J. Fluorescence spectrophotometry of reduced phosphopyridine nucleotide in intact cells in the near-ultra-violet and visible region. *Biochim. biophys. Acta* **24**, 19 (1957).
- Edmunds L. N. Persistent circadian rhythm of cell division in *Euglena*: some theoretical considerations and the problem of intercellular communication. In «Biochronometry», p. 594, National Academy of Sciences, Washington (1971).
- Edmunds L. N., Cirillo V. P. On the interplay among cell cycle, biological clock, and membrane transport control systems. *Int. J. Chronobiol.* **2**, 233 (1974).
- Ehret C. F., Trucco E. Molecular models for the circadian clock. I. The chronon concept. *J. theor. Biol.* **15**, 240 (1967).
- Eilenberg S., Steenrod N. Foundations of Algebraic Topology, Princeton University Press, 1952. (Стинрод Н., Эйленберг С., Основания алгебраической топологии, Физматгиз, 1958.)
- Elgjo K. Epidermal chalone: cell cycle specificity of two epidermal growth inhibitors. *Natn. Cancer Inst. Monogr.* **38**, 71 (1973).
- Elsdale T., Pearson M., Whitehead M. Abnormalities in somite segmentation following heat shock to *Xenopus* embryos. *J. Embryol. exp. Morph.* **33**, 625 (1976).

- Engelman W. Effect of light and dark pulses on the emergence rhythm of *Drosophila pseudo-obscura*. *Experientia* 22, 1 (1966).
- Engleberg J. On deterministic origins of mitotic variability. *J. theor. Biol.* 20, 249 (1968).
- Faraday Society Symposium 9. Physical Chemistry of Oscillatory Phenomena (1974).
- Fowler D. H. The Riemann-Hugoniot catastrophe and van der Waal's equation. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 4, p. 1, Edinburgh University Press (1972).
- Frank E. K. A mathematical model of synchronized periodic growth of cell populations. *J. theor. Biol.* 26, 373 (1970).
- Frankel J. Positional information in unicellular organisms. *J. theor. Biol.* 47, 439 (1974).
- Frankfurt O. S. Epidermal chalone. *Expl Cell Res.* 64, 140 (1971).
- Fraser A., Tiwari J. Genetical feed-back repression. II. Cyclic genetic systems. *J. theor. Biol.* 47, 397 (1974).
- Freed J. J., Schulz S. A. Chromosome aberrations in cultured cells deprived of single essential amino acids. *Expl Cell Res.* 55, 393 (1969).
- French V., Bryant P. J., Bryant S. V. Specification of position in an epimorphic field. Science, N. Y. (in the press).
- French V., Bullière D. Nouvelles données sur la détermination de la position des cellules épidermique sur un appendice de blatte. *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* 218, 53 (1975a).
- French V., Bullière D. Etudes sur la détermination de la position des cellules épidermiques; ordonnancement des cellules autour d'un appendice de blatte; démonstrations du concept de génératrice. *C. r. hebdom. Séanc. Acad. Sci., Paris* 218, 295 (1975b).
- Frye L. D., Edidin M. The rapid mixing of cell surface antigens after formation of mouse and human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7, 319 (1970).
- Gallant J., Margason G., Finch B. On the turnover of ppGpp in *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* 247, 6055 (1972).
- Garcia-Giralte E., Lasalvia E., Florentin J., Mathé G. Evidence for a lymphocyte chalone. *Eur. J. clin. Biol. Res.* 15, 1012 (1970).
- Gaze R. M., Jacobson M., Szekely G. The retino-tectal projection in *Xenopus* with compound eyes. *J. Physiol., Lond.* 165, 484 (1963).
- Gaze R. M., Jacobson M., Szekely G. (1965). On the formation of connections by compound eyes in *Xenopus*. *J. Physiol., Lond.* 176, 409.
- Gaze R. M., Keating M. J., Straznický K. The re-establishment of retino-tectal projections after uncrossing the optic chiasma in *Xenopus laevis* with one compound eye. *J. Physiol., Lond.* 207, 51P (1970).
- Gaze R. M., Keating M. J. The visual system and «Neuronal Specificity» *Nature, Lond.* 237, 375 (1972).
- Gerhardt J. C., Pardee A. B. The effect of the feed-back inhibitor, CTP, on subunit interaction in aspartate transcarbamylase. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* 28, 491 (1963).
- Gerhardt J. C., Schachman H. K. Distinct subunits for the regulation and catalytic activity of aspartate transcarbamylase. *Biochemistry, N. Y.* 4, 1054 (1965).
- Gerisch G. Cell aggregation and differentiation in *Dictyostelium*. *Curr. Top. devl Biol.* 3, 157 (1968).
- Gierer A., Meinhardt H. A theory of biological pattern formation. *Kybernetik* 12, 20 (1972).
- Gilbert W., Müller-Hill B. Isolation of the *lac* repressor. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 1891 (1966).
- Gitter C. Plasticity of biological membranes. *A. Rev. Biophys. Bioeng.* 1, 1 (1972).

- Glansdorff P., Prigogine I. Thermodynamics of Structure, Stability, and Fluctuations, Wiley Interscience, New York, 1971. (Гленсдорф П., Пригожин И., Термодинамическая теория структуры, устойчивости и флуктуаций, изд-во «Мир», М., 1973.)
- Glass L. Instability and mitotic patterns in tissue growth. J. Dynamic Systems, Measure and Control 95G, 324 (1973).
- Glass L., Kauffman S. A. The logical analysis of continuous, non-linear biochemical networks. J. theor. Biol. 39, 103 (1973).
- Glass L., Kauffman S. A. The logical analysis of continuous, non-linear biochemical networks. J. theor. Biol. 39, 103 (1973).
- Goldbeter A. Mechanism of oscillatory synthesis of cyclic AMP in *Dictyostelium discoideum*. Nature, Lond. 253, 540 (1975).
- Goodwin B. C. Temporal Organization in Cell, Academic Press, London and New York, 1963, (Гудвин Б., Временная организация клетки, изд-во «Мир», М., 1966.)
- Goodwin B. C. The division of cells and the fusion of ideas. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 1, p. 134, Edinburgh University Press (1968). (На пути к теоретической биологии. Прологомы. «Мир», М., 1970.)
- Goodwin B. C. Synchronization of *E. coli* B in chemostat by periodic phosphate feeding. Eur. J. Biochem. 19, 511 (1969a).
- Goodwin B. C. Control dynamics of β -galactosidase in relation to the bacterial cell cycle. Eur. J. Biochem. 10, 515 (1969b).
- Goodwin B. C. Growth dynamics and synchronization of cells. Symp. Soc. gen. Microbiol. 19, 223 (1969c).
- Goodwin B. S. Model of the bacterial growth cycle: statistical dynamics of a system with asymptotic orbital stability. J. theor. Biol. 28, 375 (1970a).
- Goodwin B. C. Biological stability. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 3, p. 1, Edinburgh University Press (1970b).
- Goodwin B. C. An analysis of the retino-tectal projection of the amphibian visual system. In «Lectures in Mathematics in the Life Sciences» (ed. J. D. Cowan), p. 75, American Mathematical Society, Providence, Rhode Island (1972a).
- Goodwin B. C. Biology and meaning. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 4, p. 259, Edinburgh University Press (1972b).
- Goodwin B. C. Embryogenesis and cognition. In «Cybernetics and Bionics» (eds W. D. Keidel, W. Händler and M. Spreng), p. 47, Oldenbourg-Verlag, Munich (1973).
- Goodwin B. C. Excitability and spatial order in membranes of developing systems. Faraday Soc. Symp. 9, 226 (1974).
- Goodwin B. C. A membrane model for polar ordering and gradient formation. Adv. chem. Phys. 29, 269 (1975).
- Goodwin B. C., Cohen M. H. A phase-shift model for the spatial and temporal organization of developing systems. J. theor. Biol. 25, 49 (1969).
- Gorini L., Gundersen W., Burger H. Genetics of regulation of enzyme synthesis in the arginine biosynthetic pathway of *Escherichia coli*. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 26, 173 (1961).
- Gorini L., Kalman S. M. Control by uracil of carbamyl phosphate synthesis in *Escherichia coli*. Biochim. biophys. Acta 69, 355 (1963).
- Graham R. Statistical theory of instabilities in stationary non-equilibrium systems with applications to lasers and non-linear optics. In «Quantum Statistics in Optics and Solid-State Physics» (ed. G. Höhler), p. 1, Springer-Verlag, Berlin (1973).
- Hadorn E. Konstanz, Wechsel, und Typus der Determination und Differenzierung in Zeller aus männlichen Genitalanlagen von *Drosophila melanogaster* nach Dauerkultur in vivo. Devl Biol. 13, 424 (1966).

