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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

2-е ИЗДАНИЕ, ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ
В 3-х томах

2

Перевод с английского
канд. биол. наук Т. Я. Абаимовой,
канд. биол. наук В. М. Маресина,
канд. биол. наук А. В. Никашина,
канд. биол, наук Г. И. Эйснер

под редакцией академика Г. П. Георгиева
и д-ра биол. наук Ю.С. Ченцова



Москва «Мир» 1994

ББК 28.070
М75
УДК 576.32/36

Федеральная целевая программа книгоиздания России

Авторы: Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К. Уотсон Дж. Д.

Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд. перераб. М75 и доп. Т. 2.: Пер. с англ.- М.: Мир, 1993.-539 с., ил. ISBN 5-03-001987-1

Созданный коллективом известных американских ученых (в их числе - лауреат Нобелевской премии Джеймс Уотсон) современный учебник молекулярной биологии. Энциклопедическая полнота охвата материала позволяет использовать его как справочное пособие. На русском языке выходит в 3-х томах. Читатель уже знаком с 1-м изданием (М.: Мир, 1986-1987). Новое издание переработано авторами и дополнено современным материалом. В т. 2 описана структура и функции ядра и цитоскелета, механизмы клеточного деления, организация процессов внутри и межклеточного транспорта.

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

1903010000-024
М———————— КБ 7-93-235 ББК 28.070
041 (01)-94

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001987-1 (русск.)
ISBN 5-03-001985-5
ISBN 0-8240-3695-6 (англ.)

© 1989 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts and James D. Watson
©перевод на русский язык, Абаимова Т.Я., Маресин В. М., Никашин А. В., Эйснер Г. И. 1993

8 Внутриклеточная сортировка макромолекул и сохранение клеточных компартментов

Известно, что бактериальная клетка не имеет внутренних перегородок, т. е. состоит как бы из одного отсека, окруженного плазматической мембраной. У эукариотической клетки таких отсеков несколько, эти клетки поделены на функционально различные, окруженные мембранами области (компартменты). Каждый компартмент, или органелла, имеет свой собственный набор ферментов и других специализированных молекул; существуют и сложные системы распределения, проводящие специфические продукты из одного компартмента в другой. Чтобы разобраться в строении эукариотической клетки, необходимо знать, что происходит в каждом из ее компартментов, какие молекулы курсируют между ними и как возникают и сохраняются сами компартменты.

Центральную роль в компартментации эукариотической клетки играют белки. Они катализируют реакции, протекающие в каждой органелле, и избирательно переносят малые молекулы внутрь органеллы и из нее. Белки также служат специфичными для органелл поверхностными маркерами, которые направляют новые партии белков и липидов к соответствующим компартментам. Клетка млекопитающих содержит около 10 миллиардов (10^{10}) молекул белков примерно 10000 разных типов, синтез почти всех этих белков начинается в цитозоле - общем пространстве, окружающем все органеллы. Каждый вновь синтезированный белок затем специфически доставляется в тот клеточный компартмент, который в нем нуждается. Прослеживая путь белка из одного компартмента в другой, можно разобраться в запутанном лабиринте клеточных мембран. Следовательно, нам надлежит сделать центральной темой этой главы внутриклеточные перемещения белков. Хотя здесь будут описываться и обсуждаться почти все клеточные органеллы, основное внимание будет обращено на эндоплазматический ретикулум (ЭР) и аппарат Гольджи, которые играют решающую роль в фиксации, сортировке и транспорте множества вновь синтезированных белков.

8.1. Компартментация в клетках высших организмов

В этом вводном разделе мы дадим краткий обзор клеточных органелл и взаимоотношений между ними. Мы рассмотрим методы, с помощью которых можно проследить движение белков между компартментами, и перечислим основные способы перемещения молекул белка из одного компартмента в другой.

8.1.1. Все эукариотические клетки содержат набор основных ограниченных мембраной органелл [1]

Многие важные биохимические процессы протекают внутри мембран или на их поверхностях. Например, при окислительном фосфорилировании и при фотосинтезе требуется полупроницаемая мембрана для

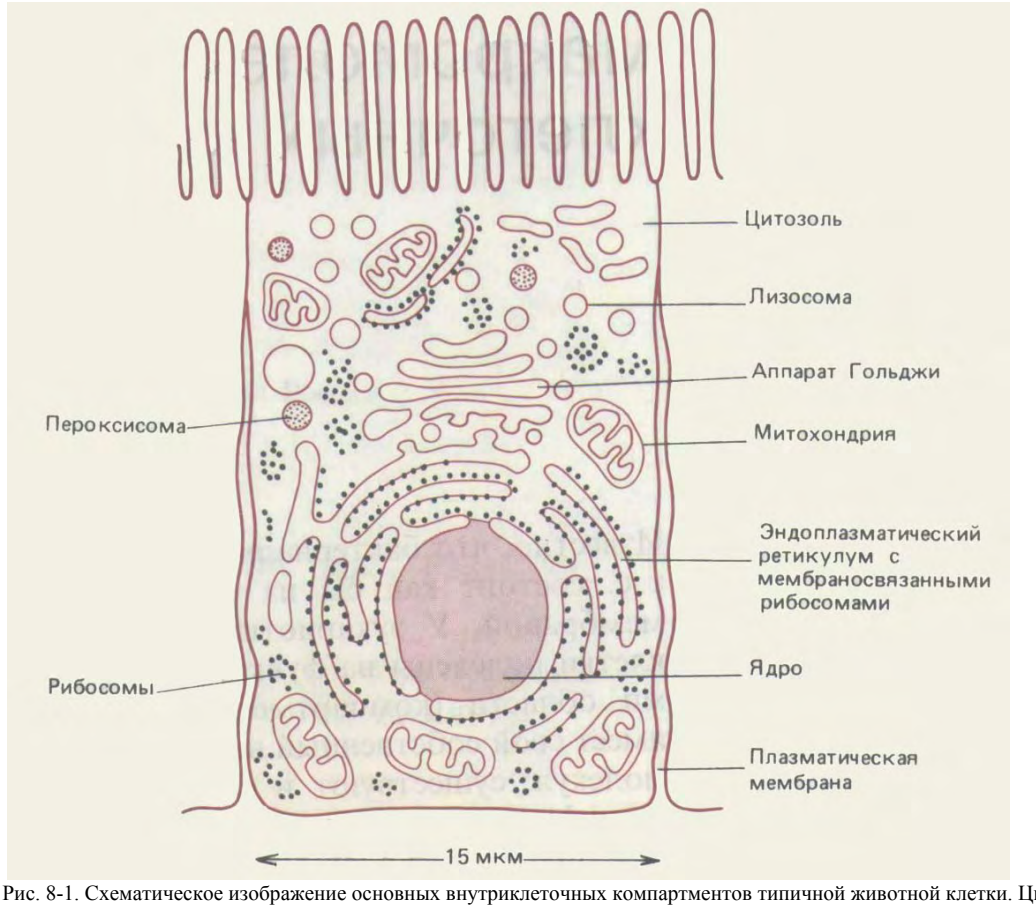


Рис. 8-1. Схематическое изображение основных внутриклеточных компартментов типичной животной клетки. Цитозоль, эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, ядро, митохондрия, эндосома, лизосома и пероксисома представляют собой индивидуальные компартменты, отделенные от остальной клетки по крайней мере одной избирательно проницаемой мембраной.

сопряжения транспорта протонов с синтезом АТР. Более того, мембраны служат каркасом для синтеза своих собственных компонентов. Внутренние мембраны эукариотической клетки делают возможной функциональную специализацию различных мембран, что является, как мы увидим, решающим фактором в разделении множества различных процессов, протекающих в клетке.

Внутриклеточные компартменты, общие для всех эукариотических клеток, показаны на рис. 8-1. Ядро содержит основную часть генома и является главным местом синтеза ДНК и РНК. Окружающая ядро цитоплазма состоит из цитозоля и расположенных в нем цитоплазматических органелл. Объем цитозоля составляет чуть больше половины от общего объема клетки. Именно в нем синтезируется белок и протекает большинство реакций так называемого промежуточного обмена - т. е. реакций, в которых одни малые молекулы разрушаются, а другие образуются, обеспечивая необходимые строительные блоки для синтеза макромолекул. Около половины всех мембран клетки ограничивают похожие на лабиринт полости эндоплазматического ретикулума (ЭР). На обращенной к цитозолю стороне ЭР находится множество рибосом. Эти рибосомы заняты синтезом интегральных мембранных белков и растворимых белков, предназначенных для секреции или для других органелл. В ЭР также синтезируются липиды для всей остальной клетки. Аппарат Гольджи состоит из правильных стопок уплощенных мембранных мешочков, называемых цистернами Гольджи; он получает из ЭР белки и липиды и отправляет эти молекулы в различные пункты внутри клетки, попутно подвергая их ковалентным модификациям. Митохондрии и хлоропласти растительных клеток производят большую часть АТР, используемого в реакциях биосинтеза, требующих поступления свободной энергии. Лизосомы содержат пищеварительные ферменты, которые разрушают отработанные органеллы, а также частицы и молекулы, поглощенные клеткой извне путем эндоцитоза. На пути к лизосомам поглощенные молекулы и частицы должны пройти серию органелл, называемых эндосомами. Наконец, пероксисомы (известные также

Таблица 8-1. Относительные объемы главных внутриклеточных компартментов в типичной клетке печени (гепатоците)

Внутриклеточный компартмент	Проценты от общего объема клетки[1)]	Приблизительное число на одну клетку[1)]
Цитозоль	54	1
Митохондрии	22	1700
Цистерны шероховатого ЭР	9	1
Цистерны гладкого ЭР плюс цистерны аппарата Гольджи	6	
Ядро	6	1
Пероксисомы	1	400
Лизосомы	1	300
Эндосомы	1	200

[1)]Считается, что все цистерны шероховатого и гладкого ЭР связаны между собой и образуют единый большой компартмент. Напротив, аппарат Гольджи в каждой клетке состоит из множества отдельных наборов собранных в стопки цистерн, и степень взаимосвязи между этими стопками до конца не выяснена.

как микротельца) представляют собой маленькие пузырьки, содержащие множество окислительных ферментов.

Кроме только что перечисленных главных мембранных органелл, клетка содержит множество мелких пузырьков, служащих переносчиками веществ между органеллами, а также пузырьков, связывающихся с плазматической мембраной в процессах эндоцитоза и секреции.

В целом, каждая мембранная органелла обладает как свойствами общими для любых клеток, так и специфическими особенностями,

Таблица 8-2. Относительные количества мембран разных типов в двух эукариотических клетках

Тип мембраны	Процент от общего количества клеточных мембран	
	Печень Гепатоцит[1)]	Поджелудочная железа Экзокринная клетка[1)]
Плазматическая мембрана	2	5
Мембрана шероховатого ЭР	35	60
Мембрана гладкого ЭР	16	<1
Мембрана аппарата Гольджи	7	10
Митохондрии		
Внешняя мембрана	7	4
Внутренняя мембрана	32	17
Ядро		
Внутренняя мембрана	0,2	0,7
Мембрана секреторных пузырьков	не определен	о 3
Мембрана лизосом	0,4	не определено
Мембрана пероксисом	0,4	- » -
Мембрана эндосом	0,4	- » -

[1)]Эти клетки сильно различаются по размерам: средний объем гепатоцита около 5000 мкм^3, а экзокринной клетки поджелудочной железы около 1000 мкм^3. Общая площадь клеточных мембран составляет примерно 110000 мкм^2 и 13000 мкм^2 соответственно.



Рис. 8-2. Электронная микрофотография участка поперечного среза клетки печени. Отмечены основные внутриклеточные компартменты. (С любезного разрешения D. S. Friend.)

связанными со специализированными функциями дифференцированных клеток. Все вместе мембранные органеллы занимают около половины объема клетки (табл. 8-1). Вполне естественно, что для их построения требуется большое количество внутриклеточных мембран. В двух типах клеток млекопитающих, проанализированных для примера в табл. 8-2, общая поверхность мембран эндоплазматического ретикулума превышает поверхность плазматической мембраны соответственно в 25 и в 12 раз. Если говорить о массе и площади, то плазматическая мембрана в большинстве эукариотических клеток - всего лишь небольшая часть всех мембран (рис. 8-2).

8.1.2. Топология мембранных органелл связана с их эволюционным происхождением [2]

Чтобы понять взаимоотношения между клеточными компартментами. полезно представить себе, как они могли возникнуть в процессе эволюции. Считается, что предшественниками эукариотических клеток были организмы, напоминающие бактерии. У бактерий, как правило, нет внутренних мембран; соответствующие функции у них выполняет плазматическая мембрана. К таким функциям относится, например, транспорт ионов, синтез ATP и синтез липидов. Однако размеры современных эукариотических клеток превышают размер типичной бактериальной клетки (такой, как E.coli) в 10-30 раз. Изобилие внутренних мембран в клетках эукариот можно рассматривать как адаптацию к этому

увеличению размеров. По-видимому, плазматической мембраны просто не хватает для поддержания многих жизненно важных функций эукариотической клетки.

Эволюция внутренних мембран, очевидно, шла параллельно со специализацией их функций. У некоторых современных бактерий есть такие участки плазматической мембраны, на которых определенные мембранные белки собраны вместе для выполнения ряда взаимосвязанных функций (рис. 8-3, А). В качестве примера можно привести «пурпурные мембраны» Halobacterium, содержащие бактериородопсин, и хроматофоры фотосинтезирующих бактерий. И те и другие можно назвать примитивными органеллами. У некоторых фотосинтезирующих бактерий эти участки преобразовались в глубокие впячивания плазматической мембраны (рис. 8-3, Б); есть и такие, у которых эти впячивания полностью отшнуровались и превратились в замкнутые мембранные пузырьки, предназначенные для фотосинтеза. Внутренняя поверхность этих пузырьков топологически эквивалентна внешней поверхности клетки (рис. 8-3, В).

Можно предположить, что эукариотическая органелла, возникшая в результате событий, представленных на рис. 8-3, тоже будет иметь внутреннюю поверхность, топологически эквивалентную внешней поверхности клетки. Именно так обстоит дело в случае ЭР, аппарата Гольджи, эндосом и лизосом, а также многих промежуточных пузырьков, участвующих в эндоцитозе и секреции (см. разд. 8.6).

Как уже обсуждалось в гл. 7, митохондрии и хлоропласты отличаются от других окруженных мембраной органелл тем, что имеют свои собственные геномы. Природа этих геномов и близкое сходство белков митохондрий и хлоропластов с белками некоторых современных бактерий подтверждает гипотезу о том, что эти органеллы произошли от бактерий, которые были захвачены другими клетками и первое время существовали в симбиозе с ними (см. разд. 7.5.16). Согласно гипотетической схеме, приведенной на рис. 8-4, А, внутренняя мембрана митохондрий и хлоропластов соответствует исходной плазматической мембране бактерий, а матрикс этих органелл произошел из бактериальной цитоплазмы. Таким образом, эти две органеллы оказались изолированы от путей транспорта, связывающих полости большинства органелл друг с другом и с внеклеточным пространством.

Происхождение клеточного ядра, имеющего особенным образом устроенную двойную мембрану, более загадочно. Известно, что единственная бактериальная хромосома прикреплена к совершенно определенным участкам с внутренней стороны прокариотической плазматической мембраны. Одно из предположений состоит в том, что двуслойная ядерная оболочка могла образоваться из глубокого впячивания плазматической мембраны, как показано на рис. 8-4, Б. Эта гипотеза объясняет, почему внутреннее пространство ядра топологически эквивалентно цитозолю. Действительно, во время митоза у высших эукариот ядерная оболочка разрушается, и содержимое ядра полностью смешивается с цитозолем, чего никогда не происходит ни с одной другой мембранной органеллой. Таким образом, во время митоза клетка временно возвращается к прокариотическому состоянию, когда хромосомы не имеют отдельного компартмента.

Эта эволюционная схема делит основные внутриклеточные компартменты эукариот на пять групп: 1) ядро и цитозоль, связанные между собой ядерными порами и поэтому являющиеся топологически неразрывными (хотя функционально различными); 2) митохондрии; 3) хлоропласты (встречаются только у растений); 4) пероксисомы (их эволюционное происхождение мы обсудим в разд. 8.5) и 5) остальные мембранные органеллы (ЭР, аппарат Гольджи, эндосомы и лизосомы).

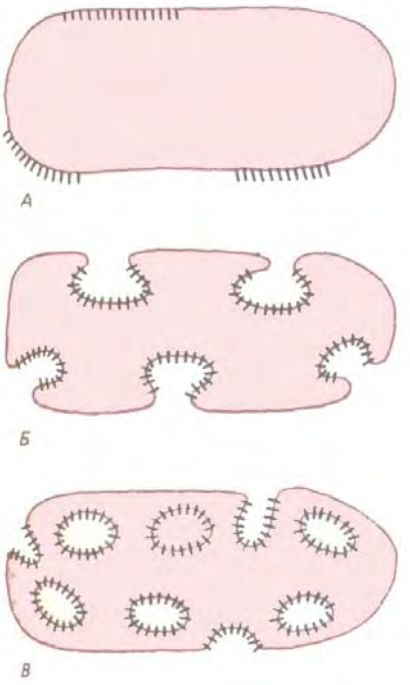


Рис. 8-3. Некоторые специализированные мембраны бактерий. А. Участки поверхности клеточной мембраны, состоящие из скоплений специализированных мембранных белков. Б. Впячивание таких участков увеличивает поверхность мембран, приспособленных для выполнения функций, например, фотосинтеза. В. Внутренняя поверхность образовавшихся в результате впячивания мембранных пузырьков топологически эквивалентна внешней поверхности клетки. Ограниченные мембранами пузырьки существуют у некоторых видов фотосинтезирующих бактерий. Их топологическое отношение к клеточной поверхности подобно отношению ЭР, аппарата Гольджи, эндосом и лизосом к поверхности эукариотических клеток.

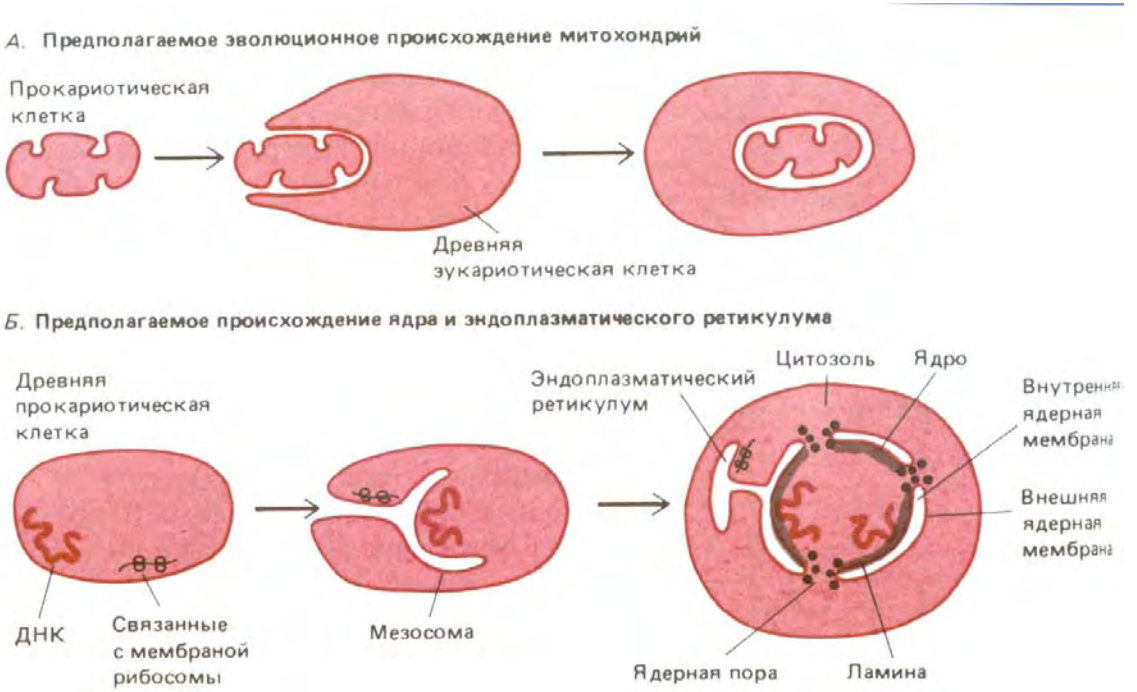


Рис. 8-4. Гипотезы эволюционного происхождения митохондрий, хлоропластов, ЭР и клеточного ядра, объясняющие топологические взаимоотношения этих внутриклеточных компартментов в эукариотических клетках. А. Митохондрии и хлоропласты могли возникнуть при поглощении бактерий эукариотической клеткой. С помощью этой гипотезы можно объяснить, почему полость перечисленных выше органелл остается изолированной от обширного везикулярного транспорта, связывающего полости многих других внутриклеточных компартментов. Б. Возможный путь эволюции ЭР и клеточного ядра. В некоторых бактериях ДНК присоединена к впячиванию плазматической мембраны, называемому мезосомой. Подобное впячивание у очень древней прокариотической клетки могло привести к образованию оболочки вокруг ДНК при сохранении доступа ДНК к цитозолю (так как ДНК должна управлять синтезом белка). Предполагается, что эта оболочка может полностью оторваться от плазматической мембраны, образуя ядерный компартмент, окруженный двойной мембраной. Как показано на рисунке, ядерная оболочка формируется при участии волокнистой структуры — ядерной ламины, и пронизана каналами, называемыми ядерными порами. Благодаря этим порам полость ядра топологически эквивалентна цитозолю. Полость ЭР переходит в пространство между внешней и внутренней ядерными мембранами и топологически эквивалентна внеклеточному пространству.

Внутренние пространства органелл, входящих в последнюю группу, связаны друг с другом и с внеклеточным пространством при помощи транспортных пузырьков, которые отпочковываются от одной органеллы и сливаются с другой. Нужно сказать, что внутренние пространства этих органелл топологически эквивалентны друг другу и внеклеточному пространству и представляют собой функционально связанные части единого комплекса.

8.1.3. Внутриклеточный транспорт белков по ЭР и аппарату Гольджи можно проследить с помощью радиоавтографии [3]

Методы изучения транспорта белков внутри клетки были разработаны в 60-е гг. и впервые применены для наблюдения транспорта из ЭР во внеклеточное пространство в секреторных клетках поджелудочной железы.

Специализированные секреторные клетки, такие, как ацинарные клетки поджелудочной железы, содержат большие количества белкового секрета, заключенного в секреторные везикулы (пузырьки). При стимуляции клетки внешним сигналом содержимое этих пузырьков быстро выбрасывается во внеклеточное пространство путем экзоцитоза. Этот процесс известен как регулируемая секреция. Его следует отличать от конститутивной секреции, представляющей собой другую форму экзоцитоза, происходящего постоянно, в отсутствие стимулирующего сигнала. Ацинарные клетки поджелудочной железы секретируют различные пищеварительные ферменты (амилазу, липазу, дезоксирибонуклеазу и рибонуклеазу), а также предшественники ферментов, так называемые зимогены (например, трипсиноген и химотрипсиноген). Эти предшественники активируются в результате их специфического расщепления протеазами.

Благодаря тому, что группа белков, синтезируемых в ацинарных клетках поджелудочной железы, предназначена для секреции, мы можем судить о пути их передвижения от места синтеза к месту высвобождения. Этот путь можно проследить, сочетая радиоавтографию с электронной микроскопией. Схема соответствующего эксперимента представлена на рис. 8-5. Если клетки кратковременно проинкубировать с [^{3}H]-аминокислотами (импульсное мечение), а затем различное время выращивать в нерадиоактивной среде, то новосинтезированные белки в первую

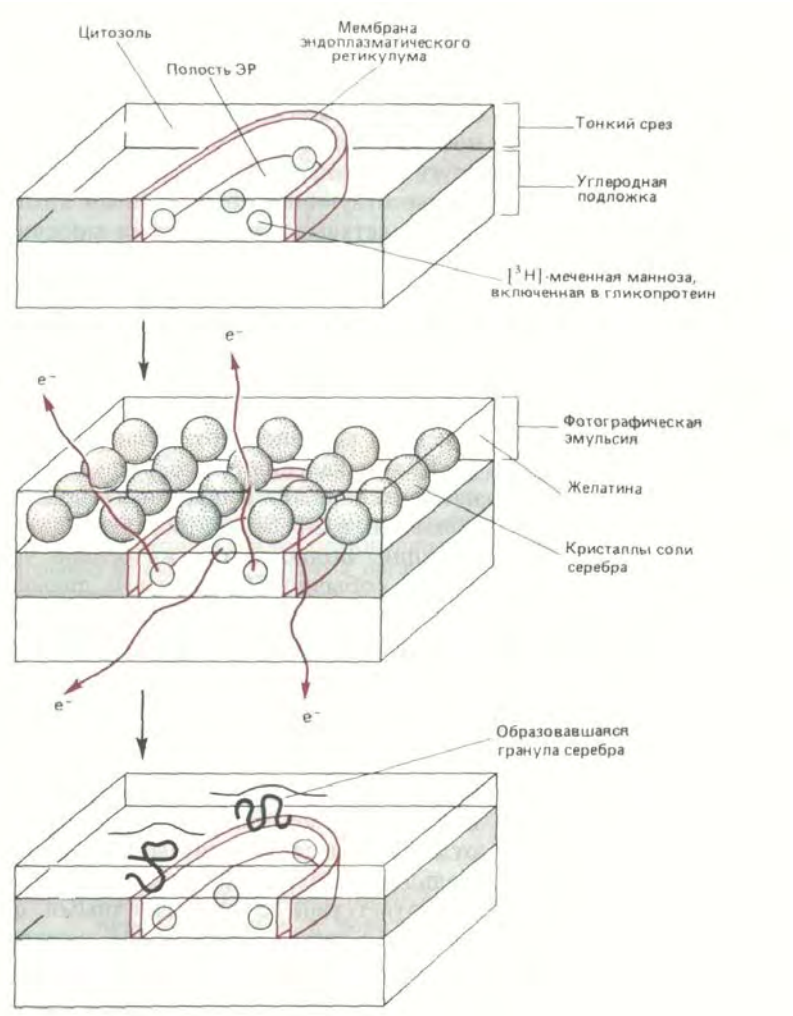


Рис. 8-5. Схема, объясняющая, как с помощью электронномикроскопической радиоавтографии можно проследить путь секреторных белков, в состав которых входят [^{3}H]-меченные аминокислоты. Важно, чтобы все свободные радиоактивные аминокислоты были отмыты до заключения и единственным радиоактивным источником в ткани оставались белки. Затем ткань покрывают тонким слоем фотоэмульсии. Электроны, испускаемые тритием, засвечивают зерна серебра в положениях, несколько смещенных по отношению к источнику излучения, поэтому локализация радиоактивной молекулы определяется менее точно, чем позволяет разрешение электронного микроскопа.

очередь выявляются в ЭР, а затем в аппарате Гольджи (рис. 8-6). Позднее [^{3}H]-белки обнаруживаются в больших, незрелых секреторных везикулах вблизи стопки Гольджи (рис. 8-7), где они все более концентрируются; в результате формируются зрелые пузырьки, хорошо различимые на электронных микрофотографиях благодаря их электроноплотному содержимому (рис. 8-7 и 8-8).

Секреторные везикулы накапливаются в апикальной части ацинарной клетки (т. е. в части, обращенной к системе протоков) между аппаратом

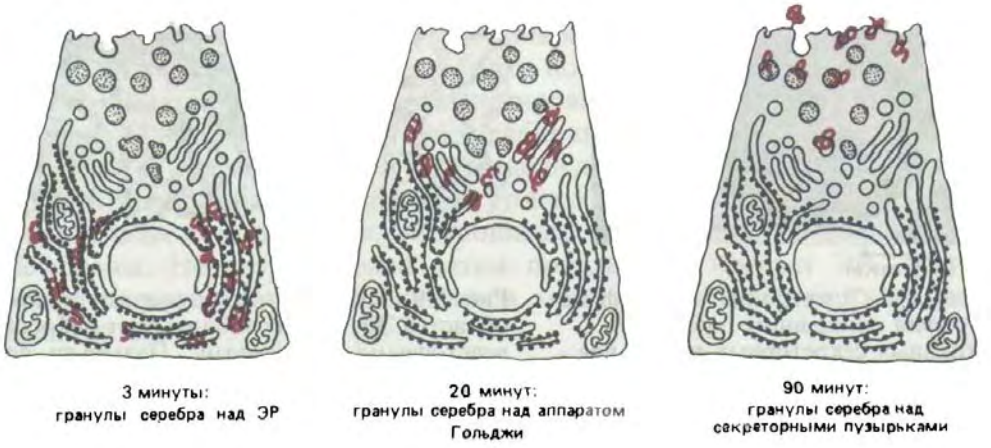


Рис. 8-6. Электронномикроскопическая радиоавтография ацинарных клеток поджелудочной железы, импульсно меченных [^{3}H]-аминокислотами и затем инкубированных различное время в немеченной среде ("pulse-chase"-метод). С течением времени зерна восстановленного серебра (выделены цветом) перемещаются по направлению к внеклеточному пространству, указывая путь, по которому следуют вновь синтезированные молекулы секреторных белков. Ацинарные клетки необычны тем, что 85% синтезируемых в них белков секретируется; пока клетка не стимулирована к секреции, эти белки сохраняются в секреторных пузырьках.



Рис. 8-7. Электронная микрофотография аппарата Гольджи в ацинарной клетке поджелудочной железы, на которой видны секреторные пузырьки на разных стадиях созревания. Незрелые секреторные пузырьки (называемые в этих клетках конденсирующими вакуолями) отпочковываются от аппарата Гольджи. Секреторные белки в этих пузырьках становятся все более концентрированными (отсюда и название «конденсирующая» вакуоль), что в конечном счете приводит к преобразованию конденсирующих вакуолей в зрелые секреторные пузырьки (вверху слева). Эти секреторные пузырьки в ацинарных клетках поджелудочной железы называют зимогеновыми гранулами. (С любезного разрешения George Palade.)

Гольджи и плазматической мембраной. Когда пузырек сливается с плазматической мембраной, его содержимое попадает во внеклеточное пространство. Эти пузырьки сливаются только с апикальной частью плазматической мембраны, тем самым исключается бесполезное и опасное выделение секрета в межклеточное пространство или в полость других органелл. Более того, экзоцитоз происходит только в ответ на соответствующий внеклеточный химический сигнал, подаваемый нервными клетками или клетками кишечника тогда, когда для пищеварения требуются панкреатические ферменты. Изучено множество секреторных белков из различных типов клеток. Оказалось, что все они проходят один и тот же путь: рибосома → ЭР → аппарат Гольджи → внеклеточное пространство. Те белки, которые должны остаться в плазматической мембране, лизосомах или цистернах аппарата Гольджи, тоже сначала попадают в ЭР и затем оттуда через аппарат Гольджи направляются к местам конечной локализации.

Для выявления более тонких деталей метаболических путей, начинающихся в ЭР, необходимы более сложные методы. Некоторые из попавших в ЭР белков остаются там для выполнения ферментативных функций. Большинство же белков упаковывается в транспортные пузырьки (обычно 50-100 нм в диаметре), которые затем отшнуровываются в специальных местах мембран ЭР, называемых переходными элементами (рис. 8-9), и специфически сливаются с ближайшей цистерной аппарата Гольджи. После слияния мембрана пузырька становится частью мембраны аппарата Гольджи, а растворимые белки содержимого пузырька доставляются в полость цистерны Гольджи (рис. 8-10). Таким способом растворимые белки избирательно переносятся из одного окруженного мембраной компартмента в другой без проникновения сквозь мембраны. Полагают, что с помощью такого же механизма отделения и слияния пузырьков белки переносятся из одной цистерны Гольджи в другую, и затем к различным местам конечного назначения, в соответствии с их различными функциями. На этом пути белки проходят через целую серию замкнутых пространств, топологически эквивалентных друг другу и внеклеточному пространству (рис. 8-11).

На каждом этапе метаболизма белки совершают выбор - остаться в цитозоле или проникнуть в ЭР, остаться в ЭР или поступить в аппарат Гольджи, стать содержимым транспортных пузырьков, направляющих-



Рис. 8-8. Электронная микрофотография очищенного препарата крупных секреторных пузырьков. Такие пузырьки встречаются в специализированных секреторных клетках. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

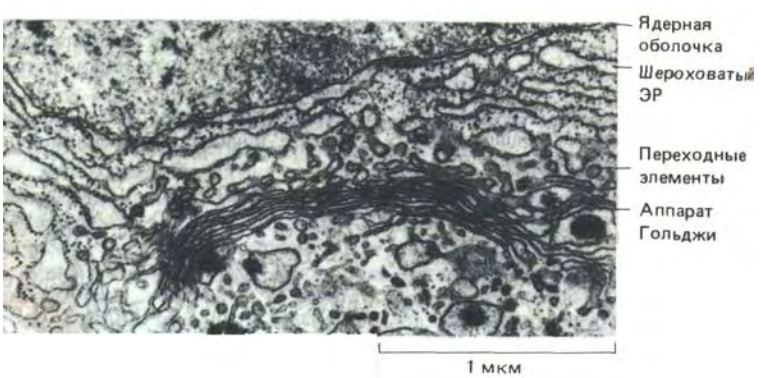


Рис. 8-9. Транспортные пузырьки отпочковываются от особых областей ЭР, почти свободных от рибосом. Эти области называются переходными элементами. Пузырьки сливаются с ближайшей цистерной Гольджи, перенося, главным образом, вновь синтезированные белки и липиды от ЭР к аппарату Гольджи. (С любезного разрешения Brij J. Gupta.)



Рис. 8-10. В процессе везикулярного транспорта сохраняется расположение «сторон» мембран. Обратите внимание, что в мембране компартмента-мишени сохраняется исходная ориентация как белков, так и липидов, а растворимые материалы переносятся из просвета в просвет.

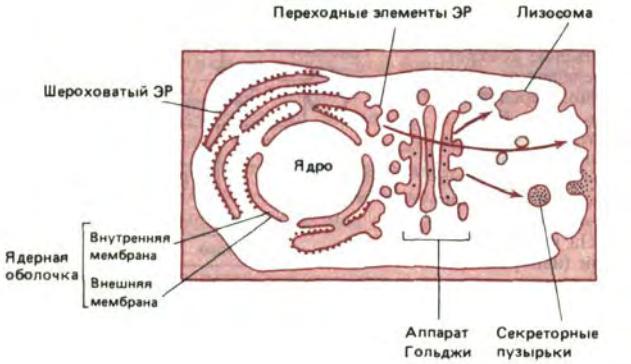


Рис. 8-11. Схема клетки, в которой топологически эквивалентные области выделены цветом. В принципе, циклическое отпочковывание и слияние пузырьков позволяет связать просвет (полость) любой органеллы с другим просветом и с внеклеточным пространством. Однако некоторые органеллы (например, митохондрии и хлоропласты) не связаны с другими органеллами везикулярным транспортом. Таким образом, они изолированы от изображенных здесь транспортных путей между органеллами.

ся к лизосомам, или вместо этого попасть в пузырьки, перемещающиеся к клеточной поверхности, и так далее. Выбор в каждом случае зависит от аминокислотной последовательности молекулы белка, содержащей сигналы сортировки, которые определяют путь белка внутри клетки.

8-3

8.1.4. Транспорт белков происходит по двум основным путям - через цитозоль и через ЭР [4]

Основные пути транспорта белков показаны на рис. 8-12. Практически все белки образуются на рибосомах, расположенных в цитозоле (кроме нескольких, синтезирующихся на митохондриальных рибосомах хлоропластов). Затем их пути расходятся. Белки, принадлежащие одной транспортной ветви, после завершения их синтеза выделяются в цитозоль. Некоторые из них содержат сигналы сортировки, направляющие их из цитозоля в митохондрии, хлоропласты (у растений), ядро или пероксисомы, другие же - их большинство - не имеют специфических сигналов сортировки и остаются в цитозоле в качестве постоянных компонентов.

Другой основной путь транспорта используется при синтезе белков, предназначенных для выведения из клетки, а также белков, которые должны стать компонентами ЭР, аппарата Гольджи, плазматической мембраны или лизосом. Все эти белки по мере их образования переносятся в ЭР при помощи сигналов сортировки, расположенных обычно на N-конце. Рибосомы, на которых собираются такие белки, остаются связанными с мембраной ЭР в течение недолгого времени после начала синтеза полипептидной цепи. Как только очередной участок полипептидной цепи синтезируется, он проникает через липидный бислой этой мембраны. Некоторые белки затем попадают в просвет ЭР, другие остаются частично заключенными в мембрану в качестве трансмембранных белков.

Обычно проходит не больше одной или двух минут с момента высвобождения белка в цитозоль до поступления его в соответствующую органеллу. Белки, предназначенные для ядра, митохондрий или

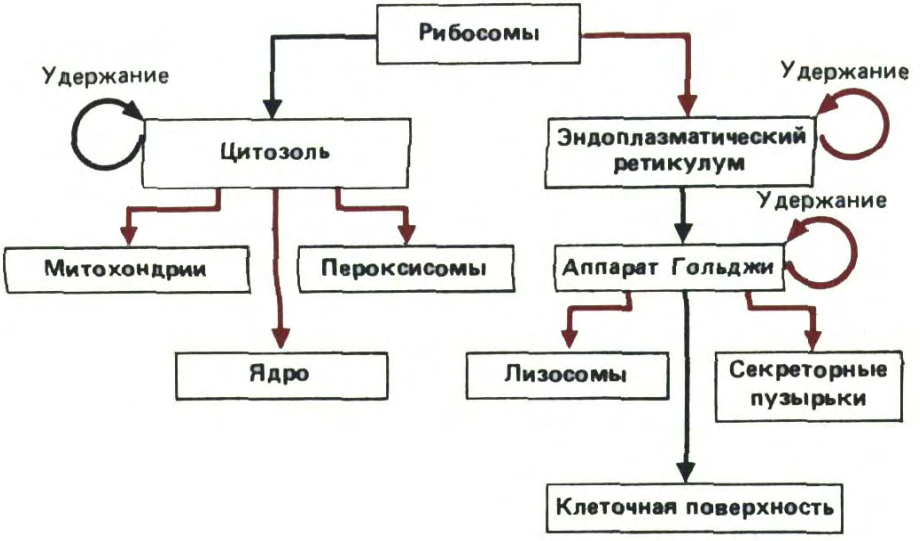


Рис. 8-12. Упрощенная схема путей метаболизма белков. Сигналы, направляющие движение конкретного белка по определенной «дороге» и, следовательно, определяющие локализацию этого белка в клетке, содержатся в его аминокислотной последовательности. «Путешествие» начинается с синтеза белка на рибосоме и заканчивается его прибытием к месту конечного назначения. На каждой промежуточной стадии (изображены прямоугольниками) принимается решение - оставить данный белок на ней или транспортировать дальше. В принципе, сигнал может требоваться либо для удержания белка в каждом из указанных компартментов, либо для его продвижения дальше, а альтернативное событие может происходить «по умолчанию» (т. е. без специального сигнала). На этой схеме те пути, которые, вероятнее всего, требуют специальных сигналов, выделены цветом; те же пути, которые, скорее всего, выбираются по умолчанию, показаны черными стрелками. Так как образование эндосом изучено плохо, здесь не изображено никаких путей, ведущих к эндосомам.

пероксисом, достигнув этих органелл, на этом заканчивают свой путь, между тем белки, попадающие в ЭР, вовлекаются в дальнейший транспорт, который, как полагают, происходит с помощью транспортных пузырьков, отделяющихся от одной мембраны и сливающихся с другой. По-видимому, для достижения конечного пункта должно произойти несколько таких циклов, и путь от мембраны ЭР до места назначения может занять один час.

8.1.5. Белки могут перемещаться между компартментами двумя принципиально различными способами [5]

Чтобы понять общие принципы работы сигналов сортировки, важно различать два совершенно различных пути, по которым белки перемещаются из одного компартмента в другой. Во-первых, они могут непосредственно проникать через мембрану, попадая из пространства, топологически эквивалентного цитозолю, в пространство, топологически эквивалентное внеклеточному, или наоборот. Этот путь требует наличия в мембране специального белка-транслокатора, кроме того, молекула транспортируемого белка должна развернуться, чтобы, подобно змее, «проползти» сквозь мембрану. В качестве примера такого рода событий может служить перемещение определенных белков из цитозоля в просвет ЭР. Второй путь передвижения белковых молекул опосредован транспортными пузырьками. Эти пузырьки захватывают определенные молекулы в полости одного компартмента (от которого они отшнуровываются) и переносят их в другой компартмент, сливаясь с ним. Именно так происходит перенос растворимых белков из ЭР к аппарату Гольджи (см. рис. 8-Ю). При таком везикулярном транспорте белки не пересекают никаких мембран, поэтому они переносятся только между компартментами, топологически эквивалентными друг другу.

Оба типа транспортных процессов избирательно контролируются с помощью специальных белков, выполняющих роль сигналов сортировки. У белка, который напрямую переносится через мембрану, эти сигналы распознаются транслокатором в мембране. А в транспортный пузырек белок попадает, если его сигнал сортировки связывается с рецептором на мембране пузырька. Вероятно, существуют и такие транспортные пузырьки, которые способны захватывать белки, утерявшие специфические сигналы сортировки. В любом случае вновь образующиеся пузырьки переносят только предназначенные для этого белки.

В настоящее время некоторые сигналы сортировки в составе белков известны, тогда как большинство комплементарных им мембранных рецепторов - нет. Кроме того, мы не знаем почти ничего о транспортных

пузырьках. Можно предположить только, что их существует множество видов, в соответствии с различными переносами, которые они должны осуществлять. Чтобы выполнять свои функции, каждый пузырек должен захватывать только определенные белки и сливаться только с определенной мембраной-мишенью: например, пузырек, переносящий молекулы от ЭР к аппарату Гольджи, не должен включать белки, которые останутся в ЭР, и должен сливаться только с аппаратом Гольджи, а не с другими органеллами. В этой главе мы рассмотрим, каким образом транспортные пузырьки достигают такой избирательности.

8.1.6. Сигнальные пептиды и сигнальные участки определяют судьбу белка [6]

Полагают, что на белках существуют два типа сигналов сортировки, направляющие их, шаг за шагом, вдоль разветвляющихся путей (рис. 8-12). Для некоторых стадий сигналы сортировки представляют собой протяженный участок аминокислотной последовательности длиной 15-60 остатков. Когда эта стадия пройдена, такой сигнальный пептид отрезается. Сигналом сортировки для других стадий, вероятно, служит определенная трехмерная структура, образуемая атомами поверхности белка при свертывании его молекулы. Аминокислотные остатки, формирующие такие сигнальные участки, могут быть расположены очень далеко друг от друга в линейной последовательности белка (рис. 8-13). Сигнальные пептиды направляют белки из цитозоля в ЭР, митохондрии, хлоропласты и ядро; они также отвечают за то, чтобы некоторые белки остались в ЭР. Сигнальные участки, видимо, играют важную роль при распознавании определенных лизосомных белков специальным ферментом в аппарате Гольджи.

Чтобы выяснить пункт назначения того или иного белка внутри клетки, необходимо определить тип его сигнального пептида (табл. 8-3). Белки, которые должны попасть в ЭР, обычно несут N-концевой сигнальный пептид. Его центральная часть образована 5-Ю гидрофобными аминокислотными остатками. Большинство этих белков направляется из ЭР в аппарат Гольджи; те же, которые имеют на С-конце специфическую последовательность из четырех аминокислот, остаются в качестве постоянных компонентов. Многие белки, предназначенные для митохондрий, имеют сигнальные пептиды, в которых положительно заряженные аминокислотные остатки чередуются с гидрофобными. Среди белков, направляющихся в ядро, большинство имеет сигнальные пептиды, образованные кластером положительно заряженных аминокислотных остатков. Наконец, некоторым белкам цитозоля присущи сигнальные пептиды, с которыми ковалентно связывается жирная кис-

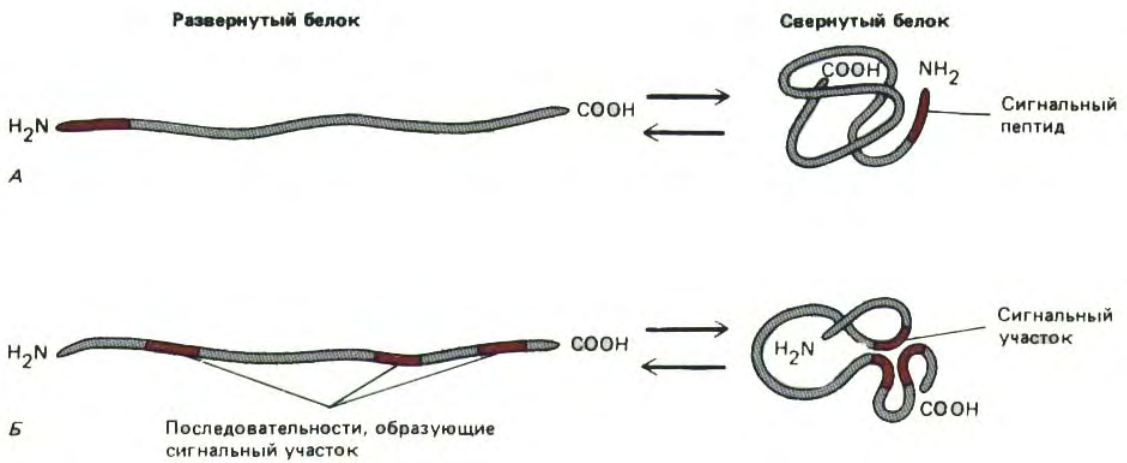


Рис. 8-13. Два способа образования на белке транспортного сигнала. А. Сигнал представляет собой единственный дискретный отрезок аминокислотной последовательности, называемый сигнальным пептидом. В свернутом белке сигнальный пептид располагается снаружи. Сигнальные пептиды чаще находятся на конце полипептидной цепи (как показано здесь), но могут быть и в других местах. Сигнальные пептиды выявляют экспериментально по их эффекту на внутриклеточную сортировку белков. Для этого сигнальный пептид с помощью методов рекомбинантных ДНК «пришивают» к какому-нибудь другому белку. Б. Сигнальный участок может быть сформирован при наложении аминокислот из удаленных друг от друга районов при сворачивании молекулы; или же такой сигнал образуется из отдельных «пятен» на поверхности свернутого белка, удаленных друг от друга на известное расстояние. И в том, и в другом случае транспортный сигнал зависит от трехмерной конформации белка. По этой причине точно локализовать такие сигналы чрезвычайно трудно.

Таблица 8-3. Типичные последовательности сигнальных пептидов

Функция сигнального пептида	Пример сигнального пептида
Импорт в ЭР	H_3N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-[Leu-Leu-Leu-Val] ⊕ [Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala]-Thr-Glu-Ala-Glu- ⊖ ⊖ Gln-Leu-Thr-Lys-Cys-Glu-Val-Phe-Gln- ⊕ ⊖
Оставление в просвете ЭР	-Lys-Asp-Glu-Leu-COO^- ⊕ ⊖ ⊖ ⊖
Импорт в митохондрии	H_3N-Met-Leu-Ser-Leu-Arg-Gln-Ser-Ile-Arg-Phe- ⊕ ⊕ ⊕ Phe-Lys-Pro-Ala-Thr-Arg-Thr-Leu-Cys-Ser- ⊕ ⊕ Ser-Arg-Tyr-Leu-Leu- ⊕
Импорт в ядро	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- ⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕
Присоединение к мембране путем ковалентного связывания миристиновой кислоты с N-концом	-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val- ⊕ ⊕ ⊕ ⊕ ⊕
	H_3N-Gly-Ser-Ser-Lys-Ser-Lys-Pro-Lys- ⊕ ⊕ ⊕ ⊕

Заряженные остатки обозначены + или —. Большой блок гидрофобных остатков заключен в рамку. H_3N- обозначает N-конец белка; — COO^- обозначает карбоксильный конец

лота, направляющая эти белки к мембранам без проникновения в ЭР.

Роль каждого такого сигнального пептида в доставке белка по месту назначения была продемонстрирована в опытах по генной инженерии. Например, помещение N-концевого сигнального пептида, связывающегося с ЭР, в начало белка цитозоля, заставляло этот белок направляться к ЭР. Сигнальные пептиды белков, имеющих одно и то же конечное назначение, функционально взаимозаменяемы, хотя их аминокислотные последовательности могут сильно различаться. Возможно, для процесса распознавания сигнала физические свойства (такие, например, как гидрофобность) оказываются важнее, чем точная последовательность аминокислот.

Сигнальные участки анализировать гораздо труднее, чем сигнальные пептиды, поэтому об их структуре известно гораздо меньше. Поскольку они образуются из сложной трехмерной конфигурации свернутого белка, их невозможно просто перенести от одного белка к другому. Более того, экспериментальное повреждение сигнального участка часто влечет за собой повреждение белка как целого.

8.1.7. Клетки не могут строить свои мембранные органеллы de novo: им требуется информация, содержащаяся в самой органелле [7]

Когда клетка воспроизводится и делится, она должна удваивать свои мембранные органеллы. Обычно это происходит путем увеличения размеров этих органелл при включении в них новых молекул; увеличенные органеллы затем делятся и распределяются по двум дочерним клеткам. Вряд ли клетка в состоянии создавать эти органеллы de novo. Если, например, из нее полностью удалить ЭР, она не сумеет его реконструировать. Ведь мембранные белки, определяющие специфику ЭР и выполняющие множество его ключевых функций, сами являются продуктами ЭР: без ЭР или по крайней мере без мембраны, содержащей

транслокаторы, необходимые для импорта белков в ЭР (и при отсутствии транслокаторов, которые требуются для импорта белков в другие органеллы), новый ЭР не может быть построен.

Следовательно, для формирования мембранных органелл недостаточно только информации ДНК, определяющей белки органелл. Необходима также «эпигенетическая» информация в виде хотя бы одного характерного белка в мембране органеллы. Эта информация передается от родительской клетки потомству с самой органеллой. Вероятно, такая информация необходима для поддержания компартментации клетки, тогда как информация, содержащаяся в ДНК, необходима для «размножения» нуклеотидных и аминокислотных последовательностей.

Заключение

Эукариотические клетки содержат внутриклеточные мембраны, замыкающие около половины общего объема клетки в отдельные внутриклеточные компартменты. Основные виды мембранных органелл во всех эукариотических клетках следующие: эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, ядро, митохондрии, лизосомы, эндосомы и пероксисомы; растительные клетки содержат также хлоропласты. Каждая органелла имеет в своем составе различные белки, определяющие ее уникальные функции.

Каждый вновь синтезированный белок органелл проходит от рибосомы до органеллы особый путь, определяемый либо сигнальным пептидом, либо сигнальным участком. Сортировка белков начинается с первичной сегрегации, при которой белок либо остается в цитозоле, либо переносится в другой компартмент (например, в ядро, митохондрию или эндоплазматический ретикулум). Белки, попадающие в ЭР, претерпевают дальнейшую сортировку по мере того, как они переносятся в аппарат Гольджи и затем из аппарата Голъджи в лизосомы, в секреторные пузырьки или к плазматической мембране. Некоторые белки остаются в ЭР и в различных цистернах аппарата Гольджи. Белки, предназначенные для других компартментов, видимо, попадают в транспортные пузырьки, которые отшнуровываются от одного компартмента и сливаются с другим.

8.2. Цитозоль

Цитозоль - это часть цитоплазмы, занимающая пространство между мембранными органеллами. Обычно на него приходится около половины общего объема клетки (см. табл. 8-1). В состав цитозоля входит множество ферментов промежуточного обмена, кроме того, он заполнен рибосомами, синтезирующими белки. Около половины всех белков, образующихся на рибосомах, остаются в цитозоле в качестве его постоянных компонентов. В данном разделе мы обсудим судьбу этих белков, а также некоторые механизмы, позволяющие контролировать их время жизни и направлять белки в определенные места цитозоля.

8.2.1. Организация цитозоля поддерживается белковыми филаментами [8]

Цитозоль содержит множество белковых филаментов, собранных в фибриллярный цитоскелет (гл. 11). Именно цитоскелет определяет форму клетки, обеспечивает движение цитоплазмы и образует общую сеть, которая организует ферментативные реакции. Более того, поскольку белки составляют около 20% массы цитозоля, правильнее будет представлять его себе как высокоорганизованный гель, а не как раствор



Рис. 8-14. Единственной известной формой гликозилирования, протекающего в цитозоле клеток млекопитающих, является присоединение N-ацетилглюкозамина к остаткам серина или треонина в белке. Таким способом модифицируются белки-регуляторы многих генов и некоторые белки ядерных пор; назначение этой модификации неизвестно. В ЭР и аппарате Гольджи происходит гораздо более сложное гликозилирование (см. рис. 8-52).

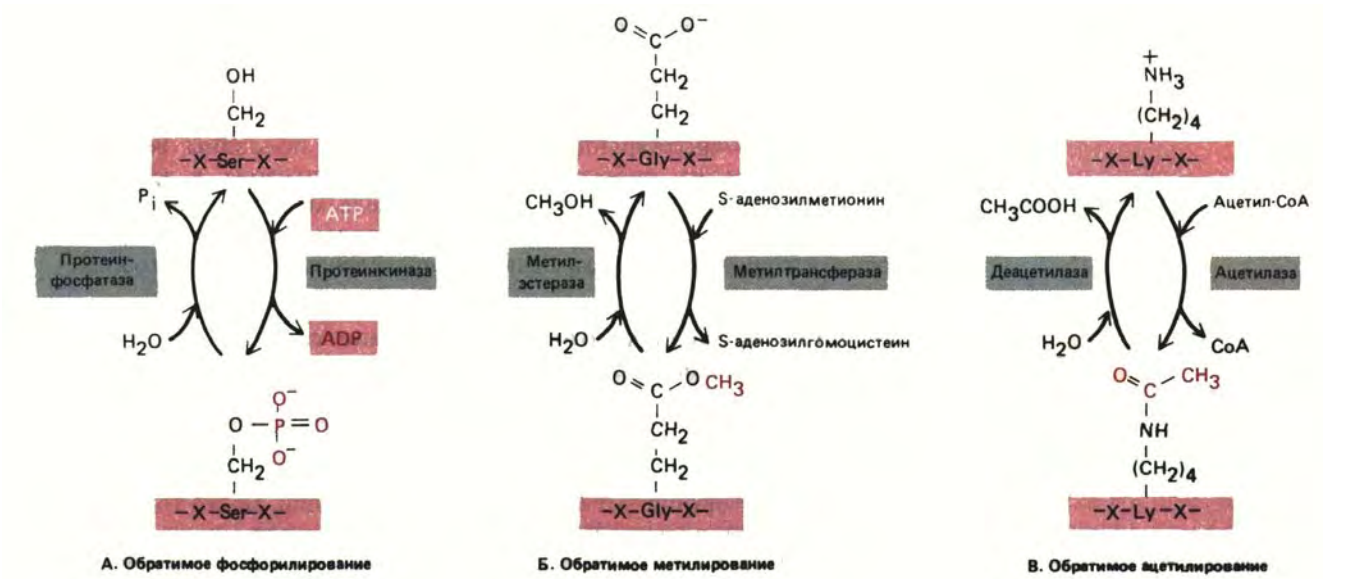


Рис. 8-15. Три типа обратимых ковалентных модификаций, которым подвергаются белки и которые влияют на их активность. Каждая изображенная модификация изменяет заряд боковой цепи аминокислоты. Наиболее распространенная модификация - это фосфорилирование OH-групп боковых цепей серина, треонина и тирозина в белке. По существующим оценкам, в животных клетках этим способом модифицировано около 10% белков цитозоля.

ферментов. Исследования скорости диффузии, однако, показывают, что малые молекулы и некоторые небольшие белки диффундируют в цитозоле почти с той же скоростью, что и в дистиллированной воде. Таким образом, с точки зрения промежуточного обмена (где и субстраты, и продукты являются малыми молекулами) мы можем рассматривать цитозоль как простой раствор.

С другой стороны, известно, что большие частицы, такие, как транспортные пузырьки и органеллы, движутся очень медленно, отчасти потому, что часто сталкиваются с компонентами цитоскелета. Чтобы они передвигались с приемлемой скоростью, специальные белковые «моторы» гидролизуют ATP и используют освобождающуюся при этом энергию для переноса крупных частиц вдоль микротрубочек или актиновых филаментов. Специфические филаменты выполняют в данном случае роль «рельсов», направляющих транспортные пузырьки к соответствующей мембране-мишени. Большинство исследователей клетки, однако, считают функцию цитоскелета менее специализированной и полагают, что специфичность везикулярного транспорта обеспечивается в основном системами рецепторов, расположенных на обращенной к цитозолю поверхности самих пузырьков (см. разд. 8.8.6).

8.2.2. Многие белки претерпевают в цитозоле ковалентные модификации [9]

Описано более 100 различных посттрансляционных модификаций белков. Роль большинства этих модификаций не выяснена; некоторые из них случайны и, по-видимому, не имеют функционального значения, но есть и такие, которые важны для жизни клетки, так как они тщательно контролируются специфическими ферментами. Далее мы увидим, что некоторые модификации происходят в ЭР и аппарате Гольджи. В этих органеллах, например, ферменты гликозилирования добавляют к белкам сложные цепи остатков Сахаров, образуя гликопротеины (см. разд. 8.6.12). Единственный известный случай гликозилирования в цитозоле клеток млекопитающих - это добавление к белкам N-ацетилглюкозамина (рис. 8-14). Однако множество других ковалентных модификаций протекает в первую очередь именно в цитозоле. Некоторые из них стабильны, и необходимы для активности белка, например, ковалентное

присоединение коферментов (биотина, липоевой кислоты или пиридоксальфосфата). Определенные ковалентные модификации, происходящие в цитозоле, обратимы и служат для регуляции активности многих белков (рис. 8-15).

Среди известных в настоящее время модификаций описана одна, чрезвычайно важная для доставки белков к месту назначения. Присоединение жирной кислоты к белку направляет его к определенным мембранам, обращенным в цитозоль.

8.2.3. Некоторые белки цитозоля прикреплены к цитоплазматической стороне мембраны через цепь жирной кислоты [10]

Клетки обладают специальным механизмом для транспорта растворимых белков из цитозоля к мембранам. Такие белки ковалентно связываются с цепью жирной кислоты, которая затем встраивается в липидный бислой с цитоплазматической стороны, заякоривая в нем белок. Связывание белка с мембраной через жирную кислоту может иметь важные функциональные последствия. Например, онкоген src вируса

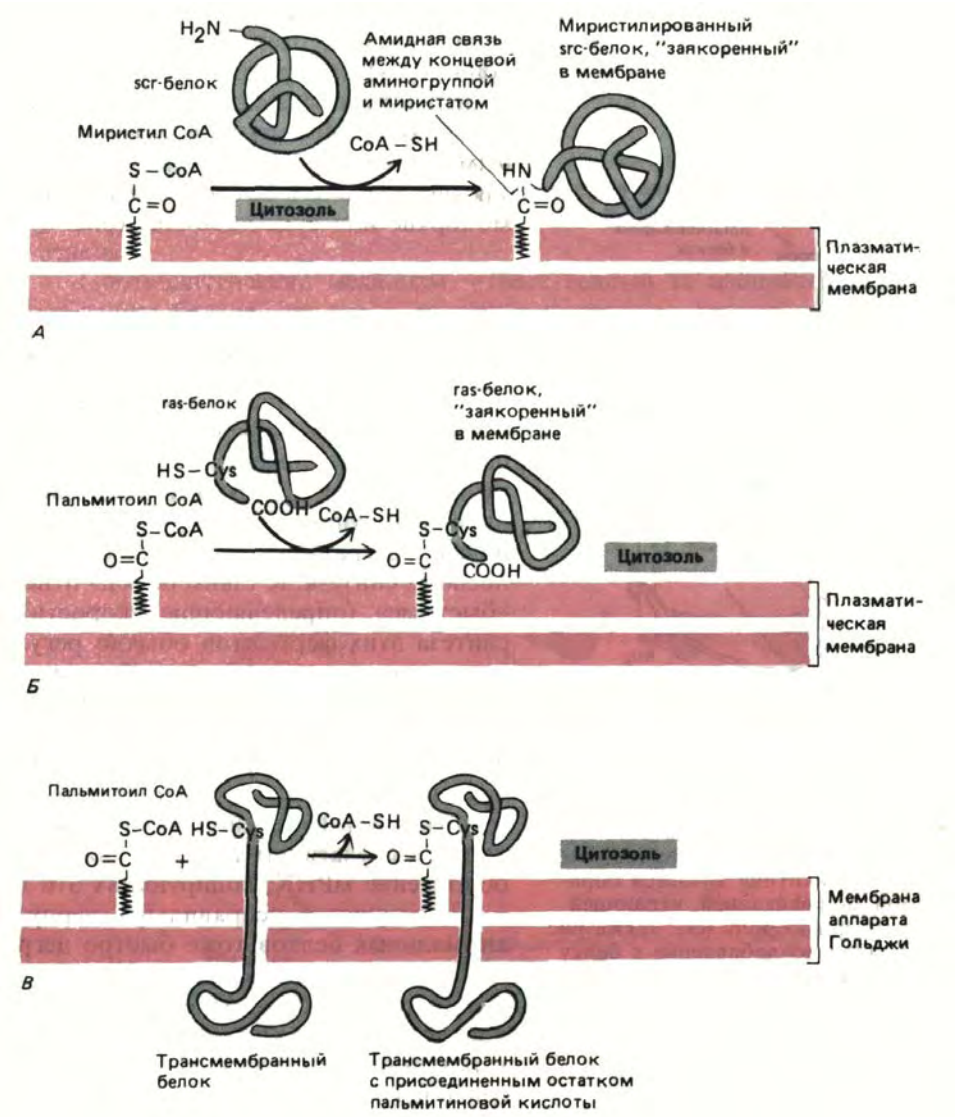


Рис. 8-16. Ковалентное присоединение к белку жирной кислоты может направлять водорастворимый белок в мембрану. А. Образование амидной связи между N-концевым глицином и миристиновой кислотой вызывает заякоривание белка src (после его синтеза в цитозоле) с цитоплазматической стороны мембраны. Б. Тиоэфирная связь между пальмитиновой кислотой и цистеином вблизи карбоксильного конца заякоривает белок ras в плазматической мембране после его синтеза в цитозоле. В. Пальмитиновая кислота и другие жирные кислоты часто присоединяются тиоэфирной связью к некоторым остаткам цистеина, расположенным в цитоплазматическом домене трансмембранного белка. Это происходит при транспорте белка из ЭР в аппарат Гольджи. Ацетилированному цистеину обычно предшествуют три гидрофобные аминокислоты (X) в последовательности NH_2-...-X-X-X-Cys-...-COOH. В примере (В), в отличие от (А) и (Б), белок остается связанным с мембраной даже без присоединения жирной кислоты.

саркомы Рауса кодирует тирозин-специфическую протеинкиназу, которая обычно связывается с мембраной при помощи ковалентно присоединенной цепи миристиновой кислоты (ненасыщенная жирная кислота с 14 углеродными атомами). В такой конфигурации эта протеинкиназа превращает нормальную клетку в раковую. Если же присоединению жирной кислоты предшествует замена в молекуле белка N-концевого глицина на аланин, то src-белок сохраняет свою активность как протеинкиназа, но остается в цитозоле и не трансформирует клетку. Очевидно, для эффективного связывания с субстратом эта киназа должна быть прикреплена к мембране. В сходных экспериментах было показано, что продукт другого онкогена, белок ras (см. разд. 12.3.1), для того, чтобы трансформировать клетку, должен прикрепиться к мембране через ковалентно присоединенную цепь пальмитиновой кислоты (ненасыщенная жирная кислота с 16 углеродными атомами).

Чем определяется, присоединится или нет к данному белку цепь жирной кислоты и какая это кислота: миристиновая или пальмитиновая? Ферменты, катализирующие данные модификации, распознают различные сигнальные пептиды в белке: цепь миристиновой кислоты (рис. 8-16, А) добавляется к N-концевому остатку глицина, расположенному внутри определенной аминокислотной последовательности (см. табл. 8-3), а цепь пальмитиновой кислоты присоединяется к боковой цепи цистеина, расположенного за четыре остатка от карбоксильного конца в составе другого сигнального пептида (рис. 8-16,Б). Кроме того, в цитозоле протекает реакция, катализируемая другим ферментом, в ходе которой цепи пальмитиновой кислоты добавляются к обращенным в цитозоль концам многих трансмембранных белков, по мере того как они проходят из ЭР в аппарат Гольджи на пути к плазматической мембране или куда-либо еще (рис. 8-16,В).

8-8

8.2.4. Некоторые белки цитозоля являются короткоживущими [11]

Кроме сигналов, определяющих место их локализации, клеточные белки имеют сигналы, определяющие время их жизни. Белки подвергаются непрерывному обмену: часть их молекул случайным образом деградирует и замещается новыми копиями. Большинство постоянных белков цитозоля существуют относительно долго - несколько дней. Другие, однако, деградируют гораздо быстрее - иногда через несколько минут после их синтеза. К таким белкам относятся ферменты, катализирующие «быстрые» (определяющие скорость) стадии метаболизма; скорости синтеза этих ферментов обычно регулируются в соответствии с внешними условиями, чтобы метаболизм был эффективен. Другие короткоживущие белки - это продукты таких клеточных онкогенов, как fos или myc, которые, как полагают, играют важную роль в регуляции роста и деления клетки (см. разд. 13.4.6). Поскольку белки указанных типов непрерывно и быстро разрушаются, их концентрации могут быстро меняться при изменении скорости их синтеза (см. разд. 12.4.7). В большинстве случаев для такой регуляции требуется еще и необычно быстрое обновление мРНК, кодирующих эти белки (см. разд. 10.4.12).

Большинство неправильно свернутых, денатурированных и других аномальных белков тоже быстро деградирует в цитозоле. Обычно они распадаются за несколько минут, тогда как нормальные копии этих же белков сохраняются. Аномальные белки возникают в результате ошибок при синтезе, когда в цепь встраивается неправильная аминокислота, или в результате химических повреждений, таких, как окисление боковых цепей некоторых аминокислот. Разнообразные мутантные формы обыч-

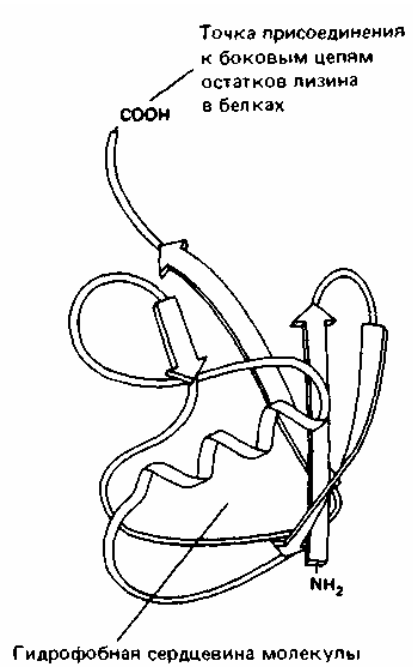


Рис. 8-17. Трехмерная структура убикитина (убиквитина), термостабильного белка, состоящего из 76 аминокислотных остатков. Присоединение к белку единичной молекулы убикитина является обратимой модификацией, играющей регуляторную роль (см. также рис. 8-15). Однако добавление к белку разветвленной убикитиновой цепи вызывает его немедленную и полную деградацию (см. рис. 8-18). (По S. Vijay-Kumar, C. E. Bugg, K. D. Wilkinson, W. J. Cook, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3582-3585, 1985.)

ных белков также распознаются в качестве аномальных. Сейчас становится все более очевидным, что и аномальные белки, и белки, генетик запрограммированные на быструю замену, в конечном счете разрушаются в цитозоле при помощи одного и того же протеолитического механизма.

8-6

8.2.5. У эукариот избирательная замена белков происходит при помощи убикитин-зависимого протеолиза [12]

Те белки цитозоля, которые должны быстро разрушаться, несут сигналы, включающие ответственный за их деградацию протеолитический механизм. Один из таких сигналов чрезвычайно прост и представляет собой всего лишь первую аминокислоту в полипептидной цепи. Аминокислоты Met, Ser, Thr, Ala, Val, Cys, Gly и Pro, когда они находятся на N-конце, являются стабилизирующими, а остальные 12 аминокислот вызывают протеолитическую атаку. Эти *дестабилизирующие* аминокислоты практически никогда не встречаются на N-конце стабильных белков цитозоля. Однако они часто присутствуют на N-конце белков, переносимых в другие компартменты, например, в ЭР. Поскольку цитозольный протеолитический механизм отсутствует в полости ЭР или аппарата Гольджи, такие белки в «своих» компартментах обычно являются долгоживущими. Дестабилизирующая N-концевая аминокислота таких нецитозольных белков может служить в клетке для удаления тех копий, которые направляются ошибочно: молекулы, которые нельзя быстро перенести из цитозоля, сразу разрушаются. Подобный же код, состоящий из одного аминокислотного остатка, видимо, существует у бактерий, где также вызывает быструю деградацию специфических белков.

Протеолитический механизм, ответственный за избирательную деградацию белков, сложен и, будучи запущенным, гарантирует полное разрушение белка. У эукариот имеется **убикитин-зависимый протеолиз.** При таком протеолизе с белком, подлежащим разрушению, связывается множество копий небольшого белка *убикитина* (рис. 8-17). Связывание убикитина с белком-мишенью катализируется многоферментным комплексом, который, как полагают, присоединяется к N-концу белка, несущему дестабилизирующую N-концевую аминокислоту. Этот фер-

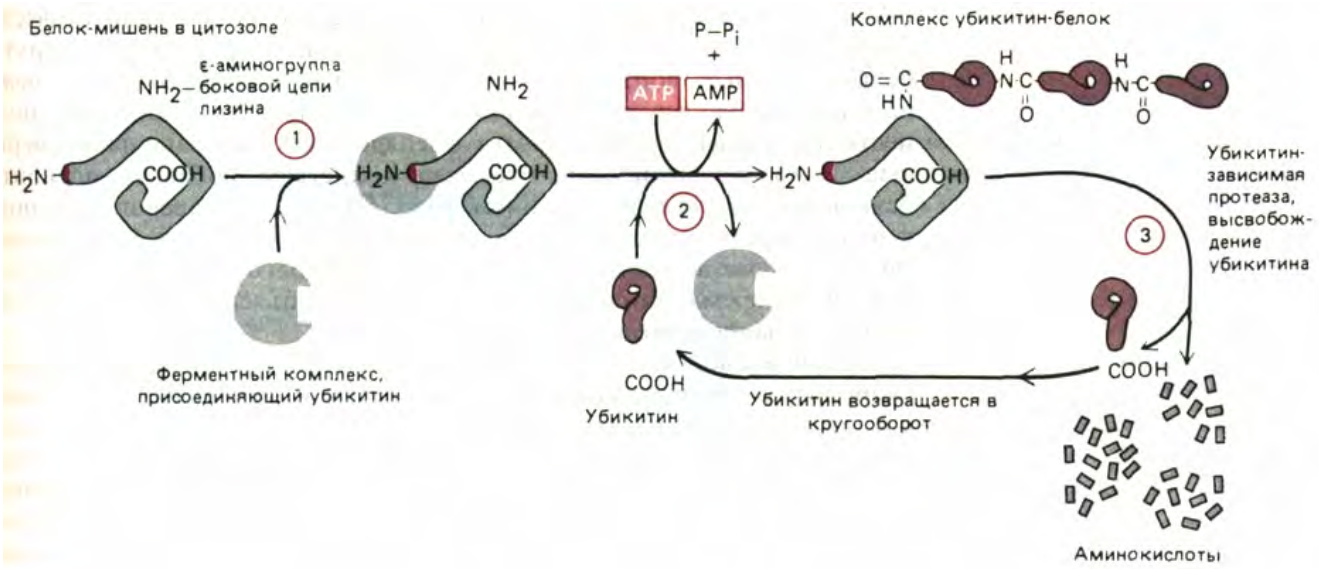


Рис. 8-18. Убикитин-зависимое разрушение белков. Белок-мишень (содержащий «дестабилизирующую» N-концевую аминокислоту, которая служит сигналом для его деградации), узнается ферментным комплексом, присоединяющим убикитин *(стадия 1)*. Затем в последовательной серии реакций *(стадия 2),* молекулы убикитина соединяются друг с другом, образуя разветвленную мультиубикитиновую цепь, присоединенную к ε-аминогруппе в боковой цепи ближайшего остатка лизина в белке. Эта реакция требует подвижности белка-мишени и ускоряется, если белок свернут неправильно. Вслед за этим *(стадия 3)* большая протеаза, расщепляющая только белки, маркированные разветвленной цепью убикитина, разрезает белок-мишень на множество мелких фрагментов.

ментный комплекс присоединяет молекулу убикитина к ближайшему остатку лизина в полипептиде, а затем добавляет к первой другие молекулы убикитина, формируя разветвленную убикитиновую цепь (рис. 8-18). Вслед за этим большая АТР-зависимая протеаза быстро разрушает такие белки. По-видимому, субстратом для этой протеазы служат только белки, содержащие полиубикитиновые разветвленные цепи, а белки, содержащие одну молекулу убикитина, связанную с лизином (например, гистоны), сохраняются.

8-7

8.2.6. Стабильность белка может определяться ферментами, повреждающими его N-конец [13]

Поскольку у цитозольных белков N-концевая аминокислота определяет, будет ли данный белок разрушаться АТР-зависимой протеазой, важно знать, каким образом этот ключевой аминокислотный остаток присоединяется к белку. Вероятно, у белков, генетически запрограммированных на короткое время жизни, дестабилизирующая аминокислота присоединяется к N-концу сразу после окончания синтеза белка. Как обсуждалось в гл. 5 (см. разд. 5.1.10), все белки исходно синтезируются с метионином на N-конце (или формилметионином у бактерий). Этот метионин, являющийся стабилизирующим остатком, часто удаляется при помощи специфической аминопептидазы вскоре после включения его в белок. Кроме того, аминоацил-тРНК-трансферазы могут добавлять один дестабилизирующий аминокислотный остаток на N-конце белка. Условия протекания этих реакций изучены еще слабо.

Мишенями для присоединения убикитина и последующей деградации служат в первую очередь денатурированные, неправильно свернутые белки, а также белки, содержащие окисленные или другие аномальные аминокислоты, причем даже в тех случаях, когда на N-конце у них присутствует стабилизирующая аминокислота. Разрушение неправильно свернутых или денатурированных белков может начинаться с распознавания групп гидрофобных аминокислот, которые в нормальной молекуле белка расположены внутри глобулы, а в аномальной могут находиться снаружи (см. разд. 3.3.1). За этим, вероятно, следуют реакции расщепления или модификации белка, в результате которых образуется новый, дестабилизирующий N-концевой остаток. И наконец, благодаря действию убикитин-зависимого прогеолитического механизма, аномальный белок может быть разрушен. При построении любой гипотетической схемы распознавания денатурированных или неправильно свернутых белков главный вопрос состоит в том, как клетка отличает целые аномальные молекулы от множества растущих на рибосомах поли-пептидных цепей, которые могут выглядеть как «неправильно» свернутые. Показано, например, что если к клеткам добавить ингибитор белкового синтеза пуромицин (см. разд. 5.1.15), то незавершенные поли-пептиды быстро распадаются в ходе убикитин-зависимого протеолиза. Возможно, метаболическая стабильность и долго-, и короткоживущих белков во время их синтеза на рибосомах объясняется тем, что они временно защищены аппаратом трансляции.

Установлено, что N-концевой остаток часто бывает устойчив к гидролизу в процессе повторяющихся реакций, используемых в аминов кислотных секвенаторах (см. разд. 4.4.7). Секвенируемые белки обычно ацетилируют по N-концу, который, видимо, становится после этого «заблокированным». Возможно, некоторые белки, модифицированные таким образом, особенно устойчивы к внутриклеточному протеолизу и поэтому являются необычно долгоживущими; к ним относятся многие

белки цитоскелета и гистоны, участвующие в укладке ДНК в клеточном ядре. Однако механизм отбора белков, которые должны быть ацетилированы, неизвестен.

8.2.7. Белки теплового шока позволяют предотвратить накопление в клетке белковых агрегатов [14]

Нормальные клетки млекопитающих растут в культуре при 37°С. Если их на короткое время подвергнуть «тепловому шоку», повышая температуру (обычно до 43°С), они начинают синтезировать в большом количестве набор специфических белков. Большинство этих **белков теплового шока** образуются и в ответ на другие повреждающие воздействия. Возможно, именно они помогают клетке пережить стрессовые ситуации. Сходные белки синтезируются у *Drosophila,* дрожжей и даже у бактерий. Изучение последовательностей ДНК показывает, что существует три основных семейства белков теплового шока: с мол. массой 25, 70 и 90 кДа. В нормальных клетках было обнаружено множество очень похожих между собой белков из каждого семейства.

Предполагают, что белки теплового шока помогают переводить в раствор и вновь сворачивать денатурированные или неправильно свернутые белки. Есть у них и другие функции (см. разд. 8.4.4. и 8.6.7). Например, белки из семейства 90 кДа, как было показано, связываются с неактивными формами белков - рецепторов стероидных гормонов и с тирозин-специфическими протеинкиназами, вероятно, таким образом участвуя в регуляции функций этих рецепторов. Лучше всего изучены белки семейства 70 кДа (hsp 70). Эти белки связываются с некоторыми другими белками, а также аномальными белковыми комплексами и агрегатами, от которых потом освобождаются, присоединяя АТР. Было доказано, что они помогают переводить в раствор и заново сворачивать агрегированные или неправильно свернутые белки путем нескольких циклов присоединения и гидролиза АТР. Аномальные белки имеются в любой клетке, но при некоторых воздействиях, например при тепловом шоке, их количество в клетке резко возрастает, и соответственно возникает необходимость в большем количестве белков теплового шока. Оно обеспечивается активацией транскрипции определенных генов. В клетках дрожжей *S. cerevisiae,* например, имеется восемь *hsp* 70-генов; некоторые из них транскрибируются при любых условиях, а остальные - только под действием высоких температур или других экстремальных факторов.

Заключение

Цитозоль, составляющий обычно около половины объема эукариотической клетки, представляет собой все внутриклеточное пространство за вычетом органелл. В цитозоле протекает большинство реакций промежуточного обмена и синтеза белка. Если вновь синтезированные белки не имеют сигналов для транспорта в органеллы, они остаются в цитозоле. Некоторые из этих белков разрушаются вскоре после синтеза. Единственная «дестабилизирующая» аминокислота на их N-конце способствует присоединению множества молекул убикитина к специфическим остаткам лизина в белке-мишени. Затем убикитин- и АТР-зависимая протеаза разрушает такой белок. Дефектные копии большинства цитозольных белков разрушаются при помощи того же убикитин-зависимого механизма.

Многие белки претерпевают в цитозоле ковалентные модификации. Некоторые из этих модификаций постоянны, другие же, например фосфорилирование, обратимы и играют валеную роль в регуляции актив-

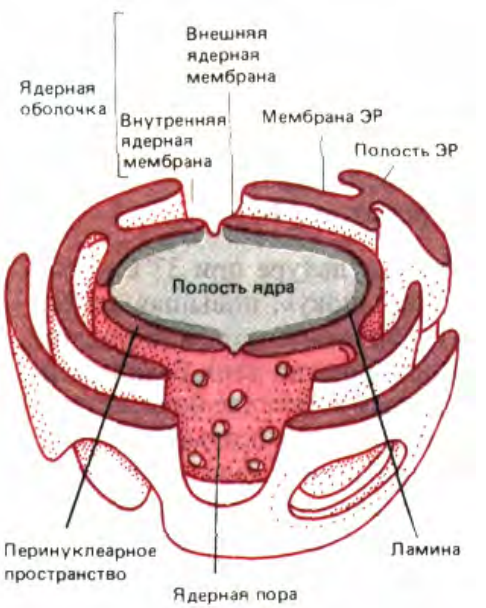


Рис. 8-19. Трехмерная модель двуслойной оболочки, окружающей ядро. Ядерная оболочка пронизана ядерными порами и переходит в эндоплазматический ретикулум.

ности этих белков. К определенным белкам ковалентна присоединяются жирные кислоты. После этого белок, бывший без такой модификации растворимым, приобретает способность связываться с цитоплазматической поверхностью клеточной мембраны.

8.3. Транспорт белков и РНК в ядро и из ядра [15]

Содержимое клеточного ядра (нуклеоплазма) отделено от цитоплазмы ядерной оболочкой. Ядерная оболочка образована двойной мембраной. Сферическая **внутренняя ядерная мембрана** содержит специфические белки, выступающие в качестве сайтов связывания *ядерной ламины,* которая поддерживает мембрану и контактирует с хромосомами и ядерными РНК. Эта мембрана окружена **внешней ядерной мембраной,** очень схожей с мембраной эндоплазматического ретикулума, в которую она переходит (рис. 8-19). Внешнюю (наружную) ядерную мембрану можно рассматривать как особую часть мембраны ЭР. Подобно мембранам шероховатого ЭР (см. разд. 8.6.1), внешняя ядерная мембрана усеяна рибосомами, участвующими в синтезе белка. Белки, образованные на этих рибосомах, переносятся в пространство между внешней и внутренней ядерными мембранами *(перинуклеарное пространство),* которое в свою очередь связано с просветом ЭР (см. рис. 8-19).

Ядро содержит множество белков, необходимых для обеспечения его уникальных функций. Эти белки (к ним относятся гистоны, ДНК-и РНК-полимеразы, белки-регуляторы различных генов и белки, участвующие в процессинге РНК) синтезируются в цитозоле и затем попадают в ядро. Чтобы достигнуть внутреннего пространства ядра *(просвета ядра),* они должны пройти внешнюю и внутреннюю ядерные мембраны. Этот транспорт происходит избирательно: многие белки, образованные в цитозоле, никогда не попадают в ядро.

8.3.1. Двойную ядерную мембрану пронизывают ядерные поры [16]

У всех эукариот, от дрожжей до человека, ядерная оболочка пронизана **ядерными порами.** Поры окружены большими кольцевыми структурами, называемыми **поровыми комплексами** (их внутренний диаметр состав-

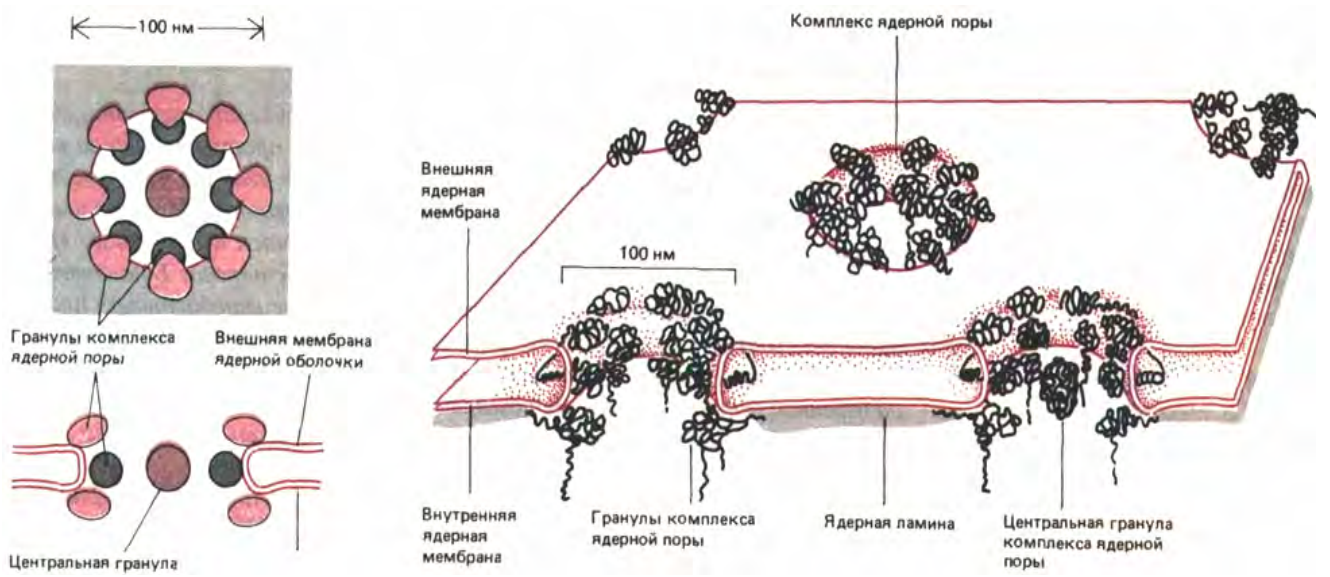


Рис. 8-20. Схема, показывающая расположение ядерных поровых комплексов в ядерной оболочке Вид сверху и поперечное сечение по центру поры (слева). Выделенная цветом «центральная гранула» присутствует в одних порах и отсутствует в других; эти гранулы могут являться частью поры, но не исключено, что это просто крупные частицы, зафиксированные в момент прохождения перового канала. Схема небольшого участка ядерной оболочки (справа).

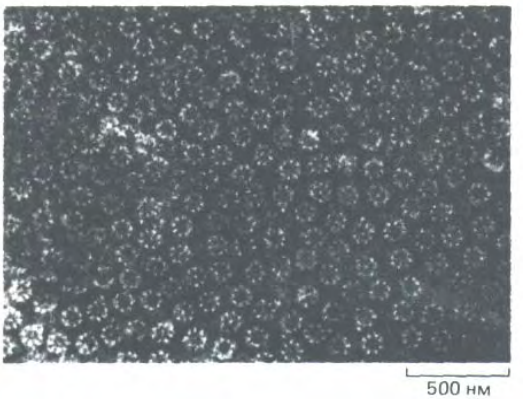


Рис. 8-21. Электронная микрофотография препарата ядерных поровых комплексов (негативное контрастирование). Каждую пору окружает кольцо из восьми гранул. Размер каждой гранулы примерно равен размеру рибосомы. (С любезного разрешения A. Faberge.)

ляет ≈ 80 нм, а мол. Масса – 50-100 млн. Каждый комплекс образован набором больших белковых гранул, сгруппированных в октагональную структуру (рис. 8-20, *А* и 8-21). Поровый комплекс пронизывает двойную мембрану, связывая по окружности поры липидный бислой внутренней и внешней мембран в единое целое (рис. 8-20, *Б).* Несмотря на эту непрерывность, которая должна была бы обеспечивать диффузию компонентов между внешней и внутренней мембранами, они остаются химически различными.

«Дыра» в центре каждого комплекса (ядерная пора) представляет собой водный канал, сквозь который водорастворимые молекулы курсируют между ядром и цитоплазмой. Часто создается впечатление, что это отверстие «закупорено» большой гранулой, которая, как полагают, состоит из вновь синтезированных рибосом или других частиц, видимых в момент переноса в цитоплазму (см. рис. 8-20, *Б).* Эффективный размер поры в состоянии покоя был определен с помощью эксперимента, в ходе которого в цитозоль вводили различные меченые молекулы неядерного происхождения и измеряли скорости их диффузии в ядро. Оказалось, что малые молекулы (5 кДа и меньше) проникают в ядро с такой скоростью, что ядерную оболочку можно считать для них свободно проницаемой. Концентрация белка с мол. массой 17 кДа выравнивается между цитоплазмой и ядром за 2 мин; для белка с мол. массой 44 кДа это происходит за 30 мин, а глобулярные белки, имеющие свыше 60 кДа, едва ли вообще проникают в ядро. Количественный анализ подобных данных подтверждает, что ядерный поровой комплекс содержит заполненный водой цилиндрический канал диаметром около 9 нм и длиной 15 нм (рис. 8-22). Эти размеры сравнимы с размером беспорядочно расположенных каналов, которые видны на некоторых электронных микрофотографиях.

По-видимому, ядерная оболочка приспособлена к тому, чтобы закрывать содержимое ядерного компартмента *(нуклеоплазму)* от множества частиц, филаментов и больших молекул, работающих в цитоплазме. Зрелые цитоплазматические рибосомы, например, слишком велики, чтобы проникать через эти 9-нанометровые каналы, поэтому весь белковый синтез ограничивается цитоплазмой. Непонятно только, как же попадают в ядро большие молекулы, которые там необходимы, например, ДНК- и РНК-полимеразы, имеющие мол. массу субъединиц от 100 до 200 кДа? Недавно получены доказательства того, что эти и многие другие ядерные белки взаимодействуют с белками-рецепторами, расположенными на границе ядерных пор, и эти рецепторы активно переносят большие белки в ядро, увеличивая канал поры.

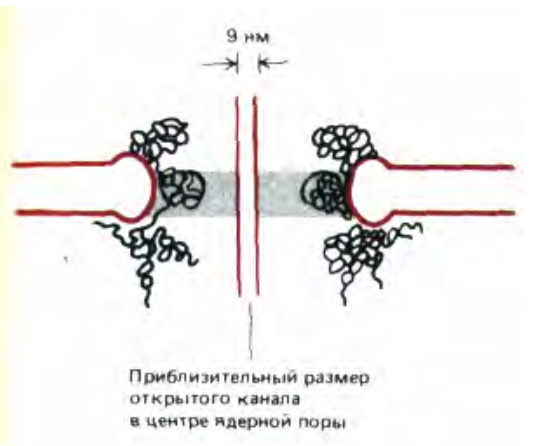


Рис. 8-22. Поперечный разрез ядерной поры (упрощенная схема). Воображаемый цилиндр, изображенный в центре поры, показывает эффективный размер открытого канала, рассчитанный путем измерений транспортируемых частиц. На некоторых электронных микрофотографиях можно различить нити, заполняющие почти все внутреннее пространство поры. Возможно, присутствие этих нитей приводит к уменьшению просвета поры до 9 нм.

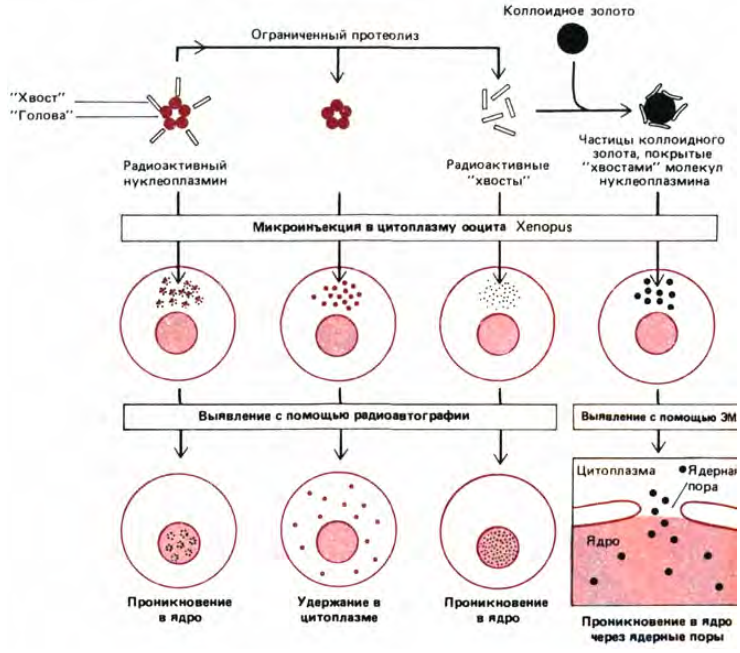


Рис. 8-23. Эксперименты, демонстрирующие проникновение избранных белков в ядро через ядерные поры. *Нуклеоплазмин* представляет собой большой пентамерный белок с отличающимися «головными» и «хвостовыми» доменами. «Головки» можно отрезать от «хвостов» при помощи ограниченного протеолиза. Интактный нуклеоплазмин при введении его в цитоплазму ооцита шпорцевой лягушки быстро накапливается в ядре, несмотря на то, что он слишком велик, чтобы пассивно проникать сквозь маленький канал в центре перового комплекса. По-видимому, сигнал, направляющий импорт этого белка в ядро, расположен в «хвостовом» домене, потому что введенные в цитоплазму ооцита отдельные «хвосты» переносятся в ядро, а отдельные «головы»-нет. Роль ядерных пор в этом управляемом сигналом переносе показана с помощью электронной микроскопии. Нуклеоплазминовые «хвосты» связывали с частицами коллоидного золота, хорошо видимыми в электронном микроскопе из-за их высокой электроноплотности. Присоединенные нуклеоплазминовые «хвосты» вызывают проникновение частиц коллоидного золота через ядерные поры.

8.3.2. Белки активно проникают в ядро через ядерные поры [17]

Если из ядра экстрагировать белки, а затем с помощью микроинъекции ввести их в цитоплазму, то даже очень крупные белки вновь будут накапливаться в ядре. Одним из наиболее хорошо изученных примеров является мажорный ядерный белок *нуклеоплазмин,* который можно протеолитически расщепить на «голову» и «хвост». В экспериментах с микроинъекциями «хвостовая» часть проникает в ядро, а «головная»-нет (рис, 8-23). Если «хвосты» связать с частицами коллоидного золота диаметром 20 нм (что гораздо больше внутреннего диаметра находящейся в покое ядерной поры), то частицы золота накапливаются в ядре, их можно видеть в ядерных порах и в процессе транспорта (рис. 8-23 и 8-24). Следовательно, ядерная пора может «открываться» и пропускать такой большой и чужеродный объект, как частица золота. Похоже, что пора работает подобно клапану, который открывается в ответ на сигнал от достаточно крупного белка. Как все это происходит на молекулярном уровне - остается загадкой.

Белки, подобные нуклеоплазмину, активно транспортируются через поры, возможно даже оставаясь при этом в свернутом состоянии. Эксперименты по воссозданию активного ядерного транспорта in vitro подтверждают, что необходимую для этого процесса энергию клетка получает в результате гидролиза АТР.



Рис. 8-24. Электронная микрофотография, показывающая прохождение частиц коллоидного золота, покрытых нуклеоплазмином (см. рис. 8-23) в ядро через ядерные поры, локализация которых отмечена цветными скобками. Сходный результат получается, если частицы золота связаны только с хвостовыми частями молекул нуклеоплазмина. Эти частицы больше в диаметре, чем покоящаяся пора. Следовательно, пора должна «открываться», чтобы обеспечить их прохождение в ядро. (По C. Feldherr, E. Kallenbach, N. Schultz, J. Cell Biol. 99: 2216-2222, 1984.)

8-11
8-12
8-13

8.3.3. В ядро активно переносятся только белки, содержащие специальные сигналы [18]

Избирательность ядерного транспорта обеспечивается *сигналами ядерного импорта,* которые имеются только у ядерных белков. Мы уже говорили о том, что у нуклеоплазмина сигнал такого типа расположен в хвостовой части молекулы. Для некоторых других ядерных белков сигналы ядерного импорта были локализованы более точно с помощью методов генной инженерии. Оказалось, что они могут находиться в любой части молекулы белка, состоят из короткого пептида (обычно от четырех до восьми аминокислотных остатков), обогащенного положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином и обычно содержат пролин. Сигнал такого типа впервые был идентифицирован в белке вируса SV40, так называемом *Т-антигене,* большом (90 кДа) белке, необходимом для репликации вирусной ДНК в ядре. В норме Т-антиген накапливается в ядре вскоре после его синтеза в цитозоле. Однако замена одной-единственной аминокислоты делает невозможной транспортировку белка и вызывает его накопление в цитоплазме (рис. 8-25). Было высказано предположение, что мутация затрагивает последовательность сигнала ядерного импорта. В ходе дальнейших экспериментов ДНК нормального Т-антигена, кодирующую этот район, состыковали с геном, кодирующим мутантный цитоплазматический белок. При этом была определена минимальная последовательность, обусловливающая способность «гибридного» белка проникать в ядро. Удалось показать, что сигнал ядерного импорта для Т-антигена представляет собой цепочку из восьми следующих друг за другом аминокислот, расположенных во внутреннем районе его полипептидной цепи (см. табл. 8-3). Дальнейшие эксперименты убедили в том, что эта сигнальная последовательность успешно функционирует и в том случае, если ее синтезировать в виде короткого пептида и химически присоединить к любой случайно выбранной боковой цепи лизина в «цитоплазма-тическом» мутантном белке. Таким образом, локализация сигнала ядерного импорта в белке, по-видимому, не важна.

Механизм транспорта белков в ядро принципиально отличается от механизмов транспорта белков в другие органеллы (которые будут описаны далее). Отличие состоит в том, что транспорт белков в ядро происходит через регулируемые водные поры, а не через одну или более мембран. Более того, когда ядро «разбирается» в митозе, его содержимое перемешивается с цитозолем, и ядерные белки выбрасываются наружу. Когда ядро собирается вновь, группы хромосом сначала упаковываются в собственные двойные мембраны, прилежащие к ним так плотно, что растворимые белки, включая множество прежних компо-

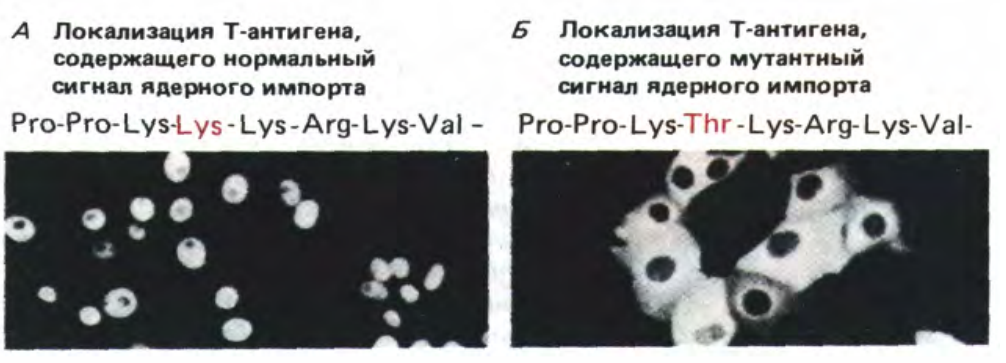


Рис. 8-25. Местонахождение Т-антигена вируса SV40, содержащего или не содержащего сигнальный пептид, определяющий ядерную локализацию. Т-белок дикого типа содержит приведенную здесь богатую лизином последовательность и импортируется в ядро к месту конечного назначения, что показано с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к Т-антигену *(А).* Т-антигены с измененным сигнальным пептидом (например, с заменой лизина на треонин) остаются в цитоплазме *(Б).* (По D. Calderon, B. Roberts, W. Richardson, A. Smith, Cell 39: 499-509, 1984.)

нентов ядра, там «не помещаются». Затем эти заключенные в оболочку хромосомы объединяются, формируя одно ядро, в которое надо транспортировать необходимые белки из цитозоля. Возможно, именно потому, что молекулам ядерного белка предстоит повторный перенос в ядро, сигнальный пептид ядерного импорта не отрезается от них после попадания в ядро. Напротив, когда молекула белка попадает в любую другую мембранную органеллу, она передается от поколения к поколению уже внутри данного компартмента, и ее никогда не приходится транспортировать в него вновь. Поэтому сигнальные пептиды таких молекул удаляются, как только белок переносится внутрь компартмента.

8.3.4. Некоторые РНК покидают ядро через ядерные поры [19]

Ядерная оболочка типичной клетки млекопитающих содержит от 3000 до 4000 пор (примерно 11 пор на 1 мкм^2 площади мембраны). Если в клетке синтезируется ДНК, то для упаковки в хроматин вновь синтезированных молекул необходимо каждые 3 минуты переносить из цитоплазмы в ядро около 10^6 молекул гистонов. Это значит, что каждая пора должна пропускать приблизительно 100 молекул гистонов в минуту. Если клетка быстро растет, то каждая пора должна еще пропускать около трех вновь образованных рибосом из ядра в цитоплазму, поскольку рибосомы формируются в ядре, а функционируют в цитозоле (см. разд. 9.4.17). И это лишь очень небольшая часть всего транспорта, проходящего через ядерные поры.

Особый интерес вызывает механизм экспорта новых субъединиц рибосом. Эти частицы слишком велики (около 15 нм в диаметре), чтобы проникать через 9-нанометровые каналы. Более вероятно, что они проникают сквозь ядерные поры, используя систему активного транспорта. Полагают, что и молекулы информационной РНК в составе рибонуклеопротеиновых частиц (в комплексе со специальными белками) переносятся из ядра в цитоплазму активно. Если частицы коллоидного золота диаметром 20 нм, подобные тем, что были использованы в экспериментах с нуклеоплазмином (см. рис. 8-24), связать с молекулами малых РНК (тРНК или 5S-РНК) и затем инъецировать в ядро ооцита лягушки, то они быстро переносятся через ядерные поры в цитоплазму. С другой стороны, если их ввести в цитоплазму ооцита, они останутся там. Видимо, помимо рецепторов, узнающих сигналы ядерного импорта, поры содержат один или более рецепторов, распознающих молекулы РНК (или связанные с ними белки), предназначенные для цитозоля; когда эти рецепторы связаны, пора катализирует активный транспорт наружу вместо транспорта внутрь ядра. Заметим, что хотя некоторые белки ядерных пор (включая мажорный мембранный белок с мол. массой 190 кДа) недавно были выделены, до сих пор неизвестно, как именно работает ядерная пора.

Заключение

Ядро заключено в оболочку, состоящую из двух концентрических мемб- ран. Внешняя ядерная мембрана переходит я *мембрану ЭР, а пространст-* f *во между внешней и внутренней ядерными мембранами переходит в полость ЭР. Молекулы РНК и рибосомы образуются в ядре и переносятся в цитозолъ, тогда как все белки, функционирующие в ядре, синтезируются в цитозоле и переносятся в ядро. Обмен материалом между ядром и цитоплазмой происходит через ядерные поры, обеспечивающие прямой путь сквозь внутреннюю и внешнюю ядерные мембраны.*

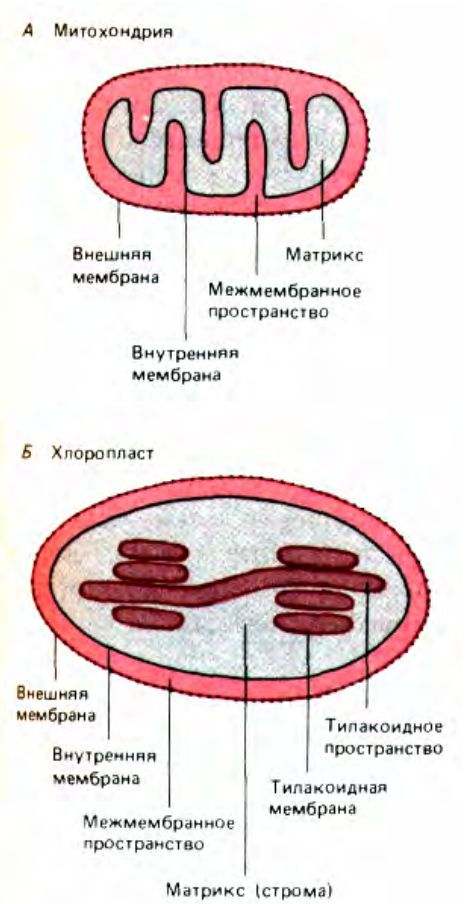


Рис. 8-26. Основные субкомпартменты митохондрий и хлоропластов. Топология хлоропласта может быть получена из топологии митохондрий простым способом: если впячивания внутренней митохондриальной мембраны полностью отпочкуются, то получится компартмент, топологически эквивалентный тилакоидам хлоропластов.

Белки, содержащие сигналы ядерного импорта, активно переносятся в ядро через поры, и узнаются эти белки по коротким, положительно заряженным сигнальным пептидам; поскольку сигнальный пептид не удаляется после переноса, ядерные белки могут быть перенесены в ядро тогда, когда это требуется при сборке ядра после митоза. Молекулы РНК и, возможно, субъединицы рибосом, активно переносятся через поры из ядра в цитоплазму.

8.4. Транспорт белков в митохондрии и хлоропласти [20]

Как мы уже хорошо знаем (гл. 7.), митохондрии и хлоропласты представляют собой окруженные двойной мембраной органеллы, специализирующиеся на синтезе АТР - путем транспорта электронов и окислительного фосфорилирования в митохондриях и фотосинтетического фосфорилирования в хлоропластах. Хотя обе органеллы имеют свою собственную ДНК и аппарат белкового синтеза, большинство их белков кодируется клеточной ДНК и поступает из цитозоля. Более того, каждый поступивший в органеллу белок должен достичь определенного субкомпартмента, в котором он функционирует. В митохондриях имеется четыре субкомпартмента: **митохондриальный матрикс, внутренняя мембрана, межмембранное пространство и внешняя мембрана,** обращенная к цитозолю (рис. 8-26, *А*). В хлоропластах, кроме этого, имеется *тилакоидная мембрана* и *тилакоидное пространство* (рис. 8-26, *Б).* Каждый из этих субкомпартментов содержит отличный от других набор белков. Рост митохондрий и хлоропластов возможен за счет импорта цитоплазматических белков, включающего последовательный избирательный перенос белков через одну, две или (в хлоропластах) даже три мембраны.

Те сравнительно немногие белки, которые кодируются собственными геномами этих органелл, расположены в основном во внутренней мембране в митохондриях и в тилакоидной мембране в хлоропластах. Полипептиды, кодируемые геномами этих органелл, обычно образуют субъединицы белковых комплексов, другие компоненты которых кодируются ядерными генами и поступают из цитозоля. Образование таких гибридных белковых агрегатов требует сбалансированности синтеза этих двух типов субъединиц; каким образом координируется синтез белка на рибосомах разных типов, разделенных двумя мембранами, остается загадкой.

8-16

8.4.1. Митохондриальные сигнальные пептиды представляют собой амфипатические аминокислотные последовательности [21]

В изучении биогенеза митохондрий оказалось чрезвычайно полезным использование в качестве объекта дрожжей. В их клетки можно эффективно вводить гибридные гены, кодирующие «смешанные» белки (полученные с помощью методов рекомбинантных ДНК). О механизмах переноса веществ в митохондрии известно гораздо больше, чем о механизмах переноса в хлоропласты. Скорее всего, эти механизмы идентичны, хотя хлоропласты и содержат еще один, самый внутренний мембранный компартмент - тилакоид.

Белки, импортируемые в митохондриальный матрикс, обычно поступают из цитозоля в течение одной-двух минут после их отделения от полирибосом. Эти белки почти всегда несут на N-конце сигнальный пептид длиной от 20 до 80 аминокислотных остатков. После

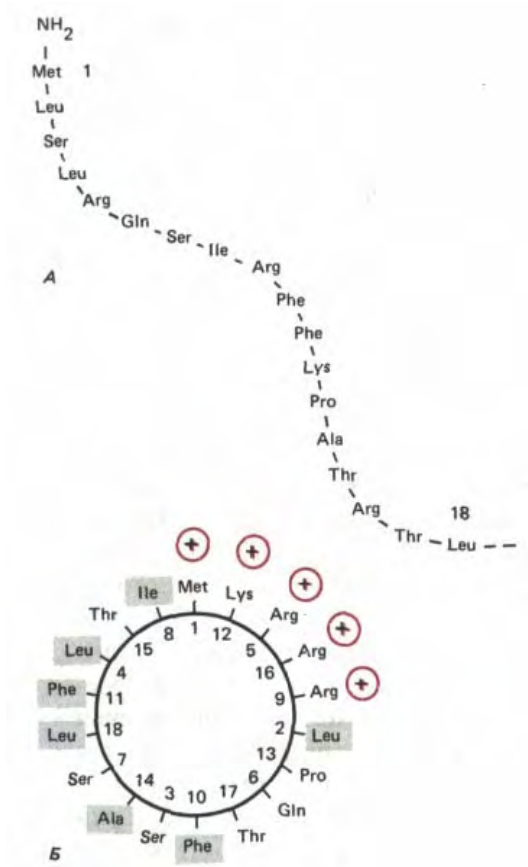


Рис. 8-27. Сигнальный пептид для импорта белков в митохондрии. Цитохромоксидаза - это большой, состоящий из многих белков комплекс, расположенный во внутренней митохондриальной мембране, где он функционирует как терминальный фермент в цепи переноса электронов. *А.* Первые 12 аминокислот предшественника субъединицы IV этого фермента служат сигнальным пептидом для импорта данной субъединицы в митохондрию. *Б.* Если на сигнальный пептид, свернутый по всей длине в α-спираль с 3,6 остатками на виток, смотреть сверху, то видно, что положительно заряженные остатки (выделены *цветом)* сгруппированы с одной стороны спирали, а незаряженные (отмечены *прямоугольниками)* собраны с противоположной стороны. Последовательности митохондриальных сигнальных пептидов почти всегда способны образовывать такую амфипатическую спираль. Полагают, что спирали данного типа играют важную роль в переносе белков через митохондриальные мембраны.

поступления белка в митохондрию сигнальный пептид быстро удаляется при помощи специфической протеазы *(сигнальной пептидазы)* матрикса и затем, вероятно, деградирует в матриксе до аминокислот. Сигнальный пептид может быть исключительно простым. Молекулярно-генетические эксперименты, в которых сигнальную последовательность постепенно укорачивали, показали, что для обеспечения импорта одного митохондриального белка требуется всего 12 аминокислот. Эти 12 остатков можно присоединить к любому митохондриальному белку, и он окажется в митохондриальном матриксе. Физические исследования полных сигнальных пептидов подтверждают, что они могут образовывать амфипатические α-спиральные структуры (рис. 8-27), в которых все положительно заряженные остатки выстроены с одной стороны спирали, а незаряженные гидрофобные остатки уложены с противоположной стороны.

Считается, что внешняя мембрана митохондрий содержит белки-рецепторы, связывающие митохондриальные сигнальные пептиды и тем самым помогающие процессу переноса, однако до сих пор эти гипотетические рецепторы не были как следует охарактеризованы.

8.4.2. Перенос веществ в митохондриальный матрикс зависит как от электрохимического градиента на внутренней мембране, так и от гидролиза ATP [22]

Практически все сведения о молекулярном механизме переноса белков внутрь митохондрии были получены при анализе бесклеточных транспортных систем. Суть экспериментов заключается в следующем. Вначале из гомогенизированных клеток методом дифференциального центрифугирования выделяют митохондрии, а затем инкубируют их с радиоактивно меченными белками, предназначенными для этих органелл **(митохондриальные белки-предшественники).** Очищенные белки-предшественники очень быстро и эффективно включаются в такие митохондрии.

Все формы направленного движения и транспорта нуждаются в энергии. В большинстве случаев эта энергия используется в форме ATP. Однако для переноса белков в митохондрии требуется еще наличие электрохимического градиента на внутренней митохондриальной мембране. Этот градиент образуется в процессе транспорта электронов по мере того, как протоны откачиваются из матрикса в межмембранное пространство (см. разд. 7.1.7). Внешняя митохондриальная мембрана свободно проницаема для ионов, поэтому на ней не поддерживается никакой градиент. Электрохимический градиент на внутренней мембране используется как аккумулятор энергии для осуществления большей части синтеза ATP в клетке. Кроме того, энергия градиента расходуется для переноса внутрь митохондрии белков, несущих положительно заряженные митохондриальные сигнальные пептиды. Если добавить ионо-форы, сбрасывающие митохондриальный мембранный потенциал (см. разд. 7.2.10), этот перенос блокируется. Каким образом электрохимический градиент способствует переносу белков? Ответ на этот вопрос пока не получен.

8.4.3. Митохондриальные белки проникают в матрикс в зонах слипания, связывающих две мембраны [23]

Пересекает ли белок на пути к митохондриальному матриксу две мембраны поочередно, или он проникает через обе мембраны сразу? Чтобы ответить на этот вопрос, можно охладить бесклеточную систему до температуры льда, задержав таким образом белки на промежуточ-



Рис. 8-28. При переносе белков в матрикс они в течение короткого времени соединяют внутреннюю и внешнюю митохондриальные мембраны. Если изолированные митохондрии инкубировать с белком-предшественником при 5°С, предшественник переносится лишь частично. В матриксе N-концевой сигнальный пептид отрезается; большая часть полипептидной цепи остается вне митохондрии (и доступна для протеолитических ферментов). При нагревании до 37°С перенос происходит полностью. Для изначального внедрения белка в митохондриальную мембрану при 5°С требуется разность потенциалов на внутренней мембране. Последующий перенос может происходить без этой разности потенциалов, но для него необходимо присутствие АТР с цитоплазматической стороны внутренней мембраны. Полагают, что гидролиз АТР необходим при разворачивании полипептидной цепи для того, чтобы белок мог пройти сквозь мембрану.

ной стадии переноса. Оказалось, что их N-концы находятся при этом в матриксе (они могут быть удалены протеазой матрикса), а остальная часть молекул расположена вне митохондрии (поскольку чувствительна к добавленным извне протеолитическим ферментам). Этот результат показывает, что белок-предшественник, когда проникает в матрикс, проходит через обе митохондриальные мембраны сразу. Специалисты по электронной микроскопии заметили многочисленные зоны слипания, в которых, внешняя и внутренняя митохондриальные мембраны сливаются, и предположили, что это именно те участки, через которые происходит перенос белков в матрикс. Недавно эти точки контакта были идентифицированы биохимически (по их связыванию с частично перенесенными внутрь митохондрии белками-предшественниками) и очищены.

Если охлажденные митохондрии, содержащие частично перенесенные промежуточные продукты, опять нагреть, то перенос быстро завершается (рис. 8-28), даже если мембранный потенциал на внутренней мембране сброшен. По-видимому, мембранный потенциал необходим лишь для начальной стадии переноса белка через мембрану, которая происходит даже при низкой температуре. Дальнейшие события, однако, требуют наличия АТР. Эти факты означают, что в норме перенос проходит в два этапа: 1) управляемое электрически проникновение сигнального пептида и связанных с ним последовательностей сквозь обе митохондриальные мембраны и 2) продвижение остатка цепи в митохондриальный матрикс, требующее гидролиза АТР и физиологических температур (рис. 8-29).

8.4.4. Когда белки проникают в митохондриальный матрикс, они разворачиваются [24]

По всей вероятности, белки-предшественники разворачиваются перед тем, как пересечь две митохондриальные мембраны в точке контакта. Трудно представить себе, что свернутый водорастворимый белок мог бы «протаранить» два (или даже один) липидных бислоя, оставаясь в своей нативной трехмерной конформации. Точно также невозможно вообразить, что пора могла бы пропускать глобулярные белки, которые сильно варьируют по размерам и форме. Ведь при этом она становилась бы проницаемой для протонов, и в результате электрохимический градиент на внутренней мембране исчезал бы. Между тем, в развернутом состоянии все белки имеют сходную конформацию и могут быть перенесены с помощью общего механизма. Но поскольку белки в свернутом состоянии обладают меньшей свободной энергией, чем в развернутом (по этой причине полипептиды спонтанно сворачиваются), разворачивание молекулы белка требует затрат энергии. Предполагается, что эту энергию обеспечивает гидролиз АТР.

Чтобы проверить, разворачиваются ли белки-предшественники, когда они пересекают митохондриальную мембрану, был сконструирован гибридный ген, кодирующий «смешанный» белок. В этом как бы состыкованном белке митохондриальный сигнальный пептид присоединен к N-концу цитоплазматического фермента-дигидрофолатредуктазы (ДГФР). Такой гибридный белок обладал почти ненарушенной ферментативной активностью, а значит ДГФР была в нативной трехмерной конформации. При смешивании с препаратом митохондрий этот белок поступал в матрикс. Однако если его предварительно обрабатывали метатрексатом, который прочно связывается с активным центром фермента и мешает разворачиванию его молекулы, то перенос резко подавлялся.

Генетические эксперименты на дрожжах подтверждают, что для

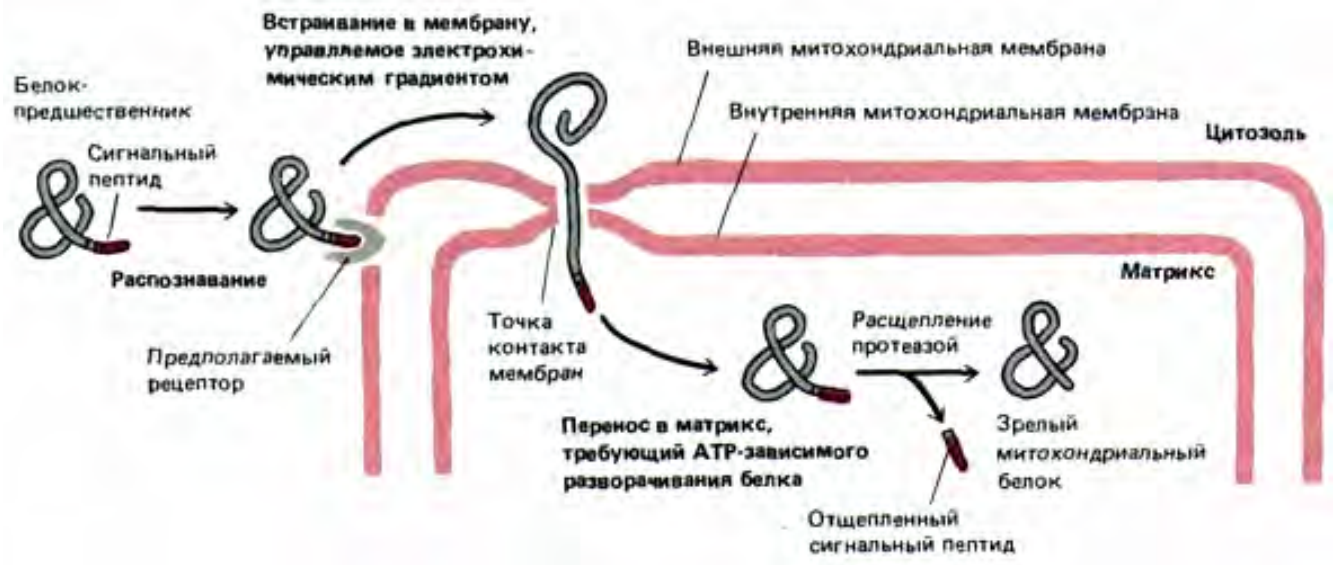


Рис. 8-29. Импорт белков в митохондрии. N-концевой сигнальный пептид белка-предшественника распознается рецептором, который, как полагают, расположен во внешней мембране. Белок переносится через обе митохондриальные мембраны в специальных точках контакта. Для начала этого процесса необходим электрохимический градиент по сторонам внутренней мембраны. В матриксе сигнальный пептид отрезается специфической протеазой, и образуется зрелый белок.

АТР-зависимой реакции разворачивания белков необходимы некоторые гены семейства *hsp 70.* Если эти гены инактивировать, то и митохондриальные белки-предшественники, и белки, предназначенные для ЭР, не могут пересечь соответствующие мембраны и вместо этого накапливаются в цитозоле.

8-17

8.4.5. Для транспорта белков в межмембранное пространство митохондрий необходимы два сигнала [25]

Транспорт некоторых белков-предшественников в межмембранное пространство митохондрий начинается с их переноса в матрикс (рис. 8-29). Однако за N-концевым сигнальным пептидом, инициирующим этот перенос, расположена очень сильно гидрофобная аминокислотная последовательность. Как только сигнальный пептид отщепляется матриксной протеазой, эта гидрофобная последовательность начинает, в свою очередь, выполнять роль сигнального пептида для обратного встраивания данного белка во внутреннюю мембрану. Вероятно, этот перенос происходит с помощью механизма, сходного с механизмом встраивания белков в мембрану ЭР. Аналогичный способ используется и для встраивания во внутреннюю мембрану митохондрий белков, кодируемых митохондриальным геномом (рис. 8-30, *А).*

После того, как белки, предназначенные для межмембранного пространства, встроятся во внутреннюю мембрану, они отрезаются протеазой в межмембранном пространстве (рис. 8-30, *Б).* Многие из этих зрелых растворимых белков в конце концов присоединяются к «внешней» поверхности внутренней мембраны, где они образуют субъединицы комплексов, содержащих также и трансмембранные белки.

Для транспорта белков из цитозоля во внутреннюю мембрану митохондрий также требуется гидрофобный сигнальный пептид. Возможно, этот транспорт происходит по схеме, изображенной на рис. 8-30, *А,* но прямо это доказано не было. Такой двухстадийный путь трудно отличить в эксперименте от альтернативного пути, при котором транспорт в точке контакта прерывается по достижении гидрофобного сигнала, и белок остается заключенным в бислой внутренней мембраны.

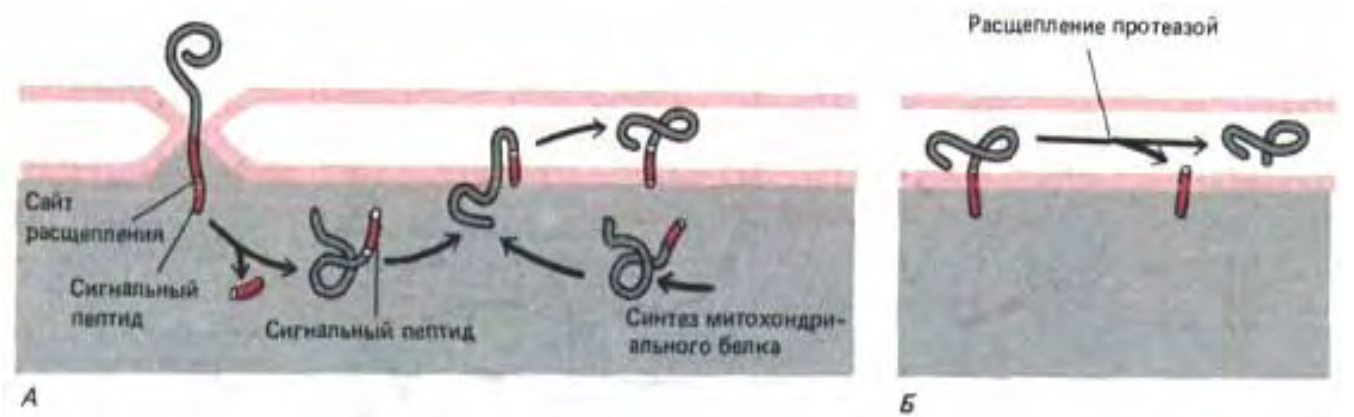


Рис. 8-30. Импорт белков из цитозоля в межмембранное пространство митохондрий или внутреннюю мембрану требует многих сигналов. Вначале белок переносится в пространство матрикса, как это показано на рис. 8-29. Однако при отрезании сигнального пептида, использованного для первичного переноса, обнажается смежный гидрофобный сигнальный пептид на новом N-конце. Этот сигнал вызывает встраивание белка во внутреннюю мембрану таким же образом, каким в нее встраиваются белки, кодируемые митохондриальным геномом *(А.)* Этот механизм предположительно сходен с тем, который бактериальные предки митохондрий использовали для встраивания белков в плазматическую мембрану, и, как полагают, напоминают механизм встраивания белков в ЭР. Для транспорта белков в межмембранное пространство требуется еще третья стадия, на которой протеаза с активным центром, обращенным в трансмембранное пространство, отрезает белок от его трансмембранного сигнального пептида, находящегося во внутренней мембране (Б). Путь, изображенный на рис. *(А),* может быть использован и для переноса белков из цитозоля во внутреннюю мембрану, который тоже требует гидрофобного пептида.