- Hagins W. A. The visual process: excitatory mechanisms in the primary receptor cells. *A. Rev. Biophys. Bioeng.* **1**, 131 (1972).
- Haken H. Synergetics — towards a new discipline. In «Co-operative Phenomena» (eds H. Haken and M. Wagner), p. 363, Springer-Verlag, Berlin (1973).
- Halberg F. Circadian (about 24 h) rhythms in experimental medicine. *Proc. R. Soc. Med.* **56**, 253 (1963).
- Hämmerling J. Über Formbildende Substanzen bei *Acetabularia mediterranea* ihre Räumliche und Zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. *Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org.* **131**, 1 (1934).
- Hämmerling J. Nucleo-cytoplasmic interactions in *Acetabularia* and other cells. *A. Rev. Pl. Physiol.* **14**, 65 (1963).
- Hampé A. Contribution à l'étude du développement et de la régulation des déficiences et des excédents dans la patte de l'embryon de poulet. *Archs Anat. microsc. Morph. exp.* **48**, 1345 (1959).
- Harris H. The reactivation of the red cell nucleus. *J. Cell Sci.* **2**, 23 (1967).
- Harris H., Sidebottom E., Grace D. M., Bramwell M. E. The expression of genetic information: a study with hybrid animal cells. *J. Cell Sci.* **4**, 499 (1969).
- Harrison R. G. On the origin and development of the nervous system studied by the methods of experimental embryology. *Proc. R. Soc. B.* **118**, 155 (1935).
- Hartwell L. H., Culotti J., Pringle J. R., Reid B. J. Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science N. Y.* **183**, 46 (1974).
- Hastings J. W. Biochemical aspects of rhythms: phase shifting by chemicals. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **25**, 131 (1960). (Биологические часы, изд-во «Мир», М., 1964.)
- Hazeltine W. A., Block R. Synthesis of guanosine tetra- and penta-phosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* **70**, 1564 (1973).
- Hearon J. Z. The kinetics of linear systems with special reference to periodic reactions. *Bull. math. Biophys.* **15**, 121 (1952).
- Helmstetter C. E., Cooper S. DNA synthesis during the division cycle of rapidly growing *Escherichia coli*. *B/r. J. molec. Biol.* **31**, 507 (1968).
- Helmstetter C. E., Pierucci O. Cell division during inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bact* **45**, 1627 (1968).
- Herbert D., Ellsworth R., Telling R. C. The continuous culture of bacteria: a theoretical and experimental study. *J. gen Microbiol.* **14**, 601 (1956).
- Herth W., Sander K. Mode and timing of body pattern formation (regionalization) in the early embryonic development of *Cyclorrhaphic Diptera* (*Protaphormia*, *Drosophila*). *Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org.* **172**, 1 (1973).
- Hertwig R. Über neue Probleme der Zellenlehre. *Arch. Zellforsch.* **1**, 1 (1908).
- Hess B., Boiteux A. Oscillatory phenomena in biochemistry. *A. Rev. Biochem.* **40**, 237 (1971).
- Higgins J. The Theory of oscillating reactions. *Ind. Engng Chem.* **59**, 19 (1967).
- Hirsch H. R., Engleberg J. Decay of cell synchronization: solutions of the cell-growth equation. *Bull. math. Biophys.* **28**, 391 (1966).
- Hitchcock S. E. Regulation of muscle contraction. Effect of calcium on the affinity of troponin for actin and tropomyosin. *Biochemistry, N. Y.* **12**, 2509 (1973).
- Hocking J. C., Young G. S. *Topology*, Addison-Wesley, New York (1961).
- Holtzer H. Mitosis and cell transformation. In «General Physiology of Cell Specialization» (eds D. Mazia and A. Tyler), p. 80, McGraw-Hill, New York (1963).

- Hondius-Boldingh W., Laurence E. B.* Extraction, purification and preliminary characterisation of the epidermal chalone: a tissue specific mitotic inhibitor obtained from vertebrate skin. *Eur. J. Biochem.* **5**, 191 (1968).
- Huang K.* Statistical mechanics, Wiley, New York, 1963. (Хуанг К., Статистическая механика, изд-во «Мир», М., 1966.)
- Iberall A. S.* New thoughts on biocontrol. «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 2, p. 166, Edinburgh University Press (1969).
- Inoye M.* Unlinking of cell division from DNA replication in a temperature-sensitive DNA synthesis mutant of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **99**, 842 (1969).
- Iversen O. H.* The regulation of cell number in epidermis. A cybernetic point of view. *Acta path. microbiol. scand.* **148**, 91 (1961).
- Iversen O. H.* Some theoretical considerations on chalones and the treatment of cancer: a review. *Cancer Res.* **30**, 1481 (1970).
- Jacob F., Monod J.* Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. molec. Biol.* **3**, 318 (1961).
- Jacob F., Brenner S., Cuzin F.* On the regulation of DNA replication in bacteria. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. **28**, 329 (1963).
- Jacob F., Ryter A., Cuzin F.* On the association between DNA and membrane in bacteria. *Proc. R. Soc. B.* **164**, 267 (1966).
- Jacobson C. O.* The localization of the presumptive cerebral regions in the neural plate of the axolotl larvae. *J. Embryol. exp. Morph.* **7**, 1 (1959).
- Jacobson C. O.* Motor nuclei, cranial nerve roots, and fibre pattern in the medulla oblongata after reversal experiments on the neural plate of axolotl larvae. *Zool. Bidr. Upps.* **36**, 73 (1964).
- Jacobson M.* Development of neuronal specificity in retinal ganglion cells of *Xenopus*. *Devl Biol.* **17**, 202 (1968a).
- Jacobson M.* Cessation of DNA synthesis in retinal ganglion cells correlated with time of specification of their central connections. *Devl Biol.* **17**, 219 (1968b).
- Jacobson M.* Discussion. In «Cell Patterning» (eds R. Porter and I. Rivers), Ciba Foundation Symposium, Vol. 29, p. 333, Elsevier, Amsterdam (1975).
- Jacobson M., Levine R. L.* Plasticity in the adult frog brain: filling the visual scotoma after excision of translocation of parts of the optic tectum. *Brain Res.* **88**, 339 (1975).
- Jacobson M., Levine R. L.* Stability of implanted duplicate tectal positional markers serving as targets for optic axons in adult frogs. *Brain Res., Osaka* **92**, 468 (1975).
- Jaffe L.* Electrical currents through the developing *Fucus* egg. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* **56**, 1102 (1966).
- Jaffe L.* Localization in the developing egg and the general role of localizing currents. In «Advances in Morphogenesis» (eds M. Abercrombie and J. Brachet), Vol. 7, p. 295, Academic Press, New York and London (1968).
- Jerka-Dziadosz M.* *Urostyla cristata* sp. n. (Urostylidae, Hypotrichida): the morphology and morphogenesis. *Acta Protozool.* **2**, 120 (1964).
- Jung C., Rothslein A.* Cation metabolism in relation to cell size in synchronously grown tissue culture cells. *J. gen. Physiol.* **50**, 917 (1967).
- Kacser H.* Some Physico-chemical aspects of biological organization. Appendix to «The Strategy of the Genes» (C. H. Waddington), Allen and Unwin, London (1957).
- Kaczanowska J.* The pattern of morphogenetic control in *Chilodonella cucullulus*. *J. exp. Zool.* **187**, 47 (1974).
- Karakashian M. W., Hastings J. W.* The inhibition of a biological clock by actinomycin D. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* **48**, 2130 (1962).
- Kauffman S. A.* Metabolic stability and epigenesis in randomly constructed genetic nets. *J. theor. Biol.* **22**, 437 (1969).