8.4.6. Для переноса белков из цитозоля во внешнюю митохондриальную мембрану также необходимо их разворачивание [26]

Во внешней мембране митохондрий имеется одна необычная структура (она напоминает внешнюю мембрану грамотрицательных бактерий), липидный слой которой содержит большие количества образующего поры *белка-порина.* По этой причине внешняя мембрана свободно проницаема для неорганических ионов и метаболитов и для молекул белков размером меньше 10 кДа. Но для больших по размеру белков внешняя мембрана является барьером и поэтому помогает удержать белки межмембранного пространства от утечки обратно в цитозоль.

Включение во внешнюю мембрану белков, кодируемых основным клеточным геномом - таких, как порин, - происходит по АТР-зависимому механизму, но не требует использования специальных пептидов, которые бы потом отрезались. Мембранный потенциал тоже не требуется. О том, как происходит подобное включение, известно очень мало. По крайней мере у одного белка внешней мембраны имеется нормальный матриксный транспортный сигнал, за которым следует последовательность, каким-то образом прерывающая перенос на внешней мембране.

8-18

8.4.7. Для того, чтобы направлять белки в тилакоидную мембрану хлоропластов, необходимы два сигнальных пептида [27]

Транспорт белков в хлоропласти во многих отношениях напоминает транспорт в митохондрии: и тот, и другой процесс происходят после трансляции, и тот, и другой нуждаются в энергии, и в том, и в другом случае используются гидрофильные N-концевые сигнальные пептиды, которые затем удаляются. Однако имеется по крайней мере одно важное отличие: в митохондриях для проведения этого транспорта используется еще электрохимический градиент на их внутренней мембране. В хлоропластах же, где электрохимический градиент имеется не на внутренней мембране, а на мембране тилакоида (см. гл. 7), по-видимому, для транспорта через внешнюю двумембранную оболочку в качестве источника энергии используется только гидролиз АТР.

Сигнальные пептиды для переноса белков в хлоропласты напоминают раннее описанные пептиды для импорта в митохондрии. Но в растительных клетках имеются и митохондрии, и хлоропласты, и соответственно, белки должны «выбирать» между ними. Например, в растительных клетках бактериальный фермент, присоединенный (методами генной инженерии) к N-концевой последовательности митохондриального белка, направляется в митохондрии. Тот же белок, связанный

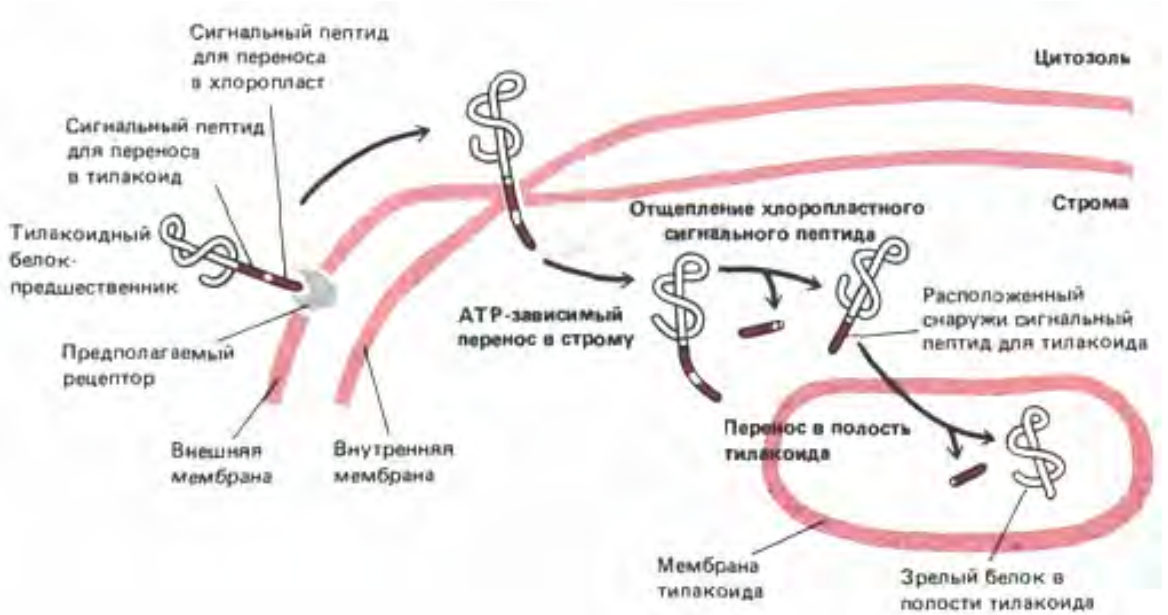


Рис. 8-31. Для переноса белков в полость (тилакоидное пространство) тилакоида в хлоропластах требуется два сигнальных пептида, такой перенос осуществляется в две стадии. Полипептнд-предшественник содержит N-кондевой сигнальный пептид для переноса в хлоропласт, за которым непосредственно следует тилакоидный сигнальный пептид. Хлоропластный сигнальный пептид вызывает перенос белка в строму через точки контакта в мембране (см. рис. 7-73); механизм этого переноса сходен с механизмом переноса в митохондриаль-ный матрикс (рис. 8-29). Затем сигнальный пептид отрезается, открывая тилакоидный сигнальный пептид, который вызывает перенос через мембрану тилакоида. Этот процесс имеет много общего с перемещением белков в ЭР.

с N-концевой последовательностью белка хлоропластов, оказывается в хлоропластах.

Хлоропласты содержат еще один окруженный мембраной компартмент - **тилакоид.** Множество белков хлоропластов, включая белковые субъединицы фотосинтетической системы и АТР-синтетазы, импортируются в мембрану тилакоида из цитозоля. Подобно некоторым митохондриальным белкам-предшественникам, эти белки доставляются к месту назначения в два этапа. Сначала они проникают через двумембранную оболочку в матрикс хлоропласта (называемый **стромой),** а затем переносятся в мембрану тилакоида (или сквозь нее в тилакоидное пространство). Предшественники этих белков имеют кроме N-концевого сигнального пептида для хлоропластов еще гидрофобный тилакоидный сигнальный пептид. После того, как белок с помощью N-концевого сигнального пептида проникает в строму, этот пептид удаляется стро-мальной протеазой (аналогичной протеазе матрикса митохондрий). В результате открывается тилакоидный сигнальный пептид, который затем инициирует транспорт через мембрану тилакоида (рис. 8-31). Как и в митохондриях, этот второй этап служит для встраивания собственных белков хлоропласта в мембрану тилакоида; необходимый для этого белок-транслокатор, вероятно, происходит от бактериального предка хлоропластов.

Заключение

Большинство белков проникает в митохондрии и хлоропласты из цитозоля сходным образом. Этот механизм был наиболее хорошо изучен для митохондрий, особенно у дрожжей. Белок переносится в матрикс митохондрии через зоны слипания внешней и внутренней мембран. Для этого переноса требуется гидролиз АТР, а также электрохимический градиент на внутренней мембране. Транспортируемый белок разворачивается, когда пересекает мито хондриальные мембраны. В митохондрии или хлоропласты переносятся только те белки, которые содержат специфический сигнальный пептид. Этот сигнальный пептид обычно расположен на N-конце молекулы белка и отрезается после переноса ее внутрь органеллы. На втором этапе транспорта белок может переноситься во внутреннюю мембрану. Для этого он должен иметь еще гидрофобный сигнальный пептид; этот пептид открывается после удаления первого сигнала. В случае хлоропластов для переноса белков из стромы в тилакоид также требуется второй сигнальный пептид.

8.5. Пероксисомы [28]

Пероксисомы (называемые также *микротельцами)* во многом отличаются от митохондрий и хлоропластов. Прежде всего, они окружены только одной мембраной и не содержат ДНК и рибосом. Поскольку пероксисомы не имеют собственного генома, все их белки должны поставляться из цитозоля. В этом отношении пероксисомы напоминают ЭР: они являются самовоспроизводящейся мембранной органеллой, существующей без своего собственного генома.

Прежде чем рассматривать биосинтез пероксисом, мы остановимся на функциях этого пестрого семейства органелл. Хотя пероксисомы есть во всех эукариотических клетках, их функции сильно различаются в клетках разных типов.

В начале 60-х гг. было показано, что главным источником по крайней мере трех окислительных ферментов - *оксидазы D-аминокислот, уратоксидазы* и *каталазы* - являются самостоятельные органеллы диаметром около 0,5 мкм. У млекопитающих пероксисомы этого размера встречаются в основном в печени. На электронных микрофотографиях их можно различить по «кристалловидной» сердцевине, состоящей из уратоксидазы (рис. 8-32). Позже, когда была разработана гистохимическая окраска на каталазу - фермент, составляющий до 40% общего белка пероксисом, было показано, что пероксисомы имеются во всех клетках. В большинстве клеток пероксисомы мельче (0,15-0,25 мкм в диаметре), чем в клетках печени.

Подобно митохондрии, пероксисома - это один из главных центров утилизации кислорода в клетке. Существует гипотеза, согласно которой пероксисома представляет собой остаток древней органеллы, выполняющей у примитивных предков эукариотических клеток все функции метаболизма кислорода. Когда в атмосфере начал накапливаться кислород, производимый фотосинтезирующими бактериями, вероятно, он был токсичен для большинства клеток. Пероксисомы могли служить для снижения концентрации кислорода в клетках, одновременно используя его химическую активность для проведения важных окислительных реакций. В соответствии с этой точкой зрения последующее появление митохондрий сделало пероксисомы в значительной мере ненужными, так как многие реакции, ранее протекавшие в пероксисомах без производства энергии, теперь с помощью окислительного фосфорилирования были сопряжены с образованием АТР. Таким образом, окислительные реакции, протекающие в современных клетках - это, возможно, те реакции, которые остались необходимыми, несмотря на появление митохондрий.

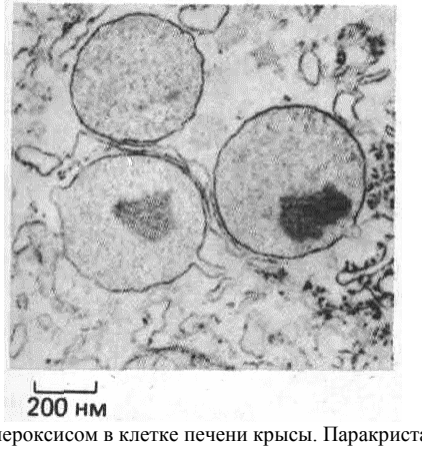


Рис. 8-32. Электронная микрофотография трех пероксисом в клетке печени крысы. Паракристалличес-кие электроноплотные включения-это фермент уратоксидаза. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

8.5.1. Пероксисомы используют в реакциях окисления молекулярный кислород и перекись водорода [29]

Пероксисомы получили такое название благодаря тому, что обычно в их состав входит один или более ферментов, использующих молекулярный кислород для отщепления атомов водорода от некоторых органических субстратов (обозначенных здесь R) в окислительной реакции *с* образованием перекиси водорода (H_2O_2):

$RH_2 + O_2 \rightarrow R + H_2O_2$

Каталаза использует H_2O_2, образованную другими ферментами в пероксисоме, для окисления множества субстратов - например, фенолов, муравьиной кислоты, формальдегида и спирта -с помощью «окислительной» реакции $H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$. Этот тип окислительных реакций особенно важен в клетках печени и почек, пероксисомы

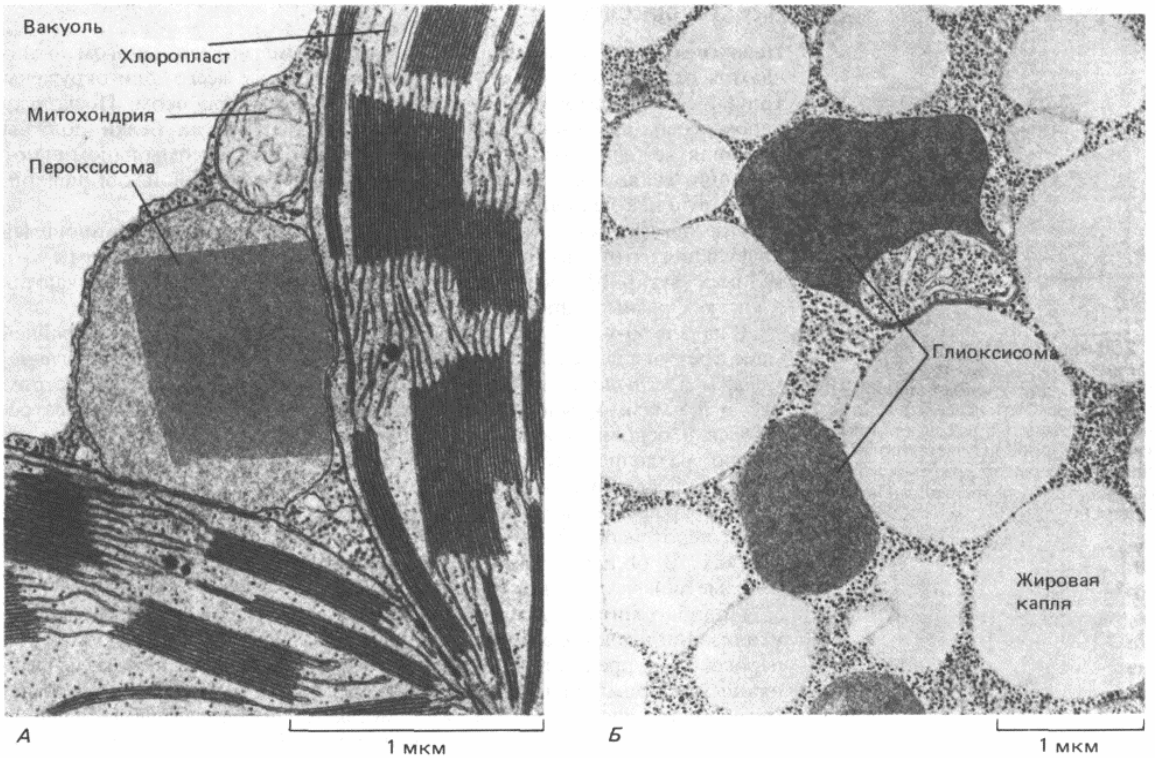


Рис. 8-33. Электронная микрофотография двух типов пероксисом, встречающихся в растительных клетках. *А*. Пероксисома с паракристаллической сердцевиной в клетке мезофилла листа табака. Полагают, что ее тесная связь *с* хлоропластами облегчает обмен материалами между этими органеллами, происходящий при фотодыхании. *Б*. Пероксисомы в жирозапасающей клетке семядоли семени томата, 4 дня после прорастания. Здесь пероксисомы *(глиоксисомы)* ассоциированы с липидными тельцами, в которых запасается жир, что отражает их центральную роль в мобилизации жиров и глюконеогенезе при прорастании семян. *(А-с* любезного разрешения P. Gruber и E. Newcomb; *Б* с любезного разрешения S. Frederick и E. Newcomb.)

которых обезвреживают множество ядовитых веществ, попадающих в кровоток. Почти половина этанола, который мы выпиваем, окисляется до ацетальдегида этим способом. Кроме того, когда в клетке накапливается излишек H_2O_2, каталаза превращает ее в H_2O($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$).

Пероксисомы представляют собой необычно разнообразные орга-неллы, содержащие в различных клетках даже одного и того же организма сильно различающиеся наборы ферментов. В некоторых случаях в зависимости от условий изменяются размеры пероксисом. Например, клетки дрожжей, растущие в среде, содержащей сахар, имеют маленькие пероксисомы. Однако, если эти клетки выращивать на среде с метанолом, в них появляются большие пероксисомы, окисляющие метанол; если в среде есть жирные кислоты, в клетках появляются большие пероксисомы, в которых жирные кислоты расщепляются до ацетил-CoA.

Особенно важную роль пероксисомы играют в растительных клетках. У растений хорошо изучены два очень различных типа пероксисом. Одни из них обнаруживаются в листьях (рис. 8-33, *А).* Эти пероксисомы катализируют окисление побочного продукта реакции, в которой CO_2 превращается в углевод (такой окислительный процесс называют *фотодыханием,* т. к. в нем используется O_2 и освобождается CO_2). Другой тип пероксисом встречается в прорастающих семенах (рис. 8-33, *Б).* Они служат здесь для превращения жирных кислот, запасенных в липидах семян, в сахара, необходимые для роста молодого растения. Поскольку это превращение жиров в сахара происходит в серии реакций, известных под названием *глиоксилатного цикла,* такие пероксисомы называют еще

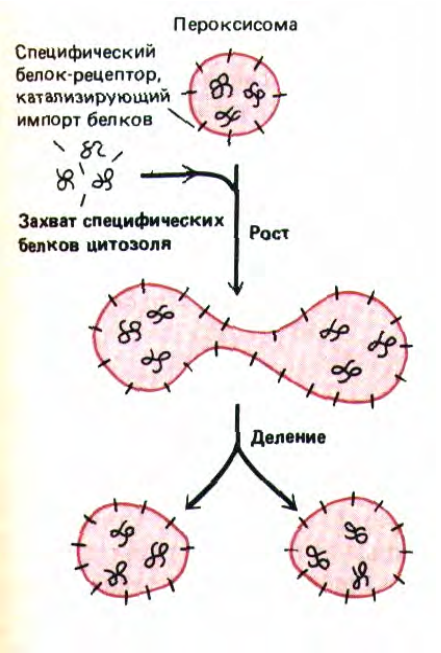


Рис. 8-34. Модель сборки пероксисом. Мембрана пероксисом содержит специфические белки-рецепторы для импорта. Все белки пероксисомы, включая новые копии этих рецепторов, синтезируются рибосомами в цитозоле и затем переносятся из цитозоля в пероксисому. Следовательно, пероксисомы образуются только из предсуществовавших пероксисом в процессе их роста и деления; подобно митохондриям и хлоропластам, они непрерывно импортируют новые компоненты из цитозоля.

глиоксисомами. В глиоксилатном цикле две молекулы ацетил-CoA, образованные в результате расщепления жирной кислоты в пероксисоме, используются для образования янтарной кислоты, которая покидает пероксисому и превращается в глюкозу. В клетках животных глиокси-латный цикл отсутствует, и поэтому они не способны превращать жирные кислоты, содержащиеся в жирах, в углеводы.

8-21
8-22

8.5.2. Все компоненты пероксисом поступают из цитозоля [30]

Пероксисомы можно рассматривать как набор органелл с одинаковой мембраной и различным содержимым. Как отмечалось ранее, в них нет ДНК и рибосом; все их белки кодируются ядерными генами и синтезируются в цитозоле. Как белки мембраны, так и внутренние белки пероксисом поступают из цитозоля после трансляции. Из всех белков пероксисом лучше всего была изучена *катализа.* Это тетрамерный гем-содержащий белок, который образуется в цитозоле в виде мономеров, не содержащих гем. Мономеры переносятся в просвет пероксисом и там собираются в тетрамеры в присутствии гема. Хотя каталаза не содержит сигнальной последовательности, отрезаемой после использования, она должна иметь какой-то сигнал, направляющий ее в пероксисому. Согласно последним данным, эту роль, по крайней мере частично, играет специфическая последовательность из трех аминокислот, расположенная вблизи карбоксильного конца многих пероксисомных белков.

Пероксисомы, по-видимому, содержат по крайней мере один уникальный белок, расположенный на обращенной к цитозолю поверхности их мембраны, который работает в качестве рецептора, распознающего сигнал на вносимом белке. Одно время полагали, что мембранная «скорлупа» пероксисом образуется путем отшнуровывания от ЭР, тогда как их содержимое переносится из цитозоля. В настоящее время имеется ряд данных, доказывающих, что новые пероксисомы всегда возникают из предсуществовавших и формируются путем роста и деления органел-лы, как это описано ранее для митохондрий и хлоропластов (см. разд. 7.5.1). Считают, что все мембранные белки пероксисом, включая предполагаемый рецептор(ы), поступают из цитозоля (рис. 8-34). Вероятно, и липиды, требуемые для построения новой мембраны пероксисом, также доставляются из цитозоля. Возможно, они переносятся от мест их синтеза в мембране ЭР белками, участвующими в обмене фосфолипидов (см. разд. 8.6.15).

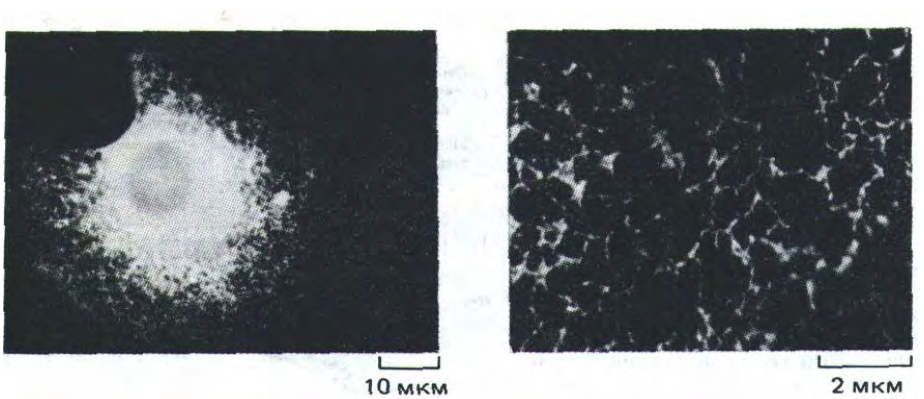


Рис. 8-35. Микрофотография культивируемой клетки млекопитающих. На препарате белки, остающиеся в ЭР, связаны с флуоресцентно меченными антителами. ЭР, подобно сети, распространяется по всей цитоплазме клетки, так что любая область цитозоля прилегает к какой-нибудь части мембраны ЭР. (С любезного разрешения Hugh Pelham.)

Заключение

Пероксисомы специализируются на проведении окислительных реакций с использованием молекулярного кислорода. Они вырабатывают перекись водорода (которая им нужна для окисления), разрушая ее избыток с помощью каталазы. Считают, что, подобно митохондриям и хлоропластам, пероксисомы являются самовоспроизводящимися органеллами. Однако они не содержат ДНК или рибосом. Полагают, что в их состав входит уникальный мембранный рецептор, позволяющий вносить внутрь органеллы все белки (включая и сам рецептор) путем избирательного транспорта из цитозоля.

8.6. Эндоплазматический ретикулум [31]

Все эукариотические клетки имеют **Эндоплазматический** ретикулум **(ЭР).** Его чрезвычайно извилистая мембрана обычно составляет более половины общего количества клеточных мембран (см. табл. 8-2). Полагают, что хотя мембрана ЭР имеет многочисленные складки и изгибы, пронизывающие всю цитоплазму, она образует непрерывную поверхность, ограничивающую единое внутреннее пространство. Это внутреннее пространство, называемое полостью ЭР, часто занимает более 10% общего объема клетки (см. табл. 8-1). Полость ЭР отделяется от цитозоля одиночной мембраной (мембраной ЭР), служащей связующим звеном между этими двумя компартментами. Наоборот полости ЭР и каждой цистерны аппарата Гольджи отделены друг от друга двумя мембранами и цитозолем, поэтому транспорт макромолекул между этими органеллами осуществляется при помощи транспортных пузырьков (рис. 8-36), ЭР играет важнейшую роль в клеточных биосинтезах. На мембранах ЭР начинается синтез трансмембранных белков и липидов ЭР, аппарата Гольджи, лизосом и плазматической мембраны. Здесь же производится большинство липидов для мембран митохондрий и пероксисом (см. разд. 8.6.14). Кроме того, все вновь синтезированные белки, независимо от их места назначения (полость ЭР, аппарат Гольджи, лизосомы или внеклеточное пространство), сначала поступают в полость ЭР. Так как ЭР служит отправной точкой для синтеза всех секретируемых белков, он также является местом, где начинается формирование внеклеточного матрикса.

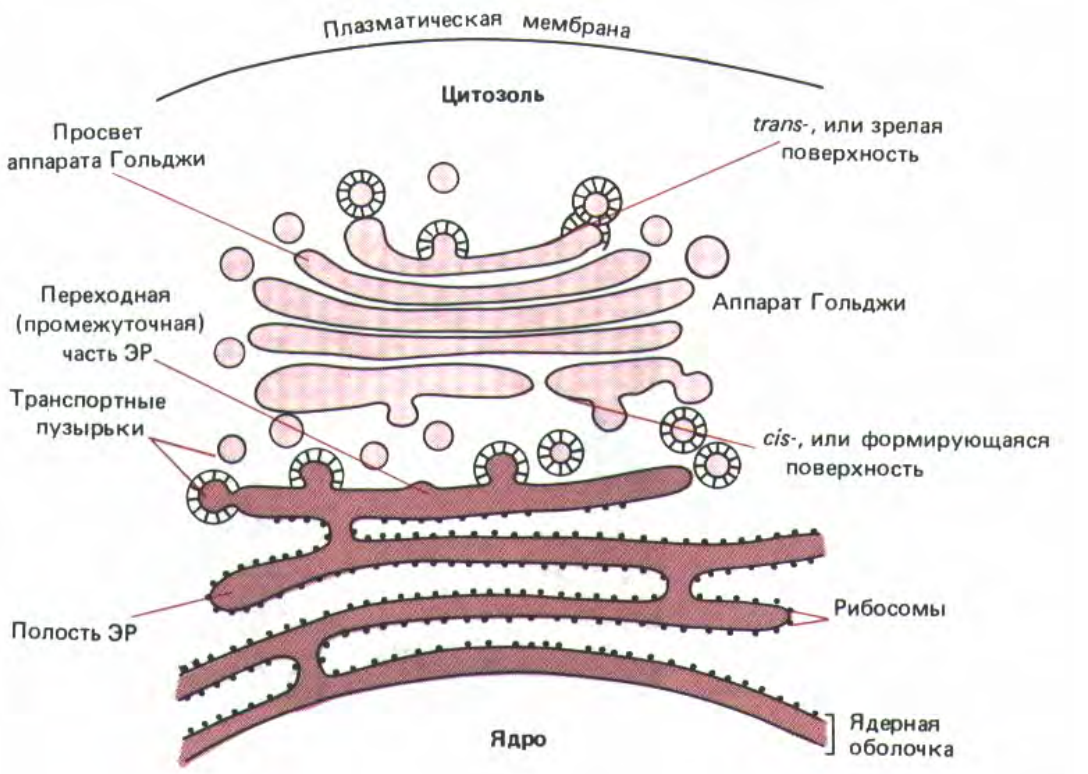


Рис. 8-36. Связь полости ЭР с другими внутриклеточными компартментами, с которыми ЭР контактирует. Просвет ЭР отделен как от ядра, так и от цитозоля всего одной мембраной, тогда как от собранных в стопку цистерн аппарата Гольджи он отделен двумя мембранами. В большинстве случаев ЭР и аппарат Гольджи можно рассматривать как единую функциональную единицу, части которой связаны с помощью транспортных пузырьков.

8.6.1. Прикрепленные к ЭР рибосомы определяют границы его гранулярных (шероховатых) областей [32]

ЭР удаляет некоторые белки из цитозоля сразу после их синтеза. Это белки двух типов: 1) трансмембранные, которые лишь частично переносятся через мембрану ЭР и остаются заключенными в нее, и 2) водорастворимые, которые полностью переносятся через мембрану ЭР и освобождаются в его полость. Трансмембранные белки предназначены для плазматической мембраны или для мембран других органелл, а водорастворимые направляются либо в полость органелл, либо секретируются. Все эти белки переносятся через мембрану ЭР с помощью одного и того же механизма и одного и того же вида сигнального пептида.

В клетках млекопитающих импорт белков в ЭР начинается еще до того, как полипептидная цепь полностью синтезирована, т. е. он происходит одновременно с трансляцией *(котрансляционно)*. Этим он отличается от импорта в митохондрии, хлоропласты, ядра и пероксисомы, который является посттрансляционным и требует различных сигнальных пептидов. Так как белок переносится внутрь ЭР сразу после образования полипептидной цепи, рибосомы, на которых происходит его синтез, должны быть прикреплены к мембране ЭР. Области ЭР, покрытые связанными с мембраной рибосомами, называют **гранулярным (шероховатым) эндоплазматическим ретикулумом** (рис. 8-37).

Таким образом, в цитоплазме имеется две пространственно изолированные популяции рибосом. Одни из них **(связанные с мембраной рибосомы)** расположены на обращенной к цитоплазме поверхности мембраны ЭР и заняты синтезом белков, которые сразу же переносятся внутрь ЭР. Другие **(свободные рибосомы)** не прикреплены ни к какой мембране и производят все остальные белки, кодируемые ядром. Связанные и свободные рибосомы идентичны по строению и функции. Они различаются только по белкам, которые синтезируются на них в каждый данный момент. Если рибосоме достается синтез белка с сигнальным пептидом для ЭР, то такой сигнал направляет рибосому к мембране ЭР. Поскольку с одной молекулой мРНК может связаться много рибосом, обычно образуется **полирибосома,** которая прикрепляется к мембране сразу многими растущими полипептидными цепями. Отдельные рибо-

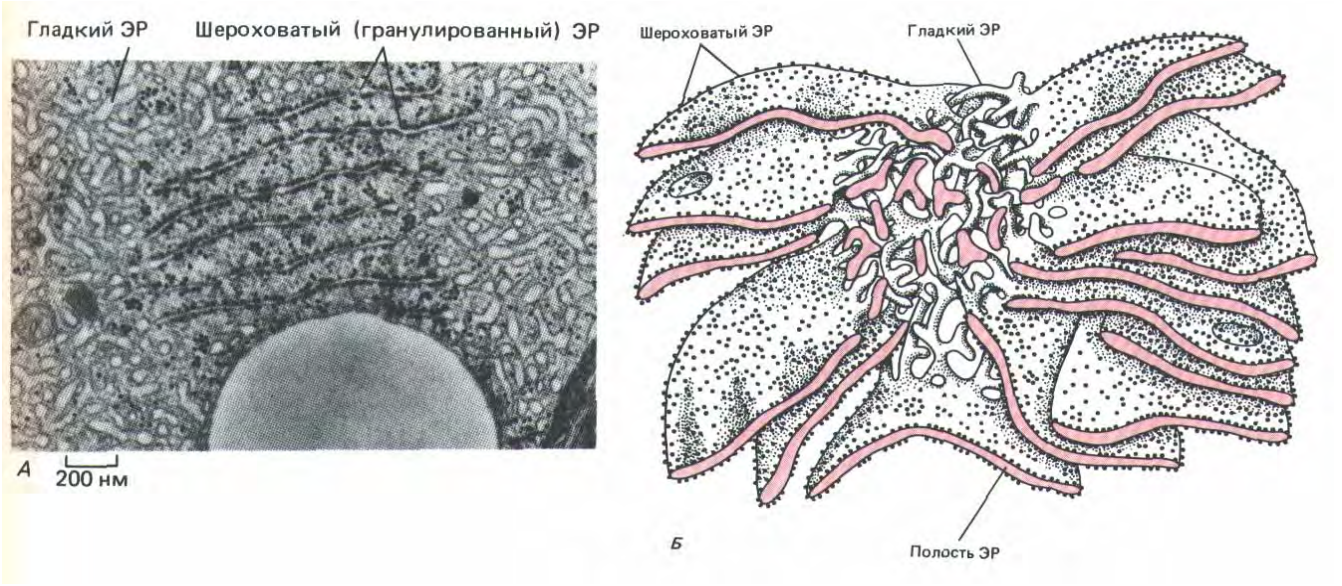


Рис. 8-37. *А.* Электронная микрофотография, на которой видны значительные различия в морфологии шероховатого и гладкого ЭР. Показанная здесь клетка Лейдига вырабатывает стероидные гормоны в семеннике и имеет поэтому необычно развитый гладкий ЭР. Видна также часть большой сферической липидной капли. *Б.* Трехмерная реконструкция участков гладкого и шероховатого ЭР в клетке печени. Шероховатый ЭР получил свое название из-за множества рибосом, расположенных на его цитоплазматической поверхности; он образует поляризованные стопки уплощенных цистерн, каждая из которых имеет просвет (полость) шириной от 20 до 30 нм. С этими цистернами соединены мембраны гладкого ЭР, который представляет собой сеть тонких трубочек диаметром от 30 до 60 нм. Считается, что мембрана ЭР непрерывна и ограничивает единую полость. *(А-с* любезного разрешения Daniel S. Friend; *Б-* по R. Krstic, Ultrastructure of the Mammalian Cell. New York: Springer-Verlag, 1979.)

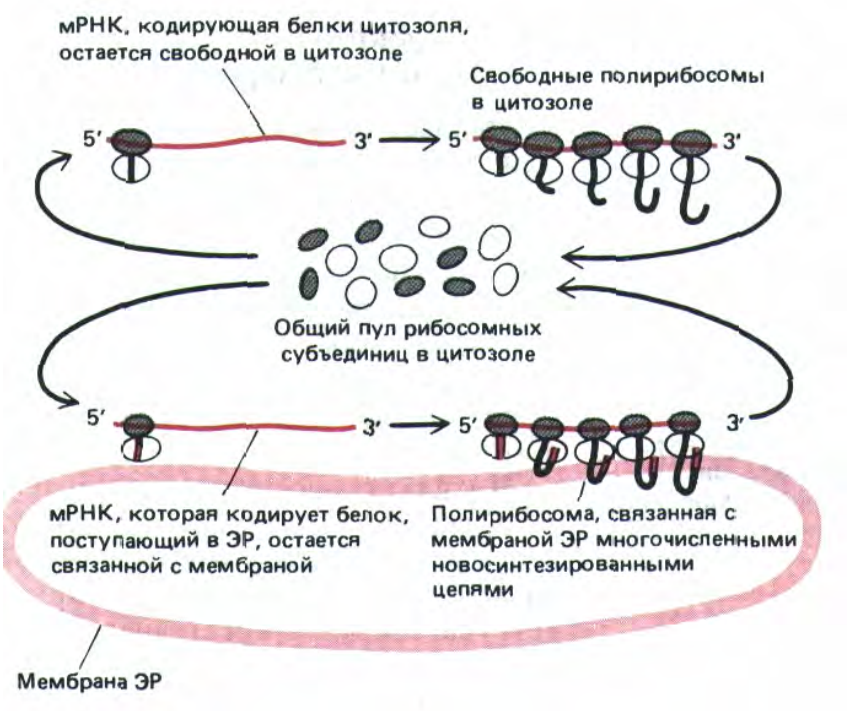


Рис. 8-38. Для синтеза белков цитозоля и белков, поступающих в ЭР, используются одни и те же рибосомы. Если на вновь синтезированной молекуле белка имеется сигнальный пептид, то он направляет связанную с этой молекулой рибосому к мембране ЭР. Молекула мРНК может все время оставаться связанной с мембраной ЭР, тогда как рибосомы, движущиеся вдоль нее, постоянно рециркулиру-ют; в конце каждого цикла белкового синтеза субъединицы рибосом освобождаются и возвращаются в общий пул рибосом в цитозоле.

сомы, связанные с такой молекулой мРНК, могут возвращаться в цито-золь, как только они закончат трансляцию вблизи ее 3'-конца. Сама мРНК, однако, стремится остаться связанной с мембраной ЭР через меняющуюся популяцию связанных с мембраной рибосом (рис. 8-38). Напротив, если мРНК кодирует белок, не имеющий сигнального пептида для ЭР, то образующаяся полирибосома остается в цитозоле и ее белковый продукт остается там же. Следовательно, с мембранами шероховатого ЭР связываются только те мРНК, которые кодируют белки, несущие сигнальные пептиды ЭР; те же молекулы мРНК, которые кодируют все остальные белки, остаются в цитозоле. Считают, что отдельные рибосомы случайным образом перемещаются между этими двумя различными популяциями молекул мРНК.

8.6.2. Некоторые специализированные клетки изобилуют гладким ЭР [33]

Участки ЭР, не несущие связанных рибосом, называются *гладким ЭР*. Как правило, если клетки и содержат настоящий гладкий ЭР, то в очень малых количествах; в действительности большинство областей ЭР частично являются гладкими, а частично-гранулярными. Их называют **промежуточным ЭР.** Именно от этих районов отшнуровываются транспортные пузырьки, переносящие вновь синтезированные белки в аппарат Гольджи (см. рис. 8-9). Однако существуют специализированные клетки, в которых гладкий ЭР хорошо развит и выполняет особые функции. В частности, **гладкий эндоплазматический ретикулум** преобладает в клетках, специализирующихся на метаболизме липидов. Например, клетки, синтезирующие стероидные гормоны из холестерола, имеют обширный гладкий ЭР, предназначенный для «расквартирования» ферментов, участвующих в синтезе холестерола и его преобразовании в гормоны (см. рис. 8-37,А).

Еще одним примером клеток, богатых гладким ЭР, являются *гепатоциты*. Это главное место, где образуются липопротеиновые частицы, предназначенные «на экспорт». Ферменты, синтезирующие липидные компоненты липопротеинов, локализованы на мембранах гладкого ЭР. На этих же мембранах расположены ферменты, катализирующие ряд реакций детоксикации, в результате которых обезвреживаются как лекарственные препараты, так и вредные соединения, образующиеся

в процессе метаболизма. Наиболее широко изучены реакции детоксикации, катализируемые ферментами семейства *цитохрома Р450.* Эти белки используют высокоэнергетические электроны, полученные от NADPH, для присоединения гидроксильных групп к любому из множества потенциально вредных водонерастворимых углеводородов, попадающих в бислой. Другие ферменты на мембране ЭР добавляют затем к этим гидроксильным группам отрицательно заряженные растворимые в воде молекулы (такие, как сульфат или глюкуроновая кислота). После нескольких подобных реакций тот нерастворимый в воде лекарственный препарат (или метаболит), который в противном случае мог бы накапливаться в клеточных мембранах, становится достаточно растворимым, чтобы покинуть клетку и выделиться с мочой. Поскольку один только шероховатый ЭР не может вместить все эти и другие необходимые ферменты, значительная часть мембран гепатоцита в норме представлена гладким ЭР (см. табл. 8-2).

Если в кровоток попадают большие количества некоторых соединений, таких, как фенобарбитал, то в печени в необычно больших количествах синтезируются ферменты детоксикации, и поверхность гладкого ЭР может за несколько дней удвоиться. После удаления лекарственного вещества избыток мембран гладкого ЭР разрушается с помощью лизо-сом (при участии особых образований, называемых *аутофагосомами* - см. разд. 8.8.3), и через 5 дней гладкий ЭР приобретает нормальный объем. Как регулируются все эти изменения, неизвестно.

Мышечные клетки имеют специализированную, подобную гладкому ЭР, органеллу, называемую *саркоплазматическим ретикулумом,* которая захватывает из цитозоля Ca^{2+}. Основной мембранный белок саркоплазматического ретикулума-Ca^{2+} -АТРаза, накачивающая внутрь ионы Ca^{2+}. Быстрое сокращение и расслабление миофибрилл в каждом цикле мышечного сокращения опосредуется высвобождением Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума и затем повторным захватом его из цитозоля. Захватывающие Ca^{2+} органеллы меньшего объема имеются в большинстве эукариотических клеток, где они высвобождают Ca^{2+} в цитозоль в ответ на внеклеточные сигналы. Раньше считалось, что они являются частью ЭР, но теперь кажется более вероятным, что это самостоятельный мембранный компартмент неизвестного происхождения.

Перейдем теперь к обсуждению двух основных функций ЭР: синтеза и модификации белков и синтеза липидов.

8.6.3. Гранулярные и гладкие области ЭР могут быть разделены центрифугированием [34]

Чтобы изучать функции и биохимию эндоплазматического ретикулума, необходимо сначала отделить его мембраны от других компонентов клетки. На первый взгляд эта задача кажется невыполнимой, поскольку ЭР как бы прослаивает все другие компоненты цитоплазмы (см. рис. 8-35). К счастью, когда ткани или клетки разрушают гомогенизацией, ЭР распадается на множество мелких («100 нм в диаметре) замкнутых пузырьков, называемых **микросомами,** которые относительно легко очистить.

Микросомы, полученные из гранулярного (шероховатого) ЭР, усеяны рибосомами и называются *шероховатыми микросомами.* Рибосомы всегда расположены на их *внешней* поверхности; это свидетельствует о том, что пространство внутри микросом с биохимической точки зрения эквивалентно полости ЭР (рис. 8-39). В таких гомогенатах обнаруживается также множество пузырьков, сходных по размерам с шероховатыми микросомами, но лишенных рибосом. Такие гладкие

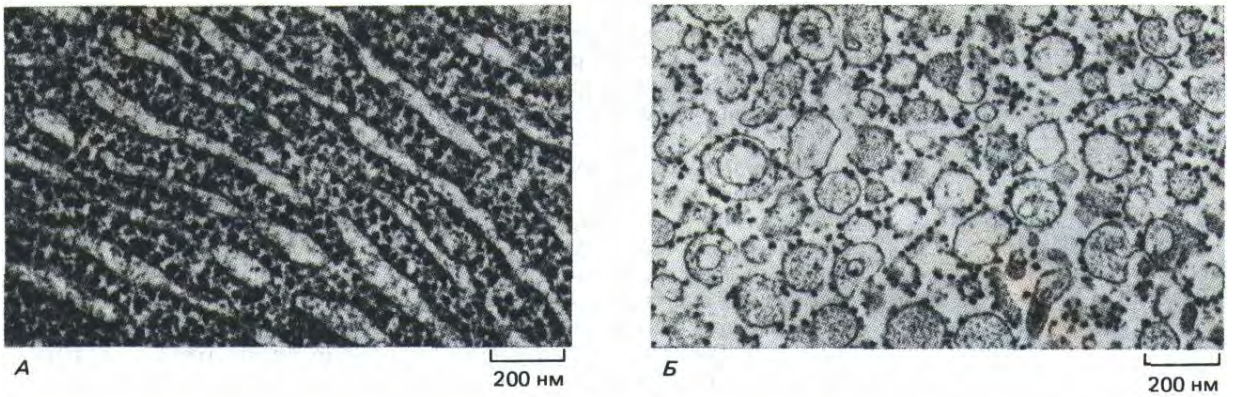


Рис. 8-39. Когда клетки разрушают гомогенизацией, цистерны шероховатого ЭР *(А)* распадаются на маленькие замкнутые пузырьки, называемые *шероховатыми микросомами* (Б). Сходным образом, гладкий ЭР распадается на маленькие пузырьки, лишенные рибосом и называемые *гладкими микросомами. (А*-электронная микрофотография любезно предоставлена Daniel S. Friend; электронная микрофотография любезно предоставлена George Palade.)

микросомы образуются частично из гладких участков ЭР, частично - из фрагментов плазматической мембраны, аппарата Гольджи, эндосом и митохондрий (соотношение их зависит от ткани, из которой получают фракцию микросом). Таким образом, если шероховатые микросомы можно отождествить с шероховатым ЭР, то происхождение гладких микросом нельзя установить с такой же легкостью. Исключением является печень. Так как в гепатоцитах содержится чрезвычайно много гладкого ЭР, источником большинства гладких микросом в гомогенатах печени служит гладкий ЭР.

Рибосомы, содержащие большое количество РНК, придают шероховатым микросомам большую плотность по сравнению с гладкими. Поэтому гладкие и шероховатые микросомы можно отделить друг от друга путем седиментации их смеси в градиенте плотности сахарозы (рис. 8-40). Если сравнить шероховатые и гладкие микросомы печени по таким параметрам как ферментативная активность или полипептидный состав, они окажутся чрезвычайно схожими (но не идентичными). Отсюда следует, что большинство компонентов мембраны ЭР может свободно перемещаться между ее гладкими и шероховатыми областями, чего и следовало ожидать, принимая во внимание текучесть и непрерывность мембранной системы.

Поскольку шероховатые микросомы легко поддаются очистке и сохраняют при этом свою функциональную активность, они исключительно полезны для изучения множества процессов, происходящих в ЭР.

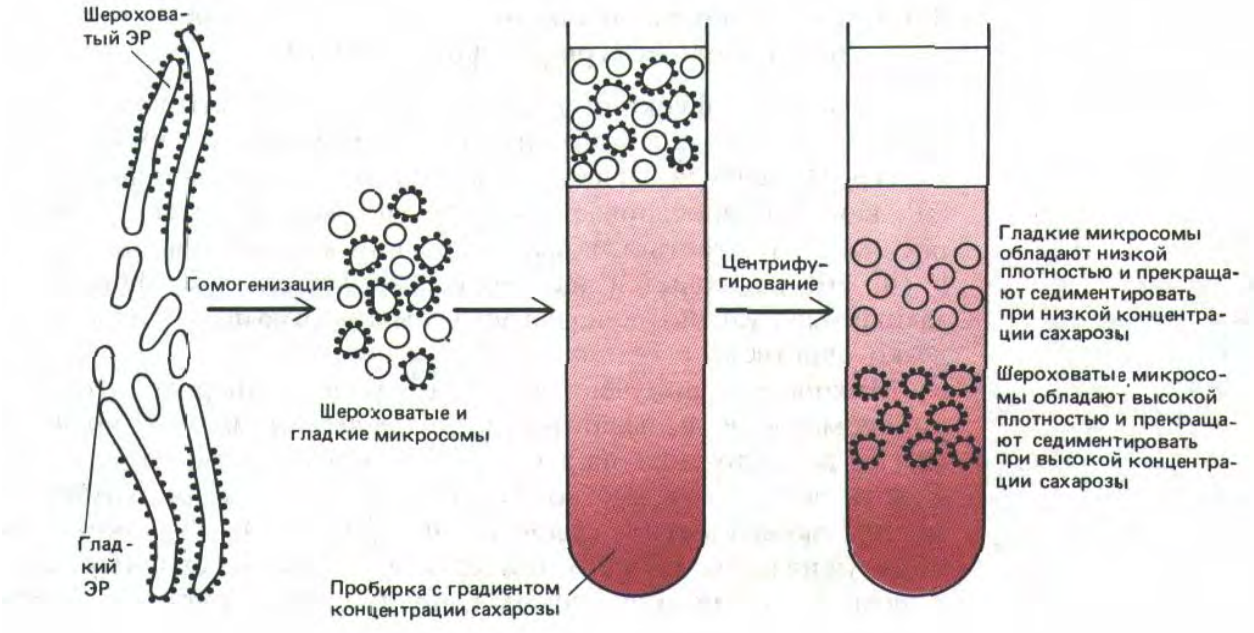


Рис. 8-40. Процедура, используемая для выделения шероховатых и гладких микросом из ЭР.

Эти органеллы топологически устроены таким же образом, как и шероховатый ЭР; их поверхность, обращенная в сторону цитоплазмы, легко доступна для ингредиентов, которые можно добавить in vitro. Для биохимика шероховатые микросомы есть не что иное, как уменьшенный вариант шероховатого эндоплазматического ретикулума, способный к синтезу белка, гликозилированию и синтезу липидов.

8.6.4. Гранулярные (шероховатые) участки ЭР содержат белки, ответственные за связывание рибосом [35]

Поскольку мембрана ЭР, как и все мембраны, представляет собой двумерную жидкость, большинство белков и липидов должно свободно распределяться в ней (при отсутствии специальных ограничений) между шероховатыми и гладкими участками. Тем не менее оказалось, что шероховатые микросомы, выделенные из печени, содержат более 20 белков, отсутствующих в гладких микросомах. Этот факт говорит о существовании определенных ограничивающих механизмов. Некоторые из таких «неравновесных» белков мембраны шероховатого ЭР

помогают связывать рибосомы, другие, вероятно, определяют ее уплощенную форму (см. рис. 8-37). Неясно, каким образом эти белки удерживаются в мембране: образуют ли они большие двумерные агрегаты или взаимодействуют с сетью структурных белков на той или другой поверхности мембраны ЭР (см. разд. 6.2.10).

Рибосомы шероховатого ЭР удерживаются на мембране частично благодаря растущим полипептидным цепям, продвигающимся сквозь мембрану по мере своего синтеза (см. ниже). Однако, если образование полипептидных цепей прерывается под действием какого-либо ингибитора (например, пуромицина), то рибосомы все равно остаются связанными с мембраной шероховатых микросом. Это сродство значительно повышается в растворах с низкими концентрациями солей. Если в таких условиях смешать очищенные рибосомы с мембранами шероховатых микросом, предварительно лишенными рибосом, то такие «ободранные» мембраны вновь приобретают то же количество рибосом, которое было на них после выделения из клеток. Участок связывания с мембраной находится на большой субъединице рибосомы, но до сих пор еще неясно, с каким из многочисленных белков мембраны шероховатого ЭР связывается рибосома. Установлено, однако, что для связывания рибосом с мембраной ЭР в физиологических условиях требуется дополнительное, более специфическое прикрепление, для которого необходим вновь созданный белок, несущий сигнальный пептид.

8.6.5. Впервые сигнальные пептиды были обнаружены в белках, попадающих в ЭР [36]

Сигнальные пептиды (и способ переноса белков с их помощью) были открыты в начале 70-х гг. при изучении секреторных белков, которые перед переносом в аппарат Гольджи и выведением из клетки, попадают в ЭР. Суть эксперимента заключалась в следующем: мРНК, кодирующую секреторный белок, транслировали в системе in vitro. Когда из этой бесклеточной системы исключали микросомы, синтезированный белок оказывался немного больше, чем нормальный секреторный продукт. Избыток длины можно было объяснить наличием N-концевого *лидерного пептида.* Однако в присутствии микросом, полученных из шероховатого эндоплазматического ретикулума, белок имел нормальный размер. Эти результаты были объяснены с помощью **сигнальной гипотезы.** Она постулирует, что лидерный участок служит сигнальным пептидом, который направляет секреторный белок к мембране ЭР и затем отре-

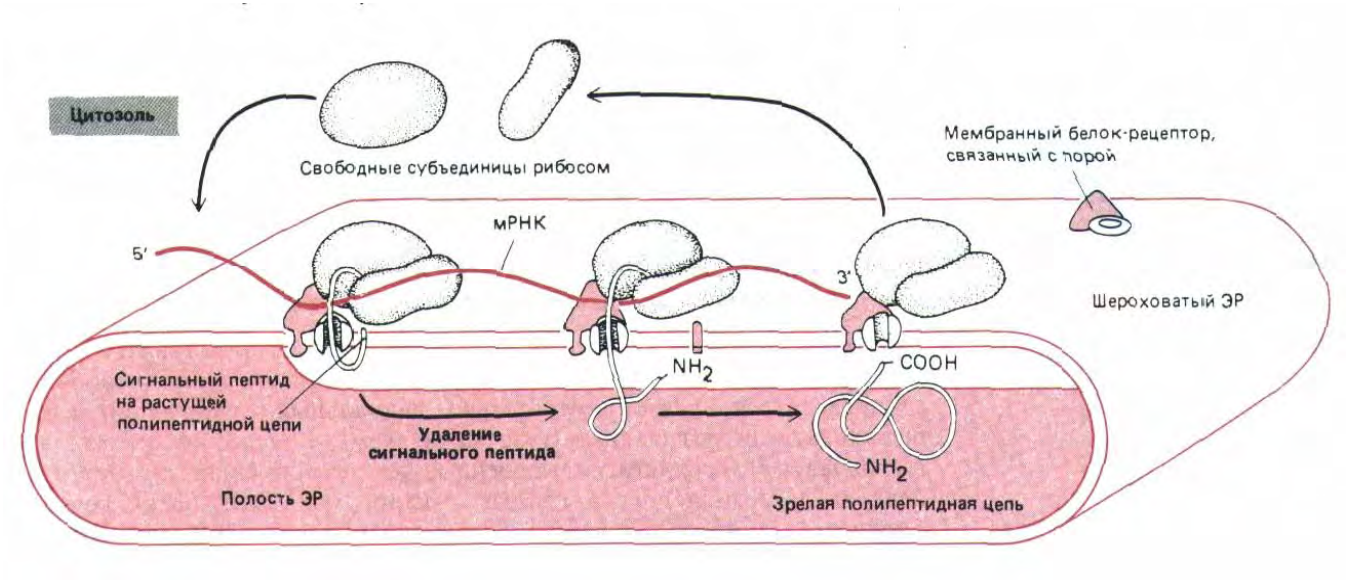


Рис. 8-41. Упрощенная схема переноса белков в ЭР, согласующаяся с исходной «сигнальной гипотезой». Как только на рибосоме синтезируется сигнальный пептид, он направляет рибосому к белку-рецептору на мембране ЭР. Считается, что по мере синтеза полипептидная цепь переносится через мембрану сквозь белковую пору, связанную с этим рецептором. В процессе трансляции сигнальный пептид отрезается, и сразу после синтеза в просвет ЭР высвобождается зрелый белок.

зается специальной протеазой на мембране ЭР еще до того, как полипептидная цепь будет синтезирована полностью (рис. 8-41).

В соответствии с сигнальной гипотезой секреторный белок в процессе его синтеза in vitro должен проникать в полость микросом. Чтобы убедиться в этом, применили протеазную обработку. Оказалось, что вновь синтезированный белок, образованный в отсутствие микросом, при добавлении протеазы деградирует. Тот же белок, синтезированный в присутствии микросом, остается интактным благодаря защите микросомной мембраны. Когда в бесклеточной системе транслировали белки, лишенные сигнального пептида, эти белки не попадали в микросомы и поэтому оставались чувствительными к протеазной обработке.

Сигнальная гипотеза была проверена и в генетических, и в биохимических экспериментах. Доказана ее справедливость и для растительных, и для животных клеток. Эта гипотеза подтверждается и для случая переноса белков через плазматическую мембрану прокариот. Более того, N-концевые лидерные пептиды были обнаружены не только у секреторных белков, но и у предшественников белков плазматической мембраны и лизосом, которые также переносятся с помощью ЭР. Как отмечалось ранее, сигнальная роль этих лидерных пептидов была напрямую продемонстрирована с использованием техники рекомбинантных ДНК при присоединении сигнальных последовательностей к белкам, в норме их лишенных; полученные гибридные белки направлялись в ЭР.

Бесклеточная система для переноса белков in vitro обеспечила мощную экспериментальную базу для изучения молекулярного механизма импорта белков в ЭР.

8-25

8.6.6. Частица, распознающая сигнал, направляет сигнальный пептид ЭР к специфическому рецептору в мембране ЭР [37]

В направлении сигнального пептида к мембране ЭР участвуют 1) частица, распознающая сигнал (a signal-recognition particle, SRP), связывающая сигнальный пептид, и ее рецептор, известный также как *стыкующий белок.* Частицы, распознающие сигнал, были открыты в ходе экспериментов, которые показали, что отмывка микросом в растворах солей уничтожает их способность импортировать секреторные белки. Эту способность можно восстановить, добавляя супернатант, содержащий солевой экстракт. Впоследствии «фактор переноса» был выделен. Он

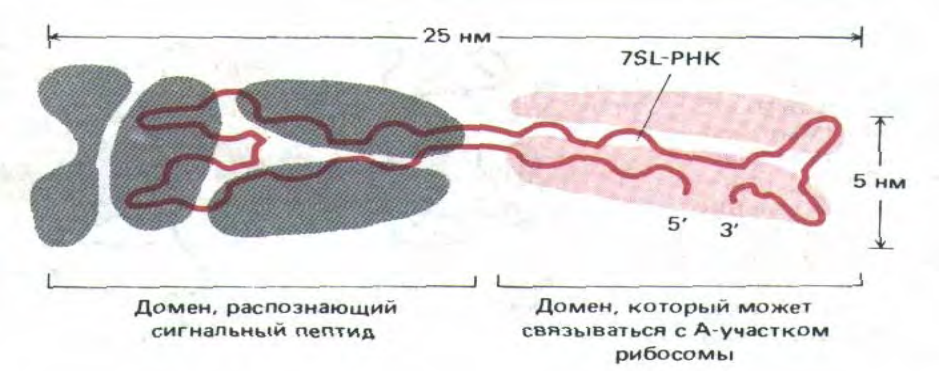


Рис. 8-42. Сильно упрощенная схема частицы, распознающей сигнал (SRP). Она представляет собой вытянутый комплекс, состоящий из шести полипептидных цепей *(закрашенные участки)* и одной молекулы 7SL-РНК. Один конец этой частицы связывается с рибосомой, а другой-с сигнальным пептидом вновь синтезированной полипеп-тидной цепи. Было сделано предположение, что часть 7SL-РНК может сворачиваться в тРНК-подобную структуру, которая конкурирует в А-участке рибосомы с поступающими аминоацил-тРНК, вызывая, таким образом, паузу в трансляции. (По V. Stegel и P. Walter, Nature 320: W-84, 1986.)

оказался сложной частицей, состоящей из шести различных полипептидных цепей, связанных с одной молекулой 7SL-РНК (рис. 8-42).

Частица, распознающая сигнал, связывается с сигнальным пептидом, как только он «сходит» с рибосомы. Это приводит к временной остановке синтеза белка, а иногда полностью прерывает его. Возникшая пауза в трансляции, вероятно, дает возможность рибосоме связаться с мембраной ЭР до того, как синтез полипептидной цепи будет завершен. Благодаря этому ненужного высвобождения белка в цитозоль не происходит.

SRP состоит из двух групп белков, соединенных единым РНК-каркасом (см. рис. 8-42). В соответствии с одной из моделей, эта частица плотно захватывает рибосому, присоединяясь и к сигнальному пептиду (как только он появляется на большой субъединице рибосомы), и к ри-босомному участку связывания аминоацил-тРНК. В результате трансляция останавливается, поскольку блокируется связывание следующей аминоацил-тРНК с рибосомой (рис. 8-43).

Пауза в трансляции длится до тех пор, пока захватившая рибосому частица не свяжется с SRP-рецептором, находящимся на цитоплазматической стороне мембраны шероховатого ЭР. Рецептор, как и сама частица, был вначале идентифицирован in vitro как необходимый компонент для переноса белка в ЭР. Теперь известно, что это интегральный мембранный белок, состоящий из двух цепей. Он взаимодействует с SRP-связанными рибосомами таким образом, что частица меняет свое положение и трансляция возобновляется. Одновременно рибосома связывается с мембраной ЭР, и растущая на ней полипептидная цепь переносится к системе транслокации в мембране. Эта система изучена

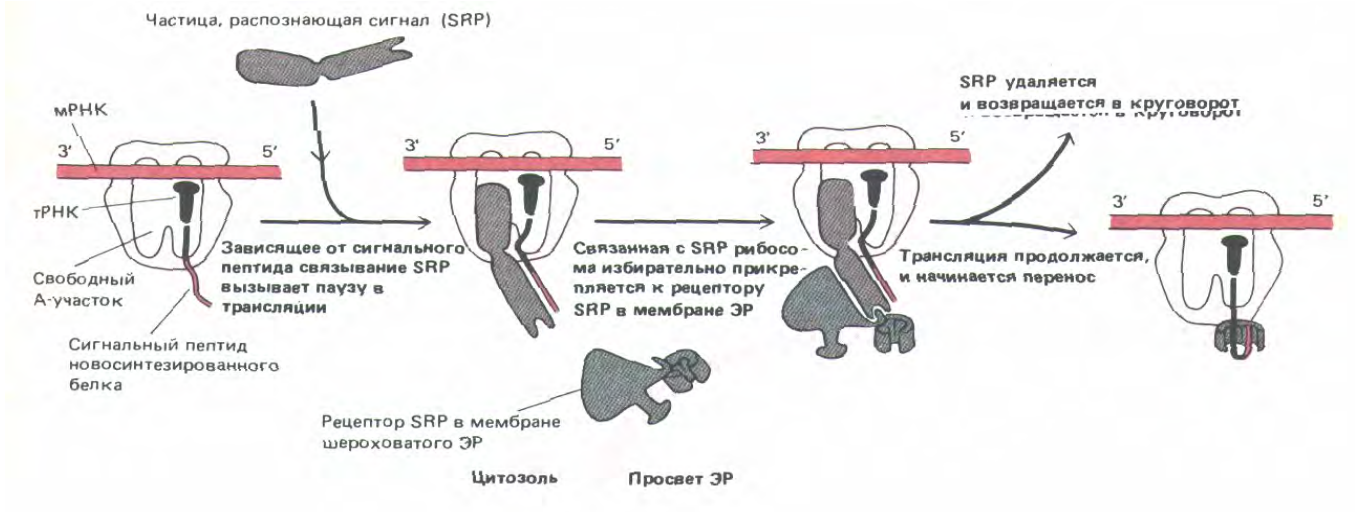


Рис. 8-43. Полагают, что частица, распознающая сигнал, и белок-рецептор SRP действуют согласованно, направляя в ЭР белок с сигнальным пептидом ЭР. SRP связывается с экспонированным сигнальным пептидом и с рибосомой, возможно закрывая А-участок. Поскольку поступление очередной аминоацил-тРНК блокируется, трансляция прерывается. Рецептор SRP в мембране ЭР связывает комплекс SRP-рибосома; затем, в процессе сложной и плохо изученной реакции, SRP удаляется, и трансляция возобновляется, теперь уже на рибосоме, расположенной на мембране ЭР. Для механизма, с помощью которого полипептидная цепь исходно встраивается в мембрану, необходим еще отдельный трансмембранный белок, который связывается с сигнальным пептидом (рецептор сигнального пептида), а также другие белковые компоненты, вовлеченные в перенос и пока как следует не охарактеризованные.

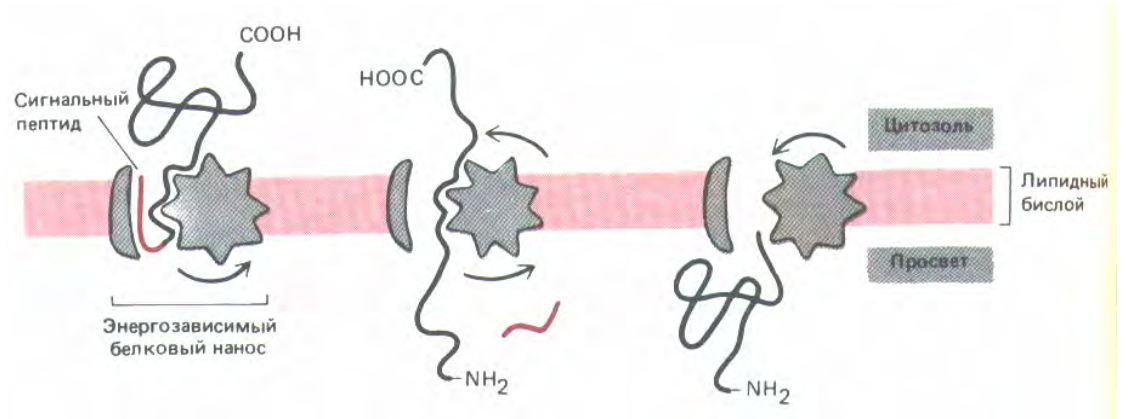


Рис. 8-44. Одно из представлений о транспорте белка через мембрану. После того, как рецептор распознает N-концевой сигнальный пептид, активируется энергозависимый белковый насос, который проталкивает весь белок сквозь мембрану; при этом полипептидная цепь временно разворачивается. Альтернативная возможность состоит в том, что разворачивание белка происходит с цитозольной стороны мембраны и является АТР-зависимым, а белок направляется сквозь мембрану только за счет энергии, высвобождаемой при обратном сворачивании.

плохо, известно только, что она включает белок-рецептор второго сигнального пептида, отличающийся от SRP (см. рис. 8-43). По-видимому, ее роль заключается в связывании рибосомы, на которой синтезировался сигнальный пептид ЭР, с мембраной ЭР; участвует она и в последующем переносе белка через мембрану.

8-26

8.6.7. При переносе через мембрану ЭР не всегда продолжается удлинение полипептидной цепи [38]

Выше шла речь о том, что перенос белков в митохондрии, хлоропласти и пероксисомы происходит после трансляции *(посттрансляционно),* когда белок синтезирован и поступил в цитозоль, между тем перенос через мембрану ЭР протекает одновременно с трансляцией *(котрансляционно).* Именно поэтому рибосомы связываются с мембраной ЭР, а не с цитоплазматической поверхностью других органелл. В течение многих лет считалось, что рибосомы шероховатого ЭР могут использовать энергию, освобождающуюся при синтезе белка, для «протаскивания» растущих полипептидных цепей сквозь мембрану ЭР. Однако последние исследования in vitro показали, что предшественники некоторых белков могут поступать в ЭР уже после того, как их синтез закончен. Этот перенос требует гидролиза АТР, но не продолжения синтеза белка (рис. 8-44). Считается, что, как и при переносе в митохондрии, гидролиз АТР необходим для разворачивания белка при прохождении его через мембрану. Об этом свидетельствуют как генетические, так и биохимические эксперименты на дрожжах.

Большинство белков-предшественников не могут проникнуть в ЭР, если они синтезировались в другом месте. Либо они сворачиваются таким образом, что маскируется сигнальный пептид, либо аппарат переноса на ЭР оказывается неспособным развернуть данный белок. Возможно, котрансляционный перенос позволяет этим белкам созревать без свертывания их молекулы, что характерно для белков, переносимых в другие органеллы.

8-27

8.6.8. Различные пространственные структуры трансмембранных белков могут определяться комбинациями пептидов, детерминирующих начало и конец переноса [39]

Большинство сигнальных пептидов удаляется специальной сигнальной пептидазой, связанной с мембраной ЭР. Однако само по себе присутствие сигнального пептида еще недостаточно для работы этой пептидазы: необходимо наличие по-соседству сайта разрезания, который не требуется для переноса. Показано, что у некоторых белков сигнальные

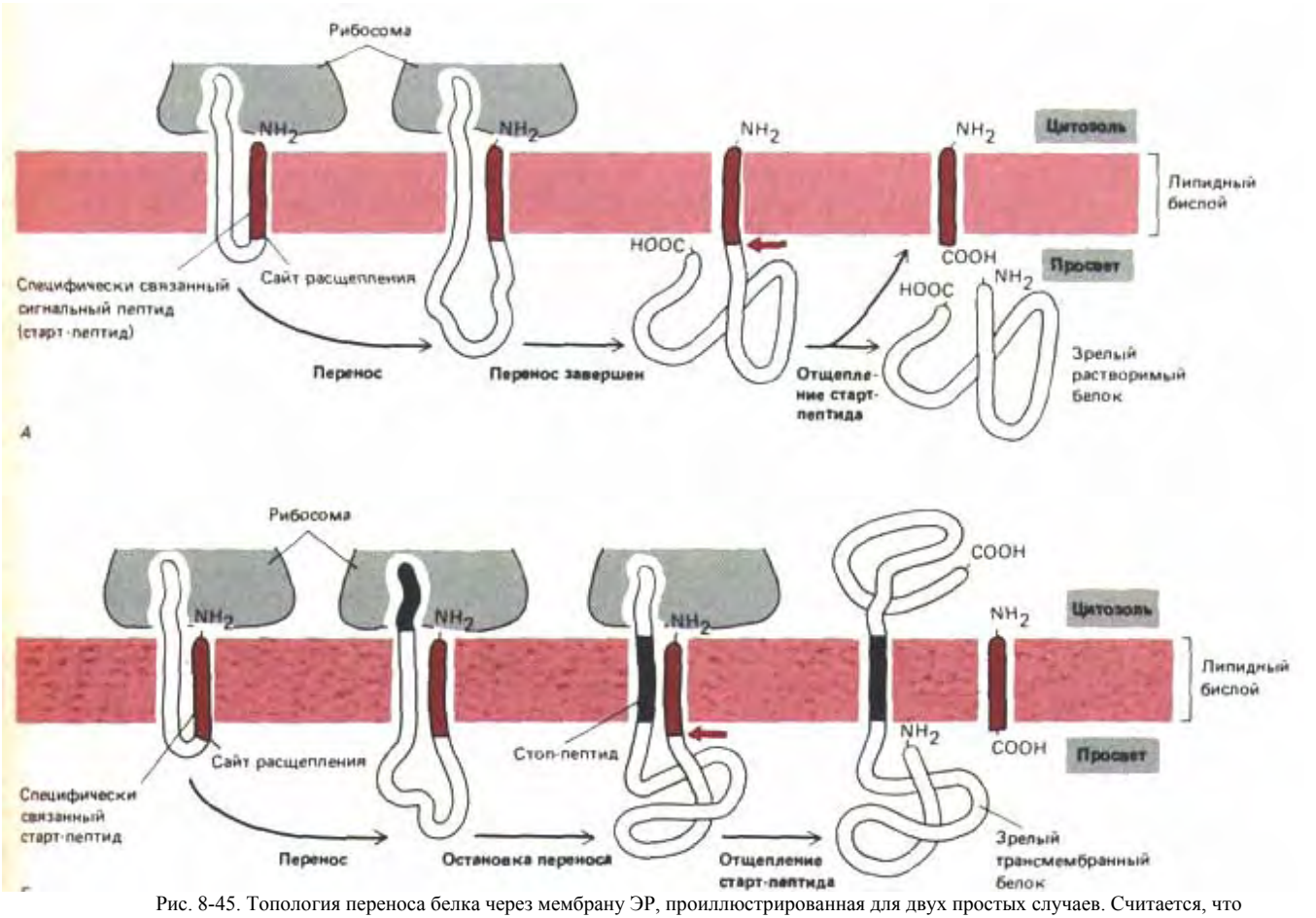


Рис. 8-45. Топология переноса белка через мембрану ЭР, проиллюстрированная для двух простых случаев. Считается, что промежуточный продукт переноса содержит петлю полипептидной цепи, в которой сигнальный пептид (называемый также сигналом начала переноса) формирует половину вертикального участка петли, а вторая половина в каждый данный момент образована переносимым участком полипептида. В случае, когда имеется только старт-пептид, а стоп-пептид отсутствует, полипептид переносится через мембрану целиком, и после отрезания стартового пептида в просвет (полость) ЭР высвобождается зрелый растворимый белок *(А)*. Если имеется один старт-пептид и один стоп-пептид, перенос прекращается, когда стоп-пептид достигнет вертикального участка петли, в то время как синтез белка с цитозольнои стороны мембраны продолжается; после отрезания сигнала начала переноса зрелый белок остается в мембране, он пронизывает липидный бислой ЭР, и с каждой стороны мембраны выступает по домену *(Б)*.

пептиды расположены внутри полипептидной цепи и никогда не вырезаются.

Полагают, что неудаленные сигнальные пептиды играют важную роль в реализации различных способов встраивания в мембрану, обнаруженных у трансмембранных белков. Все эти способы можно рассматривать как варианты той последовательности событий, в результате которой растворимый белок переносится в полость ЭР. В соответствии с современными представлениями, гидрофобный сигнальный пептид растворимого белка, кроме прочих функций, служит **сигналом начала переноса** и остается погруженным в мембрану все то время, пока остальная часть молекулы белка протаскивается сквозь нее в виде большой петли (рис. 8-45, *А*). Когда через мембрану проходит карбоксильный конец молекулы, белок остается связанным с ней только сигнальным пептидом. Следовательно, если этот пептид отрезается, белок высвобождается в полость ЭР.

Для мембранных белков ситуация сложнее, поскольку часть их полипептидной цепи переносится через мембрану, а часть - нет. В простейшем случае такой белок переносится таким же способом, какой только что был описан для растворимых белков (кроме того, что его сигнальный пептид не несет участка разрезания и поэтому не удаляется сигнальной пептидазой). В результате белок становится трансмембранным, пронизывающим мембрану один раз. В мембрану погружен N-конец, на котором сигнальный пептид образует сегмент из 20-30 гидрофобных аминокислот, находящийся в форме α-спирали (см. рис. 8-48,А).

Для трансмембранных белков, пересекающих мембрану один раз,

(однопроходные белки) и имеющих в просвете ЭР не С-конец, а N-конец, необходим более сложный механизм переноса. Известно, что у этих белков перенос также инициируется N-концевым сигнальным пептидом, но в молекуле присутствует дополнительный гидрофобный сегмент, останавливающий процесс до того, как вся полипептидная цепь пройдет через мембрану. В таких белках именно этот **сигнал конца переноса** удерживает белок в мембране, а сигнал начала переноса отрезается (рис. 8-45, Б).

Известно множество белков, полипептидная цепь которых пронизывает липидный бислой несколько раз в противоположных направлениях (многопроходные белки). Полагают, что в таких белках внутренний сигнальный пептид служит сигналом начала переноса, который длится до следующего сигнала остановки. Таким образом, основной единицей при транслокации является полипептидная петля между двумя гидрофобными сегментами (одним пептидом начала переноса и одним останавливающим пептидом). Оба этих сегмента в зрелом белке представляют собой α-спиральные мембраносвязанные домены. Гипотетический механизм, с помощью которого может происходить встраивание такой петли в мембрану, представлен на рис. 8-46. Для сложного трансмембранного белка, у которого липидный бислой пронизывает много гидрофобных сс-спиралей, транслокация должна вновь запускаться вторым стартовым пептидом и продолжаться до тех пор, пока следующий стоп-пептид не прервет ее, и так далее для последующих старт- и стоп-пептидов (см. рис. 8-48, *Г),*

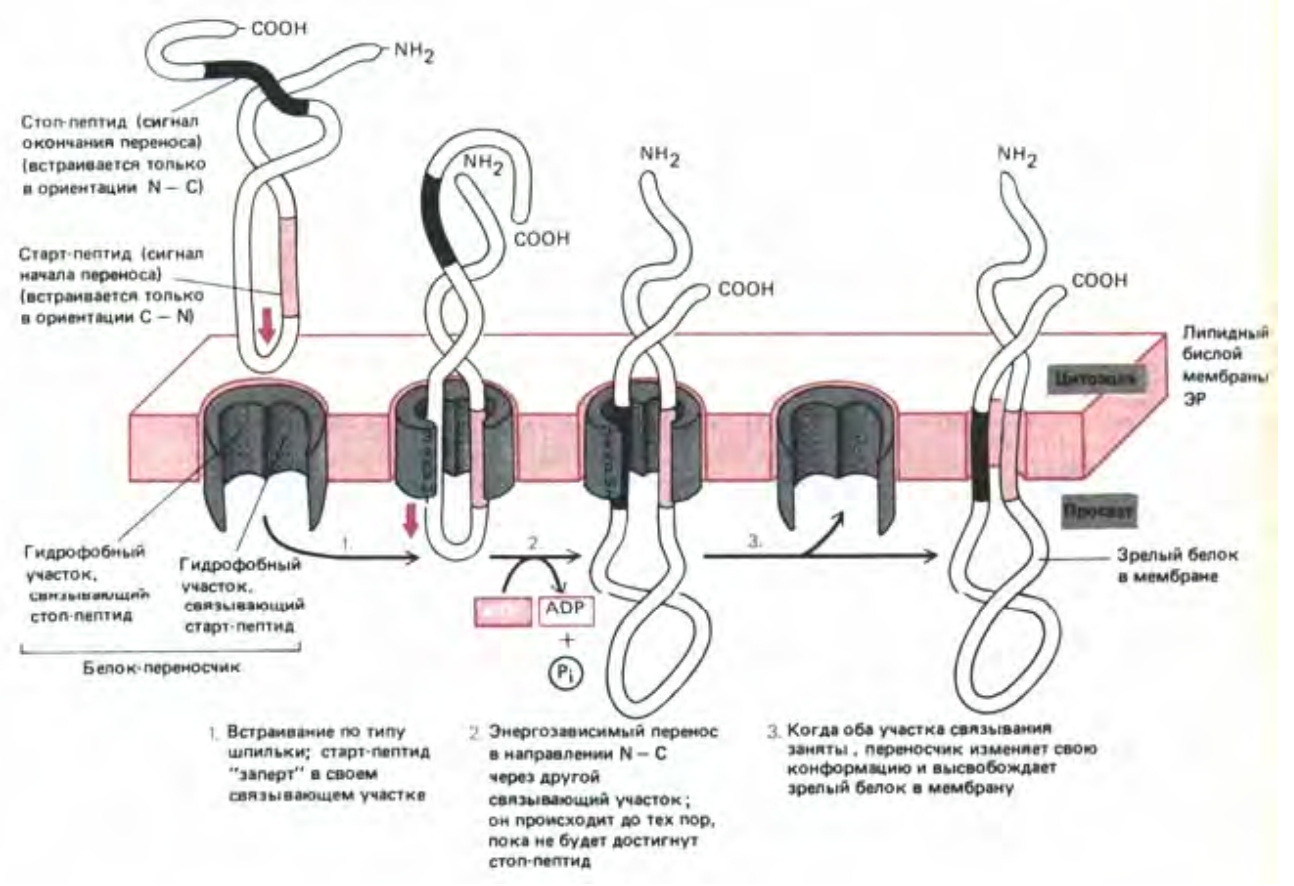


Рис. 8-46. Гипотетическая модель встраивания внутренней петли полипептидной цепи в липидный бислой ЭР. Считают, что белок-переносчик может находиться в двух конформациях, «закрытой» и «открытой». Связывая сигнальный пептид начала переноса, он переходит в закрытое состояние и начинает работать как переносчик. Но как только к его участку связывания подходит сигнальный стоп-пептид, он вновь переключается на неактивную, открытую конформацию и отделяется от белка.

8-28

8.6.9. Общую конформацию трансмембранного белка можно предсказать по положению его гидрофобных аминокислот [40]

Обычно пептиды, останавливающие перенос белка через мембрану, более гидрофобны, чем стартовые пептиды, однако, если изменить их положение в белке, иногда они могут выполнять роль старт-сигналов. Отсюда следует, что различие между гидрофобными старт- и стоп-пептидами отчасти определяется местом их расположения в полипептиднои цепи. По-видимому, существует механизм, анализирующий развернутую полипептидную цепь на наличие гидрофобных сегментов в том же направлении, в котором синтезируется белок (от NH_2- к COOH-концу). Частица, распознающая сигнал, выявляет первый подходящий сегмент и тем самым устанавливает «рамку считывания». Участок полипептиднои цепи между этим старт-сегментом и следующим за ним стоп-сигналом переноса протаскивается сквозь мембрану (см. рис. 8-46). По-видимому, процесс переноса продолжается до тех пор, пока все гидрофобные участки не встроятся в мембрану.

Такой механизм встраивания в мембрану означает, что топография мембранного белка может быть предсказана по его аминокислотной последовательности. Для этого выявляют участки длиной 20-30 аминокислотных остатков с высокой степенью гидрофобности. Они достаточно длинны, чтобы пронизывать мембрану в виде α-спирали, и для их идентификации можно исследовать профиль гидрофобности (рис. 8-47). На рис. 8-48 представлено четыре варианта топологии белка, реконструированной на основе приведенного анализа.

Мембранные белки всегда встраиваются в ЭР со стороны, обращенной к цитозолю. В результате мембрана ЭР оказывается асимметричной: белковые домены, расположенные с одной ее стороны, отличаются от доменов, расположенных с другой стороны. Эта асимметрия сохраняется при многочисленных отпочковываниях и слияниях мембран, с помощью которых белки, синтезированные на ЭР, доставляются к другим клеточным мембранам (см. рис. 8-10).

Когда белки отделяют от мембраны и заключают в искусственные липидные пузырьки, часть из них оказывается в правильной ориентации, а часть в обратной. Поэтому считают, что асимметрия белков, наблюдаемая в клеточных мембранах, целиком обусловлена процессом встраивания белков в мембрану ЭР.

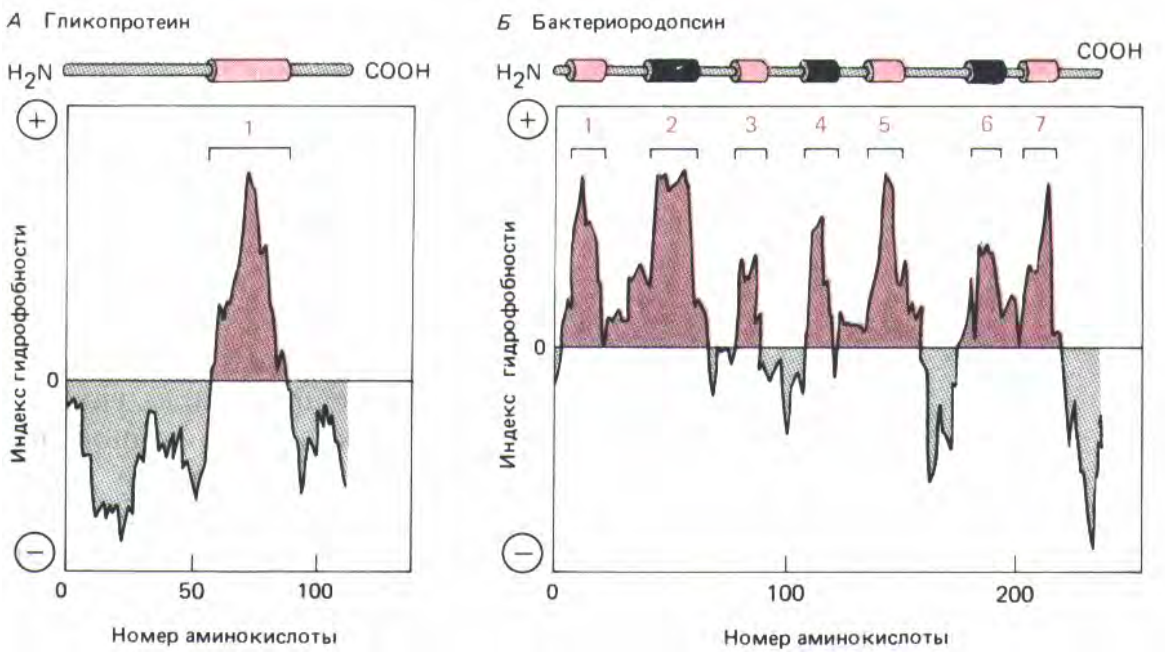


Рис. 8-47. Локализация потенциально гидрофобных (трансмембранных) сегментов полипептиднои цепи с помощью профилей гидрофобности. Свободная энергия, необходимая для переноса последовательных сегментов полипептиднои цепи из неполярного растворителя в воду, рассчитывается по аминокислотному составу с использованием данных по модельным соединениям. Такой расчет делается для сегментов фиксированного размера (обычно около 10 аминокислотных остатков), начиная с каждой последующей аминокислоты в цепи. «Индекс гидрофобности» данного сегмента откладывается по оси Y как функция от его положения в цепи. Положительные значения соответствуют случаю, когда для переноса в воду требуется свободная энергия (т. е. данный сегмент является гидрофобным), а величина пика соответствует количеству требуемой энергии. Пики индекса гидрофобности показывают положение гидрофобных сегментов в аминокислотной последовательности. Здесь приведены два примера: гликофорин имеет единственный трансмембранный гидрофобный домен и один соответствующий ему пик на профиле гидрофобности *(А);* бактериородопсин содержит семь трансмембранных спиральных участков, которым соответствуют семь пиков на профиле гидрофобности (Б) (С изменениями по D. Eisenberg, Ann. Rev. Biochem. 53: 595-624, 1984.)

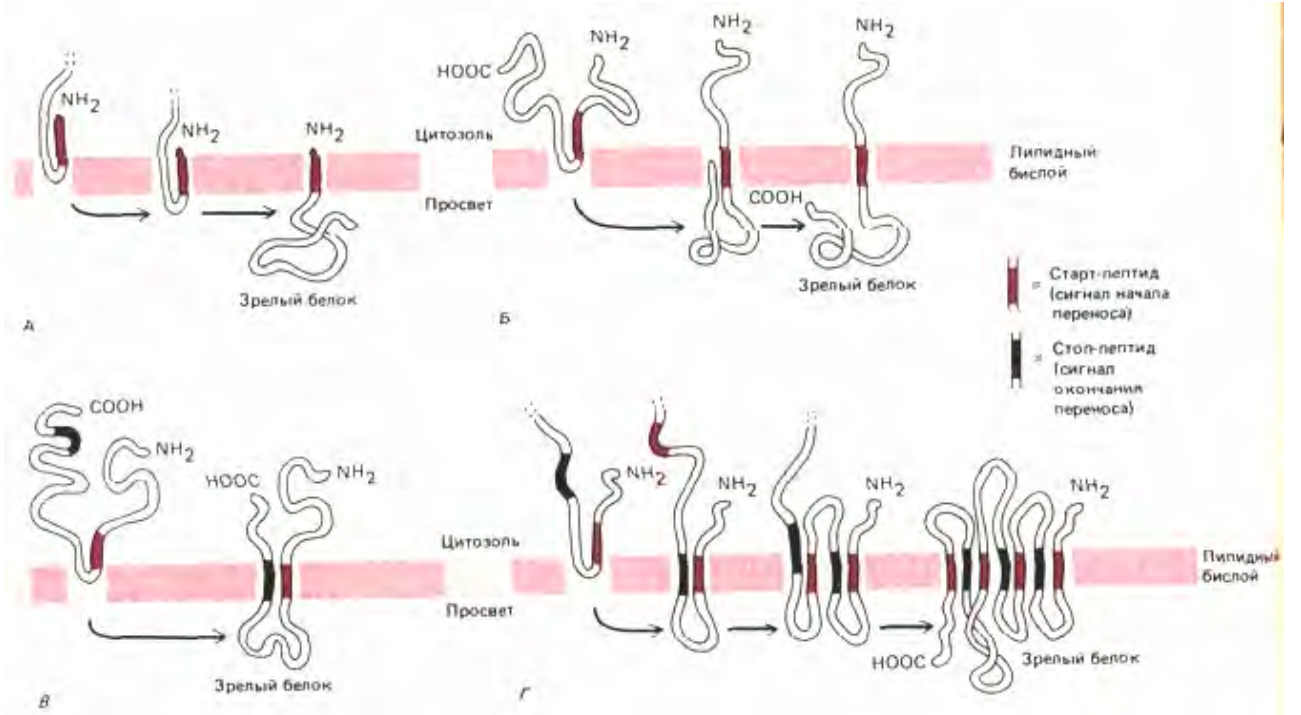


Рис. 8-48. Топология мембранного белка определяется чередованием сигнальных стоп- и старт-псптидов. Во всех приведенных примерах сигнальный пептид не отрезается. Гипотетический белок-переносчик, вероятно, функционирует по схеме, изображенной ранее на рис. 8-46. *А.* Когда N-концевой сигнальный пептид не удаляется, а стоп-пептид отсутствует, получается мембранный белок с единственным С-концевым доменом, обращенным в просвет ЭР. *Б.* Когда сигнальный пептид расположен внутри цепи, образуется белок с N-концевым цитоплазматическим доменом и С-концевым доменом, обращенным в просвет ЭР. *Б.* Когда за внутренним сигнальным пептидом следует стоп-пептид, то получается мембранный белок с тремя отдельными выступающими из мембраны доменами. *Г.* Мембранный белок, который пронизывает бислой множество раз, может быть образован путем простого удлинения того же самого процесса, включающего чередование сигнальных пептидов и стоп-пептидов, прерывающих перенос белка через мембрану.

8.6.10. Перенесенные в полость ЭР белки сворачиваются вновь [41]

Сворачивание полипептидных цепей в пространстве ЭР представляет собой особую проблему; с ней не сталкиваются белки, сворачивающиеся в цитозоле. Пространство ЭР заполнено непостоянными для этого компартмента сворачивающимися белками, тогда как в цитозоле в основном присутствуют постоянные для него свернувшиеся белки. Когда белок свернут, он имеет гидрофобную сердцевину (см. разд. 3.3.1), но, пока этого не произошло, гидрофобные остатки, из которых состоит сердцевина, обращены к водной фазе. Если в растворе присутствуют даже в низкой концентрации несвернутые полипептидные цепи, они имеют тенденцию агрегировать друг с другом и с другими белками; образовавшиеся агрегаты выпадают в осадок. Вполне возможно, что в такой сложной смеси несвернутых белков, которая имеется в полости ЭР, будут образовываться аморфные и гетерогенные преципитаты.

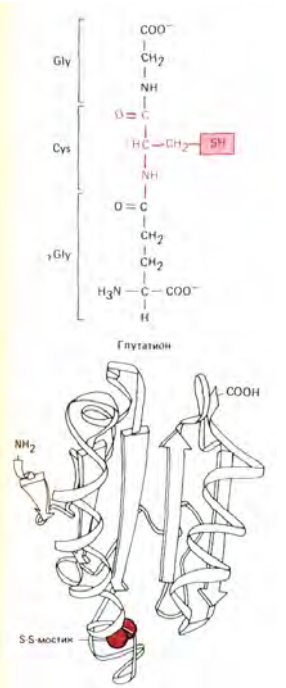


Рис. 8-49. Так как восстанавливающие агенты, такие, как трипептид *глутатион* и маленький белок *тиоредоксин,* присутствуют в высоких концентрациях в цитозоле и отсутствуют в просвете таких органелл, как ЭР, дисульфидные связи могут образовываться в просвете ЭР, но не в цитозоле. Глутатион и тиоредоксин сохраняются в цитозоле в сильно восстановленной форме при помощи ферментов, которые переносят электроны от NADPH, превращая образующиеся дисульфидные связи в цистеины. Представленная здесь трехмерная структура тиоредоксина *E. coli* была определена в ходе рентгено-структурного анализа. Она содержит два близко расположенных цистеина, показанных здесь связанными дисульфидной связью.

Известно, что время, которое белок проводит в ЭР перед тем, как попасть в аппарат Гольджи, сильно варьирует. Вероятно, эти различия в большой степени зависят от того, как долго данный белок отделяется от преципитата (переходит в растворимое состояние) и свертывается.

В полости ЭР содержится большое количество **связывающего белка** (BiP), который, по-видимому, узнает неправильно свернутые белки, связываясь с их наружными гидрофобными участками. На карбоксильном конце молекулы BiP имеется сигнальный пептид из четырех аминокислот, благодаря которому белок остается в ЭР (см. табл. 8-3). Существует гипотеза, согласно которой BIP способствует тому, что неправильно свернутые белки остаются в ЭР (и, следовательно, не попадают в аппарат Гольджи). Возможно, также, что BiP является одним из катализаторов сворачивания белков. Показано, что этот белок связывает ATP и структурно родствен белкам теплового шока, которые участвуют в импорте белков.

8.6.11. Дисульфидизомераза способствует образованию в полости ЭР правильных дисульфидных связей [42]

В цитозоле содержится смесь восстанавливающих агентов, содержащих SH-группы. Эти вещества предотвращают образование —S—S-мостиков (дисульфидных связей), поддерживая остатки цистеина в цитозоль-ных белках в восстановленной (—SH) форме (рис. 8-49). В полости ЭР таких восстанавливающих агентов нет, и поэтому —S—S-мостики там образуются. При обилии сворачивающихся белков этот процесс, по-видимому, иногда идет неправильно. В полости ЭР имеется фермент, помогающий исправлять такие ошибки. **Дисульфидизомераза -** это белок, который в большом количестве содержится в полости ЭР и прикреплен к внутренней стороне его мембраны. Он имеет тот же сигнал удержания в ЭР, что и BiP. Механизм действия дисульфидизомеразы состоит в том, что разрезая S—S-связи, она дает белку возможность быстро поменять множество конформаций, пока не будет достигнута конформация с наименьшей общей свободной энергией (рис. 8.50). На этом этапе вновь синтезированный белок сворачивается правильно. Правильная конформация может быть выбрана и случайно, но Дисульфидизомераза значительно ускоряет процесс поиска.

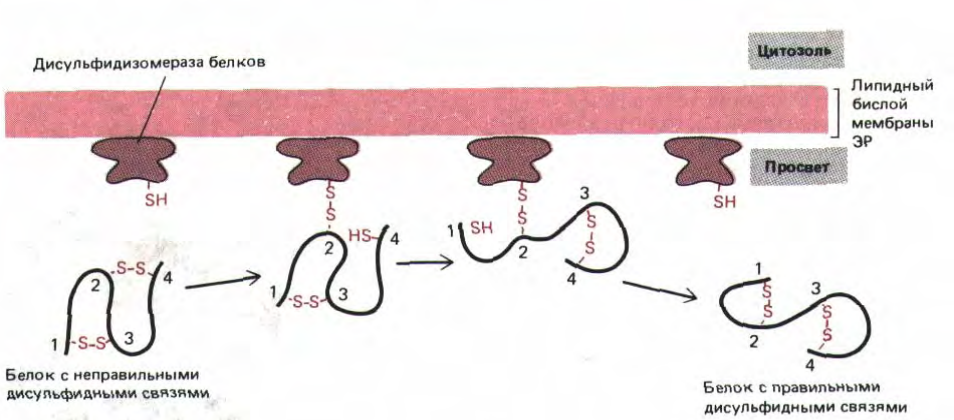


Рис. 8-50. В просвете ЭР фермент *дисулъфидизомераза белков* многократно разрезает -S-S-связи внутри полипептидной цепи, до тех пор, пока не будет достигнуто их расположение, обладающее минимальной общей свободной энергией. В этих условиях белок сворачивается правильно. Таким образом фермент облегчает сворачивание вновь синтезированных белков, которые попадают в ЭР.

8.6.12. Большинство белков, синтезированных в шероховатом ЭР, гликозилированы с помощью N-связанного олигосахарида [43]

Одна из главных функций ЭР - ковалентное присоединение Сахаров к белкам. Большинство белков, поступивших в полость ЭР, перед тем, как попасть в аппарат Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану или внеклеточное пространство, становятся гликопротеинами (рис. 8-51). Напротив, в цитозоле очень немногие белки гликозилированы, а те, которые гликозилированы, несут различные модификации Сахаров (см, разд. 8.2.2).

Весьма существенным для понимания процесса гликозилирования белков было открытие того факта, что к белкам в ЭР присоединяется всего лишь один олигосахарид, состоящий из N-ацетилгликозамина, маннозы и глюкозы и содержащий всего 14 остатков. Так как этот олигосахарид всегда присоединяется к NH_2-группе боковой цепи остатка аспарагина, его называют N-связанным или аспарагин-связанным (рис. 8-52). Присоединение катализируется связанным с мембраной ферментом, активный центр которого обращен в полость ЭР. Это объясняет, почему белки цитозоля не гликозилируются таким способом, Заранее сформированный предшественник олигосахарида переносится целиком к нужному остатку аспарагина. Это одностадийная реакция, и она происходит практически сразу после того, как остаток аспарагина появится в полости ЭР в процессе переноса белка через мембрану (рис. 8-53). Поскольку большинство белков импортируется в ЭР котрансляционно, N-связанный олигосахарид почти всегда добавляется в процессе синтеза белка, что обеспечивает наилучший доступ к нужным остаткам аспарагина. Сигналами для N-гликозилирования служат две последовательности Asn-X-Ser или Asn-X-Thr (где X - любая аминокислота, кроме пролина). Они встречаются а гликопротеинах гораздо реже, чем в негликозилированных белках цитозоля. Очевидно, что давление отбора было направлено против этих последовательностей, возможно потому, что гликозилирование в слишком многих участках могло бы помешать сворачиванию белка.

Один осахарид-предшественник удерживается в мембране ЭР молекулой специального липида-долихола. Олигосахарид связан с долихолом высокоэнергетической фосфатной связью, обеспечивающей энергию активации для реакции гликозилирования. Прежде чем присоединиться к белку, олигосахарид строится из моносахаридов на этой связанной с мембраной молекуле липида. Вначале сахара активируются

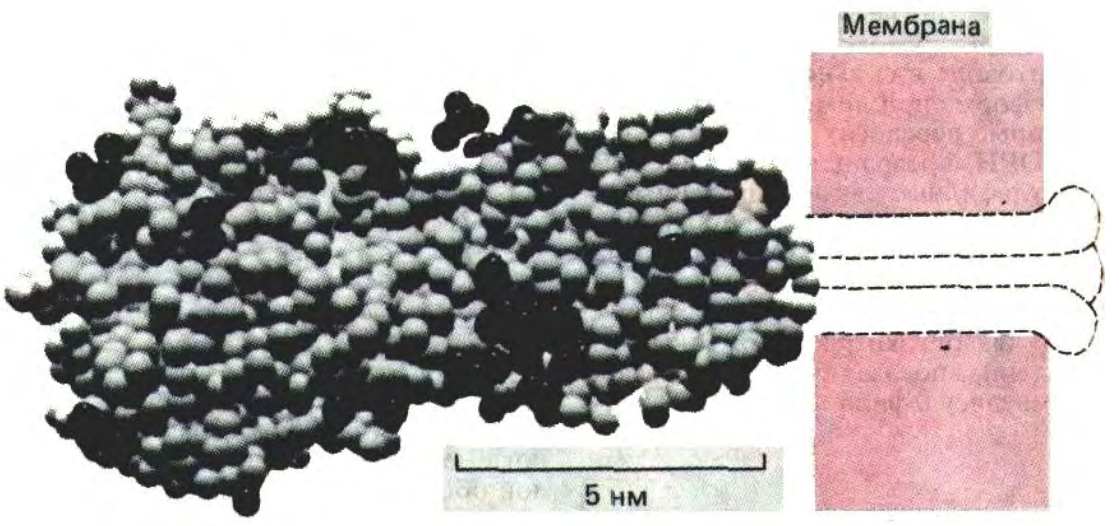


Рис. 8-51. Трехмерная структура мембранного гликопротеина-гемагглютинина вируса гриппа, показывающая расположение в нем ковалентно присоединенных олигосахаридов (выделенные темным атомы). Гликопротеины либо встраиваются в клеточные мембраны, либо выводятся из клеток при секреции; они могут содержать от 1 до 85% углеводов по весу. Некоторые богатые углеводами гликопротеины содержат десятки или даже сотни присоединенных олигосахаридных цепей на молекулу. Пронизывающие мембрану участки этого белка вирусной оболочки, состоящие из трех идентичных полипептидных цепей, могут служить основанием представленной здесь структуры. Они не изображены на рисунке, т. к. этот участок белка отрезается при приготовлении образца для рентгено-структурного анализа. (Фотографию любезно предоставил Richard J. Feldmann.)

в цитозоле путем образования промежуточных продуктов - нуклеотид-сахаров, которые затем (прямо или косвенно) передают свой сахар молекуле липида в определенной последовательности. Пройдя этот путь, предшественник олигосахарида перескакивает с цитозольной стороны мембраны ЭР в его полость (рис. 8-54). Долихол - это длинная и очень сильно гидрофобная молекула; ее 22 пятиуглеродных остатка могут пронизывать липидный бислой более трех раз, поэтому присоединенный олигосахарид прочно «заякорен» в мембране.

Все разнообразие N-связанных олигосахаридных структур возникает в результате модификаций молекулы исходного предшественника. Еще в ЭР у большинства гликопротеинов от олигосахарида отщепляется три остатка глюкозы и один остаток маннозы (см. рис. 8-63). «Доделка» или «процессинг» олигосахарида продолжается в аппарате Гольджи (см. разд. 8.7.1).

Наиболее широко распространены в гликопротеинах N-связанные олигосахариды. Гораздо реже олигосахариды связываются с гидроксильной группой боковой цепи остатка серина, треонина или гидроксилизина. Такие O-связанные олигосахариды образуются в аппарате Гольджи способом, который еще полностью не изучен (см. разд. 8.7.4).

8.6.13. У некоторых трансмембранных белков вскоре после их поступления в ЭР С-концевой трансмембранный участок обменивается на ковалентно связанный фосфолипид инозитол [44]

Как обсуждалось ранее, некоторые ферменты цитозоля катализируют ковалентное присоединение к определенным белкам единичной жирной кислоты (см. разд. 8.2.3). Недавно было обнаружено, что сходный процесс имеет место и в ЭР: карбоксильный конец некоторых белков плазматической мембраны с помощью специфических ферментов ковалентно присоединяется к остатку сахара в гликолипиде. Механизм образования этой связи представлен на рис. 8-55. Установлено, что при этом к белку добавляется гликозилированная молекула фосфатидилинозитола, содержащая две жирных кислоты. Такая модификация обнаружена для большого числа белков плазматической мембраны, включая одну из форм адгезивного белка нейронов и главный белок оболочки трипаносомы. Поскольку оба эти белки связаны с плазматической мембраной только указанным выше способом, в принципе они могут отделяться от клетки в растворимой форме в ответ на сигнал, активирующий специфическую фосфолипазу в плазматической мембране, однако до сих пор подтвердить эту гипотезу экспериментально не удалось.

8.6.14. Большая часть липидных бислоев мембран собирается в ЭР [45]

В мембране ЭР образуются почти все липиды, необходимые для построения новых клеточных мембран, включая фосфолипиды и холестерол. Основной синтезируемый фосфолипид - это фосфатидилхолин (называемый еще лецитином), который может образовываться в три этапа из двух жирных кислот, глицерофосфата и холина (рис. 8-56). Каждый этап катализируется в мембране ЭР ферментами, активные центры которых обращены в цитозоль (именно там находятся все необходимые метаболиты). На первом этапе ацилтрансфераза добавляет к глицерофосфату две жирных кислоты с образованием фосфатидиловой кислоты, соединения достаточно гидрофобного, чтобы остаться после синтеза в липидном бислое. Именно на этом этапе липидный бислой увеличи-

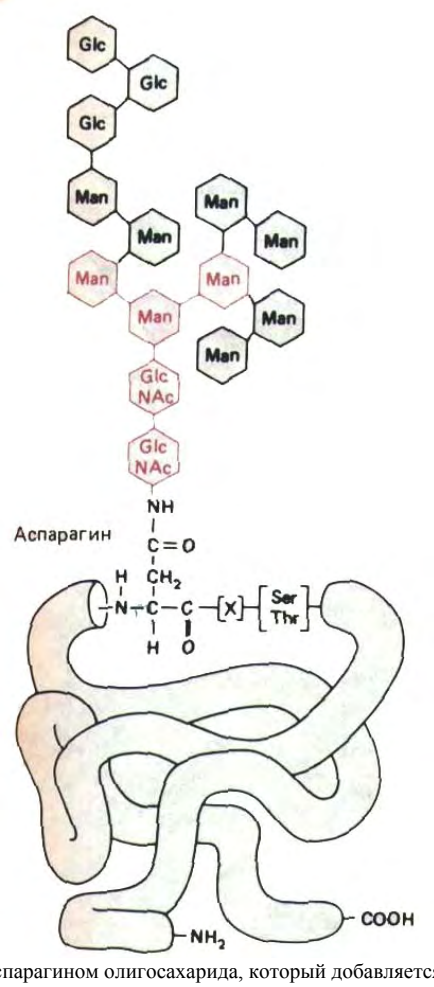


Рис. 8-52. Структура связанного с аспарагином олигосахарида, который добавляется к большинству белков на внутренней стороне мембраны ЭР. Сахара, выделенные цветом, образуют «сердцевину», или кор, этого олигосахарида. Во многих гликопротеинах после разнообразной «доделки» олигосахарида в аппарате Гольджи в нем остаются от первоначальной структуры только сахара, составляющие кор (см. рис. 8-63). Обратите внимание, что аспарагин находится в последовательности Asp-X-Ser или Asp-X-Thr, где X может быть любой аминокислотой, кроме пролина.

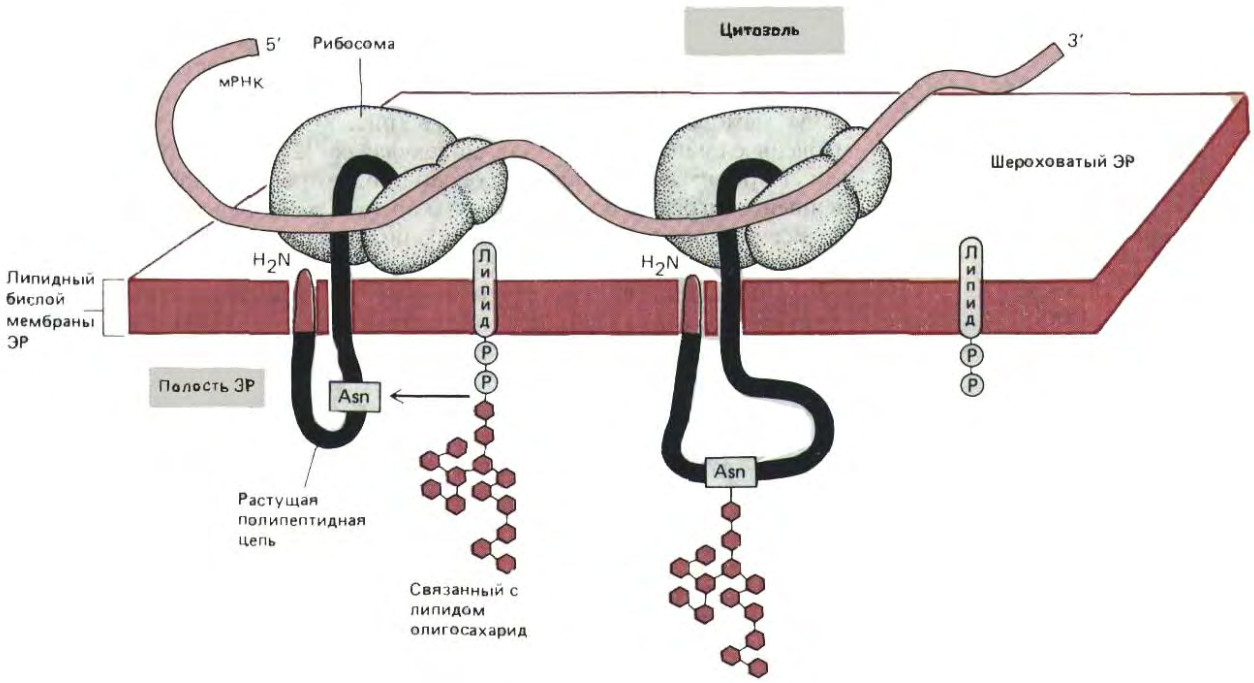


Рис. 8-53. N-связанное гликозилирование белков в ЭР. Почти тотчас после того, как полипептидная цепь попадает в просвет ЭР, она гликозилируется по доступным остаткам аспарагина. Олигосахарид, показанный на рис. 8-52, переносится к аспарагину как целая единица; эту реакцию катализирует связанный с мембраной фермент гликозил-трансфераза.

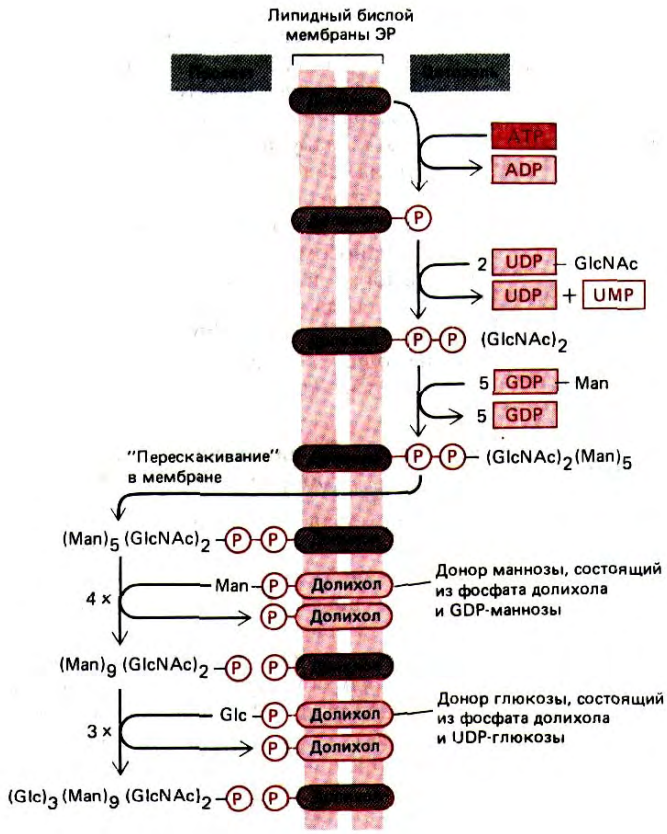


Рис. 8-54. Синтез липид-связанного олигосахарида, который переносится к остаткам аспарагина на внутренней стороне мембраны ЭР. Этот олигосахарид собирается сахар за сахаром на каркасе из молекулы липида долихола (полиизопреноид-см. схему 2-4). Первый сахар присоединяется к долихолу пирофосфатным мостиком. Эта высокоэнергетическая связь затем активирует олигосахарид для переноса его от молекулы липида к боковой цепи аспарагина. Синтез олигосахарида начинается на цитозольной стороне мембраны ЭР. После того, как промежуточный продукт -липид-$Man_5GlcNAc_2$ «перепрыгнет» через мембрану, синтез продолжается на внутренней ее стороне. Сокращения: GlcN Ac-N-ацетил глюкозамин, Man -манноза, Glc- глюкоза.

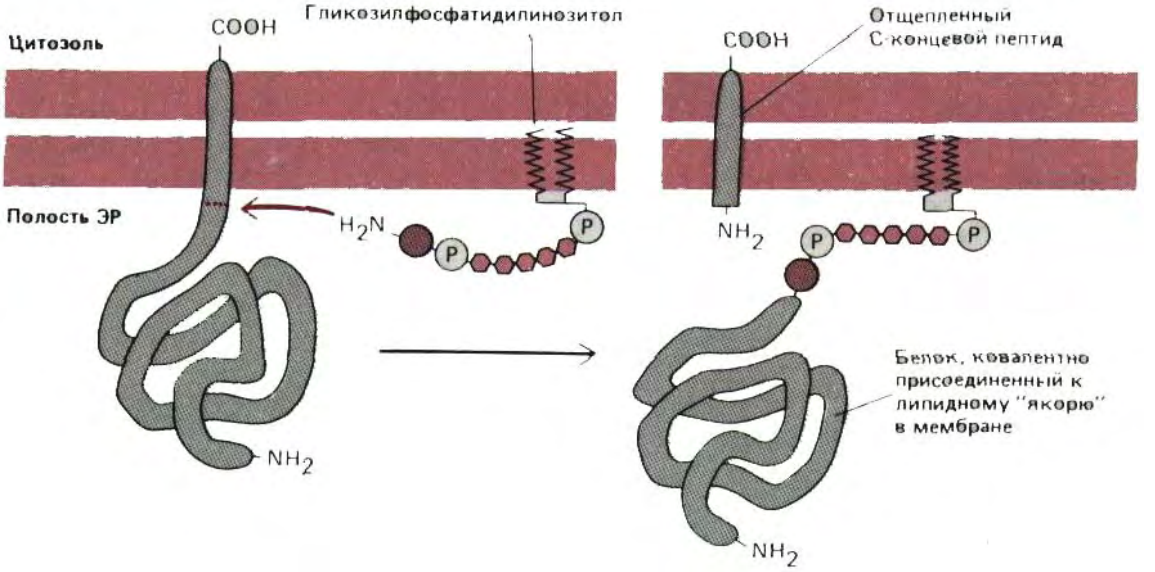


Рис. 8-55. Синтез белков, связанных с мембраной при помощи «якоря» из фосфатидилинозитола. Сразу после завершения синтеза белок остается связанным с мембраной только своим гидрофобным С-концом, состоящим из 15-20 аминокислот, а остальная часть молекулы находится в просвете ЭР. Меньше чем через минуту фермент в ЭР отрезает белок от его мембранной С-концевой части, и одновременно новый карбоксильный конец присоединяется к образовавшемуся ранее интермедиату -гликозилфосфатидилинозитолу. За счет этого ковалентно присоединенного липидного якоря белок остается связанным с мембраной. Все его аминокислоты находятся на внутренней стороне мембраны ЭР, а если белок будет транспортирован к плазматической мембране, они окажутся обращенными во внеклеточное пространство. Точная структура этого гликолипидного головного участка неизвестна.

вается. На последующих стадиях формируется «голова» вновь образованной молекулы липида и, следовательно, химическая природа бислоя, но роста мембраны по объему при этом не происходит (см. рис. 8-56). Все основные фосфолипиды мембраны - фосфатидилхолин (ФХ), фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилсерин (ФС) и фосфатидилинозитол (ФИ) - синтезируются таким способом.

Как исходное образование фосфатидиловой кислоты, так и ее последующие модификации с формированием различных типов молекул фосфолипидов происходят в той половине липидного бислоя ЭР, которая обращена к цитозолю. Этот процесс мог бы в конце концов превратить липидный бислой в монослой, если бы не существовало механизма для переноса части вновь образованных молекул фосфолипидов в другую половину бислоя ЭР. В искусственных липидных бислоях липиды не совершают таких «флип-флоп»-переходов. В ЭР же количество фосфолипидов выравнивается с двух сторон мембраны за минуты, что почти в 100000 раз быстрее, чем скорость, рассчитанная для спонтанного «флип-флопа». Полагают, что столь быстрое перемещение поперек бислоя происходит при участии транслокаторов фосфолипидов, которые специфичны для каждого их типа (в зависимости от головной группы). По-видимому, в мембране ЭР имеется транслокатор («флип-паза»), который способен переносить холин-содержащие фосфолипиды (но не этаноламин-, серин- или инозитол-содержащие) из одной половины бислоя в другую. Это означает, что ФХ достигает внутренней поверхности бислоя гораздо легче, чем ФЭ, ФС или ФИ. Таким образом транслокатор отвечает за асимметричное расположение липидов в бислое (рис. 8-57).

Известно, что в ЭР образуются также холестерол и церамид. Церамид экспортируется в аппарат Гольджи, где он служит предшественником двух типов липидов: к одним молекулам церамида присоединяются олигосахаридные цепи с образованием гликосфинголипидов, а к другим - головная фосфохолиновая группа от фосфатидилхолина, и получается сфингомиелин. Таким образом, и гликолипиды, и сфингомиелин в процессе формирования мембран образуются сравнительно поздно. Расположены они исключительно в нецитозольной половине липидного бислоя, поскольку именно там находятся синтезирующие их ферменты.

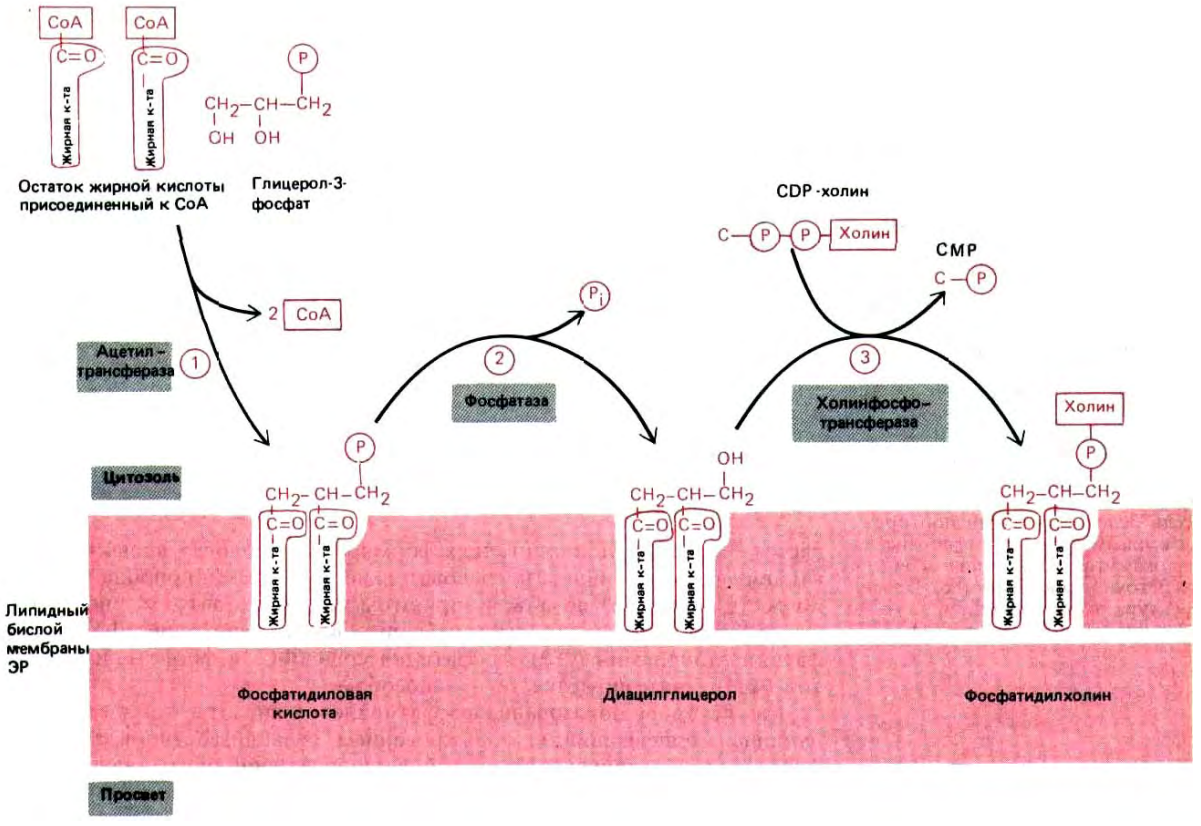


Рис. 8-56. Синтез фосфолипидов протекает на цитоплазматической стороне мембраны ЭР. Каждый фермент, участвующий в этом синтезе, представляет собой интегральный мембранный белок ЭР, активный центр которого обращен к цитозолю. В цитозоле есть все соединения, необходимые для сборки фосфолипидов. В процессе, изображенном здесь, из комплекса жирная кислота - кофермент А, глицерол-3-фосфата и цитидиндифосфохолина образуется фосфатидилхолин (CDF-холин).

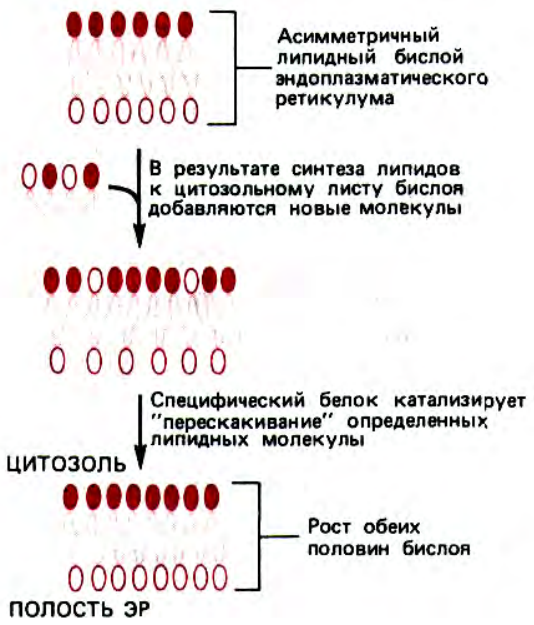


Рис. 8-57. Рост обеих половин липидного бислоя мембраны ЭР требует каталитического «флиппинга» молекул фосфолипидов из одного монослоя в другой. Так как новые молекулы липидов добавляются только к цитоплазматическому монослою и липиды не перескакивают из одного монослоя в другой спонтанно, требуются связанные с мембраной переносчики фосфолипидов («флиппазы»), чтобы переносить определенные молекулы липидов во внутренний слой мембраны. В результате мембрана растет равномерно, как бислой. Поскольку эти ферменты избирательно узнают и переносят только некоторые типы липидов, в ЭР образуется асимметричный бислой. В частности, внутренний слой (из которого образуется внешняя половина бислоя плазматической мембраны) обогащен фосфатидилхолином.

8-29

8.6.15. Белки-переносчики фосфолипидов могут доставлять их из ЭР в митохондрии и пероксисомы [46]

Плазматическая мембрана, мембраны аппарата Гольджи и лизосом - это части мембранной системы, связанной с ЭР с помощью транспортных пузырьков, поставляющих в нее и белки, и липиды. Митохондрии и пероксисомы не принадлежат к этой системе и нуждаются в других механизмах для импорта белков и липидов мембран. Мы уже убедились в том, что большинство белков этих органелл доставляется из цитозоля посттрансляционно. Хотя некоторые липиды модифицируются в митохондриях, сами митохондрии все равно должны получить их либо прямо из ЭР, где они синтезируются, либо через другие клеточные мембраны.

В экспериментах in vitro было показано, что специальные водорастворимые белки обладают способностью переносить индивидуальные молекулы фосфолипидов от одной мембраны к другой. Эти белки называют белками-переносчиками фосфолипидов (или белками, обменивающими фосфолипиды). Перенос между мембранами осуществляется так: белок «экстрагирует» молекулу фосфолипида из мембраны и отсоединяется от нее, неся в участке связывания прикрепленный липид. Когда этот белок достигает другой мембраны, он стремится «выгрузить» связанную молекулу липида в новый липидный бислой (рис. 8-58). Предполагают, что таким способом переносится в митохондрии фосфатидилсерин, затем он декарбоксилируется, образуя фосфатидилэтаноламин; фосфатидилхолин, по всей вероятности, импортируется в виде интактной молекулы.

Белки-переносчики распределяют фосфолипиды между органеллами случайным образом. В принципе, такой случайный обмен может приводить к транспорту липидов из мембраны, богатой липидами, к мембране, обедненной ими, при этом молекулы фосфатидилхолина и фосфатидилсерина переносились бы из ЭР, где они синтезируются, в мембрану митохондрий и пероксисом. Возможно, митохондрии и пероксисомы являются единственными в цитоплазме «обедненными липидами» органеллами, и такого «случайного» переноса достаточно, хотя наличие специфических механизмов переноса фосфолипидов в эти органеллы тоже вполне реально.

Заключение

ЭР служит фабрикой для производства белковых и липидных компонентов многих органелл. Его обширная мембрана содержит множество ферментов биосинтеза. Среди них те, которые ответственны за синтез почти всех клеточных липидов и за присоединение N-связанного олигосахарида к множеству белков. Вновь синтезированные белки, предназначенные как для секреции, так и для самого ЭР, аппарата Голъджи, лизосом и плазматической мембраны, сначала должны поступить из цитозоля в ЭР. В ЭР переносятся только те белки, которые имеют специфические гидрофобные сигнальные пептиды. Сигнальный пептид узнается сигнал-распознающей частицей (SRP), которая связывает новую цепь белка и рибосому и направляет их к белку-рецептору на поверхности мембраны ЭР. Это связывание с мембраной запускает АТР-зависимый перенос, при котором петля полипептидной цепи протаскивается через мембрану ЭР.