- Kauffman S. A. Control circuits for determination and transdetermination. Science, N. Y. 181, 310 (1973).
- Kauffman S. A. Measuring a mitotic oscillator: the arc discontinuity. Bull. math. Biol. 36, 171 (1974).
- Kauffman S. A., Wille J. J. The mitotic oscillator in *Physarum polycephalum*. J. theor. Biol. 55, 47 (1975).
- Keller E. F., Segel L. A. Initiation of slime mold aggregation viewed as an instability. J. theor. Biol. 26, 399 (1970).
- Kendall D. G. On the role of variable generation time in the development of a stochastic birth process. Biometrika 35, 316 (1948).
- Kieny M. Etude du mécanisme de la régulation dans le développement du bourgeon de membre de l'embryon de poulet. Devl Biol. 9, 197 (1964).
- Kishimoto S., Lieberman I. Synthesis of RNA and protein required for the mitosis of mammalian cells. Expl Cell Res. 36, 92 (1964).
- Kivilaakso E., Rytomäa T. Erythrocyte chalone, a tissue-specific inhibitor of cell proliferation in the erythron. Cell Tiss Kinet. 4, 1 (1971).
- Konijn T. M., Barkley D. S., Chang Y.-Y., Bonner J. T. Cyclic AMP: a naturally occurring acrasin in the cellular slime molds. Am. Nat. 102, 225 (1968).
- Korn A. P., Henkelman R. M., Ottensmeyer F. P., Till J. E. Investigations of a stochastic model of haemopoiesis. Expl Hemat. 1, 362 (1973).
- Kornacker K. Cognitive processes in physics and physiology. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 2, p. 248, Edinburgh University Press (1969a).
- Kornacker K. Physical principles of active transport and electrical excitability. In «Biological Membranes» (ed. R. M. Dowben), p. 39, Little and Brown, Boston (1969b).
- Kornacker K. Living aggregates of non-living parts: a generalized statistical mechanical theory. Prog. theor. Biol. 2, 1 (1972).
- Koshland D. E. The molecular basis for enzyme regulation. In «The Enzymes» (ed. P. D. Boyer), Vol. 1, p. 342, Academic Press, London and New York (1970).
- Kubitschek H. Generation times: ancestral dependence and dependence upon cell size. Expl Cell Res. 43, 30 (1966).
- Lawrence P. A. Gradients in the insect segment: the orientation of hairs in the milkweed bug *Oncopeltus fasciatus*. J. exp. Biol. 44, 607 (1966).
- Lawrence P. A. Polarity and patterns in the postembryonic development of insects. Adv. Insect Physiol. 7, 197 (1970).
- Lawrence P. A. Cell movement during pattern regulation in *Oncopeltus*. Nature, Lond. 248, 609 (1974).
- Lawrence P. A. The structure and properties of a compartment border: the intersegmental boundary in *Oncopeltus*. In «Cell Patterning» (eds R. Porter and J. Rivers), Ciba Foundation Symposium, Vol. 29, p. 3, Elsevier, Amsterdam (1975).
- Lawrence P. A., Crick F. H. C., Munro M. A gradient of positional information in an insect. Rhodnius. J. Cell Sci. 11, 815 (1972).
- Lederberg J., Tatum E. L. Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 11, 113 (1946).
- Lentz T. H. Hydra induction of supernumerary heads by isolated neurosecretory granules. Science, N. Y. 150, 633 (1965).
- Levine R. L., Jacobson M. Deployment of optic nerve fibres is determined by positional markers in the frog's tectum. Expl. Neurol. 43, 527 (1974).
- Le Witt M. A. J. Synchronisation of mammalian cells in continuous culture. Ph. D. thesis, Sussex University, 1972.
- Locke M. The cuticular pattern in an insect, *Rhodnius prolixus*, Stal. J. exp. Biol. 36, 459 (1959).

- Locke M. The cuticular pattern in an insect. The behaviour of grafts in segmented appendages. *J. Insect Physiol.* 12, 397 (1966).
- Loomis W. F., Magasanik B. Nature of the effector of catabolite repression of β -galactosidase in *E. coli*. *J. Bact.* 92, 170 (1966).
- Lowenstein W. R. On the genesis of cellular communication. *Devl Biol.* 15, 503 (1967).
- Lowenstein W. R., Kanno Y. Intercellular communication and tissue growth. *J. Cell Biol.* 33, 225 (1967).
- Lund E. J. Experimental control of organic polarity by the electrical current. I. Effects of electrical currents on regenerating internodes of *Obelia commisuralis*. *J. exp. Zool.* 34, 471 (1921).
- Maaløe O., Kjeldgaard N. O. Control of Macromolecular Synthesis, W. A. Benjamin, New York (1966).
- Maaløe O., Kurland C. G. The integration of protein and ribonucleic acid synthesis in bacteria. In «Cell Growth and Cell Division» (ed. R. J. C. Harris), p. 93, Academic Press, London and New York (1963).
- Mass W. K. Studies in repression of arginine biosynthesis in *Escherichia coli*. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 26, 183 (1961).
- Makman R. S., Sutherland E. Q. Adenosine 3',5'-phosphate in *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* 240, 1309 (1965).
- Marcus W. Untersuchungen über die Polarität der Rumpfhaut von Schmetterlingen. Wilhelm Roux Arch. EntwMech. Org. 154, 56 (1962).
- Markowitz D. Collective modes and wave-like solutions to cellular control equations. *J. theor. Biol.* 31, 475 (1971).
- Markowitz D., Nisbet R. M. Co-operativity in biological machines. *J. theor. Biol.* 39, 653 (1973).
- Marks F. A tissue-specific factor inhibiting DNA synthesis in mouse epidermis. *Natn. Cancer Inst. Monogr.* 38, 79 (1973a).
- Marks F. The second messenger system of mouse epidermis. III. Guanyl cyclase. *Biochim. biophys. Acta* 309, 349 (1973b).
- Marr A. G., Painter P. R., Nilson E. H. Growth and division of individual bacteria. Symp. Soc. gen. Microbiol. 19, 237 (1959).
- Martinez H. H. Morphogenesis and chemical dissipative structures in a computer-simulated case study. *J. theor. Biol.* 36, 479 (1972).
- Masters M., Broda P. Evidence for the bidirectional replication of the *E. coli* chromosome. *Nature, New Biology* 232, 137 (1971).
- Mayersbach von, H. (ed.) Cellular Aspects of Biorhythm, Springer-Verlag, Berlin (1969).
- Maynard Smith J. Continuous, quantized and model variation. *Proc. R. Soc. B.* 152, 397 (1960).
- McClare C. W. F. Chemical machines, Maxwell's Daemon and living organisms. *J. theor. Biol.* 30, 1 (1971).
- McClare C. W. F. A «Molecular Energy» muscle model. *J. theor. Biol.* 35, 569 (1972).
- McLane S. Categories for the Working Mathematician, Springer, New York, 1971.
- McMahon D. A cell-contact model for cellular position determination in development. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 2396 (1973).
- Meinhardt H., Gierer A. Applications of a theory of biological pattern formation based upon lateral inhibition. *J. Cell Sci.* 15, 321 (1974).
- Mohr U., Althoff J., Kinzel U., Süß R., Volm M. Melanoma regression induced by «chalones»: a new tumour inhibiting principle acting in vivo. *Nature, Lond.* 220, 138 (1968).
- Monod J. The phenomenon of enzymatic adaptation and its bearings on problems of genetics and cellular differentiation. *Growth* 11, 223 (1947).
- Monod J. La technique de culture continue: théorie et applications. *Annls Inst. Pasteur Lille* 79, 370 (1950).