Растворимые белки, предназначенные для полости ЭР, секреции или для переноса в другие органеллы, целиком проникают в полость ЭР. Трансмембранные белки, предназначенные для мембраны ЭР или других

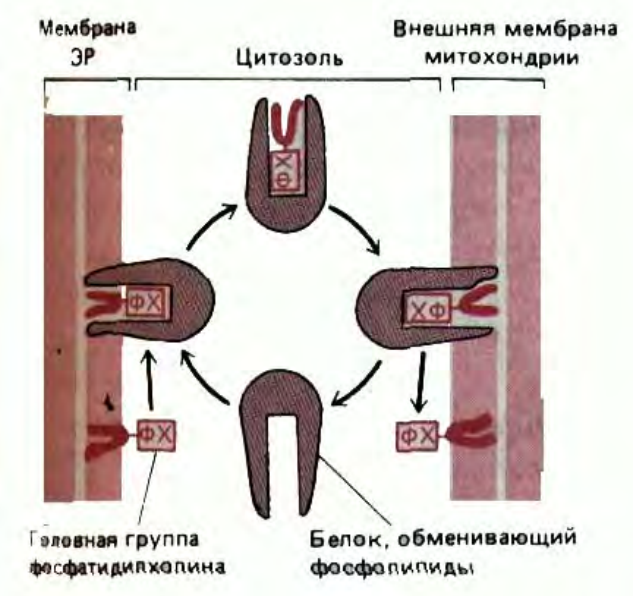


Рис. 8-58. Растворимые белки-переносчики фосфолипидов могут перераспределять фосфолипиды между мембранными органеллами. Фосфолипиды нерастворимы в воде, поэтому их переходы между мембранами требуют белка-носителя. Эти белки переносят одну молекулу фосфолипида за один раз, и могут захватывать молекулу липида из одной мембраны и высвобождать ее в другую. Перенос фосфатидилхолина (ФХ) из ЭР к митохондриям в принципе может протекать спонтанно, потому что концентрация ФХ в мембране ЭР (где он синтезируется) высокая, а во внешней митохондриальной мембране -низкая.

клеточных мембран, переносятся через мембрану, но не высвобождаются в полость ЭР. Вместо этого они остаются заякоренными в бислое при помощи одного или нескольких пронизывающих мембрану α-спиральных участков полипептидной цепи. Эти гидрофобные участки белка могут выступать в качестве сигнальных пептидов, определяющих начало или конец переноса. Если полипептид содержит множество чередующихся старт- и стоппептидов, он может проходить бислой в противоположных направлениях много раз.

Ассиметрия процессов встраивания белков в мембраны ЭР и их гликозилирования в этих мембранах обеспечивает полярность расположения мембранных белков во всех других органеллах.

8-32

8.7. Аппарат Гольджи

Аппарат Гольджи (называемый также комплексом Гольджи) обычно расположен около клеточного ядра, а в животных клетках он часто находится вблизи центросомы, или клеточного центра. Он состоит из набора окруженных мембраной уплощенных цистерн, напоминающих стопку тарелок. Каждая стопка Гольджи (у растений называемая диктиосомой) обычно содержит от четырех до шести цистерн, имеющих, как правило, диаметр около 1 мкм (рис. 8-59). Число стопок Гольджи в клетке в значительной степени зависит от ее типа: некоторые клетки содержат одну большую стопку, тогда как в других имеются сотни очень маленьких стопок.

Со стопками Гольджи всегда ассоциирована масса мелких (диаметром ≈ 60 нм) ограниченных мембраной пузырьков. Они группируются на стороне, примыкающей к ЭР, а также по периферии стопки вблизи расширенных краев каждой цистерны (см. рис. 8-59). Полагают, что эта

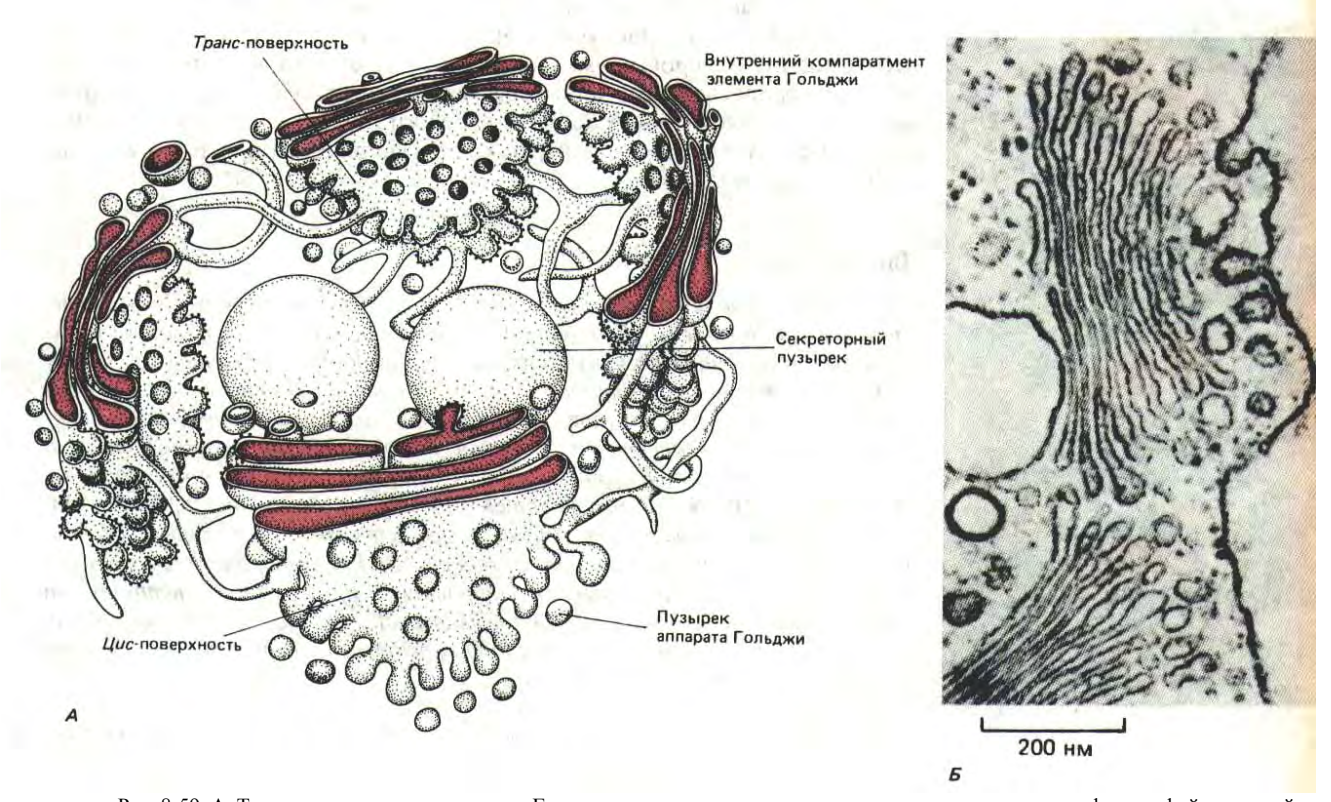


Рис. 8-59. А, Трехмерная структура аппарата Гольджи, реконструированная на основе электронных микрофотографий животной секреторной клетки. Стопки уплощенных цистерн Гольджи имеют расширенные края, от которых, видимо, отпочковываются мелкие пузырьки. Большие секреторные пузырьки образуются из транскомпартмента аппарата Гольджи. Б. Электронная микрофотография поперечного среза аппарата Гольджи в растительной клетке (зеленая водоросль Chlamydomonas). Аппарат Гольджи в растительных клетках обычно более выражен и более четко отделен от других внутриклеточных мембран, по сравнению с клетками животных. (А-по R. V. Krstic, Ultrastructure of the Mammalian Cell. New York; Springer-Verlag, 1979; Б-с любезного разрешения George Palade.)

пузырьки (пузырьки Гольджи) переносят белки и липиды в аппарат Гольджи, транспортируют их из него и между остальными цистернами. Многие пузырьки являются окаймленными и покрыты клатрином или другим специфическим белком. Часто можно видеть, как такие окаймленные пузырьки отшнуровываются от цистерн Гольджи.

Аппарат Гольджи имеет две разные стороны: формирующуюся, или цис-сторону и зрелую, или транс-сторону. Цис-сторона тесно связана с переходными элементами ЭР (см. разд. 8.1.3); транс-сторона расширяется, образуя трубчатый ретикулум, называемый транс-сетью Гольджи. Белки и липиды в составе небольших пузырьков попадают в стопку Гольджи с цис-стороны, а покидают ее, направляясь в различные компартменты, вместе с пузырьками, образующимися на транс-стороне. Переходя из одной стопки Гольджи в другую, эти молекулы претерпевают последовательные серии модификаций.

Аппарат Гольджи развит в секреторных клетках, таких, например, как бокаловидные клетки эпителия кишечника, которые выделяют большое количество слизи. На транс-стороне аппарата Гольджи, обращенной к той части плазматической мембраны, где происходит секреция, образуются необычно большие пузырьки (рис. 8-60).

8-33

8.7.1. В аппарате Гольджи происходит модификация олигосахаридных цепей [48]

Как отмечалось выше, в ЭР к белкам присоединяется N-связанный олигосахарид. Этот олигосахарид претерпевает модификации уже в ЭР (см. разд. 8.6.12). Дальнейшие изменения происходят с ним в аппарате Гольджи.

В зрелых гликопротеинах с остатком аспарагина связаны олигосахариды двух обширных классов: сложные олигосахариды и олигосахариды с высоким содержанием маннозы (рис. 8-61). Иногда к одной и той же полипептидной цепи присоединяются (в разных местах) олигосахариды обоих типов. К олигосахаридам с высоким содержанием маннозы в аппарате Гольджи новые сахара не добавляются. Они содержат два N-ацетилглюкозамина и много остатков маннозы, часто почти столько же, сколько их было у связанного с липидом олигосахарида-предшественника в ЭР. Сложные олигосахариды могут иметь больше, чем два N-ацетилглюкозамина, а также различное число остатков галактозы, сиаловой кислоты и (в некоторых случаях) фукозы. Сиаловая кислота представляет особый интерес, как единственный углеводный остаток в гликопротеинах, несущий отрицательный заряд (см. разд. 6.1.6).

Сложные олигосахариды образуются в результате «доделки» олигосахаридов, присоединенных в ЭР, и добавления дополнительных Сахаров. Таким образом, каждый сложный олигосахарид состоит из сердцевины, или кора, сформированного из исходного N-связанного олигосахарида и (обычно он содержит два N-ацетилглюкозамина и три остатка маннозы) и концевой области, состоящей из варьирующего числа трисахаридов (N-ацетилглюкозамин-галактоза-сиаловая кислота), присоединенных к сердцевинным остаткам маннозы. Иногда концевая область как бы обрезана и содержит только N-ацетилглюкозамин и галактозу или даже один N-ацетилглюкозамин. В некоторых случаях необязательным оказалось и присутствие фукозы, присоединенной к коровому N-ацетилглюкозамину. Все эти сахара, составляющие концевой участок, добавляются в транс-части аппарата Гольджи целым рядом гликозилтрансфераз, которые работают в строго определенной последовательности (рис. 8-62). Субстратом для них служат специфические активиро-

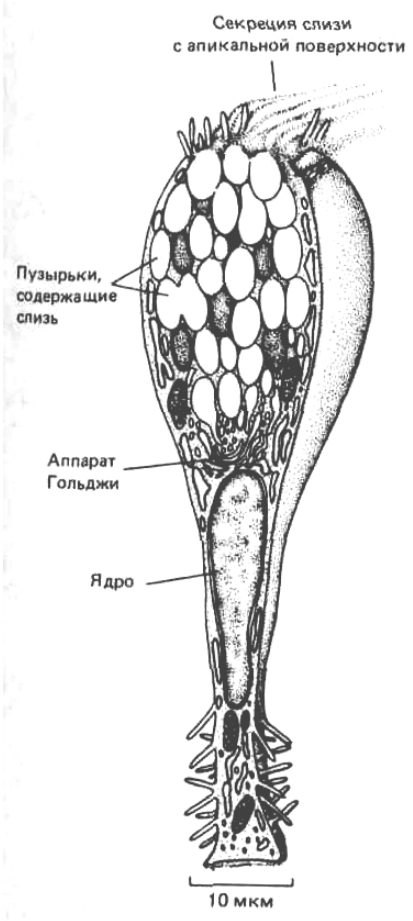


Рис. 8-60. Бокаловидная клетка тонкого кишечника. Эта клетка специализирована для секреции слизи, представляющей собой смесь гликопротеинов и протеогликанов, синтезированных в ЭР и аппарате Гольджи. Аппарат Гольджи сильно поляризован, что облегчает выделение слизи путем экзоцитоза с апикальной поверхности клетки. (По R. Krstic, Illustrated Encyclopedia of Human Histology. New York: Springer-Verlag, 1984.)

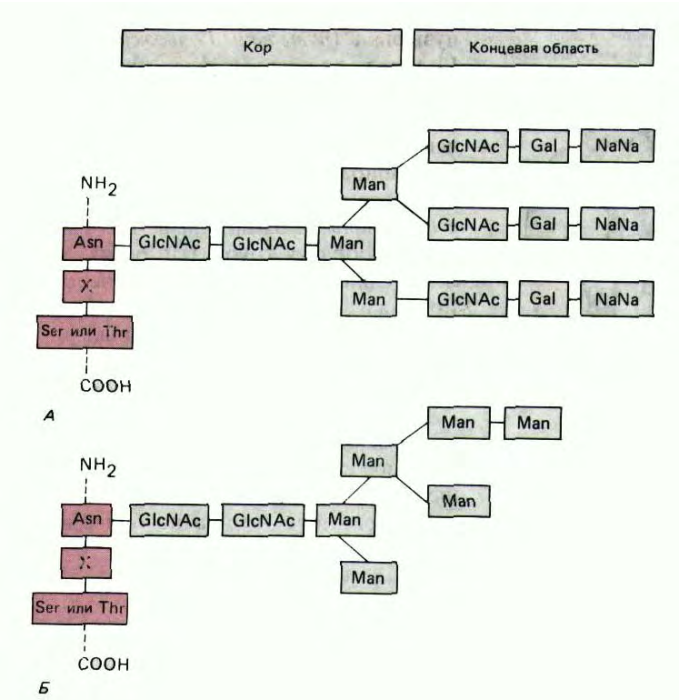


Рис. 8-61. Примеры двух основных классов связанных с аспарагином (N-связанных) олигосахаридов, обнаруженных в зрелых гликопротеинах: «сложные» олигосахариды (А) и «олигосахариды с высоким содержанием маннозы» (Б). Существует множество вариаций этих структур. Например, показанный здесь сложный олигосахарид имеет три концевых цепи, но часто встречаются также олигосахариды с двумя или четырьмя концевыми цепями, в зависимости от гликопротеина и от клетки, в которой он образуется. Встречаются также «гибридные» олигосахариды с одной маннозной концевой цепью и одной - с GlcNAc-Gal. Три аминокислоты, выделенные цветом, представляют собой последовательность, которую узнает фермент, добавляющий к белку исходный олигосахарид. Сокращения: Asn-аспарагин; Man-манноза; GlcNAc-N-ацетилглюкозамин; NANA-N-ацетилнейраминовая кислота (сиаловая кислота); Gal -галактоза; X-любая аминокислота.

ванные нуклеотид-сахара. Они транспортируются в полости аппарата Гольджи при помощи набора связанных с мембраной носителей. Эти же носители выводят нуклеотидные побочные продукты гликозилирования. Одна из описанных гликозилтрансфераз (галактозилтрансфераза) обычно используется для того, чтобы маркировать во фракции мембранных пузырьков, очищенных методом дифференциального центрифугирования, те из них, которые происходят из аппарата Гольджи.

Реакции, в результате которых получаются сложные олигосахариды, происходят по строго упорядоченной схеме, показанной на рис. 8-63.

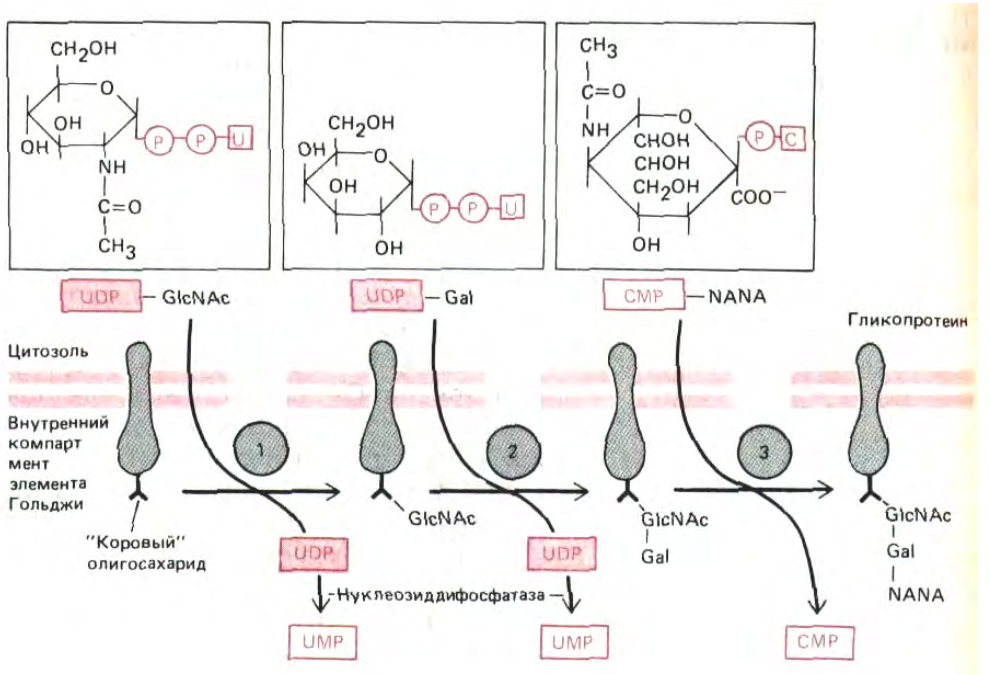


Рис. 8-62. Схема последовательного присоединения сахарных остатков. Эти реакции протекают в аппарате Гольджи и приводят к образованию сложных олигосахаридов. На каждом этапе действует одна из трех различных гликозилтрансфераз, использующих в качестве субстратов сахара, активированные за счет связывания их с нуклеотидами. Гликозилирование протекает на внутренней поверхности мембраны. Сверху показаны структуры нуклеотид-сахаров UDP-ацетилглюкоз-амина, UDP-галактозы и CMP-N-ацетилнейраминовой кислоты. Сокращения см. в подписи к рис. 8-61.

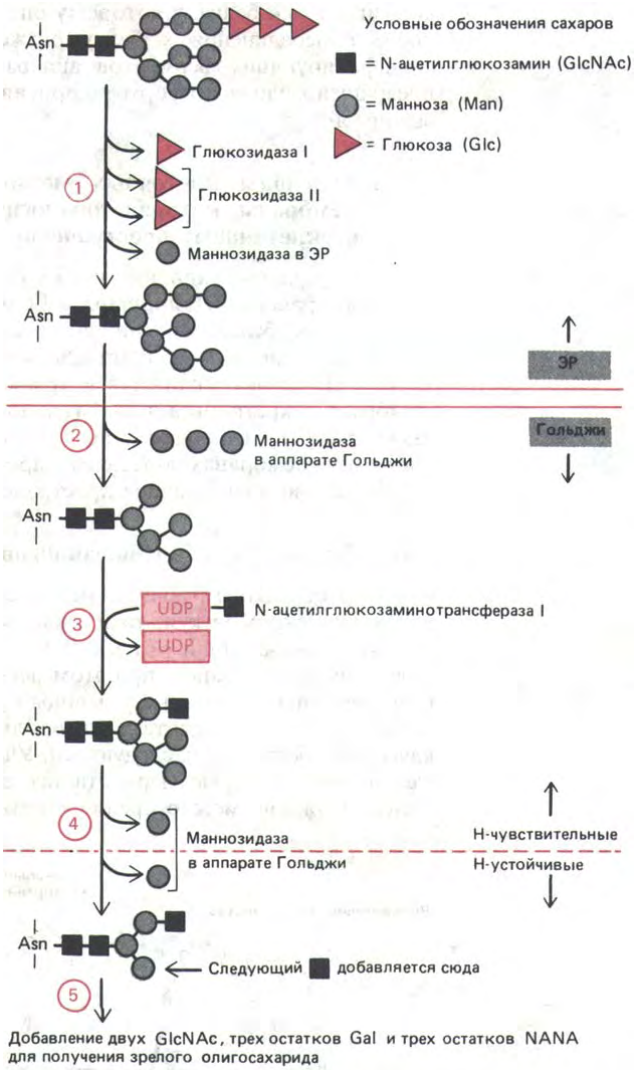


Рис. 8-63. Процессинг олигосахаридов, протекающий в ЭР и аппарате Гольджи. Процессинг высокоупорядочен, и каждая стадия, показанная здесь, зависит от предыдущей реакции в серии. Процессинг начинается в ЭР с удаления у олигосахарида, исходно перенесенного к белку, остатка глюкозы. Еще до завершения синтеза белка могут быть удалены все три остатка глюкозы. Затем маннозидаза в мембране ЭР удаляет определенный остаток маннозы. В стопке Гольджи маннозидаза I удаляет еще три остатка маннозы, а N-ацетилглюкозоаминотрансфераза I добавляет остаток GlcNAc, не дающий маннозидазе II удалить два дополнительных остатка маннозы. В конце концов это приводит к образованию кора из трех остатков маннозы, присутствующего в олигосахаридах «сложного» типа. На этом этапе связь между двумя остатками GlcNAc в коре становится устойчивой к атаке высокоспецифичной эндогликозидазы (EndoH). Так как все последующие стадии данного процесса тоже устойчивы к действию EndoH, обработка этим ферментом широко применяется для разделения сложных олигосахарядов и олигосахаридов с высоким содержанием маннозы. Наконец, добавляются дополнительные остатки GlcNAc, галактозы и сиаловой кислоты. Степень процессинга исходного олигосахарида зависит от типа белка и от положения остатка аспарагина в том белке, к которому присоединен олигосахарид. Процессинг некоторых олигосахаридов прерывается в аппарате Гольджи, другие же претерпевают в различной степени изображенные здесь модификации. Сокращения см. в подписи к рис. 8-61.

Детали этого процесса удалось выяснить, благодаря использованию разнообразных препаратов и антибиотиков, которые подавляют его специфические стадии (табл. 8-4). Останется ли данный олигосахарид богатым маннозой или будет модифицирован, определяется в основном

Таблица 8-4. Препараты, подавляющие различные стадии N-гликозилирования

Препарат (ы)	Подавляемая стадия
Туникамицин	Долихол-P → dol-P-P-GlcNAc
Кастаноспермин и N-метил-дезоксинодзиримицин	Глюкоза$_3$-Man$_9$-GlcNAC$_2$-Asn → глюкоза$_2$-Man$_9$-GlcMAc$_2$-Asn
Бромокондуритол	Глюкоза$_2$-Man$_9$-GlcNAc$_2$-Asn → Man$_9$-GlcNAc$_2$-Asn
Цезоксиманнонодзиримицин	Man$_8$-GlcNAc$_2$-Asn → Man$_5$-GlcNAC$_2$-Asn
Свэнсонин	GlcNAc-Man$_3$-GlcNAc$_2$-Asn→ GlcNAc-Man$_3$-GlcNAc$_2$ -Asn

конфигурацией белка, к которому он прикрепляется: если олигосахарид после присоединения к белку окажется стерически доступным для модифицирующих ферментов аппарата Гольджи, он, видимо, будет превращен в сложную форму; в противном случае он останется богатым маннозой.

8.7.2. Углеводы клеточных мембран обращены к той стороне мембраны, которая топологически эквивалентна внеклеточному пространству

Поскольку олигосахаридные цепи присоединяются со стороны внутреннего пространства ЭР и аппарата Гольджи, расположение углеводов на мембранных белках и липидах несимметрично. Как и асимметрия самого липидного бислоя, эта асимметричная ориентация гликозилированных молекул сохраняется в процессе транспорта к плазматической мембране, секреторным пузырькам или лизосомам. В результате олигосахариды всех гликопротеинов и гликолипидов в соответствующих клеточных мембранах обращены в просвет органелл, а в плазматической мембране - во внеклеточное пространство (рис. 8-64).

8.7.3. Зачем нужно N-гликозилирование? [49]

Существует важное различие между синтезом молекул олигосахаридов и других макромолекул, таких, как ДНК, РНК и белки. Нуклеиновые кислоты и белки копируются с матрицы путем многократного повторения одинаковых этапов, при этом используется один и тот же фермент (или ферменты). Сложные углеводы нуждаются в различных ферментах на разных этапах синтеза, и продукт каждой реакции узнается в качестве субстрата для следующей. Учитывая сложность биохимических механизмов, которые выработались в процессе эволюции для синтеза олигосахаридов, можно предположить, что эти соединения выполняют

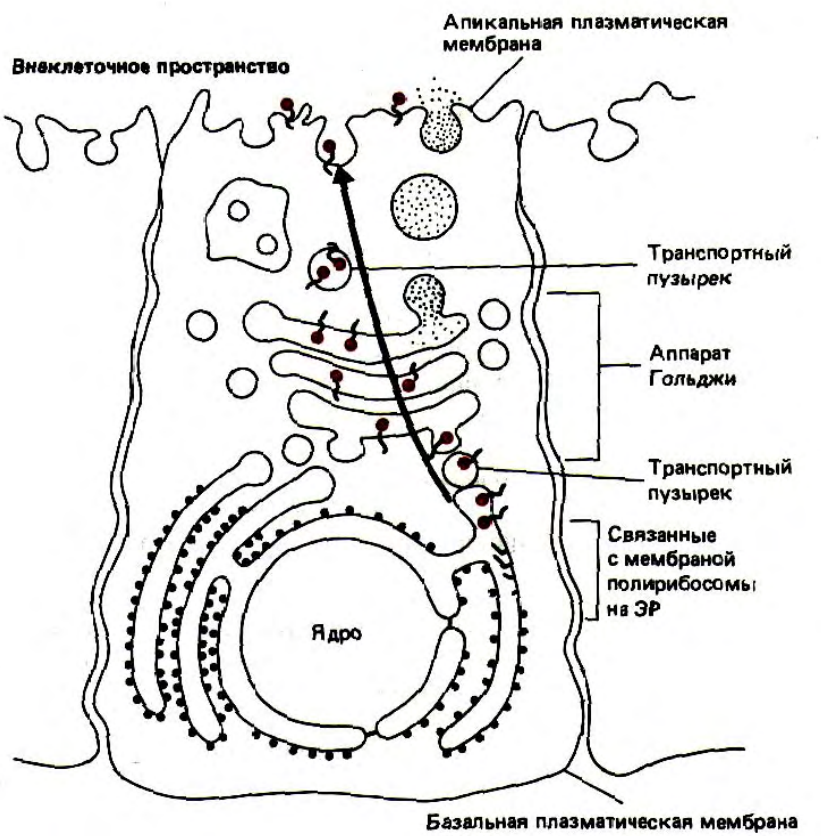


Рис. 8-64. Ориентация трансмембранного белка в мембране ЭР сохраняется при транспорте его к другим мембранам. Черные кружки на конце каждой молекулы гликопротеина обозначают N-связанный олигосахарид, который присоединяется к белкам в просвете (полости) ЭР. Обратите внимание, что эти остатки Сахаров находятся только в просвете внутренних органелл, а после того, как транспортный пузырек сольется с плазматической мембраной, они оказываются обращенными во внеклеточное пространство.

важные функции, однако большая часть этих функций пока неизвестна.

К примеру, N-гликозилирование преобладает у всех эукариот, включая дрожжи, но отсутствует у эубактерий. Поскольку у большинства белков, переносимых через ЭР и аппарат Гольджи, имеется один или более N-связанных олигосахаридов (а процесс переноса специфичен для клеток эукариот), было выдвинуто предположение, что эти олигосахариды участвуют в транспорте. Однако оказалось, что препараты, блокирующие некоторые стадии гликозилирования (табл. 8-4), в общем не влияют на транспорт (имеется, правда, одно важное исключение - транспорт в лизосомы, который мы обсудим ниже - см. разд. 8.8). Мутантные культивируемые клетки, у которых гликозилирование в аппарате Гольджи блокировано на разных стадиях, тем не менее жизнеспособны, и транспорт белков протекает у них нормально. Установлено, что некоторые белки без «своих» олигосахаридов не могут правильно свернуться, в результате они преципитируют в ЭР и становятся неспособными к транспорту, однако большинство белков сохраняет нормальную активность и без гликозилирования.

Поскольку цепочки сахаров имеют ограниченную гибкость, даже небольшой N-связанный олигосахарид выдается над поверхностью гликопротеина (рис. 8-65), и может, таким образом, ограничивать присоединение других макромолекул к поверхности этого гликопротеина. В результате присутствие олигосахарида в некоторых случаях обусловливает относительную устойчивость гликопротеина к действию протеаз. Возможно, олигосахариды обеспечивали предковой эукариотической клетке защитную оболочку, которая, в отличие от жесткой клеточной стенки бактерий, позволяла ей изменять форму и двигаться. С тех пор олигосахариды могли модифицироваться для выполнения и других функций.

8.7.4. В аппарате Гольджи происходит сборка протеогликанов [50]

В процессе переноса белков из ЭР к местам конечного назначения через аппарат Гольджи изменяются не только N-связанные олигосахариды; многие белки модифицируются и другими способами. Например, как отмечалось выше, у некоторых белков сахара присоединяются к боковым цепям определенных остатков серина или треонина. Такое O-связанное гликозилирование, как и наращивание цепей N-связанных олигосахаридов, катализируется гликозилтрансферазами. Эти ферменты добавляют к белку по одному сахару, используя в качестве субстрата нуклеотид-сахара, содержащиеся в полостях аппарата Гольджи. Обычно первым присоединяется N-ацетилгалактозамин, а за ним следует различное количество дополнительных остатков Сахаров, от нескольких до 10 и более.

Наиболее сильно гликолизируется протеогликановые коровые белки, которые в аппарате Гольджи модифицируются с образованием протеогликанов. Этот процесс включает полимеризацию одной или более цепей гликозаминогликанов (длинных неразветвленных полимеров, состоящих из повторяющихся дисахаридных единиц) с серинами корового белка. Судьба протеогликанов различна: одни из них секретируются в качестве компонентов внеклеточного матрикса, а другие остаются погруженными в плазматическую мембрану. Кроме того, протеогликаны составляют основу слизи, которая образует защитное покрытие множества эпителиев.

Сахара, входящие в состав гликозаминогликанов, сразу же после их полимеризации в аппарате Гольджи сильно сульфатируются, что придает протеогликанам отрицательный заряд. Сульфат переносится от

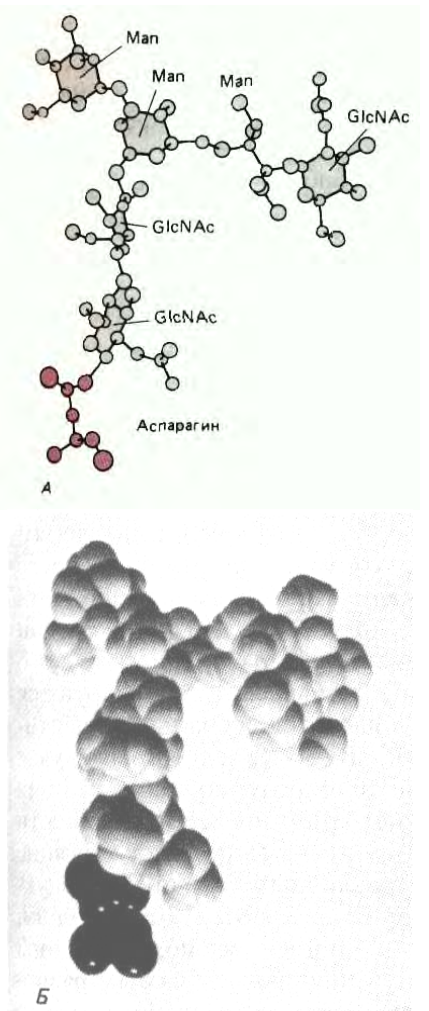


Рис. 8-65. Трехмерная структура небольшого N-связанного олигосахарида, определенная с помощью рентгеноструктурного анализа гликопротеина. Этот олигосахарид содержит всего 6 остатков Сахаров, тогда как в N-связанном олигосахариде, первоначально присоединенном к белку в ЭР, содержится 14 остатков сахаров (см. рис. 8-52). А. Шаростержневая модель, изображающая все атомы, кроме водородных; Б. пространственная модель, темные атомы - остаток аспарагина. (С любезного разрешения Richard Feldman.)

активированного донора сульфатов 3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфата (PAPS), который поступает из цитозоля в аппарат Гольджи. Самая тонкая модификация, происходящая в этой органелле, - присоединение сульфата, взятого от PAPS, к гидроксильной группе определенных остатков тирозина в белках. Сульфатированные тирозины характерны для секретируемых белков, но иногда встречаются и у белков плазматической мембраны (в их обращенных во внеклеточное пространство доменах).

8.7.5. При образовании секреторных пузырьков белки часто подвергаются протеолизу [51]

Наиболее радикальная модификация, которой подвергаются белки перед секрецией, происходит в последнюю очередь. Многие полипептидные гормоны и нейропептиды синтезируются в форме неактивного белка-предшественника, из которого затем в результате протеолиза образуется активная молекула. Полагают, что это расщепление начинается в транс-сети Голъджи и продолжается в секреторных пузырьках. Сначала связанная с мембраной протеаза расщепляет белок по связям основных аминокислот (Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys, или Arg-Arg), после чего происходит окончательная «доделка» секретируемого продукта (рис. 8-66). В простейшем случае полипептид часто имеет только один N-концевой про-участок, который отщепляется с образованием зрелого белка незадолго до секреции. Следовательно, такие белки синтезируются в виде пре-про-белков, у которых пре-часть является сигнальным пептидом ЭР, удаляемым в шероховатом ЭР. В более сложном случае пептидные молекулы синтезируются в виде полипротеинов, содержащих множество копий одной и той же аминокислотной последовательности (см. рис. 8-66). И наконец, в клетке существуют пептиды, выступающие в роли предшественников для множества различных конечных продуктов. Эти конечные продукты по одному отщепляются от исходной полипептидной цепи. В разных типах клеток одни и те же полипротеины могут расщепляться, различным образом, увеличивая тем самым разнообразие молекул, участвующих в химической передаче сигнала между клетками.

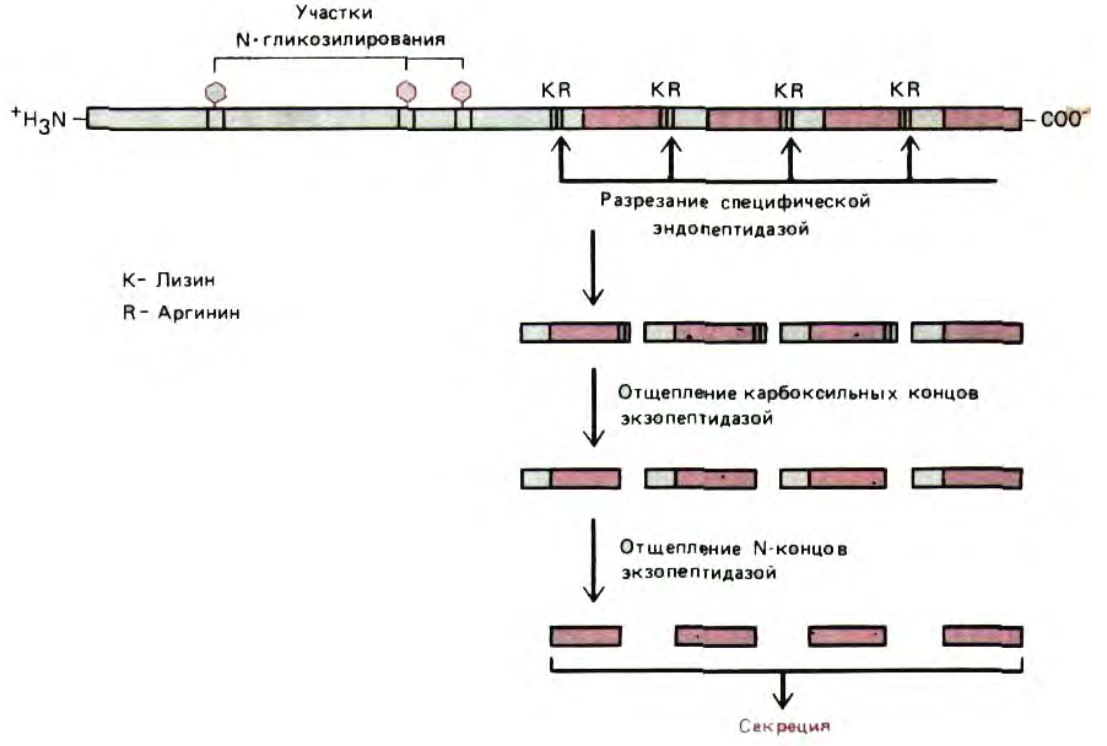


Рис. 8-66. Пример полипротеина, который разрезается с образованием множества копий одной и той же молекулы сигнального пептида. Обычно процессинг начинается с разрезания по парам основных аминокислот (здесь пары Lys-Arg), катализируемого специфической связанной с мембраной протеазой, расположенной в секреторных пузырьках или в транс-сети Гольджи. Здесь показан механизм процессинга, при котором образуется 13-ами-нокислотный пептид-α-фактор дрожжей Saccharomyces cerevisiae. Это секретируемый пептид, который регулирует у дрожжей половой процесс. (По R. Fuller, A. Brake, and J. Thorner, in Microbiology 1986 [L. Lieve, ed.], pp. 273-278. Washington, D. C: American Society for Microbiology, 1986.)

Почему для столь большого количества полипептидов характерен такой «задержанный» протеолиз? Возможно многие из них, например, энкефалины (нейропептиды, состоящие из пяти аминокислот), слишком коротки, чтобы их можно было эффективно синтезировать на рибосомах, ведь известно, что даже более длинные пептиды иногда утрачивают сигналы, необходимые для упаковки в секреторные пузырьки. Кроме того, задержка образования активного продукта до того момента, как он попадает в секреторный пузырек, может предотвращать действие данного продукта внутри клетки.

8.7.6. Цистерны Гольджи собраны в виде последовательных компартментов, в которых происходит процессинг продукта [52]

Процессинг в стопке Гольджи высоко упорядочен. Каждая цистерна представляет собой отдельный компартмент, со своим собственным набором ферментов, а вся стопка, таким образом, образует ячейку многостадийного процессинга. Белки модифицируются последовательно, по мере того, как они перемещаются из цистерны в цистерну.

Белки, поступившие из ЭР, попадают в первую цистерну Гольджи (цис-компартмент), затем переходят в следующий компартмент (промежуточный) и, наконец, оказываются в транс-компартменте (представленном последней цистерной стопки), где гликолизирование завершается. Из транс-компартмента белки попадают в транс-сеть Гольджи (ТСГ); в этом трубчатом ретикулуме они распределяются в различные транспортные пузырьки и отправляются к пунктам конечного назначения-плазматической мембране, лизосомам или секреторным пузырькам.

Функциональные различия между цис-, промежуточным и транс-компартментами стопки Гольджи были впервые обнаружены при изучении ферментов процессинга N-связанных олигосахаридов. В ходе экспериментов использовали как физическое фракционирование органеллы, так и иммуноэлектронную микроскопию. Благодаря этому, например, было показано, что удаление остатков маннозы и присоединение N-ацетилглюкозамина происходит в промежуточном компартменте, а присоединение галактозы и сиаловой кислоты-в транс-компартменте (рис. 8-67 и 8-68).

Белки, попадающие в аппарат Гольджи из ЭР (кроме тех из них, которые должны остаться в одной из цистерн Гольджи), «протекают» через стопку от цис- к промежуточному и затем к транс-компартменту, подвергаясь при этом ступенчатому процессингу. Механизм переноса белков и липидов от одной цистерны к другой точно не известен, однако полагают, что в нем участвуют окаймленные пузырьки, которые отшнуровываются от расширений цистерн. Поскольку было показано, что попавшие в аппарат Гольджи белки перемещаются от цис-компартмента через промежуточный к транс-компартменту не напрямую, и никогда не перескакивают, надо, чтобы каждый пузырек мог сливаться только с мембраной следующей цистерны. Хотя до сих пор были обнаружены только три функционально различных области аппарата Гольджи, каждая из них иногда представлена двумя или более последовательно расположенными цистернами, и, возможно, будут открыты более тонкие различия между ними. С другой стороны, может быть, существуют только три фундаментально различных компартмента, и некоторые цистерны внутри них представляют собой просто копии одной и той же функциональной ячейки.

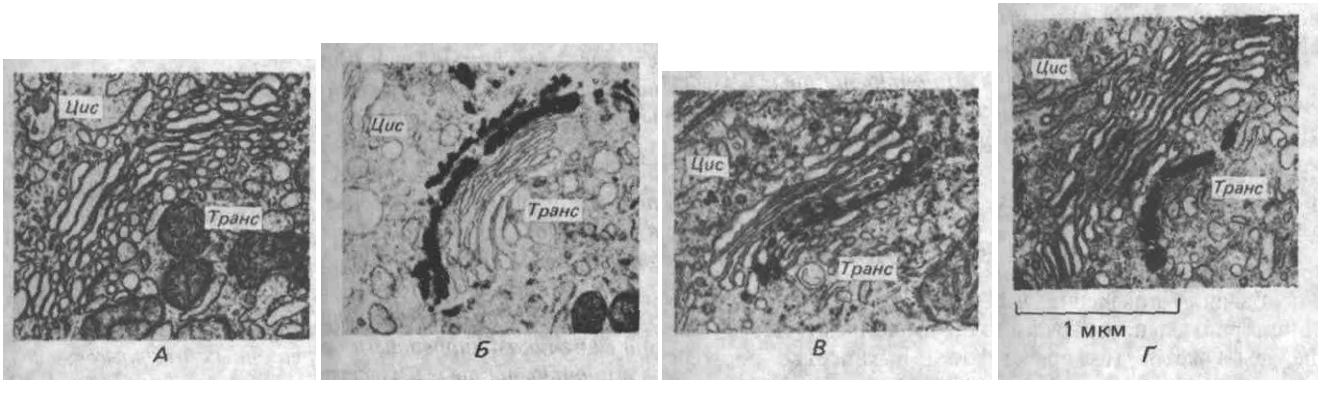


Рис. 8-67. Гистохимическое окрашивание показывает, что аппарат Гольджи биохимически поляризован. А. Неокрашенный препарат. Б. Осмий окрашивает в основном цистерны цис-компартмента. В. Фермент нуклеозиддифосфатаза (см. рис. 8-62) обнаруживается в транс-цистернах Гольджи; этот фермент раньше называли «тиаминпирофосфатазой». Г. Фермент кислая фосфатаза является маркером транс-сета Гольджи (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

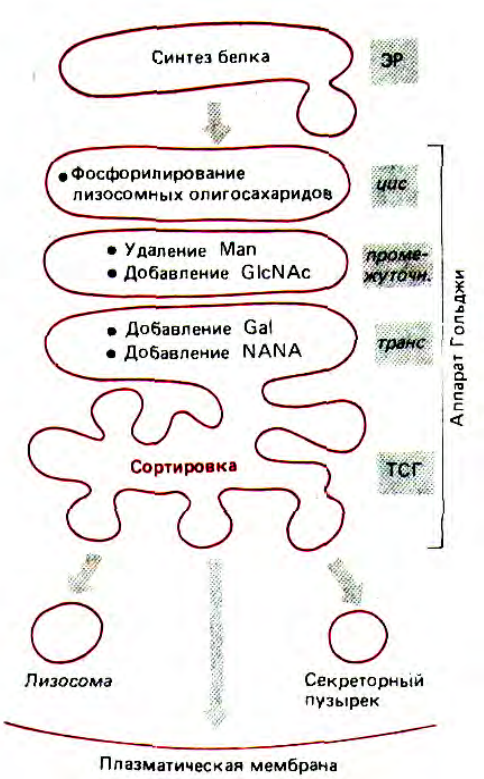


Рис. 8-68. Компартментация аппарата Гольджи. По мерс продвижения сквозь тесно сгруппированные цистерны стопки Гольджи белки претерпевают ковалентные модификации. Транс-сеть Гольджи (TGN) представляет собой трубчатый ретикулум, который работает прежде всего как ориентировочный пункт. Локализацию каждой изображенной здесь ступени процессинга удалось определить, сочетая различные методы, включая субфракционирование мембран аппарата Гольджи и электронную микроскопию после окраски антителами к некоторым ферментам процессинга. Место протекания многих других реакций до сих пор не установлено.

Заключение

Белки поступают в аппарат Гольджи из ЭР и направляются затем к плазматической мембране, лизосомам и секреторным пузырькам. Аппарат Гольджи представляет собой поляризованную структуру, состоящую из одной или более стопок уплощенных цистерн, окруженных множеством мелких пузырьков. Эти цистерны объединены в по меньшей мере три различных компартмепта (цис-, промежуточный и транс-компартмент) аппарата Гольджи. Белки из полости и мембраны ЭР переносятся на цис-сторону стопки Гольджи при помощи транспортных пузырьков. Белки, предназначенные для секреторных пузырьков, плазматической мембраны и лизосом, движутся последовательно от одной цистерны к другой. Наконец, они достигают транс-сети Гольджи, откуда каждый белок в составе специальных пузырьков отправляется к положенному месту.

В отличие от ЭР, аппарат Гольджи содержит много нуклеотид-сахаров. Различные гликозилтрансферазы используют их в качестве субстратов в реакциях гликозилирования белков и липидов, проходящих через аппарат Гольджи. Например, от N-связанных олигосахаридов отщепляются остатки маннозы, и добавляются дополнительные сахара - такие, как остатки N-ацетилглюкозамина, галактозы и сиаловой кислоты. Кроме того, в аппарате Гольджи происходит О-гликозилирование и превращение протеогликановых коровых белков в протеогликаны. Сульфатирование Сахаров в протеогликанах и некоторых остатков тирозина в белках тоже происходит именно в аппарате Гольджи.

8.8. Транспорт белков из аппарата Гольджи в лизосомы

В настоящее время полагают, что все белки, проходящие через аппарат Гольджи, кроме тех, которые остаются там в качестве постоянных компонентов, сортируются в соответствии с местом конечного назначения в транс-сеть Гольджи. Особенно хорошо механизм этой сортировки изучен для белков, направляющихся в полость лизосом. В данном разделе мы рассмотрим этот процесс избирательного транспорта. Начнем с краткого описания структуры и функции лизосом.

8.8.1. Внутриклеточное гидролитическое расщепление макромолекул происходит главным образом в лизосомах [53]

В 1949 г. при изучении ферментов углеводного обмена в гомогенатах клеток печени было замечено несколько «необычное» поведение кислой фосфатазы. Активность этого фермента в экстрактах, приготовленных на дистиллированной воде, оказалась выше, чем в экстрактах, приготовленных на изотоническом растворе сахарозы. В старых препаратах она была выше, чем в свежих, и, кроме того, в старых препаратах активность не была связана с осаждаемыми частицами. Вскоре появились такие же сообщения относительно некоторых других гидролитических ферментов. Все эти наблюдения привели к открытию новой органеллы, названной лизосомой. Она представляет собой мембранный мешок, наполненный гидролитическими ферментами, которые служат для контролируемого внутриклеточного расщепления макромолекул. Повреждение мембраны лизосом в клеточных экстрактах, вызванное осмотическим лизисом или старением препарата, приводит к высвобождению этих ферментов из лизосом в неосаждаемой форме.

Сейчас известно около 40 гидролитических ферментов, содержащихся



Рис. 8-69. Лизосомы определяют как окруженные мембранами пузырьки, участвующие во внеклеточном расщеплении веществ. Они содержат большое количество гидролитических ферментов, которые активны при кислом pH. В просвете лизосом кислый pH (около 5) поддерживается при помощи протонной помпы в мембране, которая использует энергию гидролиза ATP для накачки ионов H^+ внутрь пузырька.

в лизосомах. Это различные протеазы, нуклеазы, гликозидазы, липазы, фосфолипазы, фосфатазы и сульфатазы. Кроме того, все они - кислые гидролазы, обладающие наибольшей активностью при pH 5. Именно такое значение pH поддерживается в лизосомах. В норме мембрана лизосом не проницаема для этих ферментов, но даже в случае их утечки необходимость кислого pH для функционирования гидролаз защищает цитоплазму от разрушения.

Как и все клеточные органеллы, лизосомы не только содержат уникальный набор ферментов, но и окружены необычной, непохожей на остальные, мембраной. Эта мембрана, например, содержит транспортные белки, позволяющие продуктам расщепления макромолекул покидать лизосому, после чего они могут либо выделяться из клетки, либо использоваться внутри нее вторично. Кроме того полагают, что в мембране лизосомы находится специальный белок, использующий энергию ATP для накачки ионов H^+ в лизосому. Именно это поддерживает в полости данной органеллы pH около 5 (рис. 8-69). Большинство белков лизосомной мембраны необычно сильно гликозилированы, что, возможно, защищает их от действия протеаз в полости органеллы.

8.8.2. Лизосомы - это гетерогенные органеллы [54]

Лизосомы удалось четко визуализировать методом электронной микроскопии примерно через десять лет после того, как впервые были описаны их биохимические свойства. Лизосомы чрезвычайно разнообразны по форме и размеру, но могут быть идентифицированы как одно семейство органелл методами гистохимии. Для этого часто приходится анализировать нерастворимые продукты реакции какой-либо гидролазы с субстратом. В ходе такого исследования можно определить, какие именно органеллы содержат данный фермент (рис. 8-70). С помощью такого подхода лизосомы были обнаружены во всех эукариотических клетках. Морфологическая гетерогенность лизосом контрастирует с относительно однообразной структурой других органелл клетки. Эта гетерогенность отражает широкий спектр реакций расщепления, протекающих с участием кислых гидролаз, включая расщепление внутри- и внеклеточных отходов, переваривание фагоцитированных микроорганизмов и даже питание клетки (поскольку лизосомы - это основное место накопления холестерола из поступающих в клетку путем эндоцитоза сывороточных липопротеинов). На этом основании лизосомы иногда рассматривают как группу разнородных органелл, общим свойством которых является высокое содержание гидролитических ферментов.



Рис. 8-70. Электронная микрофотография двух срезов клетки, окрашенной для выявления кислой фосфатазы-маркерного фермента лизосом. Мембранные органеллы большего размера, содержащие электроноплотные преципитаты фосфата свинца, представляют собой лизосомы, а их разнообразная морфология отражает изменения количества и природы расщепляемых веществ. На верхнем фото показаны стрелками два маленьких пузырька, которые, вероятно, переносят гидролазы из аппарата Гольджи. Преципитаты образуются, когда ткань, зафиксированную глутаровым альдегидом (чтобы сохранить локализацию фермента) инкубируют с субстратом фосфатазы в присутствии ионов свинца. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

8.8.3. Существуют три пути поступления веществ в лизосомы [55]

Транспорт молекул в лизосомы происходит по-разному и зависит от источника этих молекул. Наиболее хорошо изучен путь, по которому идет расщепление материала, поглощенного путем эндоцитоза. Он включает окаймленные ямки, эндосомы, и, наконец, лизосомы. Как обсуждалось в гл. 6, поглощенные путем эндоцитоза молекулы проходят последовательно от периферических к перинуклеарным эндосомам. Те компоненты, которые не были извлечены из этих эндосом, чтобы вернуться в плазматическую мембрану, попадают затем в третий «промежуточный компартмент», получающий новосинтезированные лизосомные гидролазы и белки лизосомной мембраны из аппарата Гольджи. Поскольку среда в этом эндолизосомном компартменте слабокислая, полагают, что именно здесь начинается гидролитическое расщепление эндоцитированного материала. Для превращения эндолизосом в зрелые лизосомы необходимо, чтобы они утратили определенные компоненты мембран, а уровень pH внутри них еще понизился. Как происходит это превращение, неизвестно.

Существует и второй путь транспорта материала в лизосомы. Именно с ним связано разрушение отработанных частей самой клетки-процесс, называемый аутофагией. Известно, например, что в клетках печени среднее время жизни одной митохондрии составляет около 10 дней. На электронных микрофотографиях нормальных клеток можно увидеть лизосомы, содержащие митохондрии и секреторные пузырьки. Вероятно, это отработанные органеллы, которые должны быть утилизированы в лизосомах. Процесс деградации, по-видимому, начинается с окружения органеллы мембранами, происходящими из ЭР, в результате чего образуется аутофагосома. Затем, как полагают, аутофагосома сливается с лизосомой (или эндолизосомой), образуя аутофаголизосому, в которой уже начинается процесс деградации. Этот процесс хорошо отрегулирован; отдельные компоненты клетки могут направляться в лизосомы для расщепления по мере необходимости: например, гладкий ЭР, образовавшийся в клетках печени в ответ на лекарственные препараты, после

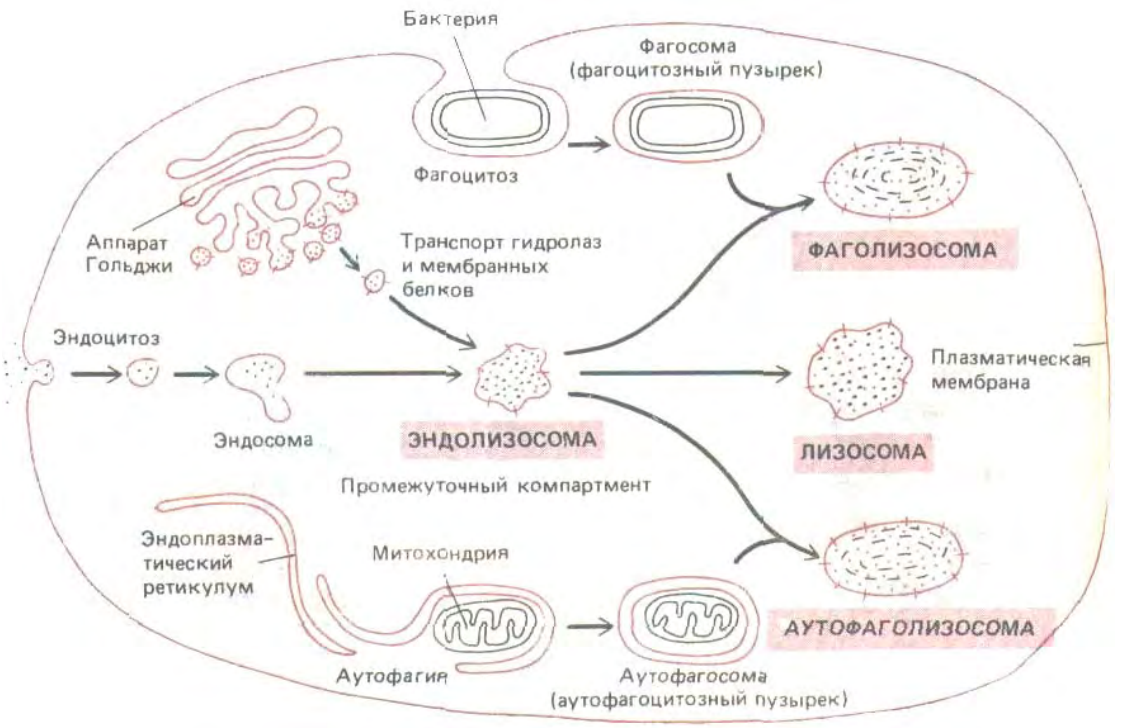


Рис. 8-71. Три возможных пути образования лизосом. В каждом случае образуются морфологически различные лизосомы, расщепляющие материал из разных источников. В центре этих путей находится «промежуточный компартмент», обозначенный здесь как эндолизосома.

До недавнего времени традиционно выделяли первичные лизосомы и вторичные лизосомы. Первым термином обозначали вновь образованные лизосомные пузырьки, еще не поглотившие никакого материала. Однако последние данные показывают, что лизосомные гидролазы и мембранные белки лизосом отбираются при помощи разных рецепторов, поэтому вероятнее, что они покидают аппарат Гольджи в отдельных транспортных пузырьках и впервые встречаются в эндолизосоме, которая уже содержит материал для расщепления.

выведения препарата из организма удаляется путем аутофагии (см. разд. 8.6.2)

Третий путь поступления материала в лизосомы имеется только у клеток, специализированных для фагоцитоза больших частиц и микроорганизмов. Такие клетки, как макрофаги и нейтрофилы, могут поглощать крупные объекты, образуя фагосомы (см. разд. 6.5.14). Предполагают, что фагосома превращается в фаголизосому тем же способом, который описан для аутофагосомы. Три вида транспорта молекул в лизосомы схематически изображены на рис. 8-71; три типа лизосом. образующихся при этом, могут не отличаться друг от друга ничем, кроме клеточного материала, который они расщепляют. Все чти по сути разнородные органеллы называют одним словом лизосомы.

8-37

8.8.4. Лизосомные ферменты сортируются в аппарате Гольджи мембраносвязанным белком-рецептором, узнающим маннозо-6-фосфат [56]

Для образования лизосом необходим синтез специфических лизосомных гидролаз и мембранных белков. И те, и другие белки синтезируются в ЭР и транспортируются через аппарат Гольджи. Транспортные пузырьки, доставляющие их в эндолизосомы, а затем в лизосомы, отделяются от транс-сети Гольджи. Эти пузырьки должны включать именно лизосомные белки и не включать множество других белков, которые упаковываются в другие транспортные пузырьки и доставляются в другие органеллы.

Каков механизм узнавания лизосомных белков? Что обеспечивает точность отбора? Собственно, эти же вопросы можно задать и в других случаях внутриклеточной сортировки, происходящей с участием транспортных пузырьков. На молекулярном уровне ответ известен только для одного класса ферментов-лизосомных гидролаз. Они имеют уникальный маркер- маннозо-6-фосфат. который присоединяется к N-связанным олигосахаридам этих растворимых лизосомных ферментов. Реакция протекает в пространстве цис-компартмента Гольджи. Соответствующие маннозофосфатные рецепторы группируются на мембране и затем концентрируются в покрытых клатрином окаймленных пузырьках. Они также были выделены и охарактеризованы. Оказалось, что эти рецепторы представляют собой трансмембранные белки, которые связывают лизосомные ферменты, отделяя их таким образом от всех остальных белков и собирая в окаймленные транспортные пузырьки. Эти пузырьки быстро теряют свою кайму и сливаются с эндолизосомами.

В некоторых клетках небольшое количество рецепторов маннозо-6-фосфата присутствует в плазматической мембране, где они участвуют в эндоцитозе лизосомных ферментов, которые были выделены во внеклеточную среду. Благодаря этим рецепторам ферменты через окаймленные ямки попадают к эндосомам, а оттуда к лизосомам. Таким необычным путем, с помощью «старьевщиков» и доставляются в лизосомы гидролазы, которые избежали процесса упаковки в транс-сети Гольджи и были поэтому транспортированы к клеточной поверхности и выведены наружу.

8.8.5. Рецептор маннозо-6-фосфата «курсирует» между специализированными мембранами [57]

Маннозофосфатный рецептор был очищен и охарактеризован в экспериментах in vitro. Оказалось, что он связывает специфический олигосаха-

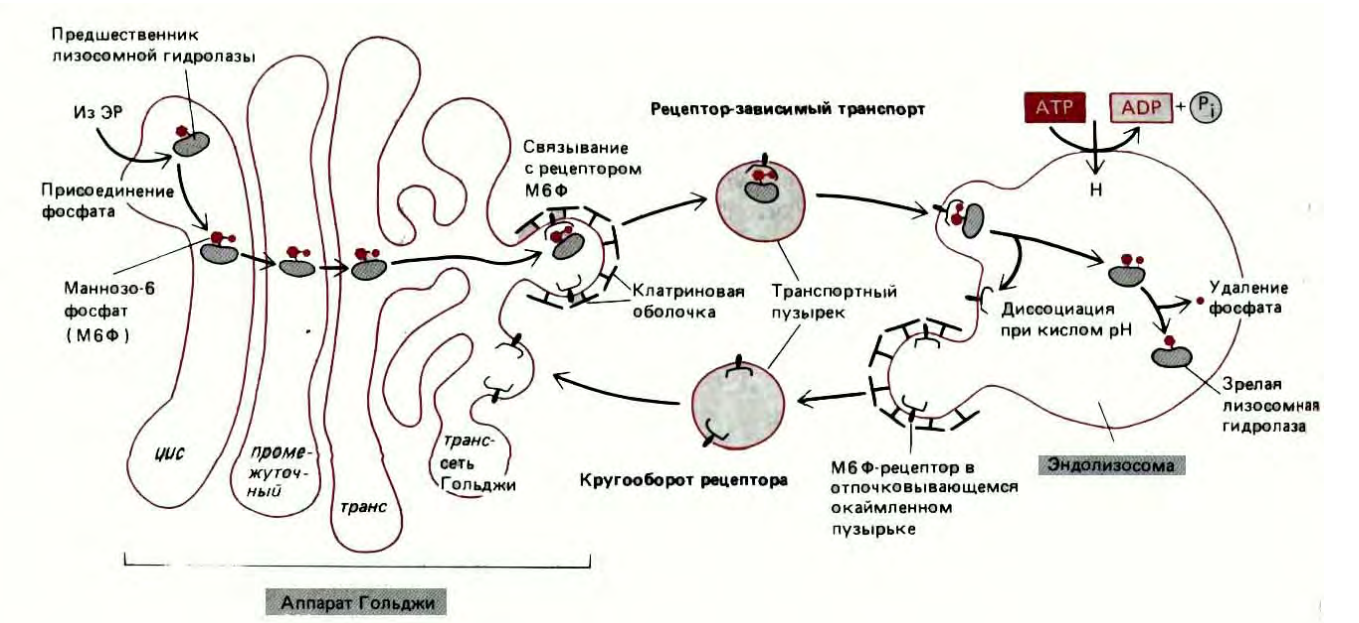


Рис. 8-72. Транспорт вновь образованных лизосомных гидролаз в лизосомы. В цис-аппарате Гольджи предшественники лизосомных гидролаз «метятся» при помощи ман-нозо-6-фосфатных групп, а в транссети Гольджи отделяются от других типов белков. Это отделение происходит потому, что отпочковывающиеся от транс-сети Гольджи клатриновые окаймленные пузырьки содержат рецепторы маннозо-6-фосфата, связывающие лизосомные гидролазы. Пузырьки утрачивают «кайму» и сливаются с эндолизосомами (см. рис. 8-71). При низком pH, который существует в эндолизосомах, гидролазы отщепляются от рецепторов. Рецепторы возвращаются в аппарат Гольджи для проведения повторных циклов транспорта. Вероятность возвращения гидролазы в аппарат Гольджи вместе с рецептором сильно снижается за счет удаления фосфата от маннозного остатка. Хотя существует два структурно различных маннозо-6-фосфат-ре-цепторных гликопротеина, сильно отличающихся по размерам, они имеют сходную аминокислотную последовательность и, вероятно, выполняют сходные функции.

рид при pH7 и отщепляет его при pH6; именно такой pH существует внутри эндолизосом. Лизосомные ферменты в эндолизосоме отделяются от белка-рецептора маннозо-6-фосфата и начинают расщеплять поглощенный материал, содержавшийся в эндосомах. Отделившись от «своих» ферментов, рецепторы восстанавливают структуру и возвращаются в мембрану транс-сети Гольджи, возможно, в составе окаймленных пузырьков (рис. 8-72). Такой механизм возвращения мембран из эндолизосом обратно в аппарат Гольджи весьма напоминает круговорот мембран между эндосомами и плазматической мембраной при опосредованном рецепторами эндоцитозе (см. разд. 6.5.10). Опосредованный рецепторами транспорт лизосомных гидролаз из аппарата Гольджи к эндолизосомам аналогичен эндоцитозу внеклеточных молекул, направляющему их от плазматической мембраны в эндосомы. В обоих случаях рецепторы собираются в покрытых клатрином участках мембраны (называемых окаймленными ямками); эти участки отшнуровываются от мембраны, образуя покрытые клатрином окаймленные пузырьки. Пузырьки доставляют затем лиганд к следующему компартменту, имеющему кислую среду, и оттуда рецепторы возвращаются в исходную мембрану.

Круговорот маннозофосфатного рецептора был прослежен с помощью специфических антител, позволяющих локализовать этот белок в клетке. В норме рецепторы маннозо-6-фосфата обнаруживают в мембранах аппарата Гольджи и эндолизосом, но не в зрелых лизосомах. Если некоторые культивируемые клетки обработать слабым основанием (например аммиаком или хлорохином), которое накапливается внутри органелл с кислой средой и поднимает там pH до нейтрального, то рецепторы исчезают из аппарата Гольджи и появляются в эндолизосомах. Можно вызвать в таких клетках возвращение рецепторов в аппарат Гольджи, либо удалив слабое основание, либо добавив в культуральную среду большое количество маннозо-6-фосфата. При обоих воздействиях рецептор отделяется от связанного с ним фермента в эндолизосоме, в одном случае в результате вторичного закисления среды в органелле, а в другом - за счет конкурентного связывания с рецептором поглощенного маннозо-6-фосфата. Эти эксперименты свидетельствуют о том, что перемещению рецептора обратно в аппарат Гольджи способствует его конформационное изменение, связанное с отщеплением гидролазы.

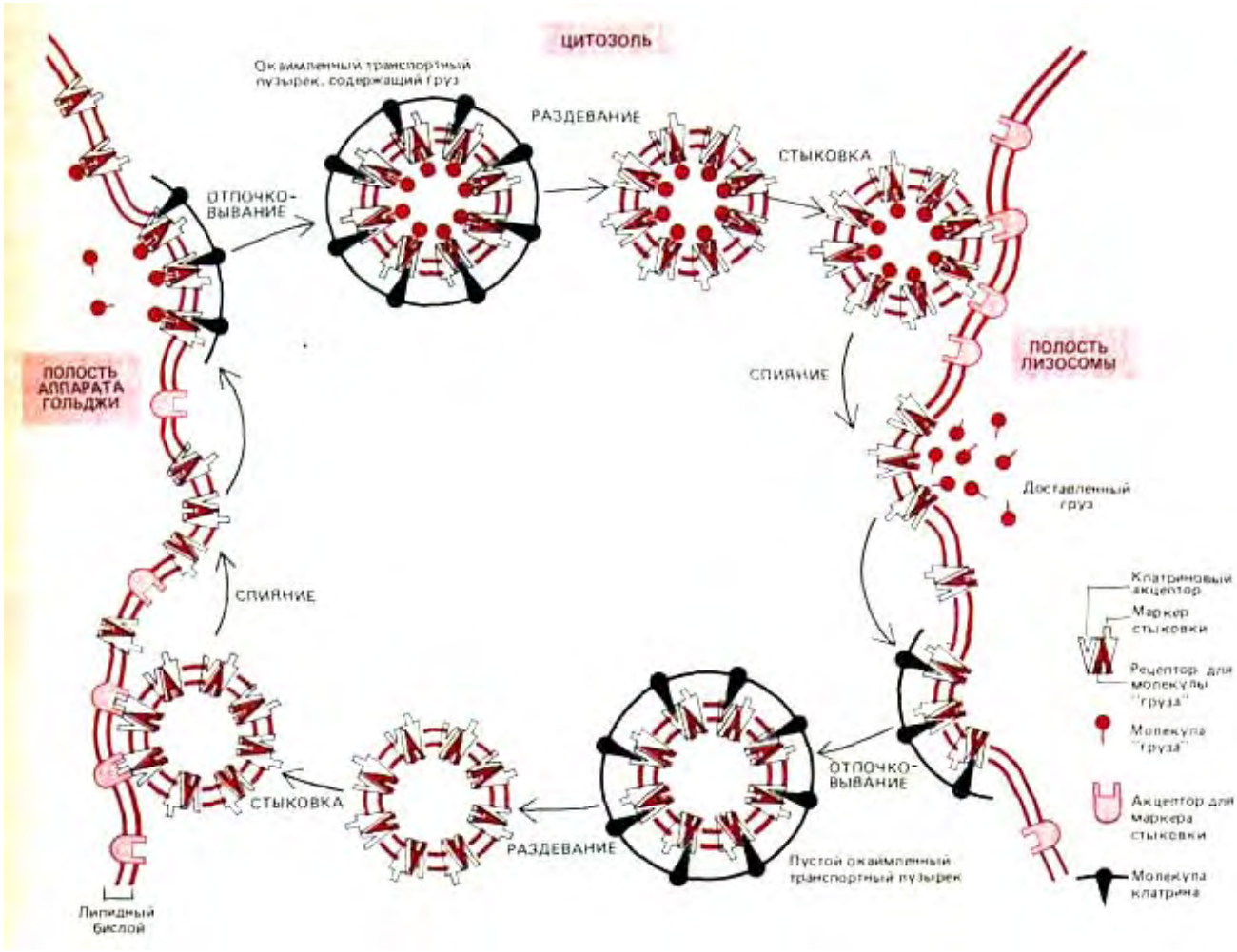


Рис. 8-73, Один из возможных механизмов, позволяющих направлять окаймленные транспортные пузырьки к определенной внутриклеточной мембране. В этой гипотетической модели молекулы «груза» - это лизосомные гидролазы, а «приемщик груза»-это белок-рецептор маннозо-6-фосфата. Изображенные здесь молекулы «маркера стыковки» и «приемщика» пока еще не охарактеризованы. Однако недавно открытые клатрин-связывающие белки, которые также связывают цитоплазматические «хвосты» некоторых мембранных белков, удовлетворяют данному здесь описанию молекул-«приемщиков». (См. Pearse, B.M., EMBO J. 7: 3331-3336, 1988.)

Челночная система для рецептора маннозо-6-фосфата, изображенная на рис. 8-72, является специфичной - пузырьки, несущие этот рецептор, сливаются только с нужными органеллами-мишенями, а не, к примеру, с мембранной ЭР. Считают, что клатриновая кайма на формирующихся пузырьках действует подобно «молекулярному фильтру», изолирующему рецептор и его лиганд внутри пузырьков. Однако клатрин не может отвечать за специфичность доставки пузырьков, так как кайма удаляется вскоре после их образования. Эксперименты in vitro показывают, что удаление клатрина катализируется htp70-подобным белком, а соответствующая реакция требует гидролиза ATP. Один или несколько белков, остающихся экспонированными на внешней стороне мембраны пузырька, вероятно служат специфическими «сигналами погрузки», которые узнаются комплементарным «приемщиком» на мембране органеллы-мишени.

Изучение механизмов сортировки лизосомных гидролаз весьма расширило наши представления о многих протекающих в клетках эукариот процессах переноса веществ с помощью транспортных пузырьков. Неважно, что олигосахаридные маркеры, по-видимому, больше нигде не используются, все остальные события-распознавание «груза» мембранным рецептором при отпочковании пузырька, слияние пузырька со специфичной мембраной-мишенью, высвобождение «груза» в компарт-

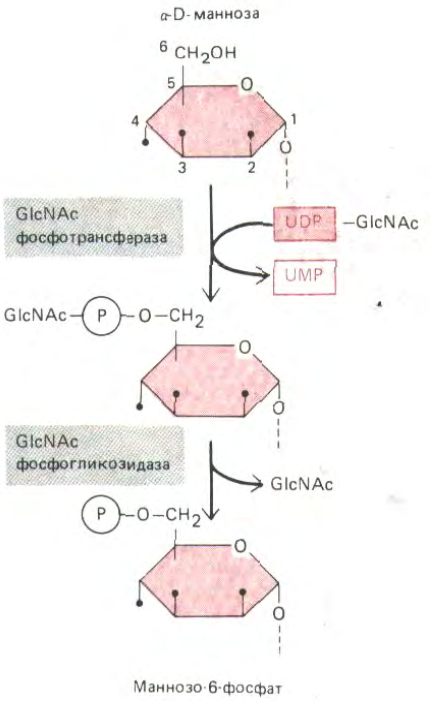


Рис. 8-74. Образование маннозо-6-фосфатного маркера на лизосомной гидролазе происходит в два этапа. Сначала GlcNAc-фосфотрансфераза присоединяет P-GlcNA.c к 6-му углеродному атому некоторых остатков маннозыг N-связапного олигосахарида, связанного с лизосомным гликопротеином-предшественником. Затем фосфогликозидаза отрезает остаток GlcNAc и в результате образуется маннозо-6-фосфатный маркер. Первый фермент специфически активируется сигнальным участком на лизосомных гидролазах (см. рис. 8-75), тогда как фосфогликозидаза является неспецифическим ферментом. Такая модификация некоторых остатков маннозы в *цис*-компартменте Гольджи защищает их от действия маннозидаз, которые встретятся позже, в *промежуточном* ком-партменте аппарата Гольджи.

мент-мишень и возвращение освободившегося рецептора в исходный компартмент-вероятно, являются общими для всех видов везикулярного транспорта.

8.8.6. Присоединение к лизосомному ферменту нескольких групп маннозо-6-фосфата усиливает сигнал сортировки [58]

Система отделения лизосомных гидролаз и отправки их в эндолизосомы работает благодаря тому, что маннозофосфатные группы добавляются в аппарате Гольджи только к определенным гликопротеинам. Для этого требуется специфическое узнавание гидролаз ферментами аппарата Гольджи, ответственными за присоединение маннозо-6-фосфата (М6Ф). Поскольку все гликопротеины, попадающие в компартмент Гольджи, имеют идентичные N-связанные олигосахаридные цепи, сигнал, по которому к олигосахариду добавляется М6Ф, должен находиться в самой полипептидной цепи каждой гидролазы.

Для присоединения маннозофосфатных групп к лизосомным гидролазам необходима последовательная работа двух ферментов. N-ацетилглюкозамин-фосфотрансфераза (GlcNAc-фосфотрансфераза) переносит GlcNAc-P-часть молекулы нуклеотид-сахара UDP-GlcNAc к остатку маннозы в олигосахарпде, а второй фермент - фосфогликозидаза-затем удаляет концевой GlcNAc, оставляя фосфат, в результате образуется маннозо-6-фосфат М6Ф (рис. 8-74). Фосфотрансфераза специфически связывается с гидролазой благодаря участку (или сайту) узнавания, не совпадающему с *активным центром* этой реакции (рис. 8-75). По-видимому, в данном случае сигнал для сайта узнавания представляет собой сигнальный участок, а не сигнальный пептид (см. разд. 8.1.6). Об этом свидетельствует тот факт, что при частичном

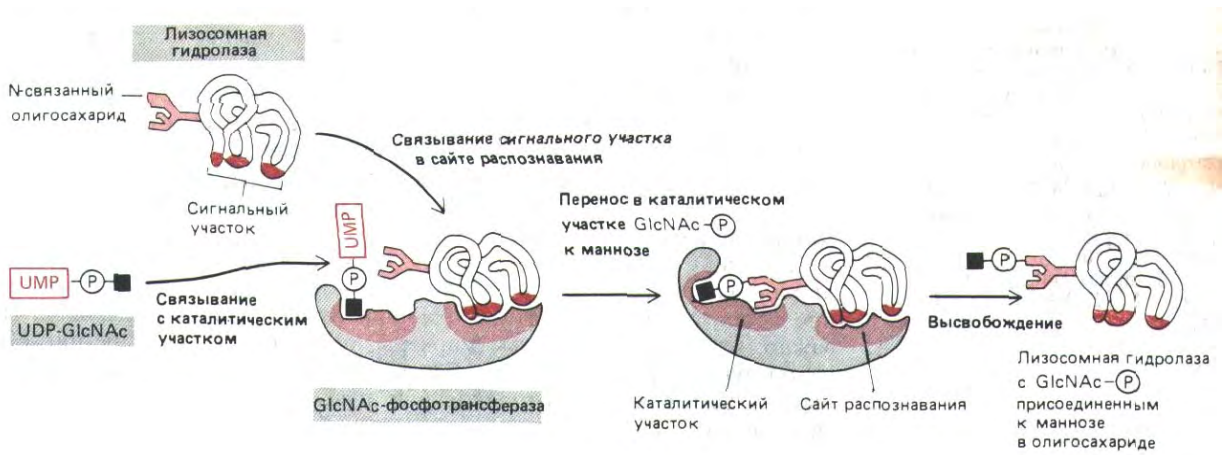


Рис. 8-75. У фермента GlcNAc-фосфотрансферазы, узнающей лизосомные гидролазы в аппарате Гольджи, участок узнавания и активный центр не совпадают. В активном центре связываются богатые маннозой N-связанные олигосахариды и UDP-GlcNAc. Сайт узнавания объединяется с сигнальным участком, имеющимся только на поверхности лизосомных гидролаз и их предшественников.

разворачивании гидролазы распознавание практически прекращается.

Как только фосфотрансфераза узнает сигнал на гидролазе, она присоединяет GlcNAc-P к одному или двум маннозным остаткам в каждой олигосахаридной цепи. Поскольку большинство лизосомных гидро-лаз несут многочисленные олигосахариды, они приобретают много остатков М6Ф, что приводит к многократному усилению сигнала. Если при связывании обычной лизосомной гидролазы с сайтом узнавания фосфотрансферазы K_a составляет 10^5 л моль, то для множественно фосфорилированной гидролазы и маннозофосфатного рецептора соответствующий показатель равен 10^4 л/моль, т.е. их связь в 10000 раз прочнее.

8-38

8.8.7. Дефекты GlcNAc-фосфотранеферазы вызывают у человека лизосомные болезни накопления [59]

Лизосомные долети накопления сыграли решающую роль в раскрытии механизма сортировки лизосомных гидролаз. Эти болезни обусловлены генетическими нарушениями, в результате которых одна или несколько лизосомных гидролаз оказываются дефектными. Нерасщепленный субстрат такой гидролазы накапливается в лизосомах, что и обусловливает патологию. Обычно такие болезни вызываются мутацией в структурном гене, кодирующем отдельную гидролазу. Наиболее тяжелые симптомы характеризуют редкую форму патологии, называемую *1-клеточной болезнью* (inclusion cell disease). У таких больных в лизосомах фиброблас-тов отсутствуют почти все гидролитические ферменты, а соответствующие нерасщепленные субстраты накапливаются в клетках в виде крупных «включений». I-клеточная болезнь обусловлена рецессивной мутацией единственного гена. Это означает, что она проявляется только у людей, получивших дефектные копии гена от обоих родителей.

При изучении 1-клеточной болезни оказалось, что в лизосомах все гидролазы отсутствуют, но в крови они обнаруживаются. Из этого следует, что структурные гены, кодирующие их, не повреждены. Аномалия в данном случае вызвана нарушениями процесса сортировки в аппарате Гольджи, в результате чего гидролазы вместо того, чтобы поступать в лизосомы, секретируются. Неправильная сортировка происходит из-за повреждения или отсутствия GlcNAc-фосфотранеферазы. Лизосомные ферменты в таких клетках не фосфорилируются и маннозофос-фатный рецептор не может собрать их в окаймленные пузырьки в *транссети* 1 ольджи. Вместо этого они доставляются к клеточной поверхности и секретируются. Те олигосахариды, которые у нормальных лизосомных ферментов содержали бы М6Ф, превращаются в олигосахариды «сложного» типа, содержащие GlcNAc, галактозу и сиаловую кислоту. Это показывает, что в норме фосфорилирование маннозы в г^мс-компартменте Гольджи предотвращает последующий процессинг олигосахаридов гидролаз в сложные формы в *промежуточном* и ш/?«нокомпартментах Гольджи.

Интенсивные исследования биохимического механизма 1-клеточной болезни в конце 60-х гг. натолкнули на мысль о том, что все лизосомные ферменты имеют общий маркер. В конце 70-х гг. при сравнении гидролаз у нормальных и больных людей было установлено, что им является маннозо-6-фосфат. Вскоре после этого удалось выделить и очистить рецептор маннозо-6-фосфата, GlcNAc-фосфотрансферазу, кроме того была выяснена роль аппарата Гольджи в механизме сортировки лизосомных гидролаз.

При 1-клеточной болезни лизосомы в клетках некоторых типов, например, в гепатоцитах, содержат нормальный набор лизосомных

ферментов. Это означает, что существует и другой механизм, направляющий гидролазы в лизосомы, который используется в одних клетках и не используется в других. Природа этого М6Ф-иезависимого пути в настоящее время неизвестна. Возможно, в данном случае сортировка гидролаз происходит путем прямого узнавания их сигнальных участков. Подобный МбФ-независимый путь существует во всех клетках в *транс-сети* Гольджи для сортировки лизосомных мембранных белков и направления их в эндолизосомы. Непонятно, почему клетке необходим более чем один способ построения лизосом.

Заключение

Лизосомы специализируются ни внутриклеточном расщеплении веществ. Они содержат уникальные мембранные делки и большое количество разных гидролитических ферментов, которые лучше всего работают при кислых точениях pH (pH5), характерных для содержимого лизосо.м. Кислый pH в лизосомах поддерживается при помощи ATP-зависимой протонной помпы в их мембранах. Вновь синтезированные белки лизосом переносятся в полость ЭР, затем транспортируются через аппарат Гольджи и из транс-сети Голъджи с помощью транспортных пузырьков доставляются в промежуточный компартмент (эндолизосому).

Лизосомные гидролазы содержат N-связанные олигосахариды, которые модифицируются в цис-компартменте Гольджи таким образом, что их остатки маннозы фосфори.шруются. Эти маинозо-6-фосфатньк (М6Ф) группы узнаются в транс-сети Гольджи М6Ф-рецептором, который отбирает гидролазы и помогает упаковывать их в отпочковывающиеся покрытые клатрином пузырьки. Транспортные пузырьки, содержащие рецептор маннозо-6-фосфата. действуют подобно челнокам, доставляя рецептор от транс-сети Гольджи к эндолизосомам и обратно. Низкий уровень pH в эндолизосомах вызывает диссоциацию комплекса лизосомной гидролазы и рецептора, делая транспорт гидролаз однонаправленным.

8.9. Транспорт из аппарата Гольджи к секреторным пузырькам и к клеточной поверхности [60]

В норме от аппарата Гольджи непрерывным потоком отделяются транспортные пузырьки, предназначенные для немедленного слияния с плазматической мембраной. Трансмсмбранные белки и липиды пузырьков обеспечивают клеточную мембрану новыми белками и липидами, а растворимые белки пузырьков секретируются во внеклеточное пространство. Таким способом клетка производит, например, протеогликаны и белки внеклеточного матрикса (см. разд. 14.2).

Такая **конститутивная секреция** существует во всех типах клеток, но в специализированных секреторных клетках имеется еще один способ секреции, при котором растворимые белки и другие вещества сначала накапливаются в секреторных гранулах, а затем по сигналу высвобождаются позднее (так называемая *переключаемая,* или **регулируемая секреция** (рис. 8-76).

В данном разделе мы проанализируем роль аппарата Гольджи в этих двух типах секреции и сравним участвующие в их реализации механизмы. Мы рассмотрим также, каким образом вирусы используют сортировочный аппарат клетки-хозяина и чем вообще вирусные частицы могут быть полезны при выяснении различных путей транспорта веществ внутри клетки.

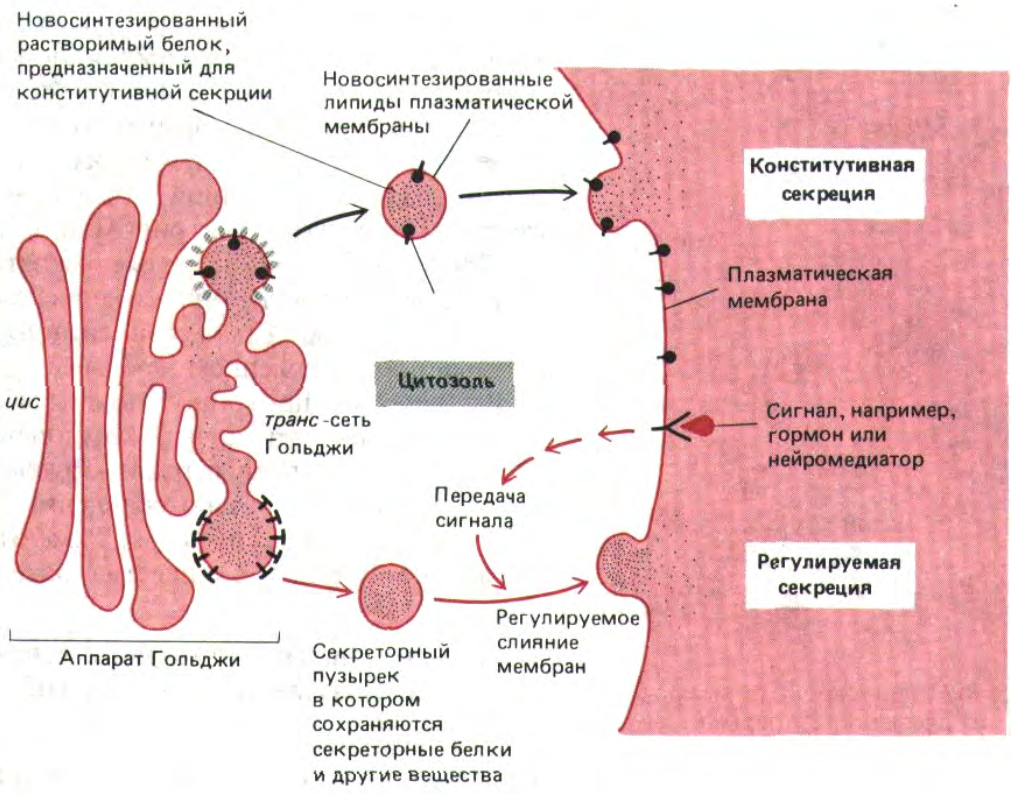


Рис. 8-76. Пути регулируемой и конститутивной секреции расходятся в *транс-сети* Гольджи. Многие растворимые белки непрерывно выводятся из" клетки по *конститутивному секреторному пути,* который существует во всех клетках. Этот же механизм снабжает плазматическую мембрану вновь синтезированными липидами и трансмембранными белками. Специализированные секреторные клетки имеют еше и *регулируемый секреторный механизм, с* помощью которого определенные белки в транс-сети Гольджи направляются в секреторные пузырьки. В них белок концентрируется и хранится до тех пор, пока не будет получен внеклеточный сигнал, вызывающий их секрецию.

8-41

8.9.1. Секреторные пузырьки отпочковываются от *транс*-сети Гольджи [61]

В клетках, в которых секреция происходит в ответ на внеклеточный сигнал, секретируемые белки концентрируются и хранятся в **секреторных пузырьках** (их часто называют *секреторными гранулами* из-за темной сердцевины). При получении соответствующего сигнала они высвобождаются путем экзоцитоза. Секреторные пузырьки отпочковываются от *транс-сети* Гольджи. Полагают, что для их образования нужен клатрин и связанные с ним белки, создающие «кайму», потому что часть поверхности формирующихся пузырьков обычно покрыта клатрином. Эта кайма удаляется вскоре после того, как пузырек полностью сформируется (рис. 8-77).

Подобно лизосомным гидролазам, описанным в предыдущем разделе, белки, предназначенные для секреторных пузырьков (их часто называют *секреторными белками)* должны быть отобраны и упакованы в соответствующие пузырьки в *транс*-сети Гольджи. По-видимому, в этом случае происходит избирательная агрегация секреторных белков. Образовавшиеся агрегаты в электронном микроскопе выглядят как электроноплотный материал в *транс-сети* Гольджи. «Сигнал сортировки», направляющий белок к таким агрегатам, неизвестен, но, видимо, это сигнальный участок, общий для многих секреторных белков. Такой вывод подтверждается следующими данными: если ген, кодирующий секреторный белок, перенести в секреторную клетку другого типа, в норме не синтезирующую данный белок, то чужой белок будет также упаковываться в секреторные пузырьки.

Неизвестно, каким образом при образовании секреторных пузырьков отбираются агрегаты, содержащие секреторные белки. Секреторные пузырьки имеют уникальные мембранные белки, часть из которых может служить рецепторами (в *транс-сети* Гольджи) для связывания агрегированного материала, подлежащего упаковке. Заметим, что секреторные пузырьки больше транспортных пузырьков, переносящих ли-

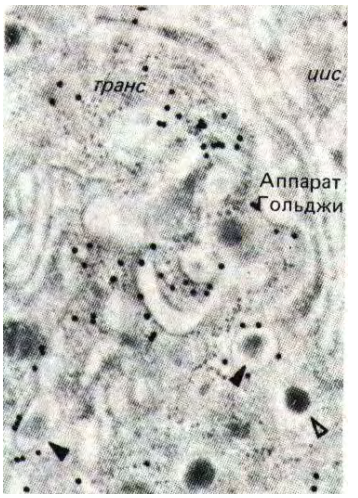


Рис. 8-77. Электронная микрофотография секреторных пузырьков, образующихся из *транс-сети* Гольджи в клетках поджелудочной железы, секретирующих инсулин. Для локализации молекул клатрина были использованы антитела, конъюгированные с частицами коллоидного золота *(черные точки}*. Незрелые секреторные пузырьки *(черные стрелки),* содержащие молекулы проинсулина, покрыты клатрином. Как только пузырек сформируется, клатриновая кайма быстро сбрасывается, и в зрелых секреторных пузырьках *(светлые стрелки)* она отсутствует. (Микрофотография любезно предоставлена Lelio Orel.)

зосомные тидролазы, и агрегаты, которые в них содержатся, слишком велики для того, чтобы каждая молекула секретируемого белка могла связаться с рецептором в мембране пузырька, как это происходит при транспорте лизосомных ферментов (см. рис. 8-73). Захват этих агрегатов секреторными гранулами скорее напоминает поглощение частиц при фагоцитозе на клеточной поверхности, которое также происходит с участием покрытых клатрином мембран.

После того, как незрелые секреторные пузырьки отпочкуются от *транс-сети* Гольджи, они утрачивают кайму, и их содержимое сильно концентрируется. Такая конденсация происходит резко и, возможно, вызывается закислением среды в полости пузырька за счет работы АТР-зависимой протонной помпы в его мембране. Агрегация секретируемых белков (или других компонентов) и последующая их конденсация в секреторных пузырьках обусловливает увеличение концентрации этих белков в 200 раз по сравнению с аппаратом Гольджи. Благодаря этому секреторные пузырьки имеют возможность высвобождать по «команде» большие количества материала.

8.9.2. Компоненты мембраны секреторных пузырьков используются вторично [62]

Многие секреторные клетки, такие, как ацинарные клетки поджелудочной железы, поляризованы, и экзоцитоз протекает только на их апикальной поверхности. Апикальная часть клеток обращена обычно в просвет системы протоков, собирающей секрет. Когда секреторный пузырек сливается с плазматической мембраной, его содержимое выбрасывается из клетки путем экзоцитоза, а мембрана становится частью плазматической мембраны (см. разд. 6.5.1). Это должно было бы сильно увеличивать поверхность плазматической мембраны. В действительности такое увеличение возникает очень ненадолго, потому что участки мембраны удаляются с поверхности путем эндоцитоза (или *рециркулируют)* почти с той же скоростью, с которой они добавляются при, экзоцитозе (рис. 8-78). Очевидно, что при таком удалении мембранные белки секреторных пузырьков возвращаются в аппарат Гольджи, где

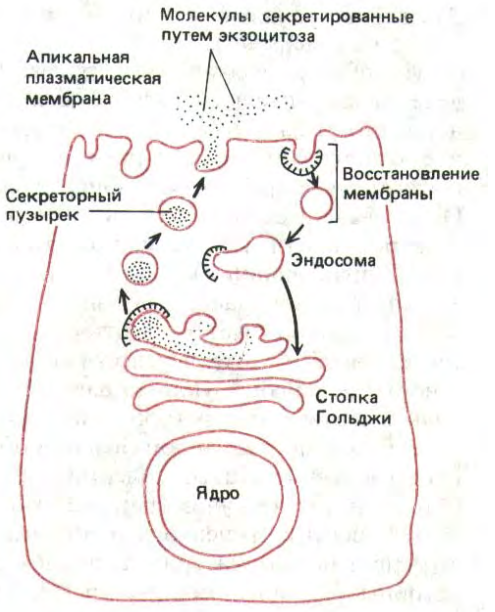


Рис. 8-78. После того, как секреторный пузырек сольется с плазматической мембраной в апикальной части клетки, его мембрана возвращается в круговорот. Количество мембран, добавляемых к плазматической мембране в процессе регулируемой секреции, может быть огромным. Но из нее все время образуются и возвращаются в *транс-сеть* Гольджи (возможно, через эндосомы) клатриновые окаймленные пузырьки; за счет этого поддерживается постоянная площадь апикальной поверхности клетки.

они могут быть использованы вторично. Рециркуляция обеспечивает постоянное распределение компонентов мембран между различными клеточными компартментами.

8.9.3. В неполиризованных клетках белки и липиды, по-видимому, автоматически переносятся от ЭР и аппарата Гольджи к клеточной поверхности [63]

В клетках, способных к регулируемой секреции, белки, перед тем, как покинуть *транс-сеть* Гольджи, должны быть рассортированы по крайней мере на три группы. Первая из них включает белки, предназначенные для эндолизосом; вторая - белки, предназначенные для секреторных пузырьков, и наконец, в третью группу входят белки, которые прямо добавляются к клеточной поверхности. Белки, направляющиеся в эндолизосомы, отбираются для упаковки в пузырьки по сигналу (для лизосомных гидролаз им служит МбФ); каждый белок, поступающий в секреторные пузырьки, также должен иметь специальный сигнал. Возможно, белки третьей группы транспортируются к поверхности клетки «неизбирательным» образом (рис. 8-79). Существует гипотеза, согласно которой в неполяризованных клетках (к ним относятся лейкоциты и большинство культивируемых клеток) любой белок из ЭР, если он не будет оставлен в качестве постоянного компонента этой органеллы, аппарата Гольджи или отобран для специфичного транспорта, будет автоматически переноситься к клеточной поверхности. Привлекательность этой гипотезы состоит в ее простоте и в том, что она объясняет, каким образом поврежденные или неправильно адресованные белки выводятся из клетки.

Была предпринята попытка экспериментально проверить возможность такого неизбирательного «поточного» транспорта к плазматической мембране. Для этого клетки в культуре инкубировали с простым трипептидом (Asn-Tyr-Thr), содержащим сигнал гликозилирования Asn-X-Thr. Этот маленький пептид может проникать в клетки и через внутриклеточные мембраны; в полости ЭР он гликозилируется по аспарагиновому остатку. Добавление N-связанного олигосахарида предотвращает обратную диффузию данного трипептида в цитозоль. Вместо этого он транспортируется в одном направлении из ЭР в аппарат Гольджи и затем к клеточной мембране. Это происходит примерно за 10 минут, что совпадает со скоростью транспорта наиболее «быстрых» белков плазматической мембраны. Полученный результат согласуется

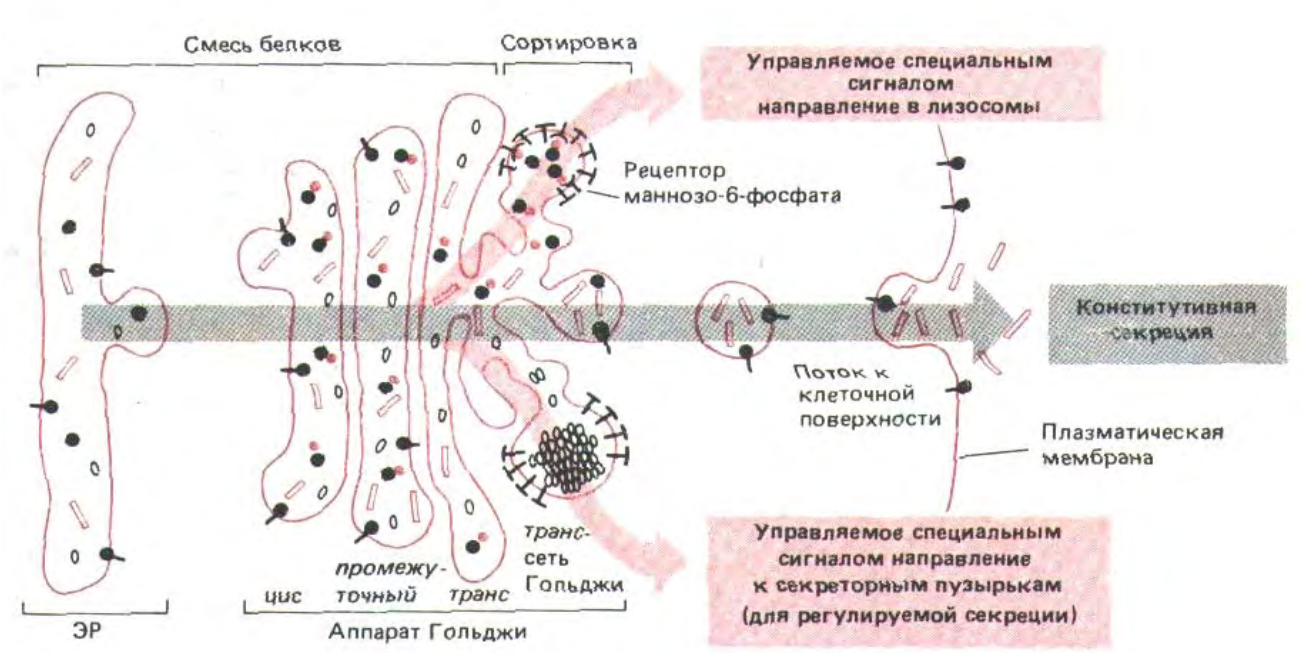


Рис. 8-79. Наиболее хорошо изученные пути сортировки белков в *транс*-сети Гольджи. Белки с ман-нозо-6-фосфатным маркером направляются в лизосомы (через эндолизосомы) в составе клатрино-вых окаймленных пузырьков (см. рис. 8-72). Белки, предназначенные для секреции, концентрируются в больших, покрытых клатрином окаймленных пузырьках, которые, утратив кайму, превращаются в секреторные пузырьки - путь, существующий только в специализированных секреторных клетках. Полагают, что в неполяризованных клетках белки, не имеющие специальных сигналов, направляются к поверхности клетки «по умолчанию» в процессе конститутивной *секреции. В* поляризованных клетках секретируемые белки и белки плазматической мемраны направляются избирательно к апикальной или базолатеральной части плазматической мембраны, и поэтому хотя бы один из этих потоков должен регулироваться специфическими сигналами.

с гипотезой о том, что существует неизбирательный поток жидкости, заполняющей полость органелл. который автоматически доставляет любую растворимую молекулу из ЭР к клеточной поверхности (если только она не остается в органелле или не направляется по сигналу куда-либо еще).

В принципе тот же неизбирательный поток может доставлять к клеточной поверхности трансмембранные белки и липиды, которые утратили сигналы сортировки. Он может также переносить белки, предназначенные для секреторных пузырьков, от ЭР к концу аппарата Гольд-жи. ведь специфические сигналы, отличающие эти белки от белков, направляющихся к плазматической мембране, требуются только в *транс-сети* Гольджи. Возможно, для того, чтобы белок остался в ЭР или аппарате Гольджи. необходим специальный механизм сортировки (см. разд. 8.1.5). Полученные недавно данные о том. что некоторые постоянные белки ЭР (включая BIP и протеиндисульфидизомеразу) содержат сигнальный пептид, ответственный за их пребывание в ЭР (см. разд. 8.1.7). подтверждают этот общий взгляд на транспорт белков внутри клетки.

Некоторые конститутивно секретируемые белки затрачивают много времени, чтобы покинуть ЭР и секретироваться. Чтобы увязать эти данные с гипотезой неизбирательного потока, предположили, что таким белкам необходимо время, чтобы правильно свернуться, и поэтому они долго удерживаются в ЭР либо за счет того, что пронизывают мембрану ЭР, либо за счет связи со специальными белками типа BIP. Как только они свернутся правильным образом, эти белки тоже попадают в неизбирательный поток.

8-42

8.9.4. Поляризованные клетки могут направлять белки из аппарата Гольджи к определенному участку плазматической мембраны [64]

Большинство клеток в тканях поляризованы, а их плазматическая мембрана состоит из двух (а иногда и большего числа) различных доменов или частей. Например, типичная эпителиальная клетка имеет две физически непрерывных, но различных по составу части клеточной мембраны (см. рис. 6-36): *апикальная часть* обращена в полость органа и часто несет специальные приспособления, такие, как реснички или щеточная каемка микроворсинок; *базолатеральная часть* покрывает всю остальную клетку. Эти две части соединены по границе кольцом *плотных контактов* (см. разд. 14.1.1). которые не позволяют белкам (и липидам внешней половины липидного бислоя) диффундировать из одной части мембраны в другую. Вот почему, хотя обе части мембраны и видны в электронный микроскоп как единое целое, они надежно изолированы друг от друга плотными контактами и содержат разные наборы белков. Липидный состав двух бислоев тоже различен, в частности, гликолипиды встречаются только в апикальной части мембраны. Существуют убедительные данные, показывающие, что и набор белков, секретируемых с апикальной и базолатеральной поверхности эпителиальной клетки, тоже различен. Следовательно, в поляризованных клетках должны существовать механизмы, специфически направляющие как мембранные, так и секретируемые белки к определенному домену плазматической мембраны. В опытах по культивированию поляризованных клеток удалось установить, что белки, предназначенные для разных доменов, вместе проходят путь от ЭР до *транс-сеть* Гольджи, где они сортируются и направляются в составе секреторных или транспортных пузырьков к соответствующим участкам клеточной

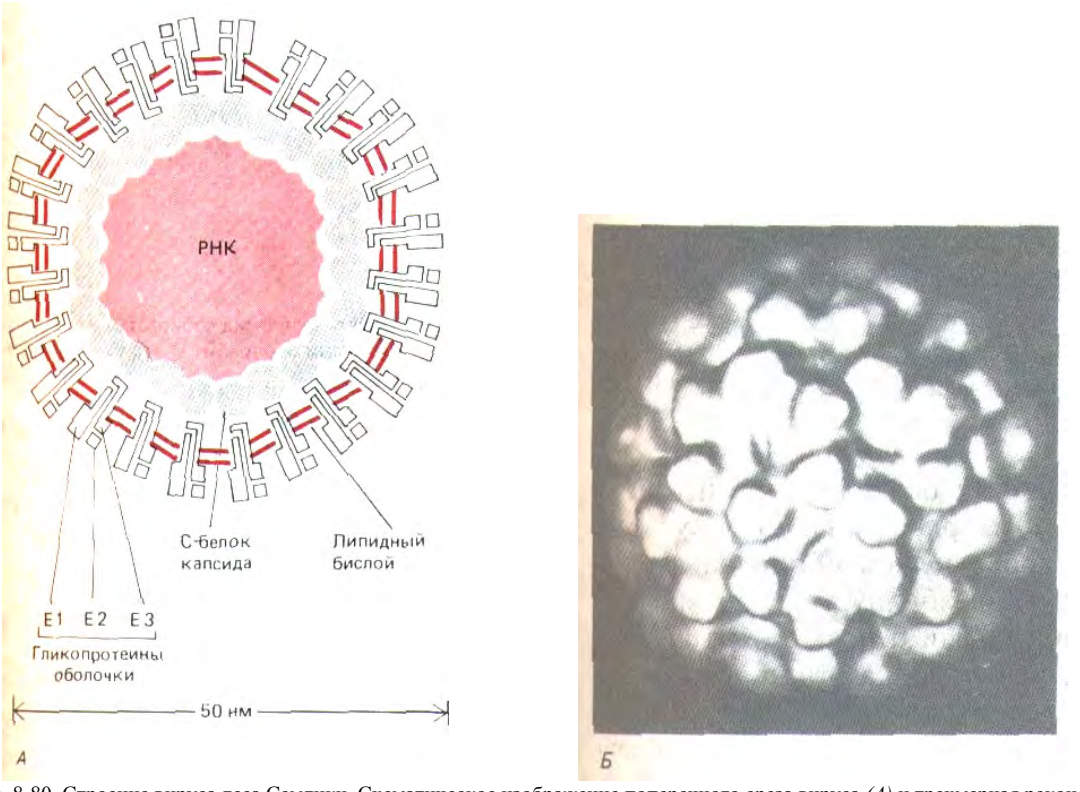


Рис. 8-80. Строение вируса леса Семлики. Схематическое изображение поперечного среза вируса *(А)* и трехмерная реконструкция его поверхности, полученная на основе криоэлектронных микрофотографий неокрашенных препаратов (Б). На каждую вирусную частицу приходится 180 копий белка С-капсида (собранных в 60 тримеров) и 240 копий каждого из трех белков оболочки (собранных в 80' тримеров}. Внешняя оболочка вируса состоит из белков оболочки, заключенных н двухслойную липидную мембрану. Вирус имеет общую массу 46 миллионов дальтон. *(Б-но* S. Fuller, Cell, 48: 923-934, 1987).

мембраны. Возможно, что и апикальные, и базолатеральные участки несут сигналы сортировки, направляющие их к соответствующему домену; с другой стороны, может быть, только один из этих путей требует специального сигнала, а другой реализуется при отсутствии сигнала.

8.9.5. Вирусы используют аппарат сортировки клетки-хозяина [65]

Геном многих вирусов животных представлен небольшим количеством нуклеиновой кислоты и включает не более четырех или пяти генов. Большинство этих генов кодирует структурные белки зрелой вирусной частицы (вириона), поэтому вирусы должны в ходе репликации пользоваться соответствующим аппаратом клетки-хозяина. Поскольку при инфекции вирусные продукты обычно вырабатываются в больших количествах, а вирусные частицы на протяжении своего жизненного цикла проходят последовательный путь через компартменты клетки-хозяина, инфицированные вирусом клетки представляют собой чрезвычайно удобную модель для выявления путей внутриклеточного транспорта.

Имеющие оболочку вирусы животных, геном которых заключен в мембрану из липидного бислоя (см. разд. 5.5.2), необычайно эффективно используют компартментацию клетки. Проследить жизненный цикл такого вируса - значит совершить путешествие по клетке. Хорошо изученным примером является *вирус леса Семлики,* геном которого представлен РНК, окруженной **капсидом,** состоящим из правильно построенной икосаэдрической (20-гранной) белковой оболочки. Белок оболочки называется С-белком. Нуклеокапсид (геном + капсид) окружен тесно прилегающим липидным бислоем, содержащим всего три белка (обозначаемых как El, E2 и E3). Эти белки **(белки оболочки)** представляют собой гликопротеины, пронизывающие липидный бислой и связывающие вместе мембрану и нуклеокапсид (рис. 8-80, *А).* Гликозшифрованные части белков оболочки всегда находятся вне липидного бислоя, и комплексы этих белков образуют на поверхности вирусной частицы «шипы», которые можно увидеть в электронном микроскопе (рис. 8-80, *Б).*

Инфекция начинается с того, что вирус связывается с белком-рецептором на плазматической мембране клетки-хозяина. Для попадания в клетку вирус использует нормальный механизм опосредованного рецептором эндоцитоза, и, таким образом, попадает в эндосомы (см. разд. 6.5.8), Но вместо того, чтобы потом быть доставленным в лизо-сомы, вирус покидает эндосомы благодаря специальным свойствам одного из белков оболочки. При кислом pH, какой существует в эндо-соме, этот белок вызывает слияние оболочки вируса с мембраной эндосомы, при этом нуклеокапсид высвобождается в цитозоль (рис. 8-81). В цитозоле нуклеокапсид «раздевается», освобождая вирусную РНК, которая затем транслируется на рибосомах клетки-хозяина с образованием кодируемой вирусом РНК-полимеразы. Этот фермент в свою очередь создает множество копий РНК. Некоторые из этих копий служат [1] затем в качестве мРНК, направляя синтез четырех структурных вирусных белков-С-белка капсида и трех белков оболочки-El, E2 и E3.

Белки оболочки и капсида проходят в клетке разные пути. Белки оболочки, подобно нормальным клеточным гликопротеинам, синтезируются на рибосомах, связанных с ЭР; белок капсида, как обычный белок цитозоля, синтезируется на свободных рибосомах. Вновь синтезированный белок капсида связывается с только что реплицированной вирусной РНК, образуя новый нуклеокапсид. Напротив, белки оболочки встраиваются в мембрану ЭР, где они гликолизируются, транспортируются к аппарату Гольджи (там модифицируются их олигосахариды), и затем доставляются к клеточной мембране.

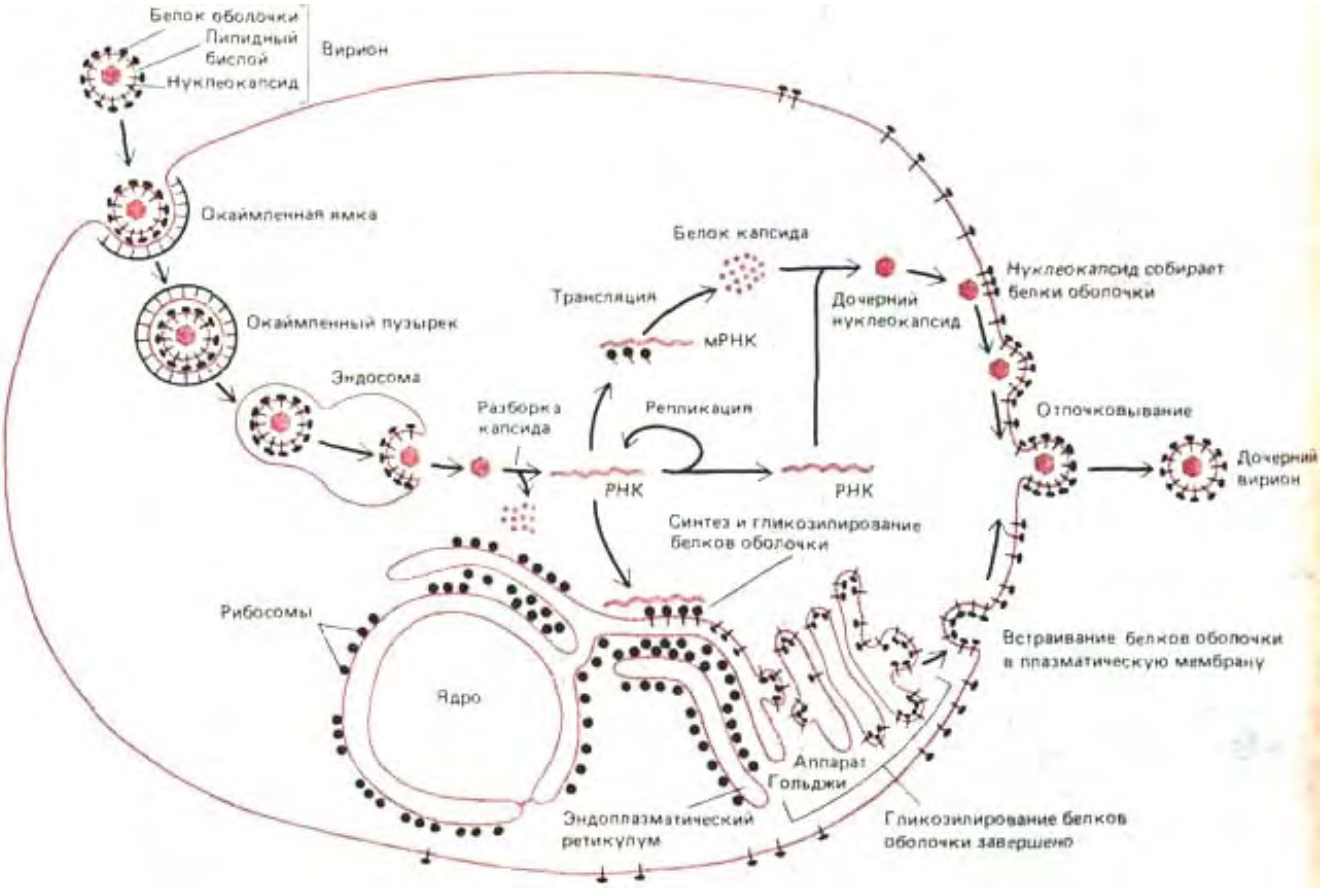


Рис. 8-81. Жизненный цикл вируса леса Семлики. На большинстве этапов биосинтеза этот вирус паразитирует на клетке-хозяине.

В конце концов вирусные нуклеокапсиды и белки оболочки «встречаются» на плазматической мембране (см. рис. 8-81). В результате специфического взаимодействия с кластером белков оболочки нуклео-капсид «заворачивается» в плазматическую мембрану, образуя «почку», мембрана которой сильно обогащена вирусными белками оболочки, но содержит липиды клетки-хозяина. Наконец, эта почка отшнуровывается, и свободная вирусная частица отделяется от клетки. Кластеризацию белков оболочки в липидном бислое можно рассматривать как модель сегрегации специфических мембранных белков при образовании окаймленных пузырьков.

8.9.6. Белки вирусной оболочки несут сигналы, направляющие их к определенным внутриклеточным мембранам [66]

Имеющие оболочку вирусные частицы отпочковываются от различных участков мембраны клетки-хозяина. Следовательно, их белки оболочки (это трансмембранные белки, синтезируемые в ЭР) должны нести сигналы, направляющие их из ЭР к определенной клеточной мембране. При культивировании эпителиальных клеток на подложке из покрытого коллаганом пористого фильтра образуются поляризованные клеточные слои. Если такие поляризованные клетки инфицировать вирусом (при этом различие между апикальной и базолатеральной частями мембраны сохраняется), то одни вирусы (например, *вирус гриппа) отпочковываются* исключительно от апикальной части плазматической мембраны, а другие (как вирус леса Семлики и вирус везикулярного стоматита)-только от базолатеральной (рис. 8-82). Такая полярность отражает присутствие на вирусных белках оболочки различных апикальных или

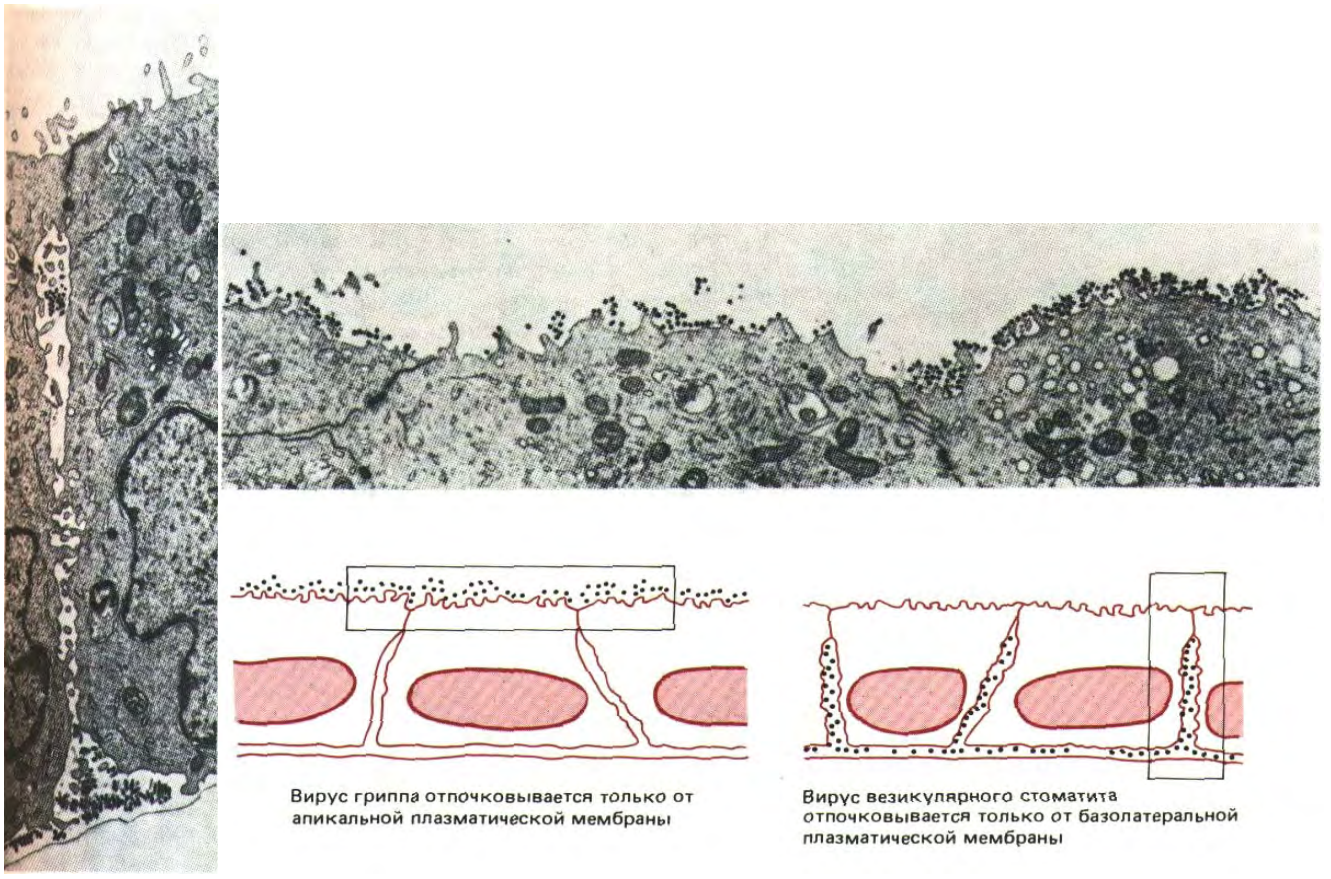


Рис. 8-82. Электронные микрофотографии, показывающие, что один тип покрытых оболочкой вирусов отпочковывается от апикальной, а другой - от базолатеральной поверхности плазматической мембраны одних и тех же эпителиальных клеток, растущих в культуре. Эти клетки растут, прикрепляясь базальной поверхностью к культуральной чашке. (С любезного разрешения E. Rodriguez-Boulan и D. Sabatini.)

базолатеральных сигналов сортировки, направляющих эти белки только к одному домену клеточной поверхности; в свою очередь белки оболочки вызывают сборку вируса именно на этом домене.

У других вирусов белки оболочки несут иные сигналы сортировки. Например, **вирус герпеса** представляет собой ДНК-содержащий вирус, который реплицируется в клеточном ядре, там же происходит сборка его нуклеокапсида. Затем этот вирус приобретает оболочку, отпочковываясь от внутренней ядерной мембраны в полость ЭР. Таким образом, белки его оболочки должны быть доставлены из мембраны ЭР во внутреннюю ядерную мембрану. Напротив, *флавивирус* отпочковывается прямо в полость ЭР, а *буньявирус* - внутрь аппарата Гольджи; это значит, что белки их оболочки несут сигналы, удерживающие их в мембране ЭР и аппарата Гольджи соответственно. Частицы вируса герпеса, флавивируса и буньявируса «растворяются» в полости ЭР и аппарата Гольджи, и движутся по направлению к клеточной поверхности в точности так, как если бы они были секретируемыми белками; в *транс-сети* Гольджи они включаются в транспортные пузырьки и выводятся из клетки по пути конститутивной секреции.

Заключение

Белки могут выводиться из клетки в процессе экзоцитоза, либо по конститутивной, либо по регулируемой схеме. При регулируемом механизме молекулы сохраняются в секреторных пузырьках, которые не сливаются с плазматической мембраной и не высвобождают свое содержимое, пока не будет получен внеклеточный сигнал. Упаковка белков в эти пузырьки в транс-сети Гольджи сопровождается их избирательной конденсацией. Регулируемая секреция происходит только в специализированных секреторных клетках, тогда как конститутивный секреторный механизм существует во всех клетках. Основной путь конститутивной секреции - везикулярный транспорт от транс-сети Гольджи к плазматической мембране. Для неполяризованных клеток доказано, что те белки, которые не предназначены специально для транспорта в какую-либо органеллу и не имеют сигналов сортировки, удерживающих их в данной

органелле, автоматически доставляются при помощи конститутивного механизма к транс-сети Гольджи и оттуда к плазматической мембране. В поляризованных клетках транспортные пути от транс-сети Гольджи к плазматической мембране должны работать избирательно, чтобы обеспечить доставку к апикальному и базолатеральпому доменам мембраны различных наборов мембранных белков, секрстируемых белков и липидов.

8.10. Везикулярный транспорт и сохранение индивидуальности компартментов

Внутриклеточная сортировка, по-видимому, требует наличия как минимум 10 различных типов транспортных пузырьков, каждый из которых имеет уникальный набор «молекулярных адресных меток» на поверхности, позволяющих доставлять содержимое пузырьков только к определенной клеточной мембране. Следовательно, транспортные пузырьки, покидающие ЭР. должны сливаться только с *цис*-компартментом Гольд-жи, покидающие *цис*-компартмент должны сливаться только с промежуточным компартментом Гольджи и т. д. На каждом этапе происходит отпочковывание, стыковка и слияние пузырька с мембраной. Все эти процессы требуют высокоспецифичрюго узнавания. В настоящее время нам мало известно о молекулярных механизмах (см. рис. 8-73). В этом разделе мы проанализируем некоторые спорные взгляды на пути сохранения внутриклеточной компартментации и опишем некоторые новые экспериментальные подходы к решению этих спорных проблем.

8.10.1. Некоторые белки удерживаются в ЭР и аппарате Гольджи в качестве постоянных компонентов [67]

При перемещении «груза» из одного компартмснта в другой транспортные пузырьки обязательно переносят как мембраны, так и содержимое органелл. Тем не менее и при таком выравнивающем процессе сохраняются различия в составе мембран разных компартментов: белок-рецептор SRP встречается только в мембране ЭР, а гликозилтрансферазы и ферменты процессинга олигосахаридов расположены только в мембранах определенных цистерн Гольджи и т. д. Следовательно, мембраны ЭР и каждою типа цистерн Гольджи должны иметь специальные механизмы для сохранения своей уникальности. Один из них - наличие специальных сигналов сортировки для каждого этапа продвижения продукта через ЭР и аппарат Гольджи. В результате, например, белки плазматической мембраны, попадающие в клетку путем специфического эндоцитоза. захватываются окаймленными ямками. Однако существует точка зрения, согласно которой при биосинтетическом транспорте через ЭР и аппарат Гольджи, используется противоположный механизм, т.е. транспорт происходит автоматически, а для удержания продукта в орга-нелле требуются специфические сигналы. В соответствии с этой гипотезой каждый постоянный компонент ЭР или аппарата Гольджи должен иметь специальный сигнал, отвечающий за его сохранение в этом компартменте. Стратегия автоматического движения вперед и избирательного сохранения привлекательна еще и потому, что число белков, проходящих сквозь ЭР и аппарат Гольджи к месту конечного назначения, значительно больше числа белков, остающихся там. Более того, при такой стратегии те белки, которые утратили свои сигналы сортировки, или были направлены в неверном направлении, могут выводиться из клетки. Наконец, если бы сигналы требовались для транспорта, то они были бы необходимы для каждой его стадии - от ЭР к аппарату Гольджи

и от каждой цистерны Гольджи к следующей. В этом случае структура многих белков оказалась бы перегруженной большим количеством сигналов сортировки, которые должны находиться на поверхности молекулы.