- Monod J., Jacob F. Teleonomic mechanisms in cellular metabolism, growth and differentiation. Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol. 26, 389 (1961).
- Monod J., Wyman J., Changeux J.-P. On the nature of allosteric transitions: a plausible model. J. molec. Biol. 12, 88 (1965).
- Moser H. The dynamics of bacterial populations maintained in the chemostat, Publication No. 614, Carnegie Institution of Washington (1958).
- Nanjundiah V. A differential chemotactic response of slime mould amoebae to regions of the early amphibian embryo. Expl Cell Res. 86, 408 (1974).
- Nanney D. L. Cortical patterns in morphogenesis. Science, N. Y. 160, 496 (1968).
- Naora H. Nuclear RNA. In «The Ribonucleic Acids» (eds. P. R. Stewart and D. S. Latham), p. 37, Springer-Verlag, New York (1973).
- Nelbach M. E., Pigiet V. P., Gerhardt J. C., Schachman H. K. A role for zinc in the quaternary structure of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. Biochemistry, N. Y. 11, 315 (1972).
- Newman S. A. A source of stability in metabolic networks. J. theor. Biol. 35, 227 (1972).
- Newman S. A. The interaction of the organizing regions in *Hydra* and its possible relation to the role of the cut end in regeneration. J. Embryol. exp. Morph. 31, 541 (1974).
- Nicolson G. L., Singer S. J. Ferritin in conjugated plant agglutinins as specific saccharide stains for electron microscopy: application to saccharides bound to cell membranes. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 68, 942 (1971).
- Njus D., Sulsman F. M., Hastings J. W. Membrane model for the circadian clock. Nature, Lond. 248, 116 (1974).
- Novak B., Bentrup F. W. An electrophysiological study of regeneration in *Acartabularia mediterranea*. Planta 108, 227 (1972).
- Novick A., Szilard L. Experiments with the chemostat on spontaneous mutations of bacteria. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 36, 708 (1950).
- Novick A., Szilard L. Experiments with the chemostat on the rates of amino acid synthesis in bacteria. In «Dynamics of Growth Processes», p. 21, Princeton University Press (1954).
- Nübler-Jung K. Cell migration during pattern reconstitution in the insect segment *Dysdercus intermedius* Dist., (Heteroptera). Nature, Lond. 248, 610 (1974).
- Nucitelli R., Jaffe L. F. Spontaneous current pulses through developing fucoid eggs. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 71, 4855 (1974).
- Pardee A. B. Control of cell division: models from micro-organisms. Cancer Res. 28, 1802 (1968).
- Passano L. M., McCullough C. B. Coordinating systems and behaviour in *Hydra*. J. exp. Biol. 42, 205 (1965).
- Pastan I., Perlman R. Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. Science, N. Y. 169, 339 (1970).
- Pattee H. H. Discrete and continuous processes in computers and brains. In «Lecture Notes in Biomathematics. IV. Physics and mathematics of the nervous system» (eds M. Conrad, W. Güttinger, and M. Dal Cin), p. 128, Springer-Verlag, Berlin (1974).
- Paul J. General theory of chromosome structure and gene activation in eukaryotes. Nature, Lond. 238, 444 (1972).
- Pederson F. S., Lane E., Kalgora N. O. Codon specific, tRNA dependent in vitro synthesis of ppGpp and pppGpp. Nature, New Biology 243, 13 (1973).
- Peterkovsky A., Gazdor C. Glucose inhibition of adenylate cyclase in intact cells of *Escherichia coli*. B. Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A. 71, 2324 (1974).
- Piepho H. Über die polare Orientierung der Bälge und Schappen auf dem Schmetterlings-rumpf. Biol. Zbl. 74, 467 (1955).

- Piérard A., Glansdorff N., Mergeay M., Wiame J. M. Control of the biosynthesis of carbamyl phosphate in *Escherichia coli*. *J. molec. Biol.* **14**, 23 (1965).
- Pilgrim S. Autoradiographic investigations with ^3H -thymidine on the influence of the diurnal rhythm in cell proliferation kinetics. In «The cellular aspects of biorhythms» (ed. H. von Mayersbach), p. 100, Springer-Verlag, Berlin (1967).
- Pilgrim C., Erb W., Maurer W. Diurnal fluctuations in the numbers of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. *Nature, Lond.* **199**, 863 (1963).
- Pittendrigh C. S. Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **25**, 159 (1960). (См. сборник Биологические часы, изд-во «Мир», М., 1964.)
- Pittendrigh C. S. On the mechanism of the entrainment of a circadian rhythm by light cycles. In «Circadian Clocks» (ed. J. Aschoff), p. 277, North-Holland, Amsterdam (1965).
- Pittendrigh C. S. The circadian oscillation in *Drosophila pseudo-obscura* pupae: a model for the photoperiodic clock. *Z. Pflanzenphysiol.* **54**, 275 (1966).
- Pittendrigh C. S., Bruce V. G. An oscillator model for biological clocks. In «Rhythmic and Synthetic Processes in Growth» (ed. D. Rudnick), p. 75, Princeton University Press (1957).
- Porcellati G., di Jeso F. (eds) Membrane-bound enzymes. *Adv. exp. Biol. Med.* **14**, 71 (1971).
- Potten C. S. The epidermal proliferative units: the possible role of the central basal cell. *Cell Tiss. Kinet.* **7**, 77 (1974).
- Powell E., Errington F. Generation time of individual bacteria: some corroborative measurements. *J. gen. Microbiol.* **31**, 315 (1963).
- Prescott D. M. Relation between cell growth and cell division. *Expl Cell Res.* **11**, 86 (1956).
- Prescott D. M., Goldstein L. Nuclear-cytoplasmic interaction in DNA synthesis. *Science, N. Y.* **155**, 469 (1967).
- Prestige M. C., Willshaw D. J. On a role for competition in the formation of patterned neural connexions. *Proc. R. Soc. B.* **190**, 77 (1975).
- Prevost C., Moses V. Pool sizes of metabolic intermediates and their relation to glucose repression of β -galactosidase synthesis in *E. coli*. *Biochem. J.* **103**, 349 (1967).
- Prigogine I. Structure, dissipation and life. In «Theoretical Physics and Biology» (ed. M. Marois), p. 23, North-Holland, Amsterdam (1969).
- Pritchard R. H., Barth P. T., Collins J. Control of DNA synthesis in bacteria. *Symp. Soc. gen. Microbiol.* **19**, 263 (1969).
- Prothero J. W., Tyler R. W. A model of thymocyte proliferation. *J. theor. Biol.* **51**, 357 (1975).
- Rahn O. A chemical explanation of the variability of the growth rate. *J. gen. Physiol.* **15**, 257 (1932).
- Rapp P. E. A theoretical investigation of a large class of biochemical oscillators. *Math. Biosciences*, **25**, 165 (1975).
- Reaney D. C. A regulatory role for viral RNA in eukaryotes. *J. theor. Biol.* **49**, 461 (1975).
- Richter C. P. Biological Clocks in Medicine and Psychiatry, Charles C. Thomas, Springfield, Illinois, 1965.
- Roberts R. B., Abelson P. H., Cowie D. B., Bolton E. T., Britten R. J. Studies of biosynthesis in *Escherichia coli*, Publication No. 607, Carnegie Institution of Washington, 1955.
- Robertson A., Drage D. J., Cohen M. H. Control of aggregation in *Dictyostelium discoideum* by an externally applied periodic pulse of cyclic AMP. *Science, N. Y.* **175**, 333 (1972).

- Rose S. M. Polarized control of regional structure in *Tubularia*. *Devl Biol.* 7, 488 (1963).
- Rosenbusch J. B., Weber K. Subunit structure of aspartate transcarbamylase from *Escherichia coli*. *J. biol. Chem.* 246, 1644 (1971).
- Rubin J., Robertson A. The tip of the *Dictyostelium discoideum* pseudoplasmodium as an organizer. *J. Embryol. exp. Morph.* 33, 227 (1975).
- Rusch H. P. Some biochemical events in the life cycle of *Physarum polycephalum*. *Adv. Cell Biol.* 1, 297 (1970).
- Rytomaa T., Kiviniemi K. Control of cell production in rat chloroleukaemia by means of the granulocytic chalone. *Nature, Lond.* 220, 136 (1968a).
- Rytomaa T., Kiviniemi K. Control of granulocyte production. *Cell Tiss. Kinet.* 1, 329 (1968b).
- Sachsenmaier W., Remy U., Plattner-Schobel R. Initiation of synchronous mitosis in *Physarum polycephalum*. *Expl. Cell Res.* 73, 41 (1972).
- Saetren H. A. A principle of auto-regulation of growth. Production of organ specific mitosis-inhibitor in kidney. *Expl. Cell Res.* 11, 229 (1956).
- Сандахчиев Л. С., Пучкова Л. И., Пикалов А. В. Subcellular localization of morphogenetic factors in anucleate *Acetabularia* at the stages of genetic information transfer and expression. In «Biology and Radiobiology of Anucleate systems. II. Plant Cells» (eds S. Bonotto, R. Goutier, R. Kirchner and J.-R. Maisin), p. 297, Academic Press, New York and London (1972).
- Sander G., Pardee A. B. Transport changes in synchronously growing CHO and L cells. *J. cell. Physiol.* 80, 267 (1972).
- Saunders J. W. The proximo-distal sequence of origin of the parts of the chick wing and the role of the ectoderm. *J. exp. Zool.* 108, 363 (1948).
- Saunders J. W., Gosseling M. T. Ectodermal-mesodermal interactions in the origin of limb symmetry. In «Epithelial-Mesenchymal Interactions» eds R. Fleischmajer and R. E. Billingham, p. 78, Williams and Wilkins, Baltimore (1968).
- Savageau M. A. Genetic regulatory mechanisms and the ecological niche of *Escherichia coli*. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 71, 2453 (1974).
- Schaechter M., Williamson J. P., Houd J. R., Koch A. L. Growth cell and nuclear divisions in some bacteria. *J. gen. Microbiol.* 29, 421 (1962).
- Schaller C. H. Isolation and characterization of low molecular weight substances activating head and bud formation in *Hydra*. *J. Embryol. exp. Morph.* 29, 27 (1973).
- Schrödinger E. W. What Is Life? Cambridge University Press, 1948 (Шредингер Э., Что такое жизнь? Атомиздат, М., 1972).
- Schubiger G. Regeneration, duplication and transdetermination in fragments of the leg discs of *Drosophila melanogaster*. *Devl Biol.* 26, 277 (1971).
- Schweiger E., Wallraff H. G., Schweiger H. G. Endogenous circadian rhythms in cytoplasm of *Acetabularia*; influence of the nucleus. *Science, N. Y.* 146, 658 (1964).
- Segel L. A. On collective motions of chemotactic cells. In «Lectures on Mathematics in the Life Sciences» (ed. J. D. Cowan), Vol. 4, p. 1, American Mathematical Society, Providence, Rhode Island (1972).
- Shaffer B. M. The Acrasina. In «Advances in Morphogenesis» (eds M. Abercrombie and J. Brachet), Vol. 2, p. 109, Academic Press, New York and London (1962).
- Siekevitz P. Biological membranes: the dynamics of their organization. *A Rev. Physiol.* 34, 117 (1972).
- Singer S. J., Nicolson G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science, N. Y.* 175, 720 (1972).
- Smith J. A., Martin L. Do cells cycle? *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 70, 1263 (1973).

- Sompayrac L., Maaloe O.* Autorepressor modell for control of DNA replication. *Nature, New Biology* 241, 133 (1973).
- Sonneborn T. M.* Does preformed cell structure play an essential role in cell heredity? In «The Nature of Biological Diversity» (ed. J. M. Allen), p. 166, McGraw-Hill, Maidenhead, Berks (1963).
- Sperry R. W.* Optic nerve regeneration with return of vision in anurans. *J. Neurophysiol.* 7, 57 (1944).
- Sperry R. W.* Regulative factors in the orderly growth of neural circuits. *Growth* 15, 63 (1951).
- Sperry R. W.* Problems in the biochemical specification of neurons. In «Biochemistry of the Developing Nervous System» (ed. H. Waelsch), p. 74, Academic Press, New York and London (1955).
- Sperry R. W.* Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fibre patterns and connections. *Proc. natn. acad. Sci. U. S. A.* 50, 703 (1963).
- Spiegelman S.* Differentiation as the controlled production of unique enzymatic patterns. *Symp. Soc. exp. Biol.* 2, 286 (1948).
- Spiegelman S., Reiner J.* The formation and stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate. *J. gen. Physiol.* 31, 175 (1947).
- Stanley H. E.* Introduction to Phase Transitions and Critical Phenomena, Oxford University Press, 1971. (Стенли Г., Фазовые переходы и критические явления, изд-во «Мир», М., 1973.)
- Stent G. S., Brenner S.* A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 47, 2005 (1961).
- Stockdale F. E., Topper Y. J.* The role of DNA synthesis and mitosis in hormone-dependent differentiation. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* 56, 1283 (1966).
- Stone L. S.* Functional polarization in developing and regenerating retinæ of transplanted eyes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 49, 856 (1948).
- Straznicky K., Gaze R. M., Keating M. J.* The retino-ectal projection from a double-ventral compound eye in *Xenopus laevis*. *J. Embryol. exp. Morph.* 31, 123 (1974).
- Stumpf H. F.* Further studies on gradient-dependent diversification in the pupal cuticle of *Galleria mellonella*. *J. Exp. Biol.* 49, 49 (1968).
- Sugita M.* The idea of a molecular automation. *J. theor. Biol.* 4, 179 (1963).
- Summerbell D., Lewis J. H.* Time, place and positional value in the chick wing bud. *J. Embryol. exp. Morph.* 33, 621 (1975).
- Sommerbell D., Lewis J. H., Wolpert L.* Positional information in chick limb morphogenesis. *Nature, Lond.* 244, 492 (1973).
- Sweeney B. M.* Potassium content of *Gonyaulax polyedra* and phase clamps in the circadian rhythm of stimulated bioluminescence by short exposure to ethanol and valinomycin. *Pl. Physiol., Lancaster* 53, 337 (1974a).
- Sweeney B. M.* A physiological model for circadian rhythms derived from the *Acetabularia* rhythm paradoxes. *Int. J. Chromobiol.* 2, 25 (1974b).
- Sweeney B. M., Hastings J. W.* Rhythmic cell division in populations of *Gonyaulax polyedra*. *J. Protozool.* 5, 217 (1958).
- Sweeney B. M., Haxa E. T.* Persistence of a photosynthetic rhythm in enucleated *Acetabularia*. *Science, N. Y.* 134, 1361 (1961).
- Sweeney B. M., Tuffli C. F., Rubin R. H.* The circadian rhythm in photosynthesis in *Acetabularia* in the presence of actinomycin D, puromycin and chloramphenicol. *J. gen. Physiol.* 50, 647 (1967).
- Szekely G.* Regulations tendenzen in der Ausbildung der «funktionellen Spezifität» der Retinaanlage bei *Triturus vulgaris*. *Arch. EntwMech. Org.* 150, 48 (1957).
- Tartar V.* Morphogenesis in protozoa. In «Research on Protozoology» (ed. T.-T. Chen), Vol. 2, p. 1, Pergamon Press, Oxford (1967).