8-45

8.10.2. Существует по крайней мере два типа окаймленных пузырьков [68]

Клатрин находится на цитоплазматической поверхности плазматической мембраны и *транс-сети* Гольджи; по-видимому, этот белок участвует в транспорте, управляемом сигналами. Покрытые клатрином пузырьки отвечают за опосредованный рецепторами эндоцитозный путь от плазматической мембраны к эндосомам, а также за управляемый рецепторами путь от *транс-сета* Гольджи к эндолизосомам. В первом случае окаймленные пузырьки переносят избранный набор рецепторов клеточной поверхности. Вероятно, это верно и для различных типов покрытых клатрином пузырьков, отпочковывающихся от аппарата Гольджи.

Окаймленные клатрином пузырьки не отделяются ни от ЭР, ни от *цис-* или *промежуточных* цистерн аппарата Гольджи. Вместо них гам (а также и в *транс-сети* Гольджи) существует другой тип окаймленных пузырьков. Они не окрашиваются антителами к клатрину и отличаются от клатриновых окаймленных пузырьков при анализе в электронном микроскопе (рис. 8-83). Белки «каймы» этих пузырьков еще не идентифицированы.

Возможная модель белкового транспорта в неполяризованных клетках представлена на рис. 8-84. В соответствии с этой моделью, белки «по умолчанию» перемещаются из ЭР в аппарат Гольджи, от одной цистерны Гольджи к другой и от *транс-сети* Гольджи к поверхности клетки. Предполагают, что этот неизбирательный процесс происходит при помощи неклатриновых окаймленных пузырьков. От *транс-сети* Гольджи управляемый рецепторами транспорт в лизосомы происходит с участием клатриновых окаймленных пузырьков, а транспорт к секреторным гранулам - с участием частично покрытых клатрином пузырьков. Каким образом можно проверить эту модель?

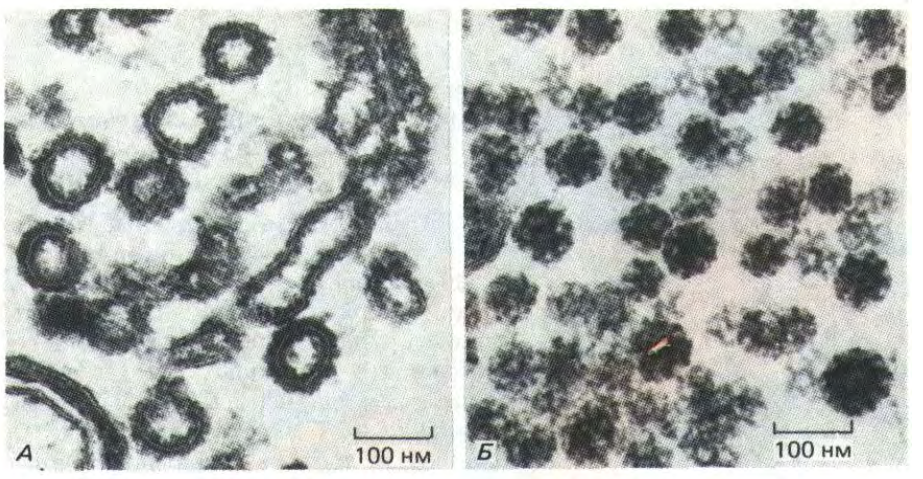


Рис. 8-83. Сравнение клатриновых и неклатриновых окаймленных пузырьков. *А,* Электронная микрофотография цистерн Гольджи из бесклеточной системы, в которой происходит отпочковывание неклатриновых окаймленных пузырьков в пробирке. Клатриновые окаймленные пузырьки, показанные на фото *(Б),* имеют гораздо более упорядоченное строение. (Электронные микрофотографии любезно предоставлены Lelio Orci, см. L. Or-ci, B. Click, and J. Rolhman, Cell, 46: 171-184.)

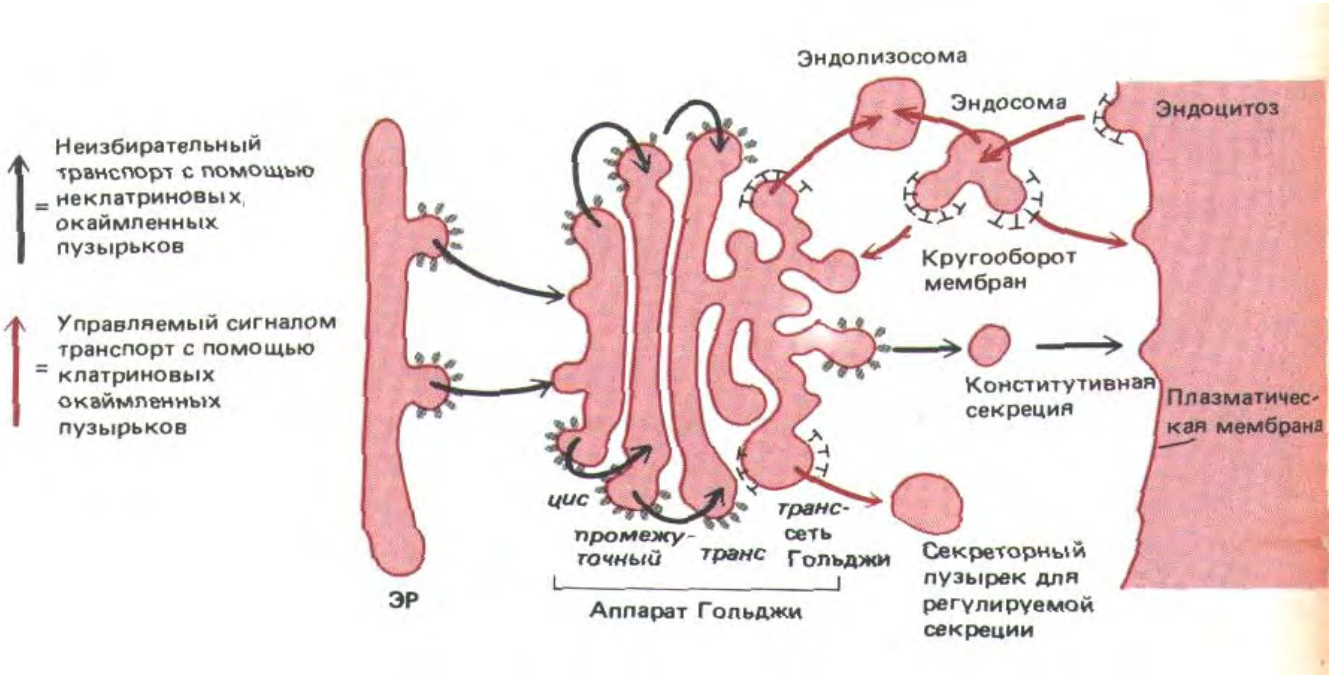


Рис. 8-84. Гипотетическая модель транспорта белков в неполяризованных клетках. Полагают, что неизбирательный (конститутивный) транспорт происходит при помощи неклатриновых окаймленных пузырьков, а различные варианты регулируемого сигналами транспорта при помощи клатриновых окаймленных пузырьков. Эти пузырьки отпочковываются от *транс*-сети Гольджи, эндосом и плазматической мембраны. В поляризованных клетках необходим еще дополнительный регулируемый сигналами транспортного от транс-сети Гольджи.

8.10.3. Раскрыть механизм транспорта помогают мутантные клетки с нарушенной секрецией [69]

Так как транспорт исключительно важен для эукариотической клетки, то мутантные клетки, неспособные осуществлять один из его этапов (например, дефектные по маркеру стыковки или акцепторному белку), должны были бы гибнуть. Однако, если мутантный белок не функционирует только при высоких температурах, в обычных условиях клетка с таким дефектом вполне жизнеспособна. У дрожжей было выявлено более 25 *температурочувствительных (термочувствительных) мутаций* в генах, отвечающих за секрецию. Клетки, несущие такие мутации, не способны при высоких температурах транспортировать белки из ЭР в аппарат Гольджи, от одной цистерны Гольджи к другой, из аппарата Гольджи к вакуоли или к плазматической мембране.

Используя температурочувствительные мутанты дрожжей, легко клонировать гены этого организма, ответственные за транспорт. Такой подход чрезвычайно плодотворен, т. к. позволяет напрямую выявить главные белки транспортного механизма, не зная даже, как происходит секреция. Один из дрожжевых генов, отвечающих за секрецию, который был выявлен таким образом - это ген *sec 4*. Полагают, что он кодирует GTP-связывающий белок из семейства *ras* (см. разд. 12.3.11 и 13.4.6). Биохимические эксперименты на клетках млекопитающих свидетельствуют о том, что сходный GTP-связывающий белок участвует в везикулярном транспорте и у высших эукариот. Возможно, он регулирует «раздевание» неклатриновых окаймленных пузырьков перед их связыванием с мембранами.

8.10.4. Бесклеточные системы дают другой плодотворный подход к изучению молекулярных механизмов везикулярного транспорта [70]

Чтобы понять молекулярные механизмы, лежащие в основе потока веществ между мембранными компартментами, надо выявить основные «рабочие части» транспортных пузырьков. Каким образом транспортные пузырьки отпочковываются от мембраны? Что направляет их к мембранам-мишеням? Как они сливаются с мембранами? Кроме только что описанных генетических экспериментов для ответа на эти вопросы были использованы опыты по реконструкции везикулярного транспорта в бесклеточной системе. Впервые этого удалось добиться для стопки Гольджи. Когда выделенные стопки Гольджи инкубировали

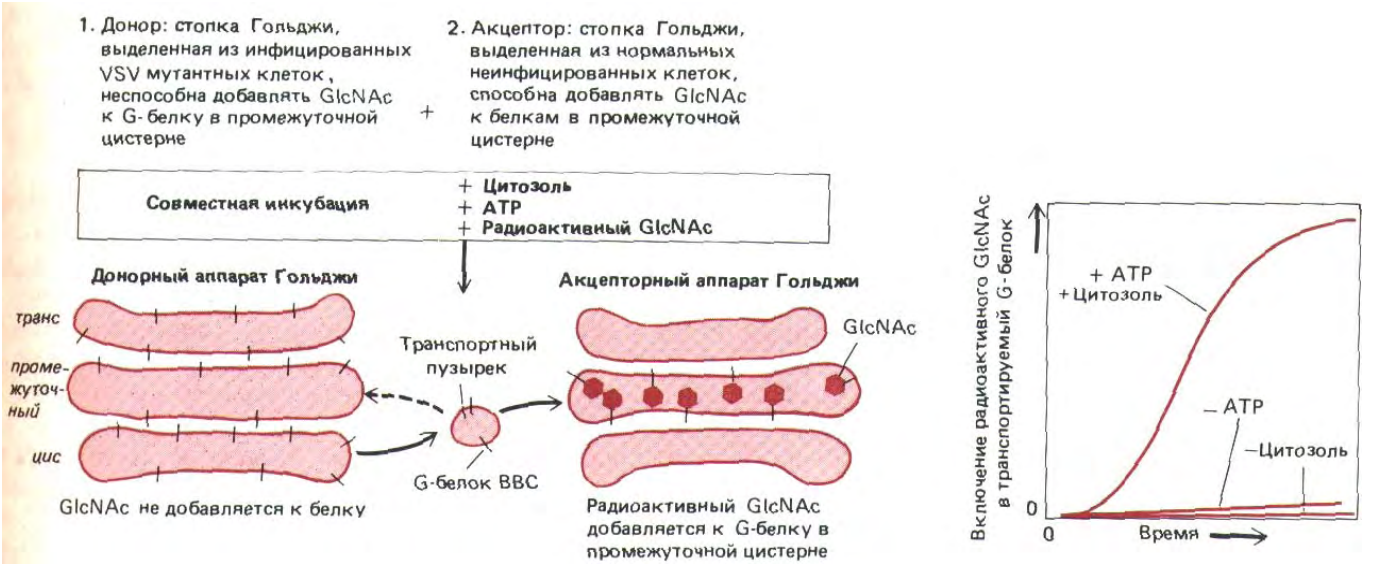


Рис. 8-85. Бесклеточная система, воссоздающая везикулярный транспорт вирусного белка между цистернами аппарата Гольджи. Когда препарат стопок Гольджи инкубируют с цитозольными экстрактами и ATP, от цистерн отпочковываются неклатриновые окаймленные пузырьки. Вирус везикулярного стоматита (VSV) кодирует белок оболочки, называемый G-белком. Чтобы понять., как происходит транспорт отого трансмембранного белка между цистернами аппарата Гольджи, две популяции выделенных стопок Гольджи инкубировали вместе. Популяция-«донор» была получена из инфицированных VSV мутантных клеток, не имеющих GlcNAc-трансферазы I. (поэтому в «донорной» популяции стопок Гольджи не происходит включения остатков GlcNAc в N-связанные олигосахариды G-белка). «Акцепторные» стопки Гольджи были получены из неинфицированных клеток дикого типа и поэтому содержали нормальную копию GlcNAc-трансферазы, но не содержали G-белка. Следовательно, для присоединения к G-белку GlcNAc нужно, чтобы этот белок из *цис*-компартмента донорной стопки Гольджи попал в *промежуточный* компартмент стопки-акцептора. Проверить, идет ли сопряженное с транспортом гликозилирование, можно, наблюдая за включением в G-белок [^{3}H]-GlcNAc из UDP-[^{3}H]-GlcNAc, добавленного в культуральную среду. Как показано на графике справа, транспорт идет только тогда, когда добавляется и цитозольный экстракт, и ATP. Такие же условия необходимы для отпочковывания неклатриновых окаймленных пузырьков. Такая схема опыта, впервые примененная для того, чтобы понять механизм переноса из *цис*-компартмента Гольджи в его *промежуточный* компартмент, позволила также воссоздать in vitro транспорт из ЭР в *цис*-аппарат Гольджи, из *промежуточного* в *транс*- компартмент Гольджи, от *транс*-аппарата Гольджи к плазматической мембране, от эндосом к лизосомам, и от *транс*-аппарата Гольджи к эндолизосомам.

с цитозолем и ATP, от их краев отшнуровывались неклатриновые окаймленные пузырьки, которые, по-видимому, переносили белки между цистернами (рис. 8-83,*А*). Прослеживая последовательный процессинг олигосахаридов на гликопротеинах по мере их продвижения из одного компартмента Гольджи к другому, стало возможным реконструировать in vitro процесс везикулярного транспорта (рис. 8-85).

Было обнаружено, что отпочковывание неклатриновых окаймленных пузырьков в такой бесклеточной системе требует наличия смеси белков из цитозоля и ATP, из чего следует, что это активный процесс, а не простая самосборка. Необходимые для транспорта компоненты эволюционно крайне консервативны, так как в экспериментах по реконструкции цитозоль животной клетки можно с успехом заменить цитозолем дрожжей или растений. Таким образом, для идентификации молекул,

участвующих в везикулярном транспорте, можно сочетать генетический подход, используемый для клеток дрожжей, и бесклеточные системы млекопитающих.

Заключение

ЭР и каждый компартмент аппарата Гольджи содержат уникальные наборы белков. По-видимому, эти белки задерживаются в органеллах благодаря имеющимся у них специальным сигналам. При этом большая часть веществ переносится от ЭР к аппарату Гольджи, сквозь стопку Гольджи и от транс-сети Гольджи к поверхности клетки автоматически. Высказано предположение, что транспорт при таком неизбирательном пути происходит с участием неклатриновых окаймленных пузырьков, которые не специализируются в зависимости от содержимого. В то мое время транспорт, управляемый сигналами (сортировка), опосредован покрытыми клатрином окаймленными пузырьками. Чтобы проверить эти гипотезы, необходимо расшифровать молекулярные механизмы, участвующие в отпочковывании транспортных пузырьков, направлении их к мишеням и слиянии с мембранами. В генетических экспериментах на дрожжах идентифицировано более 25 генов, продукты которых отвечают за отдельные стадии транспорта. Кроме того, для млекопитающих разработаны бесклеточные системы, в которых происходило избирательное отпочковывание и слияние пузырьков. Вероятно, именно сочетание генетического и биохимического подходов позволит в будущем выделить в чистом виде многие белки, участвующие в этих процессах.

Литература

Общая

Burgess T. L., Kelly R. B. Constitutive and regulated secretion of proteins. Annu. Rev. Cell. Biol., 3, 243-293, 1987.
Dingwall C., Laskey R. A. Protein import into the cell nucleus. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 367-390, 1986.
Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. FASEB J., 1, 462-468, 1987.
Pfeffer S. R., Rothman J. E. Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. Annu. Rev. Biochem., 56, 829-852, 1987.
Verner K., Schatz G. Protein translocation across membranes. Science, 241, 1307-1313, 1988.

Цитированная

1. *Bolender R. P.* Stereological analysis of the guinea pig pancreas. J. Cell Biol., 61, 269 287. 1974.
   Palade J. E., Farquhar M. G. Cell biology. In: Pathophysiology: The Biological Principles of Disease (L. H. Smith, S. D. Thier, eds.), pp. 1-56. Philadelphia, Saunders, 1981.
   Weibel E. R., Staubli W., GnagiH.R., Hess F. A. Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. J. Cell Biol., 42, 68 91, 1969.
2. *Blobel G.* Intracellular protein topogenesis. Proc. Nail. Acad. Sci. USA, 77, 1496-1500, 1980.
   Grav M. W., Doolinle W. F. Has the endosymbiont hypothesis been proven? Microbiol. Rev., 46, 1-42, 1982.
   Schwarz R. M., Davhoff M. 0. Origins of the prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. Science, 199, 395-403, 1978.
3. *Palade G.* Intracellular aspects of the process of protein synthesis. Science, 189, 347-358, 1975.
4. *Kelly R. B.* Pathways of protein secretion in eukaryotes. Science, 230, 25-31, 1985.
   Sabatini D. D., Kreibich G., Morimoto T., Adesnik M. Mechanisms for the incorporation of proteins in the membranes and organelles. J. Cell Biol., 92, 1 -22, 1982.
5. *Pfeffer S. R., Rothman J. E.* Biosynthetic protein transport and sorting by the endoplasmic reticulum and Golgi. Annu. Rev. Biochem., 56, 829 852, 1987.
   Wickner W. T., LodishH.E. Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. Science, 230, 400-406, 1985.

6. *Blobel G.* Intracellular protein topogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 1496-1500, 1980.
Garoff H. Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in the eukaryotic cell. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 403-445, 1985.
7. *Warren G.* Membrane traffic and organelle division. Trends Biochem. Sci., 10, 439-443, 1985.
8. *Alien R.D.* The microtubule as an intracellular engine. Sci. Am., 238(2), 42-49, 1987.
Fulton A.B. How crowded is the cytoplasm? Cell, 30, 345-347, 1982.
Lubv-Phelps K., Taylor D. L., Lanni F. Probing the structure of cytoplasm. J. Cell Biol., 102, 2015 2022, 1986.
Vale R. D. Intracellular transport using microtubule-based motors. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 347-378, 1987.
9. *Chock P. B., Rhee S. G., Stadtman E. R.* Interconvertible enzyme cascades in cellular regulation. Annu. Rev. Biochem., 49, 813-843, 1980.
Holt G. D. et a/. Nuclear pore complex glycoproteins contain cytoplasmically disposed O-linked N-acetylglucosamine. J. Cell Biol., 104, 1157-1164, 1987.
Wold F. In vivo chemical modification of proteins (post-translational modification). Annu. Rev. Biochem., 50, 783-814, 1981.
10. *Kamps M.P., Buss J.E., Sefton B.M.* Mutation of NH_2-terminal glycine of $p60^{src}$ prevents both myristoylation and morphological transformation. Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 82, 4625-4628, 1985.
Schutltz A. M., Henderson L. E., Orozlan S. Fatty acylation of proteins. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 611-648, 1988.
Willumsen B. M., Harris K., Papayeorye A. G., Hubbert N. L., Lowy D. R. Harvey murine sarcoma virus $p21^{ras}$ protein: biological and biochemical significance of the cysteine nearest the carboxy terminus. EM BO J., 3, 2582-2585, 1984.
11. *Dice J. F.* Molecular determinants of protein half-lives in eukaryotic cells. FASEB J., 1, 349-357, 1987.
Goldbera A.L., GoffS.A. The selective degradation of abnormal proteins in bacteria. In: Maximizing Gene Expression (W. Reznikoff, L. Gold, eds.), pp. 287-314. Stoneham, MA, Butterworth, 1986.
12. *Bachmair A., Finley D., Varshavsky A.* In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science, 234, 179 186, 1986.
Hershko A., Ciechanover A. The ubiquitin pathway for the degradation of intranuclear proteins. Prog. Nucleic Acid Res. Moï. Biol., 33, 19-56, 1986.
Rechsteiner M. Ubiquitin-mediated pathways for intracellular proteolysis. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 1 30, 1987.
13. *Auyen J., Wold F.* How much sequence information is needed for the regulation of amino-terminal acetylation of eukaryotic proteins? Trends Biochem. Sci,, 11, 494-497, 1986.
Ferber S., Ciechanover A. Role of arginine-tRNA in protein degradation by the ubiquitin pathway. Nature, 326, 808-811, 1987.
Varshavsky A., Bachmair A., Finlev D., Gonda D., Wunniny I. The N-end rule of selective protein turnover: mechanistic aspects and functional implications. In: Ubiquitin (M. Rechsteiner, ed.), pp. 284 324. New York, Plenum, 1988.
14. *Craiy E.A.* The heat-shock response. CRC Crit. Rev. Biochem., 18, 239-280, 1985.
Lindquist S. The heat-shock response. Annu. Rev. Biochem., 55, 1151-1191, 1986.
Pelham H. R. B. Speculations on the functions of the major hat shock and glucose-regulated proteins. Cell, 46, 959-961, 1986.
15. *Franke W.W., Scheer U.. Krohne G., Jarash E.D.* The nuclear envelope and the architecture of the nuclear periphery. J. Cell Biol., 91, 39s 50s, 1981.
Newport J. W., Forbes D.J. The nucleus: structure, function, and dynamics. Annu. Rev. Biochem., 56, 535 565, 1987.
16. *Banner W.M.* Protein migration and accumulation in nuclei. In: The Cell Nucleus (H. Busch, ed.), Vol. 6, Part C, pp. 97-148. New York, Academic, 1978.
Lang L, Schol: M., Peters R. Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells. J. Cell Biol., 102, 1183-1190, 1986.
17. *Dingwall C., Laskey R.A.* Protein import into the cell nucleus. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 367-390, 1986.
Feldherr C. M., Kallenbach E., Schult: N. Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. J. Cell Bol., 99, 2216-2222, 1984.
Newmeyer D.D., Forbes D.J. Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. Cell, 52, 641-653, 1988.
18. *Goldfarb D.S., Gariepy J., Schoolnik G., Kornbery R.D.* Synthetic peptides as nuclear localization signals. Nature, 322, 641-644, 1986.
Kalderon D., Roberts B. L., Richardson W. D., Smith A. E. A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell, 39, 499-509, 1984.
Lanford R. E., Bute/ J. S. Construction and characherization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. Cell, 37, 801-813, 1984.

19. *Clawson G.A., Feldherr C.M., Smuckler E. A.* Nucleocytoplasmic RNA transport. Moï. Cell. Biochem., 67, 87-100, 1985.
Dworetzky S. I., Feldherr C. M. Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. J. Cell Biol., 106, 575 584, 1988.
20. *Attardi G., Schatz G.* Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 289-333, 1988.
Tzayoloff A. Mitochondria. New York, Plenum, 1982.
21. *Hawlitschek G. et al.* Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a procesing enchancing protein. Cell, 53, 795-806, 1988.
Hurt E.G., van Loon A.P.G.M. How proteins fnd mitochondria and intramitochondrial compartments. Trends Biochem. Sci. 11, 204-207, 1986.
Pfanner N.. Neupert W. Biogenesis of mitochondrial energy transducing complexes. Curr. Top. Bioenerg., 15, 177-219, 1987.
Raise D., Schatz G. Mitochondrial presequences. J. Biol. Chem., 263, 4509-4511, 1988.
22. *Eilers M., Schatz G.* Protein unfolding and the energetics of protein translocation across biological membranes. Cell, 52, 481-483, 1988.
Pfanner N.. Neupert W. Transport of proteins into mitochondria: a potassium diffusion potential is able to drive the import of ADP/ATP carrier. EM BO J., 4, 2819-2825, 1985.
Raise D., Horvath S.J., Tomich J.M., Richards J.H., Schatz G. A chemically synthesized pre-sequence of an imported mitochondrial protein can form an amphiphilic helix and perturb natural and artificial phospholipid bilayers. EM BO J., 5. 1327 1334. 1986.
23. *Schleyer M., Neupert W.* Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. Cell, 43, 339-350, 1985.
Schwaiger M., Herzog V., Neupert W. Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. J. Cell Biol., 105, 235-246, 1987.
24. *Deshaies R. J., Koch B. D., Werner-Washburne M., Craig E. A., Schekman R.* A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochonrial precursor polypeptides. Nature, 332, 800-805, 1988.
Eilers M., Schatz G. Binding of a specific ligand inhibits import of a purified precursor protein into mitochondria, Nature, 322, 228-232, 1986.
Pfanner N.. Tropschug M., Neupert W. Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import competence to precursors. Cell, 49, 815-823, 1987.
25. *Hartl F. U., Ostermann J., Guiard B., Neupert W.* Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptids. Cell, 51, 1027-1037, 1987.
van Loon A. P. G. M., Brandli A. W., Schatz G. The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochon-drial sorting. Cell, 44, 801-812, 1986.
26. *Pfaller R., Neupert W.* High-affinity binding sites involved in the import of porin into mitochondria. EMBO J., 6, 2635 2642, 1987.
Pfanner N. et al. Role of ATP in mitochondrial protein import. J. Biol. Chem., 263, 4049-4051, 1988.
27. *Boutry M., Nagy F., Polsen G., Aoyagi K., Chua N. H.* Targeting of bacterial chloramphenicol acetyltranferase to mitochondria in transgenic plants. Nature, 328, 340 342, 1987.
Pain D., Kanwar Y.S., Blobel G. Identification of a receptor for protein import into chloroplasts and its localization to envelope contact zones. Nature, 331, 232-237, 1988.
Schmidt G. W., Mishkind M. L. The transport of proteins into chloroplasts. Annu. Rev. Biochem. 55, 879-912, 1986.
Smeekens S., Bauerie C., Hageman J., Keegstra K., Weisbeek P. The role of the transit peptide in the routing of precursors toward different chloroplast compartments. Cell 46, 365 375, 1986.
28. *de Duve C.* Microbodies in the living cell. Sci. Am., 248(5), 74 84, 1983.
de Duve C.. Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). Physiol. Rev. 46, 323-357, 1966.
Fahimi H. D., Sies H., eds. Peroxisomes in Biology and Medicine. Heidelberg, Springer, 1987.
29. *Tolbert N. E.. Essner E.* Microbodies: peroxisomes and glyoxysomes. J. Cell Biol., 91, 271s-283s, 1981.
Veenbuis M., Van Dijken J. P., Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. Adv. Microb. Physiol., 24, 1 -82, 1983.
30. *Could S. J., KellerG.A., Subramani S.* Identification of a peroxisomal targeting

signal at the carboxy terminus of four peroxisomal proteins. J. Cell Biol., 107, 897-905, 1988.
Imanaka T., Small G. M., Lazarow P. B. Translocation of acyl-CoA oxidase into peroxisomes requires ATP hydrolysis but not a membrane potential. J. Cell Biol., 105, 2915-2922, 1987.
Lazarow P. B., Fujiki Y. Biogenesis of peroxisomes. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 489-530, 1985.

31. *DePierre J. W., Dallner G.* Structural aspects of the membrane of the endoplasmicreticulum. Biochim. Biophys. Acta, 415, 411-472, 1975.
Fawcett D. The Cell, 2nd ed., pp. 303-352. Philadelphia, Saunders, 1981.
Lee C., BoChen, L. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. Cell, 54, 37-46, 1988.

32. *Adelman M. R.. Sabatini D. D., Blobel G.* Ribosome-membrane interaction: nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components. J. Cell Biol., 56, 206-229, 1973.
Blobel G., Dohberstein B. Transfer of proteins across membranes. J. Cell Biol., 67, 852-862, 1975.

33. *Jones A. L., Fawcett D. W.* Hypertrophy of the agranular endoplasmic reticulum in hamster liver induced by phenobarbital. J. Histochem. Cytochem., 14, 215-232, 1966.
Mori H., Christensen A. K. Morphometric analysis of Leydig cells in the normal rat testis. J. Cell Biol., 84, 340-354, 1980.

34. *Dallner G.* Isolation of rough and smooth microsomes - general. Methods Enzymol., 31, 191-201, 1974.
de Duve C. Tissue fractionation past and present. J. Cell Biol., 50, 20d 55d, 1971.

35. *Hortsch M., Avossa D., Meyer D.I.* Characterization of secretory protein transloca-tion: ribosome-membrane interaction in endoplasmic reticulum. J. Cell Biol., 103, 241-253, 1986.
Kreibich G., Ulrick B. L., Sabatini D. D. Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. J. Cell Biol., 77, 464 487, 1978.

36. *Blobel G., Dobberstein B.* Transfer of proteins across membranes. J. Cell Biol., 67, 835-851, 1975.
Garoff H. Using recombinant DNA techniques to study protein targeting in the eucaryotic cell. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 403-445, 1985.
Milstein C., Brownlee G., Harrison T., Mathews M. B. A possible precursor of immunoglobulin light chains. Nature New Biol., 239, 117-120, 1972. *van Heijne G.* Signal sequences: the limits of variation. J. Moï. Biol., 184, 99-105, 1985.

37. *Meyer D. L, Krause E., Dobberstein B.* Secretory protein translocation across membranes-the role of the "docking protein". Nature, 297, 647-650, 1982.
Tajima S., Lauffer L., Rath V.L.. Walter P. The signal recognition particle receptor is a complex that contains two distinct polypeptide chains. J. Cell Biol., 103, 1167-1178, 1986.
Walter P., Blobel G. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. Nature, 299, 691-698, 1982.
Walter P., Lingappa V. R. Mechanism of protein translocation across the endoplasmic reticulum membrane. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 499-516, 1986.
Wiedmann M., Kurzchalia T. V., Hartmann E., Rapoport T. A. A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. Nature, 328, 830- 833, 1987.

38. *Chirico W.J., Waters M. G., Blobel G.* 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature, 332, 805-810, 1988.
Perara E., Rothman R. E., Lingappa, V. R. Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. Science, 232, 348-352, 1986.
Zimmermann R., Meyer D.I. 1986 A year of new insights into how proteins cross membranes. Trends Biochem. Sci., 11, 512-515, 1986.

39. *Rapoport T. A.* Extensions of the signal hypothesis sequential insertion model versus amphipatic tunnel hypothesis. FEES Lett., 187, 1-10, 1985.
Wickner W.T., Lodish H.F. Multiple mechanisms of protein insertion into and across membranes. Science, 230, 400-406, 1985.

40. *Engelman D. M., Steitz T. A.. Goldman A.* Identifying nonpolar transbilayer helices in amino acid sequences of membrane proteins. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 15, 321-353, 1986.
Kaiser C. A., Preuss D., Grisafl P., Botstein D. Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase. Science, 235, 312-317, 1987.
Kyte J., Doolittle R. F. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Moï. Biol., 157, 105-132, 1982.
Zerial M., Huylebroeck D., Garoff H. Foreign transmembrane peptides replacing the

internal signal sequence of transferrin receptor allow its translocation and membrane binding. Cell, 48, 147 155, 1987.

41. *Bole D. G., Hendershof L.M., KearnyJ.F.* Posttranslational association of immunoglobulin heavy chain binding protein with nascent heavy chains in nonsecrcting and secreting hybridomas. J. Cell Bol., 102, 1558 1566, 1986.
Lodish H. F. Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. J. Biol. Chem., 263, 2107-2110, 1988.
Mumo S., Pelham H. R. B. A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins. Cell, 48, 899 907, 1987.
42. *Freedman R.* Native disulphide bond formation in protein biosynthesis: evidence for the role of protein disulphide isomerase. Trends Biochem., Sci., 9, 438-441, 1984.
Holmgren A. Thioredoxin. Annu. Rev. Biochem., 54, 237-272, 1985.
43. *Hirschberg C. B.. Snider M. D.* Topography of glycosylation in the rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. Annu. Rev. Biochem., 56, 63-87, 1987.
Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem., 54, 631 664, 1985.
Torres C., Hart G. Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetyl-glucosamine residues on the suface on intact lymphocytes. J. Biol. Chem., 259, 3308-3317, 1984.
44 *Cross G. A. M.* Eukaryotic protein modification and membrane attachment via phosphatidylinositol. Cell, 48, 179-181, 1987.
Ferguson M. A.J., Williams A. F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosil-phosphatidylinositol structures. Annu. Rev. Biochem., 57, 285-320, 1988.
Loif *M. G., Sa/tiel A. R.* Structural and functional roles of glycosil-phosphatidylino-sitol in membranes. Science, 239, 268-275, 1988.
45. *Bishop W. R., Bell R. M.* Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement, and intracellular translocation. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 579-610, 1988.
Bishop W. R., Bell R. M. Assembly of the endoplasmic reticulum phospholipid bilayer: the phosphatidylcholine transporter. Cell, 42, 51-60, 1985.
Dawidowic: E. A. Dynamics of membrane lipid metabolism and turnover. Annu. Rev. Biochem., 56, 43-61, 1987.
Pagano R. E., Sleight R. G. Defining lipid transport pathways in animal cells. Science, 229, 1051 1057, 1985.
Rothman J.E., Lenard J. Membrane asymmetry. Science, 195, 743-753, 1977.
46. *Dawidowic: E. A.* Lipid exchange: transmembrane movement, spontaneous movement, and protein-mediated transfer of lipids and cholesterol. Curr. Top. Memb. Transp., 29, 175-202, 1987.
Yaffe M. P.. Kennedy E. P. Intracellular phospholipid movement and the role of phospholipid transfer proteins in animal cells. Biochemistry, 22, 1497-1507, 1983.
47. *Farqulmr M.G., PaladeG.E.* The Golgi apparatus (complex)-(1954 1981)-from artifact to center stage. J. Cell. Biol., 91, 77s-103s, 1981.
Pavelka M. Functional morphology of the Golgi apparatus. Adv. Anat. EmbryolCell Biol, 106, 1-94, 1987.
Rothman J. E. The compartmental organization of the Golgi apparatus Sci Am 253(3), 74-89, 1985.
48. *Hubbard S.* C, *Ivatt R. J.* Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. Annu. Rev. Biochem., 50, 555-583, 1981.
Kornfeld R., Kornfeld S. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. Annu Rev. Biochem., 54, 631 664, 1985.
Schachter H., Roseman S. Mammalian glycosyltransferases: their role in the synthesis and function of complex carbohydrates and glicolipids. In: The Biochemistry of Glycoproteins and Proteoglycanes (W.J. Lennarz, ed.), Chapter 3 New York Plenum, 1980. '
49. Elbein A. D. Inhibitors of the biosynthesis and processing of N-linked oligosacchande chains. Annu. Rev. Biochem., 56, 497-534, 1987.
Stanley P. Glycosylation mutants and the functions of mammalian carbohydrates Trends Genet., 3, 77-81, 1987.
West C. M. Current ideas on the significance of protein glycosylation. Moï Cell Biochem., 72, 3-20, 1986.
50. *Hassel J. R.. Kimura J. H., Hascal V. C.* Proteoglycan core protein families Annu Rev. Biochem., 55, 539-567, 1986.
Huttner W. B. Tyrosine sulfation and the secretory pathway. Annu. Rev. Physiol., *50, 363 - 376, 1998.*
Ruoslahti F. Structure and biology of proteoglycans. Annu. Rev. Cell Biol., 4, *229*--255, 1988.
Wagh P. V., Bahl O. P. Sugar residues on proteins. CRC Crit. Rev. Biochem., 10, 307-377, 1981,
51. *Douglass J., Civelli O., Herbert E.* Polyprotein gene expression: generation of diversity of neuroendocrine peptides. Annu. Rev. Biochem., 53, 665-715,

Orel L. et al. Conversion of proinsulin to insulin occurs coordinately with acidication of maturing secretory vesicles. J. Cell Biol., 103, 2273-2281, 1986.

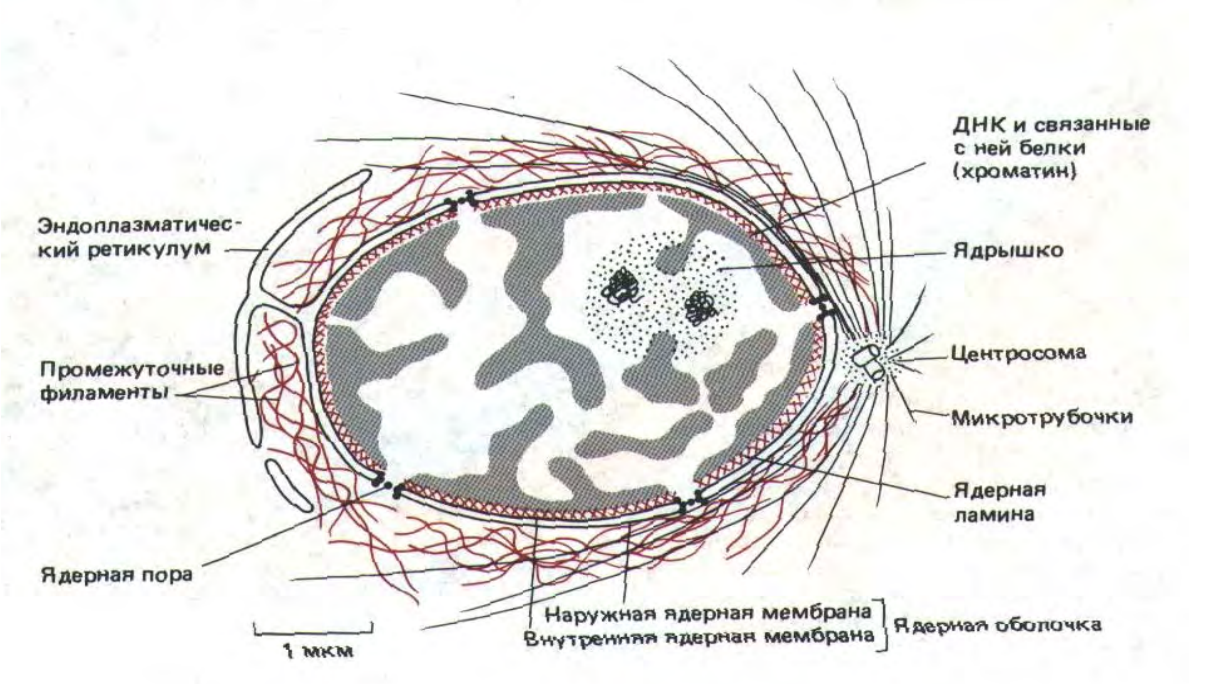
52. *Dunphy W. G., Rothman J. E.* Compartmental organization of the Golgi stack. Cell, 42, 13-21, 1985.
53. *Bainton D.* The discovery of lysosomes. J. Cell Biol., 91, 66s- 76s, 1981.
de Duve C. Exploring cells with a centrifuge. Science, 189, 186 194, 1975.
54. *Holzman E.* Lysosomes: A Survey. New York, Springer-Verlag, 1976.
55. *Griffiths G., Holfack B., Simons K., Mellman* /., *Kornfeld S.* The mannose 6-phosphate receptor and the biogenesis of lysosomes. Cell, 52, 329 341, 1988.
Helenius A., Mellman /., *Wall D., Hubbard A.* Endosomes. Trends Biochem. Sci., 8, 245-250, 1983.
Mayer R.J., Dohertv F. Intracellular protein catabolism: state of the art. FEBS Lett., 198, 181-193, 1986.
Mellman I., Fuchs R., Helenius A. Acidification of the endocytic and exocytic pathways. Annu. Rev. Biochem., 55, 663-700, 1986.
Silverstein S.C., Steinman R.M., Cohn Z.A. Endocytosis. AnhurRev. Biochem., 46, 669-722, 1977.
56. *Dahms N. M., Label P., Breitmeyer J., Chirgwin J. M., Kornfeld S.* 46 kd mannose 6-phosphate receptor: cloning, expression, and homology to the 215 kd mannose 6-phosphate receptor. Cell, 50, 181 192, 1987.
Kornfeld S. Trafficking of lysosomal enzymes. FASEB J., 1, 462-468, 1987.
Pfeffer S. R. Mannose 6-phosphate receptors and their role in targeting of proteins to lysosomes. J. Membr. Biol., 103, 7-16, 1988.
van Fiqura K., Hasilik A. Lysosomal enzymes and their receptors. Annu. Rev. Biochem., 55, 167-193, 1986.
57. *Brown W.J., Goodhouse J.; Farquhar. M.G.* Mannose 6-phosphate receptors for lysosomal enzymes cycle between the Golgi coplex and endosomes. J. Cell Biol., 103, 1235-1247, 1986.
Duncan J. R., Kornfeld S. Intracellular movement of two mannose 6-phosphate receptors: return to the Golgi apparatus. J. Cell Biol., 106, 617-628, 1988.
Geuze H.J.. Slot J. W., Strous G.J.A.M., Hasilik A., van Figura K. Possible pathways for lysosomal enzyme delivery. J. Cell Biol., 101, 2253-2262, 1985.
Rothman J. E., Schmid S. L. Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. Cell, 46, 5-9, 1986.
58. *Lane/ L., Reitman M., Tang J., Roberts R. M., Kornfeld S.* Lysosomal enzyme phosphorylation. J. Biol. Chem., 259, 14663-14671, 1984.
Reitman M. L., Kornfeld S. Lysosomal enzyme targeting. N-acetylglucosaminyl-phosphotransferase selectively phosphorylates native lysosomal enzymes. J. Biol. Chem., 256, 11977 11980, 1981.
59. *Kornfeld S.* Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. J. Clin. Invest., 77, 1-6, 1986.
Neufeld E. F., Lim T. W., Shapiro L. J. Inherited disorders of lysosomal metabolism. Annu. Rev. Biochem. 44, 357 376, 1975.
60. *Burgess T. L., Kelly R. B.* Constitutive and regulated secretion of proteins. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 243-293, 1987.
61. *Griffiths G., Simons K.* The *trans-Golgi* network: sorting at the exit site of the Golgi complex. Science, 234, 438-443, 1986.
Orci L. et a/. The trans-most cisternae of the Golgi complex: a compartment for sorting of secretory and plasma membrane proteins. Cell, 51, 1039-1051, 1987.
62. *Herzoy V'., Farquhar M. G.* Luminal membrane retrieved after exocytosis reaches most Golgi cisternae in secretory cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5073-5077, 1977.
Snider M. D.. Rogers O. C. Membrane traffic in animal cells: cellular glycoproteins return to the site of Golgi mannosidase I. J. Cell Biol., 103, 265-275, 1986.
63. *Lodish H. F.* Transport of secretory and membrane glycoproteins from the rough endoplasmic reticulum to the Golgi. J. Biol. Chem., 263, 2107-2110, 1988.
Rothman J. E. Protein sorting by selective retention in the endoplasmic reticulum and Golgi stack. Cell, 50, 521-522, 1987.
Wieland F. T., Gleason M. L., Serafini T. A., Rothman J. E. The rate of bulk flow from the endoplasmic reticulum to the cell surface. Cell, 50, 289-300, 1987.
64. *Bartles J. R.. Hubbard A. L.* Plasma membrane protein sorting in epithelial cells: do secretory pathways hold the key? Trends Biochem. Sci., 13, 181 184, 1988.
Matlin K. S. The sorting of proteins to the plasma membrane in epithelial cells. J. Cell Biol., 103, 2565 2568, 1986.
Mostov K. E., Breitfeld P., Harris J. M. An anchor-minus form of the polymeric immunoglobulin receptor is secreted predominantly apically in Madin-Darby canine kidney cells. J. Cell Biol., 105, 2031-2036, 1987.
Simons K., Fuller S. D. Cell surface polarity in epithelia. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 243-288, 1985.

65. *Simons K., Garoff H., Helenius A.* How an animal virus gets into and out of its.host cell. Sci. Am., 246(2), 58-66, 1982.
Simons K., Warren G. Semliki forest virus: a probe for membrane traffic in the animal cell. Adv. Protein Chem., 36, 79-132, 1984.
66. *Rodriguez-Boulan F. J.* Membrane biogenesis, enveloped RNA viruses, and epithelial polarity. In: Modern Cell Biology. Vol. 1 (J. R. Mcintosh, B. H. Satir, eds.), pp. 119 170, 1983.
Rodriguez-Boulan E. J., Sabatini D. D. Asymmetric budding of viruses in epithelial monolayers: a model system for the study of epithelial polarity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5071-5075, 1978.
Roth M. G., Sirnivas R. V., Compans R. W. Basolateral maturation of retroviruses in polarized epithelial cells. J. Virol., 45, 1065-1073, 1983.
Strauss E. G., Strauss J. H. Assembly of enveloped animal viruses. In: Virus Structure and Assembly (S. Casjens, ed.), Chapter 6. Boston, Jones and Bartlett, 1985.
67. *Rothman J. E.* Protein sorting by selective retention in the endoplasmic reticulum and Golgi stack. Cell, 50, 521-522, 1987.
68. *Griffiths G., Pfeiffer S., Simons K., Mat/in K.* Exit of newly synthesized membrane proteins from the *trans* cisterna of the Golgi complex to the plasma membrane. J. Cell Biol., 101, 949-964, 1985.
Orci L., Click B. S., Rothman J. E. A new type of coated vesicular carrier that appears not to contain clathrin: its possible role in protein transport within the Golgi stack. Cell, 46, 171-184, 1986.
69. *Bourne H.* Do GTPases direct membrane traffic in secretion? Cell, 53, 669-671, 1988.
Novick P., Field C., Schekman R. Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. Cell, 21, 205-215, 1980.
Scheckman R. Protein localization and membrane traffic in yeast. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 115-143, 1985.
70. *Batch W. E., Dunphy W. G., Braell W. A., Rothman J. E.* Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. Cell, 39, 405-416, 1984.
Dunphy W. G. et al. Yeast and mamals utilize similar cytosolic components to drive protein transport through the Golgi complex. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 1622-1626, 1986.
Fries E., Rothman J. E. Transport of vesicular stomatitis virus glycoprotein in a cell-free extract. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3870-3874, 1980.

9 Клеточное ядро

Почти вся ДНК эукариотической клетки сосредоточена в ядре, объем которого составляет приблизительно 10% от общего объема клетки. Ядро окружено **ядерной оболочкой,** состоящей из двух концентрически расположенных мембран. Ядерные мембраны пронизаны удаленными на некоторое расстояние друг от друга порами, которые играют важную роль в переносе определенных молекул в цитоплазму из нее. Ядерная оболочка непосредственно связана с эндоплазматическим ретикулумом. С обеих сторон к ней прилегают сетеподобные структуры, состоящие из промежуточных филаментов. Та из них, которая выстилает внутреннюю ядерную мембрану, имеет вид тонкой оболочкя и называется **ядерной ламиной.** Сетеподобная структура, окружающая наружную ядерную мембрану, гораздо менее компактна (рис. 9-1).

Скорее всего у предков эукариотических клеток, как и у живущих ныне прокариотических организмов, ядро отсутствовало (см. разд. 8.1.2), и можно только строить догадки, почему в ходе эволюции появилась такая обособленная структура. О возможных причинах отделения ДНК от цитоплазмы можно судить по двум специфическим свойствам эукариотических клеток. Одно из таких свойств - существование цитоскелета, состоящего главным образом из микротрубочек и акти-новых нитей, участвующих в движении эукариотических клеток (см. гл. И). Бактерии, ДНК которых контактирует с цитоплазмой, лишены таких филаментов и передвигаются с помощью наружных образований. Возможно, одна из функций ядерной оболочки эукариот состоит в защите их длинных ломких молекул ДНК от механических воздействий цитоскелета.



Рис, 9-I. Поперечный срез ядра типичной клетки. Ядерная оболочка состоит из двух мембран, причем наружная является продолжением мембраны эндоплазматического ретикулума (см. также рис. 8-19). ЛипидныЙ бислой внутренней и наружной ядерных мембран соединяются в ядерных порах. Две сети нитевидных промежуточных фибрилл *(цветные линии)* обеспечивают механическую прочность ядерной оболочки. Фибриллы внутри ядра образуют подстилающую ядерную ламину.

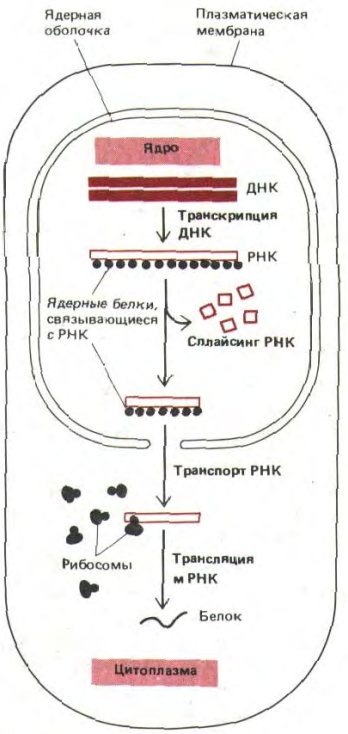


Рис. 9-2. Синтез белка у эукариот (ДНК -+ РНК -» белок). Благодаря ядерной оболочке активные рибосомы отделены от ядра; в результате транскрипты РНК проходят про-цессинг до выхода из ядра в цитоплазму, где происходит трансляция. Таким образом, между транскрипцией ДНК и трансляцией РНК осуществляется процессинг и транспорт РНК.

Второй важной особенностью эукариотических клеток является наличие у них процессинга РНК, который происходит перед трансляцией РНК в белок. В эукариотической клетке в ходе эволюции возникли многочисленные ограниченные мембраной компарт менты, в каждом из которых происходит вполне определенный набор химических реакций. Ядро можно рассматривать как один из таких компартментов. Известно, что в прокариотических клетках синтез РНК **(транскрипция)** и синтез белка **(трансляция)** происходят одновременно: рибосомы синтезируют белок начиная с 5'-конца молекулы РНК, а в это время на З'-конце молекулы РНК еще продолжается транскрипция. Таким образом, воз-можностъ внесения изменений й траискршты РНК до трансляции белка относительно невелика. У эукариот же процессы транскрипции и трансляции разделены и во времени, и в пространстве: транскрипция происходит в ядре, а трансляция-в цитоплазме. Транскрипты РНК сразу же упаковываются в рибонуклеопротеиновые комплексы, что способствует их последующему процессингу. В ходе процессинга определенные нук-леотидные последовательности РНК удаляются, и оставшиеся «сращиваются» (сплайсируются). Эту стадию в процессе переноса генетической информации у эукариот следует признать чрезвычайно важной. Лишь по завершении сплайсинга упаковывающие белки удаляются, и молекулы РНК переносятся из ядра в цитоплазму, где рибосомы начинают трансляцию белка с РНК (рис. 9-2).

Сплайсинг РНК позволяет одному гену детерминировать образование нескольких различных белков (см. разд. 10.4.2) и кроме того дает клетке ряд преимуществ (см. разд, 10,5.3). Вполне возможно, что биологический смысл появления ядра в ходе эволюции эукариотических клеток заключается именно в том, что ядерный компартмент обеспечивает эффективный сплайсинг (рис. 9-3). Гипотетическая схема возникновения ядра представлена на рис. 8-4.

Строение ядерной оболочки подробно рассматривается в гл. 8 в связи с проблемой избирательного транспорта макромолекул (см. разд. 8.3). В настоящей главе мы обсудим, как белки упаковывают ДНК в хромосомы, как хромосомы складываются и размещаются в ядре и как они реплицируются в течение S-фазы каждого клеточного цикла. Большое

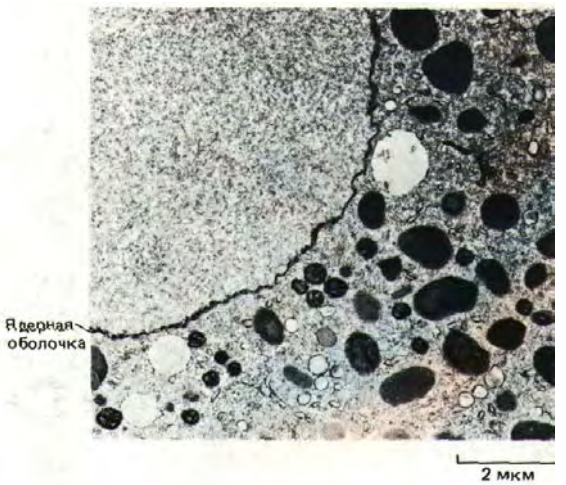


Рис. 9-3. Ядерная оболочка отделяет ядро от цитоплазматических органелл. На этой электронной микрофотографии представлен тонкий срез ооцита морского ежа, ядро которого окрашивается необычайно равномерно, а цитоплазма плотно забита органеллами. (С любезного разрешения David Begg и Tim Hunt.)

внимание будет уделено проблемам синтеза и сплайсинга РНК, наиболее значительным событиям, происходящим в интерфазном ядре. Механизмы, контролирующие экспрессию генов, обсуждаются в гл. 10.

9.1. ДНК и белки, входящие в состав хромосом [1]

В течение первых 40 лет нашего столетия биологи не принимали всерьез предположения о том, что содержащаяся в хросомах ДНК несет генетическую информацию. Отчасти это было следствием господствовавшего тогда ошибочного мнения, будто бы в нуклеиновых кислотах имеются лишь простые регулярно повторяющиеся тетрануклеотидные последовательности (например, *AGCTAGCTAGCT...).* Сейчас мы знаем, что ДНК представляет собой чрезвычайно длинный неразветвленный линейный полимер, который может содержать много миллионов нуклеотидов, расположенных в нерегулярной, но отнюдь не случайной последовательности: эта последовательность нуклеотидов в полинуклеотидной цепи ДНК является кодовой формой записи наследственной информации. Линейный четырехбуквенный генетический код, словами-символами которого служат тройки нуклеотидов **(кодонов,** определяющих аминокислоты, см. разд. 5.1.6), позволяет хранить огромное количество информации в очень малом объеме. В ДНК 1 млн. «букв» (нуклеотидов) умещается на отрезке прямой, длина которого равна 3,4 х 10^5 нм (0,034 см), и занимает объем, составляющий примерно 10^6 $нм^3$ ($10^{\sim 15}$ $см^3$).

Каждая молекула ДНК упакована в отдельную **хромосому,** а вся генетическая информация, хранящаяся в хромосомах организма, называется **геномом.** Геном бактерии **E.coli** содержит 4,7 х 10^6 нуклеотидных пар, составляющих единственную молекулу ДНК (одна хромосома). Геном человека представлен 6 х 10^9 парами нуклеотидов, распределенных в 46 хромосомах (22 пары аутосом и 2 отличающиеся друг от друга половые хромосомы), и, следовательно состоит из 24 типов молекул ДНК. У диплоидных организмов, таких как мы с вами, имеется по две копии каждого типа хромосом, одна из этих копий наследуется от матери, а другая от отца (за исключением половых хромосом самцов, которым Y-хромосома всегда достается от отца, а X-хромосома-от матери). Итак, типичная клетка человека содержит 46 хромосом и около 6 х 10^9 нуклеотидных пар ДНК. Другие млекопитающие имеют геном примерно такого же размера. Теоретически это количество ДНК можно упаковать в куб со стороной 1,9 мкм. Для сравнения, 6 х 10^9 букв в такой книге заняли бы более миллиона страниц, и ее объем оказался бы в 10^{17} раз больше.

В данном разделе мы обсудим взаимосвязь между молекулами ДНК и хромосомами и расскажем про разнообразные белки, которые связываются с молекулой ДНК, преобразуя ее в активную эукариотическую хромосому. Некоторые из этих белков контролируют экспрессию генетической информации, регулируя синтез молекул РНК на определенных участках генома. Другие белки, главным образом *гистоны,* складывают каждую длинную молекулу ДНК таким образом, что она становится компактной и упорядоченной, но при этом сохраняется доступ к необходимой генетической информации.

9-3

9.1.1. Каждая хромосома образуется из одной длинной молекулы ДНК [2]

В каждой отдельной хромосоме человека содержится от 50 х 10^6 до 250 х 10^6 нуклеотидных пар. В нескрученном состоянии молекулы ДНК

такого размера имели бы длину от 1,7 до 8,5 см, но при удалении хромосомных белков даже самое слабое механическое воздействие приводит к их разрыву. Целые молекулы ДНК можно выделить из некоторых низших эукариотических организмов, таких как дрожжи *Saccharomyces cerevisiae,* хромосомы которых значительно короче. С помощью метода пульс-гельэлектрофореза удалось показать, что каждая хромосома дрожжей состоит из единственной линейной молекулы ДНК. Эти данные согласуются с результатами весьма сложных измерений, основанных на степени спирализации. Соответствующие эксперименты проводили на хромосомах дрозофилы, молекулы ДНК которой имеют примерно ту же длину, что и хромосомы человека. Полученные разными способами данные позволяют сделать вывод, что все хромосомы содержат только одну молекулу ДНК.

9-4
9-5

9.1.2. Каждая молекула ДНК, образующая хромосому, должна содержать центромеру, две теломеры и точки начала репликации [3]

Для того, чтобы молекула ДНК могла сформировать активную хромосому, она должна обладать способностью реплицироваться, разделяться при митозе и сохраняться в ряду клеточных поколений. Применение метода рекомбинантных ДНК к клеткам дрожжей позволило выделить и определить те элементы, которые «превращают» последовательность нуклеотидов в хромосому. Два из трех этих элементов были идентифицированы при изучении небольших кольцевых молекул ДНК, самостоятельно реплицирующихся в клетках дрожжей *Saccharomycos cerevisiae.* Оказалось, что для репликации такой молекулы необходима специальная последовательность, которая выполняет роль **участка инициации репликации ДНК** (называемого также **точкой начала репликации).** В каждой хромосоме дрожжей таких участков несколько. Второй элемент, необходимый для функционирования последовательности ДНК как хромосомы, называется **центромерой.** Центромера соединяет содержащую ее молекулу ДНК с митотическим веретеном во время М-фазы (см. разд. 13.5.3). В каждой хромосоме дрожжей имеется только одна центромера. Если участок, выполняющий роль центромеры, встроить в плазмиду, то при делении каждая дочерняя клетка дрожжей обязательно получит одну из двух копий вновь реплицировавшейся молекулы плазмидной ДНК.

Третий необходимый элемент хромосомы - это **теломера,** она должна присутствовать на каждом конце линейной хромосомы. Если кольцевая плазмида, содержащая участок инициации репликации и центромеру, разрывается по какому-либо сайту, она продолжит свою репликацию и останется прикрепленной к митотическому веретену, однако в последующих поколениях клеток все-таки будет утеряна. Это происходит вследствие того, что репликация на отстающей цепи требует того, чтобы перед копируемым участком имелась последовательность ДНК, которая могла бы служить матрицей для РНК-затравки (см. рис. 5-43). Так как для последних нескольких нуклеотидов линейной молекулы ДНК этих последовательностей нет, ее цепи с каждым новым циклом репликации становятся все короче. У бактерий и вирусов хромосома имеет кольцевую форму, и поэтому подобные затруднения при окончании репликации не возникают. Эукариотические клетки, хромосомы которых линейны, обзавелись специальной теломерной последовательностью ДНК. Это простая повторяющаяся последовательность нуклеотидов, которая периодически наращивается специальным ферментом (см. разд. 9.3.5).

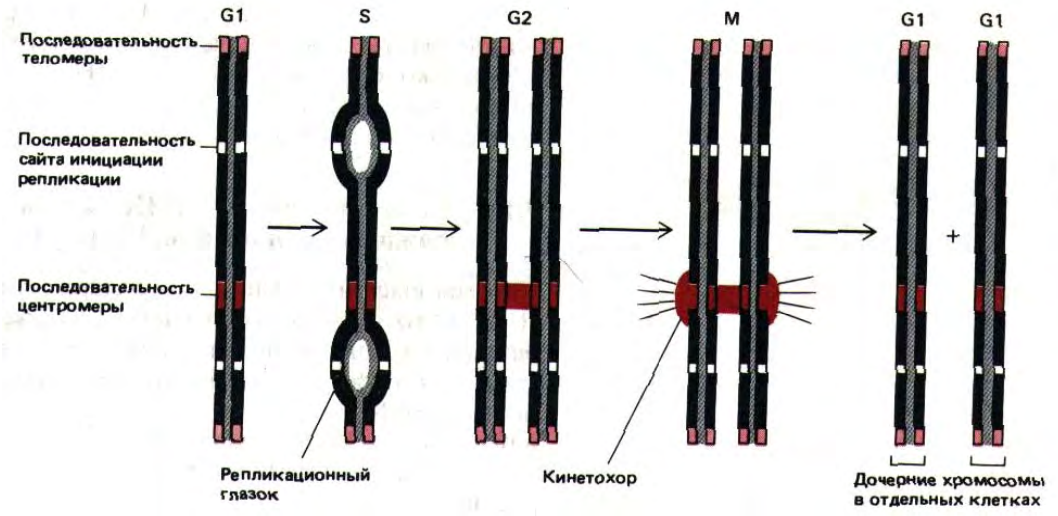


Рис. 9-4. Функционирование трех элементов последовательности ДНК, необходимых для образования стабильных линейных эукариотических хромосом. **Теломерные** последовательности предотвращают укорачивание хромосом, которое без них происходило бы при каждом цикле репликации ДНК. **Центромеры** служат для выстраивания молекул ДНК на митотическом веретене в ходе М-фазы. Точки начала репликации **(сайты инициации репликации)** нужны для формирования решшкационных вилок в S-фазе.