- Thom R. Phase transitions as catastrophes. In «Statistical Mechanics: New Concepts, New Problems, New Applications» (eds S. A. Rice, K. F. Freed and J. C. Light), p. 93, University of Chicago Press (1970a).
- Thom R. Topological models in biology. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 3, p. 89, Edinburgh University Press (1970b).
- Thompson J. M. T. Experiments in catastrophe. *Nature*, Lond. **254**, 392 (1975).
- Thornley J. H. M. Phyllotaxis. I. A mechanistic model. *Ann. Bot.* **39**, 491 (1975).
- Thornley J. H. M. Phyllotaxis. II. A description in terms of interacting logarithmic spirals. *Ann. Bot.* **39**, 509 (1975).
- Tickle C., Summerbell D., Wolpert L. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. *Nature*, Lond. **254**, 199 (1975).
- Tiwari J., Fraser A. Genetic regulation by feedback repression. *J. theor. Biol.* **39**, 679 (1973).
- Turing A. M. The chemical basis of morphogenesis. *Phyl. Trans. R. Soc. Ser. B.* **237**, 37 (1952).
- Tyson J. J., Light J. C. Properties of two-component biomolecular and trimolecular chemical reaction systems. *J. chem. Phys.* **59**, 4164 (1973).
- Umbarger H. E. Evidence for a negative feedback mechanism in the biosynthesis of isoleucine. *Science*, N. Y. **123**, 848 (1956).
- Viniegra-Gonzalez G., Martinez H. M. Stability of biochemical feedback systems. *Biophys. Soc. Abstracts* **13**, 210 (1969).
- Vogel H. J. Aspects of repression in the regulation of enzyme synthesis: pathway-wide control and enzyme-specific response. *Cold Spring Harb. Symp. quant. Biol.* **26**, 163 (1961).
- Vonderhaar B. K., Topper Y. J. A role of the cell cycle in hormonedependent differentiation. *J. Cell Biol.* **63**, 707 (1974).
- Waddington C. H. Form and information; Epilogue. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 4, pp. 109 and 283, Edinburgh University Press (1972).
- Walker J. R., Pardee A. B. Evidence for a relationship between DNA metabolism and septum formation in *Escherichia coli*. *J. Bact.* **95**, 123 (1968).
- Walter C. F. Oscillations in controlled biochemical systems. *Biophys. J.* **9**, 863 (1969).
- Walter C. F. The occurrence and the significance of limit cycle behaviour in controlled biochemical systems *J. theor. Biol.* **27**, 259 (1970).
- Webster G. C. Morphogenesis and pattern formation in hydroids *Biol. Rev.* **46**, 1 (1971).
- Weiss P., Kavanau J. L. A model of growth and growth control in mathematical terms. *J. gen. Physiol.* **41**, 1 (1957).
- Whitaker D. M. The effect of hydrogen ion concentration on the induction of polarity in *Fucus* eggs. III. Gradient in hydrogen ion concentration. *J. gen. Physiol.* **21**, 833 (1938).
- Wigglesworth V. B. The Control of Growth and Form: A Study of the Epidermal Cells in the Insect. Cornell University Press (1959).
- Wilby O. K., Webster G. C. Experimental studies on axial polarity in *Hydra*. *J. Embryol. exp. Morph.* **24**, 595 (1970).
- Winfree A. T. Biological rhythms and the behaviour of populations of coupled oscillators. *J. theor. Biol.* **16**, 15 (1967).
- Winfree A. T. The temporal morphology of a biological clock. In «Lectures in Mathematics in the Life Sciences» (ed M. Gerstenhaber), Vol. 2, p. 109, American Mathematical Society, Providence, Rhode Island (1970).
- Winfree A. T. Corkscrews and singularities in flies: resetting behaviour of the circadian eclosion rhythm. In «Biochronometry», p. 81, National Academy of Sciences, Washington (1971).
- Winfree A. T. Resetting the amplitude of *Drosophila's* circadian chronometer. *J. comp. Physiol.* **85**, 105 (1973).

- Winfree A. T. Unclocklike behaviour of biological clocks. *Nature*, Lond. **253**, 315 (1975).
- Wolpert L. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J. theor. Biol.* **25**, 1 (1969).
- Wolpert L. The concept of positional information and pattern formation. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 4, p. 83, Edinburgh University Press. (1972).
- Wolpert L., Hicklin J., Hornbruch A. Positional information and pattern regulation in regeneration of *Hydra*. *Symp. Soc. exp. Biol.* **25**, 391 (1971).
- Wolpert L., Lewis J., Summerbell D. Morphogenesis of the vertebrate limb. In «Cell Patterning» (eds R. Porter and J. Rivers), Ciba Foundation Symposium, Vol. 29, p. 95, Elsevier, Amsterdam (1975).
- Woolley W. H., De Rocco A. G. Asynchronous divisions in cell colonies. I. General considerations and a linear control model. *J. theor. Biol.* **39**, 73 (1973).
- Yamazaki L., Yokota K., Nakajuma R. Analysis of the conditions causing the oscillatory oxidation of reduced nicotinamide-adenine dinucleotide by horseradish peroxidase. *Biochim. biophys. Acta* **132**, 310 (1967).
- Yang H.-L., Zubay G., Urm E., Reiness G., Cashel M. Effects of guanosine tetraphosphate, guanosine pentaphosphate and β - γ -methylenyl-guanosine pentaphosphate on gene expression of *Escherichia coli* in vitro. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 63 (1974).
- Yates R. A., Pardee A. B. Control of pyrimidine biosynthesis in *Escherichia coli* by a feed-back mechanism. *J. biol. Chem.* **221**, 757 (1956).
- Yoon M. G. Retention of the original topographic polarity by 180° rotated tectal reimplant in young adult goldfish. *J. Physiol., Lond.* **233**, 575 (1973).
- Yoshikawa H. The initiation of DNA replication in *Bacillus subtilis*. *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.* **58**, 312 (1967).
- Zeeman E. C. Differential equations for the heart beat and nerve impulse. In «Towards a Theoretical Biology» (ed. C. H. Waddington), Vol. 4, p. 8, Edinburgh University Press (1972).
- Zeeman E. C. Primary and secondary waves in developmental biology. In «Lectures on Mathematics in the Life Science», Vol. 7, p. 69, American Mathematical Society Providence, Rhode Island (1974).
- Zwilling E. Limb morphogenesis. In «Advances in Morphogenesis» (eds M. Abercrombie and J. Brachet), Vol. 1, p. 301, Academic Press, New York and London (1961).

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Автокатализ 63
- Адгезивные маркеры, специфичность 213
- Аденилатциклаза 50
- Адреналэктамирование и митотические ритмы 130
- Активаторы 34
- Алло-лактоза 48
- Аллостерические свойства ферментов 20—26
 - ферменты 24
 - центры 34
 - эффекты 30, 33
- Аминоацил-тРНК 58
- Аналого-цифровая двойственность 256
- Антиметаболиты и биологические часы 139
- Апикальный эктодермальный гребень 195
- Апорепрессор 38
- Аргинин, биосинтез 52
 - цепь управления 53
- Асимптотическая орбитальная устойчивость 135
- Аспартаткарбамоилтрансфераза 19, 23—25
- Acetabularia* 139—140, 164—165
 - ритмы 140
- Ambystoma* 209

- Белок-инициатор 89, 129
- Бинарные переменные 70
- Биологические часы 57, 134—150
 - — влияние антиметаболитов 138—139
 - — мембранные модели 140—141
 - — температурная компенсация 143
- Бифуркации 221, 248
- Большое каноническое распределение 238
- Бүлевая функция 70

- Внутренний катафорез 172
- Волна дифференцировки 188
 - источник 176
 - эпигенетической индукции 185
- Волновая модель и пространственная периодичность 185
 - — — эпидермис насекомых 193
 - — — эпиморфоз 197
 - — мембраны 169, 170, 171, 185, 193, 197
- Волны метаболической активности в мембранах 169
- Временные разрывы 253
- Время релаксации метаболической системы 15
 - — эпигенетической системы 45
- Вынужденная синхронность в моделируемой культуре клеток 127—128

- β -Галактозидаза 45
- β -Галактозидацетилаза 45
- Гапглиозные клетки 208
- Гемоглобин 30
- Геп-инициатор 77
- Ген-репликатор 77
- Генеративная грамматика 254
 - теория 260
- Генетическая система 45
- Гетерархия 35
- Гидроиды 153—160
 - изменение полярности 182
 - пейсмекерная область 178
 - периодические режимы 177—182
- Гиперболическая омбилическая точка 250
- Гипостомный индуктор 155—156
- Гистон FI 94
- Глазодвигательный нерв 213
- Гликолиз 20, 39—40
- Гликолитический осциллятор 39
- Глюкоза, истощение 48, 53
- Глюконеогенез 20

- Гормон повреждения 99
 Градиентная гипотеза и пространственная организация 105—106, 153
 Граничные значения 200, 203
 Гуанозинтетрафосфат 59
Gonyaulax, люминесценция 136—137
- Дерепрессия 47
 Десмосомы 104
 Диссипативная структура 68, 248
 Диффузия, уравнения 159
 Дорсо-вентральная ось 202—203, 209
Dictyostelium discoideum 160, 256
 — — агрегация 161—163, 173—174
 — — периодическое движение 162
- Закон действующих масс 16
 Знание как информация 226
 Значение поля 203—204
 Зона поляризующей активности 196, 198
 Зона развития 195
 Зрительный нерв 208
 — тектум 208
- Иерархическая организация 16
 Иерархия 34—35, 45
 Изинга модель 238
 Изоцитратдегидрогеназа 34
 Имгинальный диск 200, 202
 Ингибирование конечным продуктом 19
 — по типу обратной связи 18
 Индуцируемость 46
 Инициация репликации ДНК 76
 Инозиновая кислота 60
 Интеллект 261
 Интеркалярный рост 204
 Интерпретация информации 226
 Инфузорин 167
 Искусственный интеллект 220
- Канал информации 226
 Карбамонлфосфатсинтетаза 55
 Катаболическая репрессия 50—51
 Катаболический репрессор 49, 50
 Катастрофа ласточкина хвоста 246
 — Римана — Гюгонио 245
 — сборки 246
 Категории 234, 236
 Кваитующий митоз 96
- Кейлонная теория 99—109
 Кейлоны и опухоли 108—109
 Клеточное деление и релаксация складчатой структуры 191—192
 Клеточный кортекс 167, 168
 Клеточный цикл и индукция синтеза казеина 96
 — — — клеточная дифференцировка 97—98
 — — прокариотов 73
 — — эукариотов 83
 Когерентные колебания 251
 Колебания адгезивности 214
 — и ингибирования по типу обратной связи 35
 Коллективный ритм 249
 Коллективные колебания 251
 — моды и синхронность клеточного деления 247
 — переменные 242
 — явления 236
 Конечность таракана: локальная и глобальная упорядоченность 202
 Конечные автоматы 71
 Конкурентное ингибирование 20
 Консервативная динамика 65
 Конститутивные мутанты 46
 Контактное торможение 131
 Контакты 132, 215
 — плотные 215
 — щелевые 215
 Концепция активности, чувствительной к ситуации 257
 — — — — — эмбриогенез 258
 Кооперативная периодичность в цепях управления клетки 249—250
 Кооперативное поведение 29, 30—31
 Кооперативные системы 218
 Кривая фазового ответа циркадных часов 146
 — — равновесия 241, 243
 Критическая температура 240, 242—243
 Кросс-корреляционные члены 232
 Крыло цыпленка: эпиморфоз 195—197
- Лазер 247
 Лактопероксидаза 39
 Леприкон 78
 Лингвистика 220
 Лингвистическая компетентность 219
 Лишние конечности 249
 Логические переключающие цепи 69
 Локальная обратная связь 199

- Магическое пятно 59
 Макромолекулярные «наблюдатели» 222
 Максвелла соглашение 243
 Марковский процесс 249
 Медиальный гипостом 180
 Мембранные модели биологических часов 140—141
 Мембраны, возбудимость 237—240
 — волны метаболической активности 169
 — жидкостная мозаичная модель 143
 — и морфогенез 168
 — переход между состояниями возбудимости и невозбудимости 207, 240
 Метаболическая система, время релаксации 15—16
 — цепь 35
 Метаболические градиенты 155
 Метаболический выключатель 29
 Метаболическое возбуждение мембран 169
 Миграция энергии 233
 Митоген 90, 91
 Многомерные ферменты 29
 Модель регенерации, полярная система координат 201
 Мозг промежуточный 212
 — средний 212
 Морфоген 176
 — источники и стоки 190—191
 Мультистабильность 37, 192
 Мутант RC 58

 Назо-темпоральная ось 208
 Нейронная специфичность 210
 Нейроны в тексте 208
 Нелинейные сети 17
 Нервная сеть 258

 Область конденсации 243
 — сосуществования фаз 239
 Образование полярной оси у оплодотворенной яйцеклетки 172
 — почки и электрические токи 199
 Обратная предельная последовательность 228
 Обратное предельное пространство 231
 Обратные предельные системы 227, 235
 Объем бактериальной клетки 79—81
 Операторы усреднения 228

Ias-Оперон 45—48
 Оперон дифференцировки 101—102
 — клеточного цикла 101—102
 Орбитальная устойчивость 138
 Организатор движений 257
 Орнитинтранскарбамиллаза 53
 Осциллятор релаксационного типа 145
 Отношение объемов ядра и цитоплазмы 107
Obelia 178

 Пейскемер 160, 181, 198
 — и организатор 171
 Перегородка в бактериальной клетке, формирование 75
 Периодичность у многоклеточных 123
 Пероксидаза из хрена 39
 Плазмодий 88, 89
 — слияние 88, 89
 Позиционная информация 156
 Познавательная мощность 232, 254
 Познание и знание 218
 — составные части 261
 Познающая единица 224
 — система 219
 — — и знание 224
 Поле поведения 258
 — угловых координат 203
 Поля для развивающихся структур 202—206
 Поляризация миксамеб 173—174
 Потенциальная поверхность 245
 — функция 245
 Правила генерации 204—205
 — — процессов, формирующих структуры 203
 — усреднения 203—204
 Правило дивергенции 204
 Предельный цикл 36, 91, 92, 252
 — — и клеточный цикл эукариотов 91
 — — колебания 38, 39
 Предельные ритмы и циркадные часы 147—148
 Промотор 50
 Пространственная организация 152
 — периодичность 183
 Процесс генерации 237, 254
 — генерирующий глобальные градиенты 199
 — эволюция и познание 221

Phaseolus 140
Physarum polycephalum 87

- Разрыв дуги 93
 — фазового ответа 149
 Распространение волны активности 198
 Регенерация имагинального диска 200
 — почки конечности 175, 177
 — шляпки 169
 — *Hydra* 180
 Регуляторный ген 47
 Регуляция 156
 — и волновая модель мембраны 177
 — пространственных периодичностей 185, 188
 Резонанс 233
 Резонансное соответствие 234
 Релаксация складчатой структуры 190
 Репликон 77, 89
 — гипотеза 77
 Репрессор 47
 — инициации 78, 79, 89, 90
 — — и объем клетки 80—81
 Ретино-текстальная проекция 208
 Решетчатый газ 238
 Рибосомная РНК 55
 — — гены 57
 — — синтез 55
 РНК-полимераза 47, 59
 — ингибирование фФГфф 61
 Родопсин 175
Rhodnius 190

 Самоорганизующаяся система 256
 Свертка 229
 Сигмоидная кинетика 29
 Сигнал и символ 227
 Синтетически-аналитическая двой-
 ственность 256
 Синхронизация клеток 121
 — популяций 144
 Синхронность митозов 57
 Системы восстановления клеток 120
 Складчатая структура 190
 Скорость роста клетки 251
 Сложное отображение 228
 Сомитогенез 188—189
 Состояние организации клеток 111
 Спонтанная синхронизация 252
 Статистическая механика 67, 68, 248
 Стохастическая переменная 230
 Стохастический вариант 249
 Структурно-зависимые преобразова-
 ния 219
 Суточные ритмы 130
Saccharomyces cerevisiae 86

 Таландическая температура 133
 — энергия 133
 Температурная компенсация в биоло-
 гических часах 253
 Теория гомологий Чеха 236
 — катастроф 237
 — плазматгена 62
 — чистого гена 95
 Тканевой гомеостаз 99, 105
 — — и кейлоны 103
 Трансдeterminация 72
 Транспортная РНК 56
Tenebrio 192
Triturus 209
Tubularia, периодические режимы 177

 Ударные волны 245
 Удвоение имагинального диска 200
 Узнавание на молекулярном уровне 26
 Уравнение возобновления 125
 — Лапласа 208
 — Михаэлиса — Ментен 22, 23
 — самосогласованного поля 238
 — Фоккера — Планка 248
 — Хилла 33
 «Установление соответствия» в зри-
 тельной системе 215
 Устойчивость периодических решений 184

 Фазовые переходы 236, 242
 Фазы клеточного цикла 85
 Ферментативная адаптация 42
 — кинетика, кооперативность 26
 Ферменты, бесконечная кооператив-
 ность 29
 Филоподии 214
 Фоновый ферментативный синтез 48
 Фосфорилирование белков в мембра-
 не 175
 Фосфофруктокиназа 20, 39
 Функторы 234, 235
 Функциональная иерархия 54, 221
 Функция согласованности 233
 — распределения времени удвоения 125
 — — плотности 67
Fucus 172

 Характеристическое уравнение 38
 Хемостат 112
 — адаптивное поведение 117
 Хиазма 212

- Химическая периодичность и морфогенез 182
Хлорамфеникол и синтез рРНК 57
Хранилище клеточной памяти 223
— филогенетической памяти 225
Хромосомы, начало репликаций 75—76
Xenopus laevis 209, 211—212
- Цепи управления 34—41, 51—61, 230—232
— — метаболизмом 34
Циклический АМФ (цАМФ) 49
Циркадные ритмы 134—150
- Часы, контролирующие вылупление личинок у *Drosophila* 144
Число оборотов фермента 15
- Шум в клеточном цикле 110
— — сопряженной системе 132
- Щелочная фосфатаза 123
- Эволюция и интеллект 261
— — обучение 223, 224
Экзогастрюляция 258
Электрические волны 173
Электрофизиологическая карта 208—209
Эпигенетические сети 61
Эпигенетическое управление, единица 50
— — уравнения 64
Эпидермальная пролиферативная единица 104
Эпидермальный кейлон 100
Эпидермис насекомых 189
Эпиморфоз 195
Эритропоэтин 121
- Ядерная киназа 94

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие к русскому изданию	4
Предисловие автора	8
Глава 1. УСТОЙЧИВОСТЬ И РЕГУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ	13
Метаболическая сеть	13
Устойчивость и закон действующих масс в метаболической системе	16
Ингибирование по типу обратной связи в метаболических системах	18
Аллостерические свойства ферментов	20
Кооперативная ферментативная кинетика	26
Цепи управления метаболизмом и их динамика	34
Заключение	40
Глава 2. УСТОЙЧИВОСТЬ И РЕГУЛЯЦИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ	42
Ферментативная адаптация	42
Индукция и репрессия генов	45
Репрессия путей биосинтеза по типу обратной связи	51
Контроль синтеза рибосомной РНК	55
Динамика эпигенетических сетей	61
Аналогия со статистической термодинамикой	62
Аналогия с вычислительными машинами: клетка как конечный автомат	69
Глава 3. МИТОТИЧЕСКИЙ И КЛЕТОЧНЫЙ ЦИКЛЫ	73
Прокариоты	73
Репликон и гипотеза инициатора	77
Гипотеза репрессора инициации	78
Эукариоты	83
Представление клеточного цикла в виде последовательности стадий	85
Клеточный цикл млекопитающих	95
Управление скоростью цикла и клеточная дифференцировка	98
Эпидермис млекопитающих и кейлонная теория	99
Вероятностные модели клеточного цикла и его управления	109
Глава 4. КЛЕТОЧНЫЙ РОСТ, СИНХРОННОСТЬ КЛЕТОЧНЫХ ЦИКЛОВ И БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЧАСЫ	111
Хемостат	112
Адаптивное поведение хемостата	117
Системы восстановления клеток	120
Синхронизация клеток	121
Суточные ритмы деления клеток в тканях млекопитающих	130

Контактное торможение	131
Клеточные часы	134
Физиология клеточных часов	137
Динамика часов, контролирующих вылупление личинок у <i>Drosophila</i>	144
Глава 5. МОРФОГЕНЕЗ: ОДНОМЕРНАЯ АПЕРИОДИЧЕСКАЯ УПО- РЯДОЧЕННОСТЬ	151
Введение	151
Полярность и осевые градиенты	153
Пейсмекеры и волны активности	160
Морфогенез одноклеточных	164
Мембраны и морфогенез	168
Регуляция и устойчивость	175
Периодические режимы у гидроидов	177
Глава 6. МОРФОГЕНЕЗ: ПРОСТРАНСТВЕННЫЕ ПЕРИОДИЧНОСТИ И МНОГОМЕРНАЯ УПОРЯДОЧЕННОСТЬ	183
Распространение волн и пространственные периодичности	185
Эпидермис насекомых	189
Мембрана и эпидермис насекомых	193
Эпиморфоз: крыло цыпленка	195
Волновая модель и эпиморфоз	197
Локальная и глобальная упорядоченность: имагинальный диск и ко- нечность таракана	200
Ретино-текстальная проекция зрительной системы амфибий	208
Механизм образования двумерной проекции	213
Глава 7. ОРГАНИЗМ КАК ПОЗНАЮЩАЯ И КООПЕРАТИВНАЯ СИ- СТЕМА	218
Функциональная иерархия	221
Обратные предельные системы	227
Кооперативные взаимодействия и фазовые переходы в познающих системах	236
Фазовые переходы и теория катастроф	242
Коллективные моды в ритмических процессах	247
Процессы генерации в познающих системах	254
Приложение	262
Список литературы	265
Предметный указатель	281