Таким образом, потерянная теломерная ДНК восстанавливается, что дает возможность линейной хромосоме реплицироваться полностью.

На рис. 9-4 представлены схемы действия трех элементов последовательности ДНК, которые обеспечивают стабильность линейной хромосомы в клетке дрожжей. По-видимому, такие же элементы необходимы и для поддержания стабильности хромосом в клетках человека. Однако до сих пор участки инициации репликации ДНК и последовательности центромер человека охарактеризованы далеко не полностью, а соответствующие дрожжевые последовательности в клетках высших эука-риот, как оказалось, не функционируют.

С другой стороны, рекомбинантные конструкции, состоящие из ДНК человека и дрожжей, способны реплицироваться в клетках дрожжей как

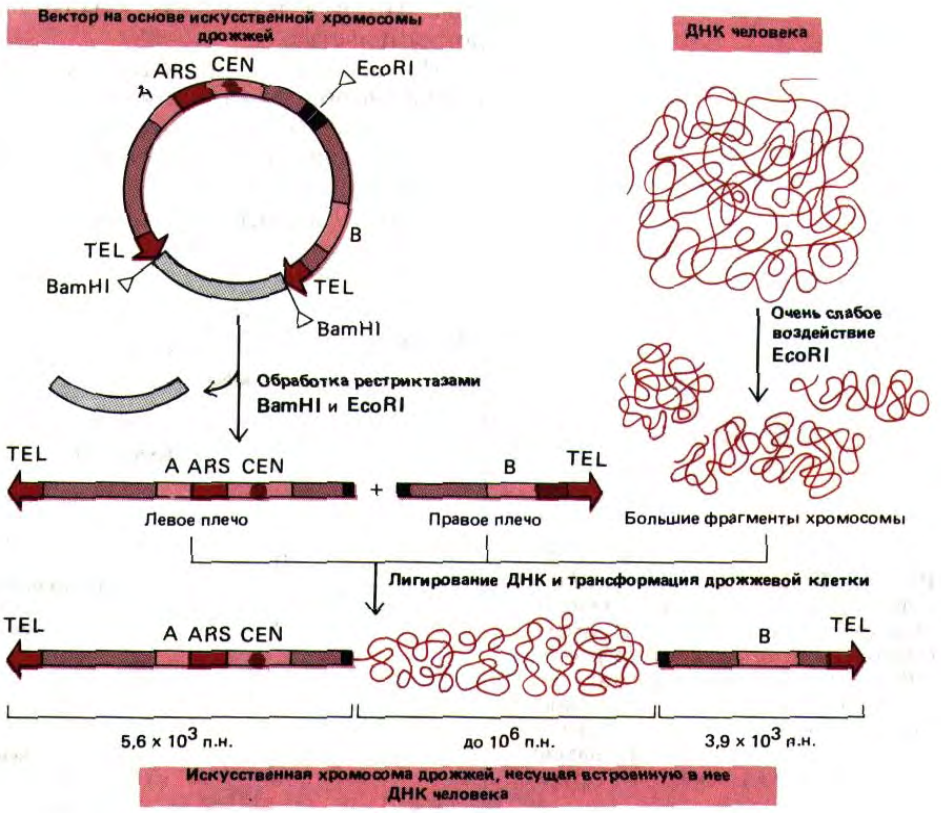


Рис. 9-5. Искусственный хромосомный вектор дрожжей (yeast artificial chromosome, YAC-вектор), позволяющий клонировать очень большие молекулы ДНК. Теломера, центромера и точка начала репликации дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* обозначены соответственно TEL, CEN и ARS (ARS от англ, autonomously replicating sequence - автономно реплицируготшеся последовательности. Точка начала репликации лает возможность плазмиде реплицироваться вне хромосом клеток хозяина). BamHl и EcoRl-рестрикционные эндонуклеазы, которые разрезают двойную спираль ДНК в строго определенных сайтах. Последовательности, обозначенные «А» и «В», кодируют ферменты, которые служат селективными маркерами для отбора трансформированных дрожжевых клеток, несущих искусственную хромосому. (С изменениями из D. T. Burke, G. E. Carle and M. V. Olson, Science 236: 806-812, 1987.)

искусственные хромосомы. Таким образом, клетки дрожжей можно использовать для получения геномных библиотек человека (см. разд, 5.6.3), в которых каждый клон ДНК, размноженный в виде искусственной хромосомы, содержит до миллиона нуклеотидных пар последовательности ДНК человека (рис. 9-5).

9.1.3. Большая часть ДНК хромосомы не кодирует жизненно важных белков или РНК [4]

Геномы высших организмов содержат, по-видимому, большой избыток ДНК. О том, что относительное содержание ДНК в гаплоидных геномах различных организмов напрямую не связано со сложностью организма, стало ясно уже давно: например, клетки человека содержат в 700 раз больше ДНК, чем *E.coiï,* в то же время в клетках некоторых земноводных и растений ДНК в 30 раз больше, чем в клетках человека (рис. 9-6). Более того, содержание ДНК в геномах различных видов земноводных может различаться в 100 раз.

Биологи, изучающие генетику популяций, попытались оценить количество ДНК высших организмов, кодирующей белки клетки или принимающей участие в регуляции генов, ответственных за синтез таких белков. Их подход заключался в следующем: каждый ген всегда с небольшой долей вероятности подвержен мутации-случайному изменению нуклеотидов в ДНК. Чем больше число генов, тем выше вероятность того, что по крайней мере в одном из них произойдет мутация. Так как большинство мутаций приводит к повреждению активности гена, в котором они происходят, скорость мутирования накладывает ограничения на число жизненно важных генов. Принимая во внимание этот довод и исходя из наблюдаемой скорости мутирования, можно заключить, что в регуляции или кодировании жизненно важных белков принимает участие не более нескольких процентов генома млекопитающих. Ниже в поддержку такого вывода будут приведены и другие доказательства.

На основании приведенных рассуждений можно сделать весьма важный вывод. Хотя геном млекопитающих в принципе имеет достаточную величину (3 x 10^9 нуклеотидов), чтобы кодировать почти 3 млн. белков средних размеров, ограничения, накладываемые точностью воспроизведения ДНК, означают, что ни один организм не может иметь более 60000 жизненно важных белков (при этом не учитывается вклад

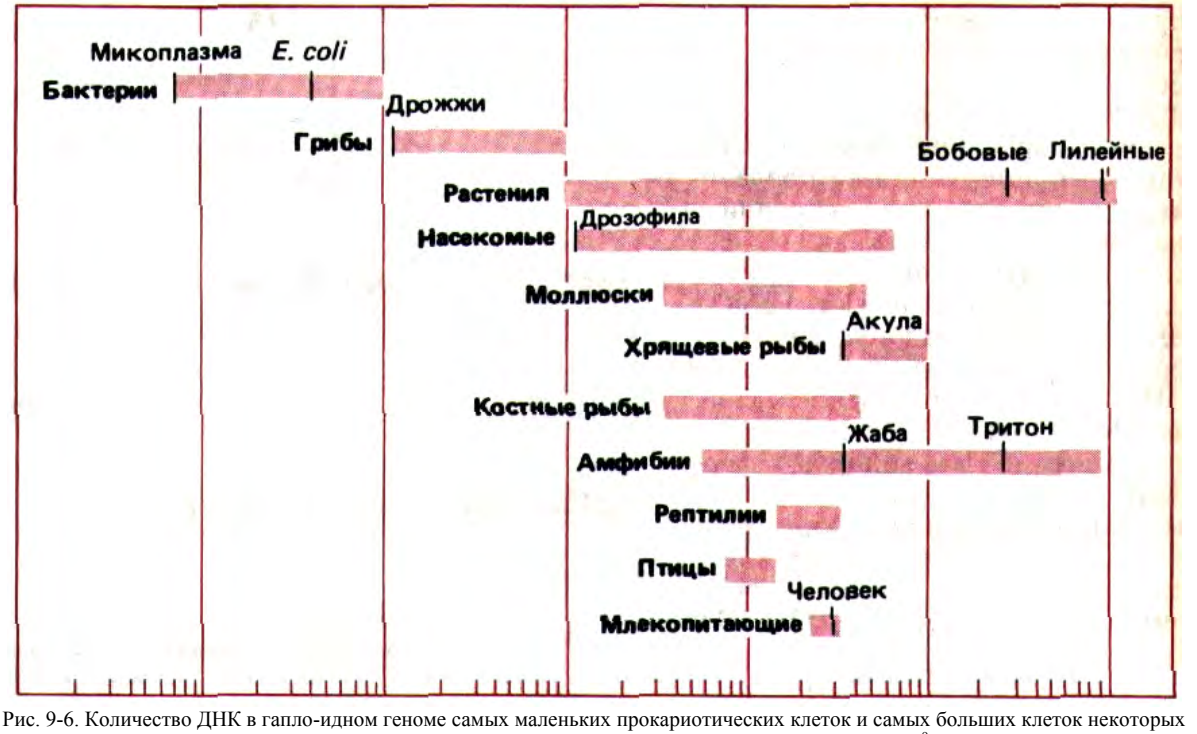


Рис. 9-6. Количество ДНК в гапло-идном геноме самых маленьких прокариотических клеток и самых больших клеток некоторых растений и амфибий может различаться в 100000 раз. Обратите внимание, что размер генома у человека (3 x 10^9 нуклеотидных пар) намного меньше, чем у некоторых других организмов.

альтернативного сплайсинга РНК). Таким образом с генетической точки зрения человек, вероятно, лишь в 10 раз сложнее, чем плодовая мушка дрозофила, имеющая около 5000 генов.

Для чего бы ни служила избыточная ДНК в клетках высших эукариот (см. гл. 10), данные, приведенные на рис. 9-6, доказывают, что клетки высших эукариот, содержащие большое количество дополнительной ДНК, не страдают от этого. И действительно, даже важные кодирующие последовательности у них часто прерываются длинными участками некодирующей ДНК.

9.1.4. Каждый ген-это сложная функционально активная единица, предназначенная для регулируемого синтеза молекулы РНК

Главной функцией генома является образование молекул РНК. Определенные участки последовательности нуклеотидов ДНК копируются с образованием соответствующих последовательностей РНК, которые либо кодируют белки (как мРНК), либо образуют «структурную» РНК, например молекулы тРНК или рРНК. Каждый участок молекулы ДНК, на которой синтезируется активная молекула РНК, носит название «ген».

Гены, входящие в состав хромосом высших эукариот, могут содержать до 2 млн. нуклеотидных пар, а гены, размер которых превышает 100000 нуклеотидных пар, встречаются довольно часто (табл. 9-1). Между тем для кодирования белка среднего размера (содержащего от 300 до 400 аминокислотных остатков) требуется всего лишь 1000 нуклеотидных пар. Большая часть избыточных участков состоит из длинных последовательностей некодирующей ДНК, которая перемежается относительно короткими сегментами кодирующей ДНК. Кодирующие последовательности называются **экзонами,** а разделяющие их некодирующие последовательности - нитронами. Молекула РНК, синтезированная с такого гена, носит название **первичного транскрипта.** Для того чтобы первичный транскрипт превратился в мРНК, он подвергается **процессиигу.** При этом некодирующие последовательности удаляются, а кодирующие как бы «сращиваются» в единую молекулу **(сплайсинг РНК).**

Большие гены состоят из длинной вереницы чередующихся экзонов и нитронов. Кроме того, в каждом гене имеются **регуляторные последовательности ДНК,** с которыми связываются **регуляторные белки,** контро-

Таблица 9-1. Размер некоторых генов человека в тысячах нуклеотидов

	Размер гена [1)]	**Размер мРНК**	**Число нитронов**
β-глобин	1,5	0,6	2
Инсулин	1,7	0,4	2
Протеинкиназа С	11	1,4	7
Альбумин	25	2,1	14
Каталаза	34	1,6	12
Рецептор ЛНП	45	5,5	17
Фактор VIII	186	9	25
Тироглобулин	300	8,7	36
Дистрофии[1)]	более 2000	17	более 50

[1)] В указанный размер гена входит его транскрибируемая часть вместе с близлежащими регуляторними последовательностями ДНК (По данным Victor McKusick).

[2)] Измененная форма этого гена вызывает мышечную дистрофию Дюшенна.

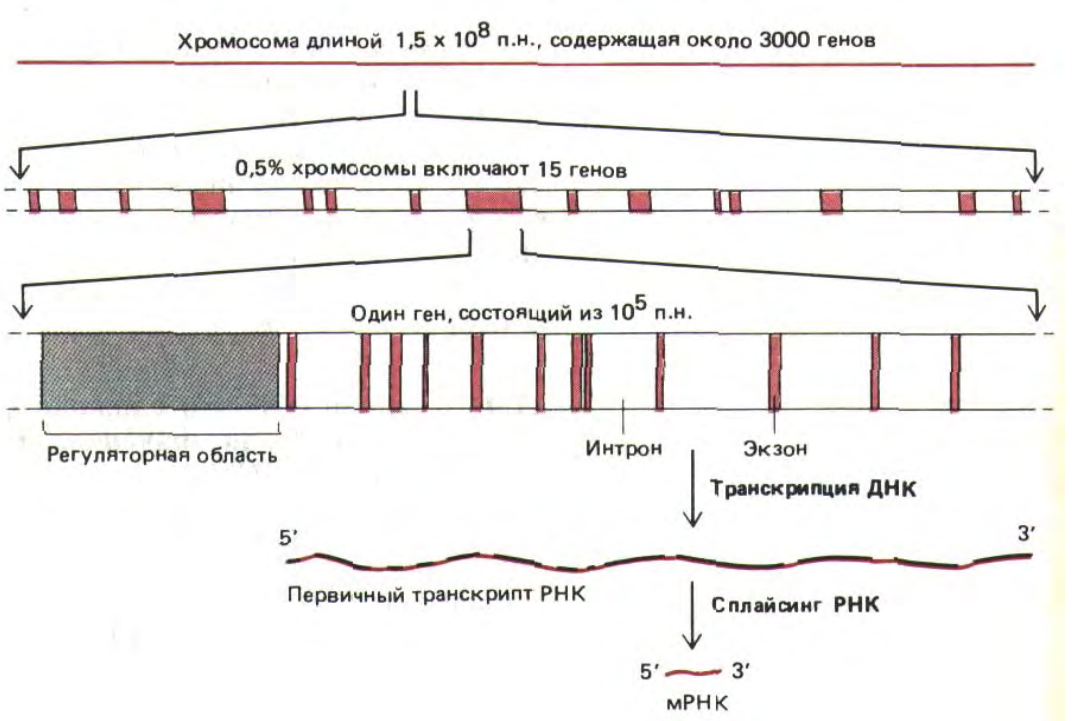


Рис. 9-7. Организация генов в типичной хромосоме позвоночных. Белки, связывающиеся с ДНК в регуляторных областях, определяют транскрипцию гена. Регуляторные последовательности, как правило, расположены на 5'-конце гена (как показано на схеме), но могут находиться в нитронах, экзонах и на 3'-конце. При образовании молекул информационной РНК (мРНК) последовательности интро-нов из первичных транскриптов РНК удаляются. Приведенные здесь данные по количеству тенов в хромосоме соответствуют минимальной оценке.

лирующие транскрипцию. Многие регуляторные последовательности расположены перед (на 5'-конце) сайтом, с которого начинается транскрипция РНК, однако они могут также находиться в нитронах, за (на 3'-конце) сайтом, где кончается транскрипция РНК или даже внутри экзонов. Типичная хромосома позвоночных схематически изображена на рис. 9-7, кроме того, на рисунке представлен один из многих генов, входящих в ее состав.

9-6

9.1.5. Сравнение ДНК родственных организмов позволяет выявить в ней консервативные и неконсервативные области [5]

По мере совершенствования методов определения нуклеотидной последовательности ДНК все более реальной представляется идентификация всех 3 x 10^9 нуклеотидов, составляющих геном человека. Однако необходимы специальные подходы, чтобы выявить ту небольшую часть последовательности (менее 10%), которая собственно и является смысловой. Один из путей решения это задачи - *определение* последовательности соответствующих областей генома родственного вида, например, мыши. Полагают, что человек и мышь произошли от общего предка около 80 х. 10^6 лет назад. Это дейстаточно продолжительное, время дм того, чтобы примерно два из каждых трех нуклеотидов подверглись изменениям при случайных мутациях. Следовательно, те немногие области, которые в обоих геномах оказались схожими (консервативные последовательности), представляют собой именно те участки, в которых мутация приводит к повреждению активности. Организмы, несущие такую вредную мутацию, очевидно, при естественном отборе будут элиминироваться. Неконсервативные области соответствуют некодирующей ДНК, расположенной между генами и входящей в состав нитронов. Последовательности такой ДНК не оказывают столь сильного влияния на функцию. Напротив, консервативные участки содержат функционально важные экзоны и регуляторные области. Изучая результаты столь длительного «эксперимента», поставленного природой, можно выявить наиболее интересные области геномов. Сравнение нуклеотидной последовательности ДНК у разных видов свидетельствует о том, что у позвоночных более чем 90% ДНК не имеет существенного значения.

9.1.6. Хромосомы содержат разнообразные белки, связанные с определенными последовательностями ДНК

Информация, хранящаяся в ДНК, организуется, реплицируется и считывается разнообразными **белками, связывающимися с ДНК** (ДНК-связанные белки). Некоторые из этих белков связываются по всей длине молекулы относительно неспецифически и участвуют в ее упаковке, не мешая при этом функционированию других белков. Эти упаковывающие белки будут обсуждены ниже (см. разд. 9.1.17). Другие белки объединяются с определенными короткими последовательностями ДНК, которые часто в ходе эволюции оказываются в различных геномах консервативными (см. рис. 10-34). Такие **сайт-специфические ДНК-связывающие белки** имеют самые разнообразные функции. Некоторые из них, вероятно, участвуют в сворачивании длинной молекулы ДНК с образованием различных доменов, другие способствуют инициации репликации ДНК; многие из них контролируют транскрипцию генов. Каждый тип клеток многоклеточного организма содержит разнообразную смесь таких **регуляторних белков.** Действуя совместно, они определяют характер экспрессии различных генов (см. разд. 10.2.8).

Контроль экспрессии генов обсуждается в гл. 10. Здесь мы рассмотрим только вопрос о том, каким образом белок связывается с ДНК. Все до сих пор описанные сайт-специфические ДНК-связывающие белки узнают свою последовательность с внешней стороны молекулы и ассоциируют с ДНК, не влияя на спаренные основания. Это оказывается возможным благодаря тому, что части каждой нуклеотидной пары расположены в двух отдельных «бороздках» - *большой* и *малой* (рис. 9-8, *А).* В большой бороздке каждая из четырех возможных пар (A-T, T-A, G-C или C-G) однозначно узнается по специфическому расположению выступающих атомов, малая бороздка менее информативна в этом

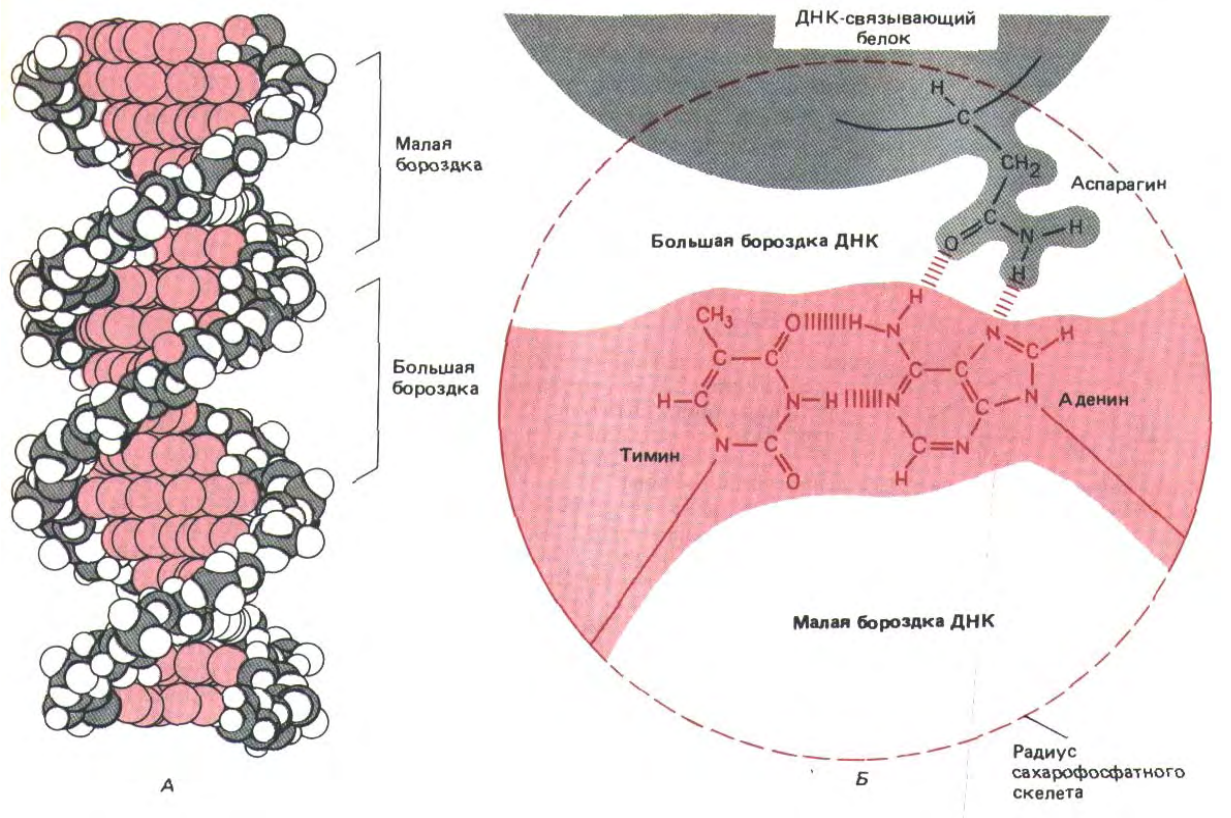


Рис. 9-8. Узнавание ДНК-связывающими белками определенных пар оснований в составе молекулы ДНК. *А.* Двойная спираль ДНК (B-форма): цветом выделены большая и малая бороздки. «Края» каждой пары оснований выступают в эти бороздки, что дает возможнсть ДНК-связывающим белкам опознавать различные последовательности нуклеотидов, образуя с ними водородные связи. Предполагаемое взаимодействие аминокислоты и A-T-пары схематически изображено на *Б* (вид вдоль оси спирали). Расположение водородных связей донорных и акцепторных групп в этой бороздке различно для каждого из четырех возможных сочетаний нуклеотидных пар. Необходимо отметить, что B-форма спирали ДНК правозакручена (см. рис. 3-4). Сайт-специфические ДНК-связывающие белки могут узнавать последовательности длиной от 4 до 50 нуклеотидных пар.

отношении. Как будет показано ниже, аминокислоты в связывающемся участке сайт-специфического белка расположены таким образом, чтобы усилить электростатические и водородные связи, возникающие при взаимодействии белка и определенной последовательности ДНК. Как и ожидалось, большая часть водородных связей с нуклеотидными парами, по-видимому, приходится на большую бороздку. Схема взаимодействия между боковой аминокислотной цепью и одной парой оснований в этой бороздке представлена на рис. 9-8, *Б*.

10-3
10-12

9.1.7. Уменьшение подвижности в геле позволяет выявить сайт-специфические ДНК-связываюшие белки в экстрактах клеток [6]

Молекула ДНК обладает высоким отрицательным зарядом и, следовательно, в электрическом поле быстро движется к положительному электроду. При электрофорезе в полиакриламидном геле молекулы ДНК разделяются по размеру, так как меньшие молекулы легче и быстрее проходят через поры геля. Молекулы белка, связавшись с ДНК, вызывают уменьшение подвижности ее молекул в геле. Чем больше связавшийся белок, тем медленнее движется связанная с ним ДНК. Это явление лежит в основе метода, регистрирующего **сдвиг подвижности** в теле. С помощью этого метода удается обнаруживать даже следовые количества сайт-специфического ДНК-связывающего белка. Короткие фрагменты ДНК, длина и последовательность которых известна (полученные либо при клонировании ДНК, либо путем химического синтеза), метят радиоактивной меткой и смешивают с экстрактом клеток; полученную смесь наносят на полиакриламидный гель и проводят электрофорез. Если фрагмент ДНК соответствует области хромосомы, с которой связываются многие сайт-специфические белки, то при радиоавтографии выявляется серия полос, обладающих разной подвижностью. Белки, связанные с ДНК в каждой из полос геля, можно отделить, фракционируя затем клеточные экстракты (рис. 9-9).

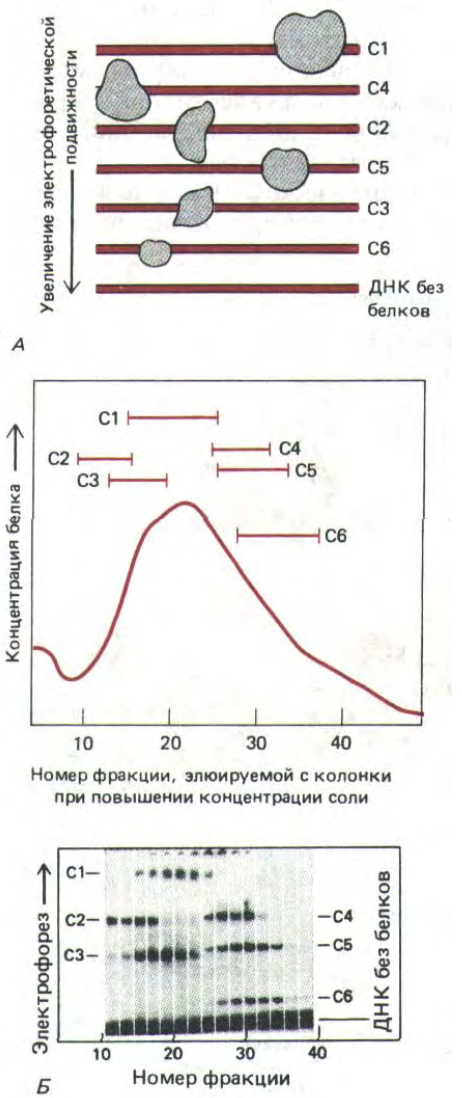


Рис. 9-9. Замедление в геле. Принцип метода схематически изображен на рис. 9-9, *А*. Экстракт, полученный из линии клеток, продуцирующих антитела, смешивают с радиоактивными фрагментами ДНК, содержащими последовательность от точки —131 до + 36 (относительно сайта инициации транскрипции в положении + 1) гена, кодирующего легкую цепь соответствующей молекулы антитела. Воздействие белков, входящих в состав экстракта, на подвижность фрагмента ДНК определяют методом электрофореза в полиакриламидном геле с последующей радиоавтографией. Свободные фрагменты ДНК быстро передвигаются к концу геля, тогда как фрагменты, связанные с белком, задерживаются. Обнаружение шести зон с замедленным движением указывает на присутствие в экстракте шести различных сайт-специфических ДНК-связывающих белков (обозначенных С1-С6). На схеме *Б* экстракты фракционировали с помощью стандартной хроматографической методики, каждую фракцию смешивали с радиоактивным фрагментом ДНК, наносили на одну дорожку полиакриламидного геля и анализировали далее, как указано на схеме *А*. *(Б-с* изменениями из C. Scheidereit, A. Heguy, R.G. Roeder, Cell 51: 783-793, 1987.)

9.1.8. Сайт-специфические ДНК-связывающие белки можно выделить и охарактеризовать, используя их сродство к ДНК [7]

Впервые сайт-специфические белки, связывающиеся с ДНК, были обнаружены у бактерий. С помощью генетического анализа у этих микроорганизмов удалось доказать существование регуляторных белков, таких как репрессор lac-оперона, репрессор бактериофага лямбда и cro-белок. Эти белки были выделены при последовательном фракционировании клеточных экстрактов на хроматографических колонках, а специфически связывающие их участки ДНК определены методом футпринт-тинга (см. разд. 4.6.6). Аналогичными методами были выделены и охарактеризованы первые сайт-специфические ДНК-связывающие белки у эукариот: Т-антиген вируса SV_{40}, фактор транскрипции *TF11A* и рецептор стероидного гормона.

В настоящее время для выделения сайт-специфических ДНК-связывающих белков разработаны гораздо более совершенные методы. Процедура обычно начинается с определения сдвига подвижности в геле. Благодаря этому можно выяснить, с каким именно участком на фрагменте ДНК связывается неизвестный белок в клеточном экстракте (см. рис. 9-9). Затем химическим способом синтезируется соответствующий этому связывающему участку двухцепочечный олигонуклеотид, который можно использовать двумя способами. При *аффинной хроматографии* олигонуклеотид связывают с нерастворимым пористым носителем, например агарозой, а затем таким нагруженным носителем заполняют колонку, которая селективно связывает белки, узнающие определенные последовательности ДНК. Этот относительно нетрудоемкий метод позволяет добиться 10000-кратной очистки.

Большинство белков, связывающихся с определенной последовательностью ДНК, присутствуют в клетках высших эукариот в количестве нескольких тысяч копий на клетку (что соответствует примерно одной молекуле из 50000 молекул всех белков клетки). Этого количества оказывается достаточно, чтобы методом аффинной хроматографии выделить белок той степени чистоты, которая позволяет определять у него аминоконцевую последовательность аминокислот. Это дает возможность синтезировать олигонуклеотидный зонд и с его помощью идентифицировать соответствующий клон кДНК. Имея в руках нужный клон кДНК, исследователь может определить полную аминокислотную последовательность белка и получать его в неограниченных количествах. В некоторых случаях клон кДНК, кодирующий сайт-специфический ДНК-связывающий белок, легче получить более простым путем, используя второй метод, еще более эффективный, чем аффинная хроматография ДНК. Этот метод начинается с получения библиотеки кДНК в соответствующим образом подобранном векторе. Отдельная колония бактерий (если экспрессирующий вектор - плазмида) или негативная колония (если вектор-бактериофаг) будет продуцировать большое количество белка, закодированного в содержащейся в ней кДНК. Чтобы найти ту редкую колонию, которая образует нужный белок, олигонуклеотид, содержащий соответствующий сайт связывания, метят радиоактивной меткой и используют его в качестве зонда на бумаге, куда нанесены аликвоты отдельных колоний (см. разд. 5.6.5). Те немногие колонии, которые синтезируют белки, специфически связывающие меченый олигонуклеотид, выращивают отдельно и испытывают дальше, чтобы найти среди них ту единственную, продуцирующую искомый белок.

Этот высоко эффективный метод разработан сравнительно недавно и поэтому на сегодняшний день из многих сотен сайт-специфических ДНК-связывающих белков, которые, как полагают, присутствуют в клетках высших эукариот, удалось выделить лишь небольшую часть.

9.1.9. Многие сайт-специфические ДНК-связывающие белки имеют одинаковые области [8]

Фактор транскрипции III А **(TFIIIA)** эукариот необходим для инициации синтеза небольших рибосомных РНК (5S-рРНК); он связывается в виде мономера с последовательностью ДНК размером около 50 нуклеотид-ных пар, расположенной почти в середине очень маленького гена 5S-рРНК. Аминокислотная последовательность этого белка дает основание предполагать, что он организован в виде серии девяти повторяющихся доменов, каждый из которых содержит по 30 аминокислот, сложенных в одну структурную единицу вокруг атома Zn, связывающего два остатка цистеина и два-гистидина. Другие белки, предположительно участвующие в регуляции генов, содержат меньшее число доменов со сходной структурой. Такие домены обычно называют **«цинковыми пальцами».** Белки, их содержащие, функционируют на ранних стадиях развития дрозофилы, более пяти таких белков участвуют в процессе скрещивания дрожжей; к этому же классу относится обычный фактор транскрипции млекопитающих Spl (см. разд. 10.2.8) и большая группа белков-рецепторов стероидного гормона (см. рис. 10-25).

Пока не определена трехмерная структура белков этого типа, и, следовательно, остается неизвестным, как они связываются с ДНК. На рис. 9-10 представлена гипотетическая схема, которую подтверждают данные футпринтинга.

9.1.10. Симметричные димеры ДНК-связывающих белков часто узнают симметричные последовательности нуклеотидов [8]

Для определения трехмерной структуры белка обычно необходим дифракционный рентгеноструктурный анализ больших кристаллов, получение которых часто представляет собой нелегкую задачу. Один из первых регуляторных белков, изученных таким методом - сго-белок бактериофага лямбда. Это небольшой белок (66 аминокислотных остатков), который не имеет «цинковых пальцев», однако, связывается с кластером специфических последовательностей ДНК, каждая из которых содержит

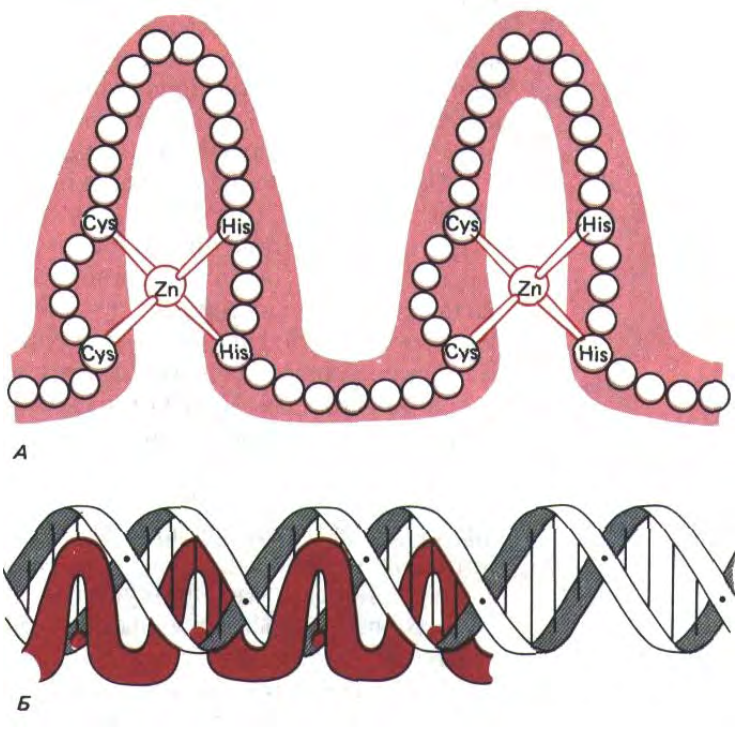


Рис. 9-10. Семейство сайт-специфических ДНК-связывающих белков типа «цинковые пальцы» *А.* Упрощенная схема строения ДНК-связы-вающего домена; кружочками обозначены отдельные аминокислоты. В настоящее время считается, что полипептидная цепь, образующая каждый «палец», имеет сложную глобулярную структуру. *Б.* Схема взаимодействия четырех «цинковых пальцев» с последовательностью ДНК. Согласно этой модели, каждый палец узнает определенную последовательность, состоящую примерно из пяти нуклеотидных пар. (С изменениями из A. Klug, D. Rhodes, Trends in Biochem. Sci. 12: 464-469, 1987.)



Рис. 9-11. Специфическая последовательность ДНК, узнаваемая cro-белком бактериофага лямбда. Выделенные цветом нуклеотиды в этой последовательности расположены симметрично, что позволяет половине димерного белка распознавать каждую половину данного сайта.

по 17 нуклеотидных пар. Одна из этих последовательностей приведена на рис. 9-11. Выделенная цветом часть последовательности является симметричной, т.е. при повороте спирали ДНК на 180° она не изменится. Симметрией обладают и многие участки связывания сайт-специфических белков. Такую симметрию можно объяснить исходя из структуры cro-белка, определенной методом дифракции рентгеновских лучей.

Cro-белок представляет собой симметричный гомодимер, который связывается с ДНК способом, изображенным на рис. 9-12. В связи с тем, что ось симметрии второго порядка последовательности белка расположена на оси симметрии второго порядка последовательности ДНК, каждая из одинаковых половин димера может образовывать одинаковые связи с теми нуклеотидными парами ДНК, которые она узнает. Во всех случаях, когда последовательность связывающего сайта ДНК симметрична, белок, узнающий ее, скорее всего оказывается димером или симметричным образованием большего размера.

9.1.11. Cro-белок принадлежит к семейству ДНК-связывающих белков, построенных по принципу «спираль-виток-спираль» [9]

Сайт мономера белка его, контактирующий с ДНК, образован последовательностью из 20 аминокислот, формирующих две α-спирали, которые разделены коротким витком. Такой фрагмент **спираль-виток-спираль** обнаружен и у ряда других бактериальных сайт-специфических **ДНК-свя-**зывйющих белков, трехмерные структуры которых известны (рис. 9-13). Более того, анализ аминокислотных последовательностей (обнаруженная при этом гомология) свидетельствует о том, что такой фрагмент присутствует и в составе других белков, участвующих в регуляции активности генов у бактерий, дрожжей и дрозофилы.

Все белки, содержащие структуру спираль-виток-спираль, изображенные на рис. 9-13, представляют собой симметричные гомодимеры. Одна из α-спиралей в каждом мономере, называемая *узнающей,* располагается в большой бороздке, где выступающая часть ее аминокислотной последовательности образует водородные связи с определенными основаниями **ДНК.** Важно, что две идентичные узнающие спирали в димере разделены только одним витком цепи **ДНК** (3,4 нм). Такое разделение дает возможность каждой узнающей спирали одинаковым образом взаимодействовать с симметрично расположенными парами оснований в участке связывания (рис. 9-14).

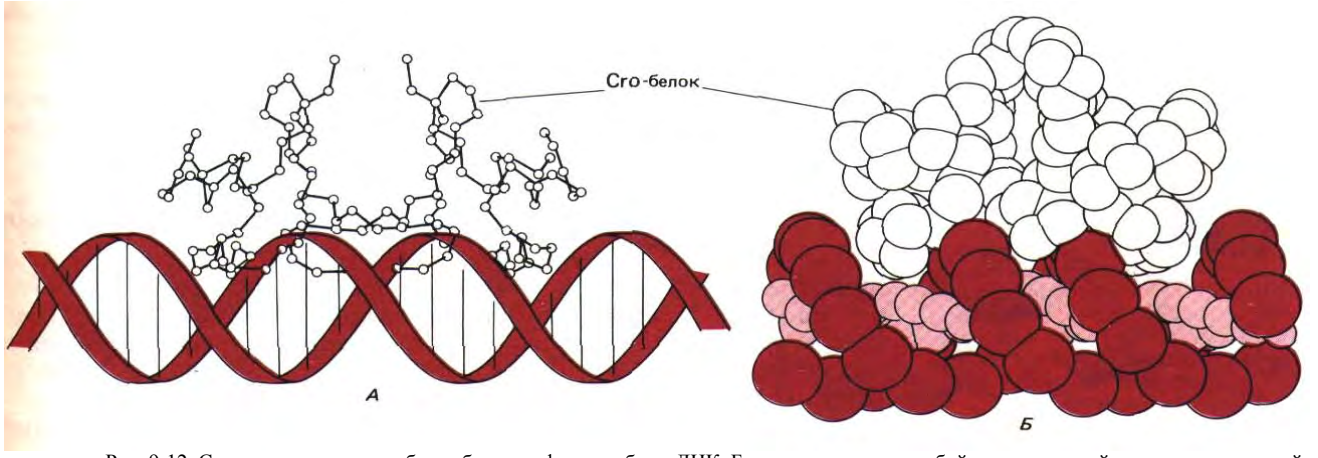


Рис. 9-12. Схема связывания cro-белка бактериофага лямбда с ДНК. Белок представляет собой симметричный гомодимер, который связывается с симметричной последовательностью ДНК, представленной на рис. 9-11. Способ связывания с ДНК определен путем анализа молекулярных моделей. *А.* Проволочная модель молекулы белка, совмещенная со схематическим изображением двойной спирали ДНК. *Б.* Пространственная модель ДНК-белкового комплекса, показанного на *А.* На этой модели каждая аминокислота в белковой цепи изображена в виде сферы; цветные шары представляют остов ДНК. (С любезного разрешения Brian W. Matthews по W. F. Ander-son, D. H. Ohlendorf, Y. Takoda and B. W. Matthews, Nature 290: 754-758, 1981, © 1981, Macmillan Journals Ltd.)

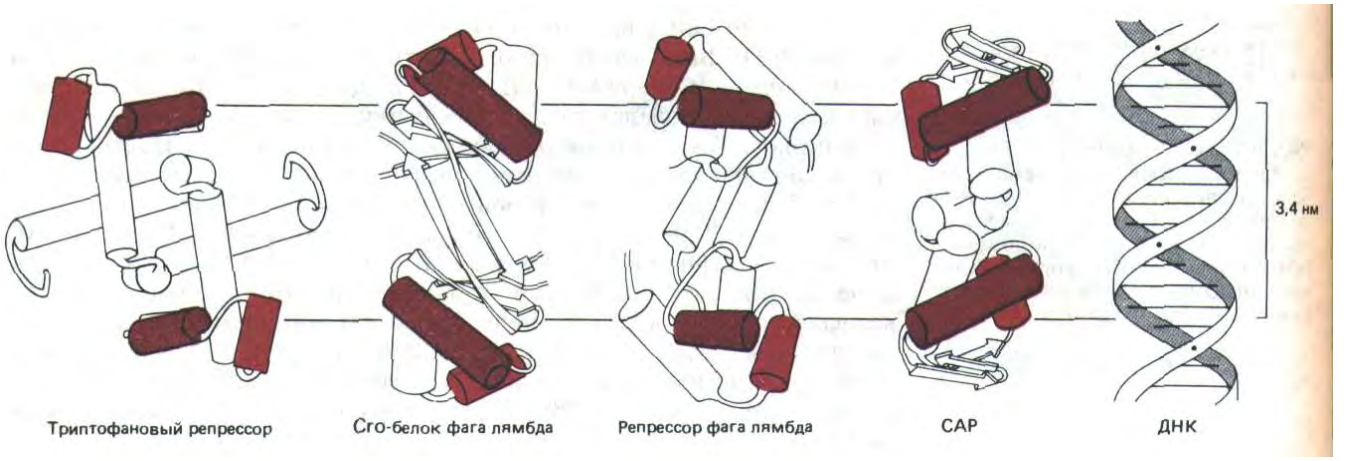


Рис. 9-13. Семейство димерных ДНК-связывающих белков. Эти регуляторные белки работают в бактериальных системах: репрессор лямбда и cro-белок контролируют экспрессию генов бактериофага лямбда, а белок активатор катаболизма (CAP) регулирует экспрессию ряда генов *E. coli,* которые могут включаться лишь в отсутствие глюкозы. В каждом случае рентге-ноструктурный анализ выявил наличие двух копий узнающей спирали *(коричневый цилиндр),* разделенных одним витком спирали ДНК (3,4 нм).

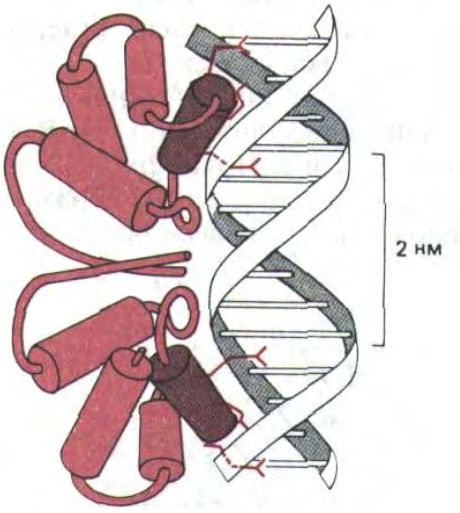


Рис. 9-14. Спаривание боковой цепи аминокислот с парами оснований ДНК при узнавании нуклеотидной последовательности регуляторним белком-репрессором, влияющим на активность гена бактериофага 434. Комплекс ДНК с этим белком изучали методом рентгеноструктурного анализа. (С изменениями из J. E. Anderson, M. Ptashne and S.C. Harrison, Nature 326: 846-852, 1987.)

Молекула аллостерического эффектора, связываемая белком такого типа, может значительно повышать или снижать его сродство с ДНК, меняя расстояние между двумя узнающими спиралями. Аналогичным образом аллостерические эффекторы могут изменять сродство с ДНК других типов белков, регулирующих активность генов. Подобные изменения имеют большое значение при включении и выключении генов в ответ на изменения в окружающей среде (см. разд. 10.2.10).

9.1.12. Молекулы белков при связывании с ДНК частоконкурируют или кооперируются друг с другом [10]

Большинство генетических процессов зависит от взаимодействия между молекулами белков, которые одновременно связываются с близлежащими сайтами ДНК. В простейшем случае два сайт-специфических белка, участки связывания которых частично или полностью перекрываются, конкурируют друг с другом за место на спирали ДНК (рис. 9-15, *А).* Например, белок-репрессор может подавлять транскрипцию гена, блокируя связывание активирующего белка с ДНК. Однако белки могут и помогать друг другу более прочно удерживаться на ДНК. Такое **кооперативное связывание** может происходить как между двумя различными молекулами белка (рис, 9-15, Б), так и между двумя копиями молекул одного типа. В последнем случае белки, как правило, связываются по типу «все или ничего» и образуют на ДНК кластеры. При повышении концентрации этих белков, их связывание с ДНК резко возрастает (рис. 9-15, *В).* В качестве примера кооперативно связывающихся белков такого типа можно привести спираль-дестабилизируюгций белок, белок recA (гл. *5)* и гистон Н1.

Механизм взаимодействия при кооперативном и конкурентном связывании на примере двух различных сайт-специфических ДНК-связывающих белков будет обсуждаться дальше в связи с проблемой регуляции транскрипции (гл. 10).

9.1.13. Геометрия спирали ДНК зависит от последовательности нуклеотидов [11]

В течение 20 лет после открытия двойной цепи ДНК в 1953 г. полагали, что эта молекула имеет одинаковую структуру на всем своем протяжении, причем поворот спирали между соседними парами оснований составляет точно 36° (10 нуклеотидных пар на поворот спирали). Последующие эксперименты выявили, что ДНК гораздо более полиморфна, а варианты ее формы определяются последовательностью

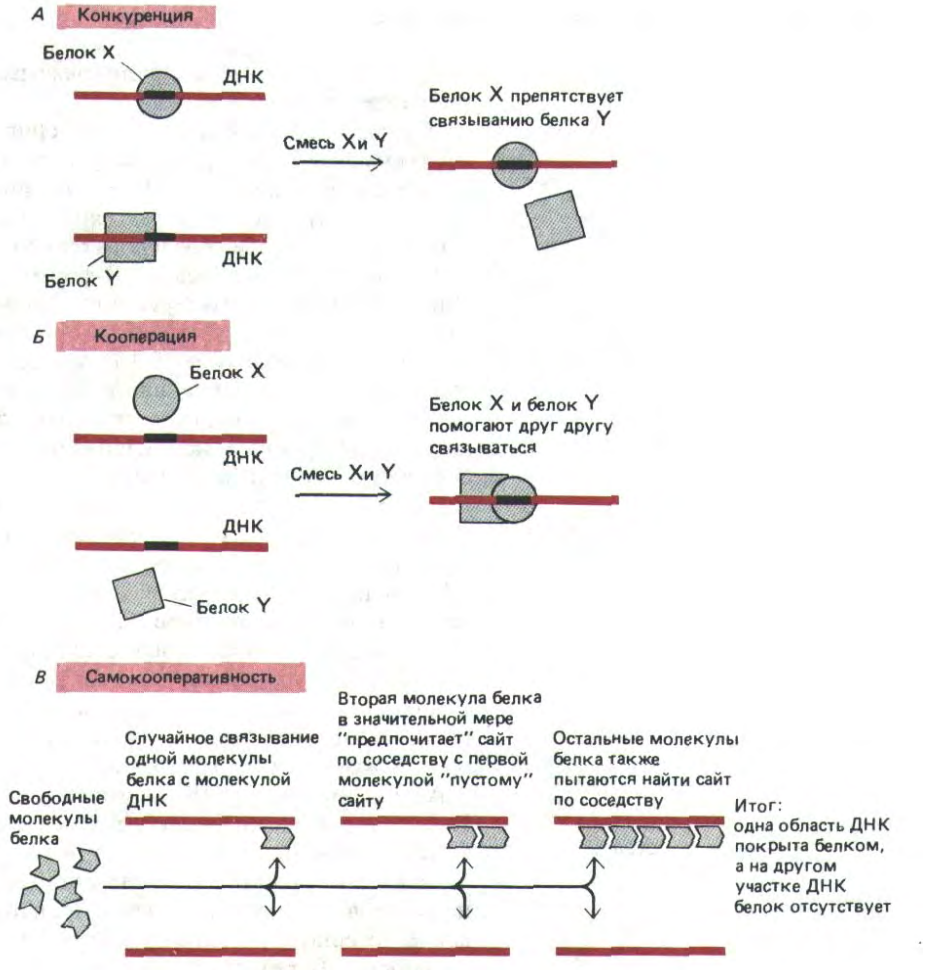


Рис. 9-15. Примеры конкурентного и кооперативного взаимодействия при связывании белков с ДНК. *А.* Конкуренция происходит, когда связывание белков X и Y со специфическими сайтами ДНК взаимно исключается. *Б.* Кооперация имеет место, если связывание одного белка с ДНК повышает сродство другого белка к близлежащему сайту. *В.* Самокооперативность приводит к связыванию отдельного белка в виде кластера молекул, в результате связывание с какой-либо областью ДНК происходит по типу «все или ничего».

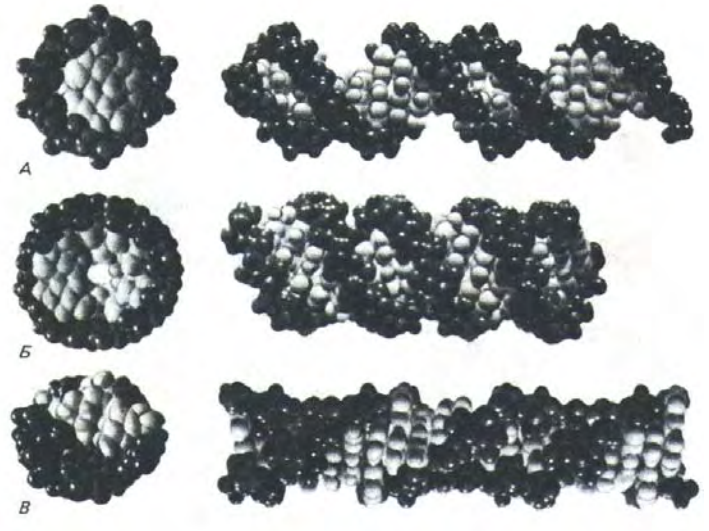


Рис. 9-16. Три формы спирали ДНК, каждая из которых содержит 22 нуклеотидные пары. Все эти структуры образованы двумя антипараллельными цепями ДНК, которые удерживаются вместе благодаря спариванию комплементарных нуклеотидов. Каждая форма показана сбоку и сверху. Сахарно-фосфатный остов и пары оснований выделены разными оттенками серого: темно-серым и светло-серым, соответственно. *А.* В-форма ДНК, которая чаще всего встречается в клетках. *Б.* А-форма ДНК, которая становится преобладающей при высушивании любой ДНК, независимо от ее последовательности. *В.* Z-форма ДНК: такую форму приобретают некоторые последовательности при определенных условиях. В-форма и А-форма-правоза-крученные, а Z-форма -левозакру-ченная (см. рис. 3-4). (С любезного разрешения Richard Feldmann.)

нуклеотидов. Форма спирали оказывает значительное влияние на ее взаимодействие с белками.

Существует несколько типов спирали ДНК, причем в некоторых случаях изменения в ее структуре оказываются весьма значительными. Самая стабильная форма ДНК - это правозакрученная спираль **В-формы** (рис. 9-16, *А).* Изучение рассеяния рентгеновских лучей показало, что небольшие области последовательности образуют правозакрученную спираль, отличающуюся от В-формы и известную как **А-форма ДНК.** Для этой формы характерен более сильный наклон оснований, в результате чего спираль оказывается более короткой и более широкой, чем в случае В-формы (рис. 9-16, *Б).* Вероятно, в некоторых случаях это имеет большое значение, например, когда нить ДНК спаривается с РНК в затравочной части фрагментов Оказаки (дополнительная гидроксиль-ная группа рибозы не позволяет спирали РНК-ДНК образовывать В-форму). По тем же причинам А-форму имеет и спираль РНК-РНК. А-форма характерна для спиральных областей шпилечных структур всех одноцепочечных РНК и, следовательно, чрезвычайно важна для жизнедеятельности клетки. Биологическая роль третьей спиральной формы ДНК менее ясна. Последовательности ДНК, состоящие из чередующихся пуринов и пиримидинов (GCGCGCGC) легко образуют левозакручен-ную двойную спираль, известную как **Z-форма** ДНК (рис. 9-16, *В).* Считается, что короткие области с такой структурой редко встречаются в хромосоме. Можно предположить, однако, что они особым образом распознаются белками, а значит, тоже способны играть существенную роль в жизнедеятельности клетки.

А- и Z-формы ДНК, которые сильно отличаются от стабильной В-структуры, весьма редки, но менее сильные изменения В-цепи являются обычными, и, несомненно, имеют важное биологическое значение. У нуклеиновых кислот, находящихся в В-форме, наклон оснований и угол поворота спирали между их парами существенно зависят от того, какие именно нуклеотиды соседствуют друг с другом в последовательности. В результате атомы спирали отклоняются от идеального положения. Даже ДНК-связывающие белки, которые не обладают способностью специфически узнавать определенные нуклеотидные пары, могут «чувствовать» такие искажения.

Значение вариаций в структуре ДНК-спирали для связывания сайт-специфических белков четко показано на примере репрессора бактерио-

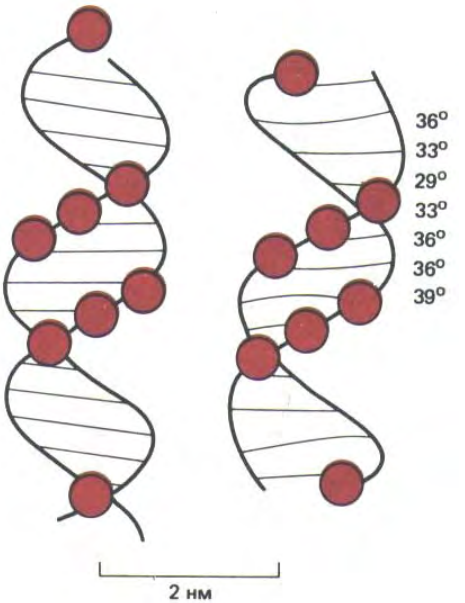


Рис. 9-17. Сравнение конформации ДНК в составе комплекса с репрессором бактериофага 434 *(справа) с* идеальной спиралью В-формы *(слева).* Фосфаты ДНК, контактирующие с белком, обозначены цветными кружочками. Углы, образующиеся при повороте спирали между парами оснований, указаны для искаженной спирали. Считается, что отклонения от идеальной спирали необходимы для более тесного связывания белка. Энергия связывания частично зависит от «неспецифического» взаимодействия между NH-группами и фосфатами ДНК. Такие, способствующие связыванию контакты, может образовывать лишь несколько искаженная спираль В-формы: середина малой бороздки в области связывающего сайта должна быть слегка сужена, и спираль немного изогнута. Поскольку для получения такого изгиба и уплотнения спирали в центральной области должны присутствовать АТ-пары, их замена на GC значительно ослабляет связывание белков. Таким образом, пары оснований, расположенные в центре, узнаются репрессором даже если белок не контактирует непосредственно с этими основаниями (см. также рис. 9-14). (С изменениями из J.E. Anderson, M. Ptashne and S.C Harrison, Nature 326: 846-852, 1987.)

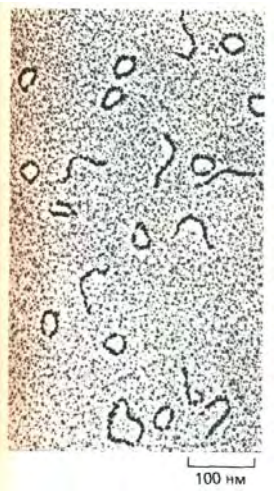


Рис. 9-18. Электронная микрофотография фрагментов, несущих сильно изогнутый сегмент спирали ДНК. Фрагменты ДНК, выделенные из миниколец кинетопластов трипаносоми *Crithidia fasciculata* содержит всего лишь 200 пар нуклеотидов, однако некоторые из них изогнуты так, что весь фрагмент замыкается в кольцо. Нормальная спираль ДНК такой длины может при изгибе образовать в среднем лишь четверть кольца (один равномерный правый виток). (По J. Griffith, M. Bleyman, C. A. Rauch, P. A. Kitchin and P. T. Englund, Cell 46: 717-724, 1986.)

фага X. С помощью рентгеноструктурного анализа установлено, что ДНК при связывании с этим белком приближается к идеальной В-форме (рис. 9.17).

9-7

9.1.14. Некоторые последовательности ДНК сильно изогнуты [12]

Спираль ДНК обладает достаточной конформационной свободой, чтобы выдерживать пружинящие изгибы и вращательные движения. Однако в связи с тем, что эта спираль обладает и жесткостью, для того чтобы она могла изогнуться под углом 90°, в молекуле ДНК должно содержаться приблизительно 200 нуклеотидных пар. Некоторые последовательности ДНК оказываются необычайно гибкими и намного легче остальных принимают изогнутую форму.

Есть последовательности ДНК, которые склонны всегда оставаться изогнутыми. К числу последних принадлежат последовательности, в которых через каждые 10-11 нуклеотидов встречаются повторы AAAAANNNNN (где N-любой нуклеотид) (рис. 9-18). Сильный изгиб таких молекул представляет собой крайнюю форму вариаций структуры спирали. Еще не ясно, обусловлен ли такой изгиб суммарным вкладом небольших наклонов между определенными парами оснований, большим изгибом в месте соединения коротких областей или же обоими типами воздействий.

Даже если специфические последовательности, влияющие на изгиб спирали, отсутствуют, структуру ДНК в значительной мере может исказить связывание белков, принимающих участие в формировании высококонденсированных комплексов белка и ДНК.

9.1.15. Белки могут сворачивать ДНК в плотную спираль [13]

Многие белки при связывании с ДНК изгибают ее, а если подобных ДНК-белковых связей много, то нить ДНК может сформировать плотную спираль вокруг белкового комплекса с образованием нуклеопротеиновой частицы. Известно, что у бактерий такие нуклеопротеиновые частицы образуются при связывании инициаторных белков с точкой начала репликации (см. разд. 5.3.9), а также при связывании ДНК с интегразой фага лямбда для катализа сайт-специфической рекомбинации (рис. 9-19). По-видимому, в таком сложном трехмерном соединении участвуют как конкурентное, так и кооперативное взаимодействия. Аналогичные типы взаимодействий используются при регуляции каталитической активности нуклеопротеиновых частиц, как показано на примере белкового комплекса, содержащего интегразу фага лямбда (рис. 9-20). В связи с тем, что при экспрессии эукариотических генов происходит связывание кластеров белков, регулирующих активность генов,

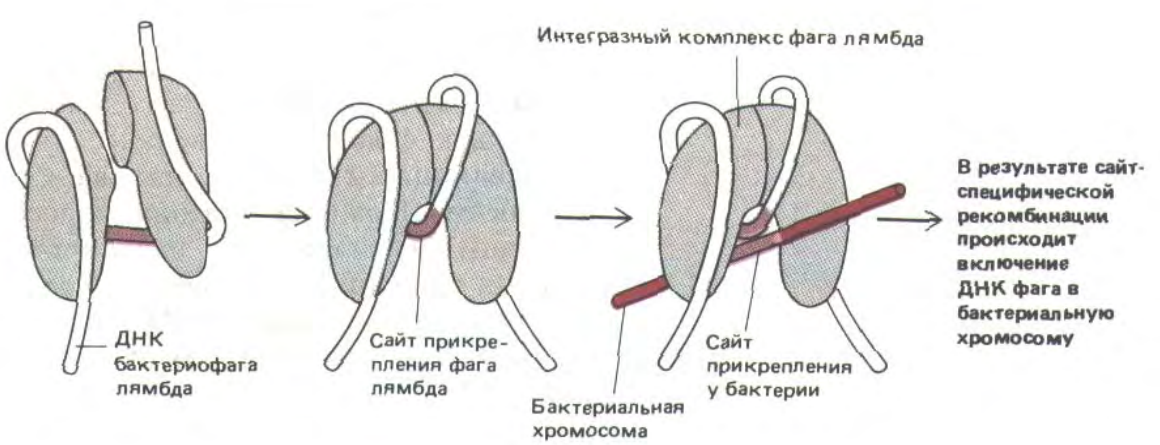


Рис. 9-19. Схема комплекса ДНК—белок, образуемого интегразой фага лямбда, ферментом, осуществляющим встраивание ДНК бактериофага в хозяйскую хромосому *E. coli.* Этот комплекс катализирует сайт-специфическую рекомбинацию, разрывая и воссоединяя спирали ДНК бактериофага лямбда и бактерии по определенным участкам, называемым сайтами прикрепления (см. рис. 5-66). (С изменениями по E. Richet, P. Abcarian, H.A. Nash, Cell 52: 9-17, 1988.)

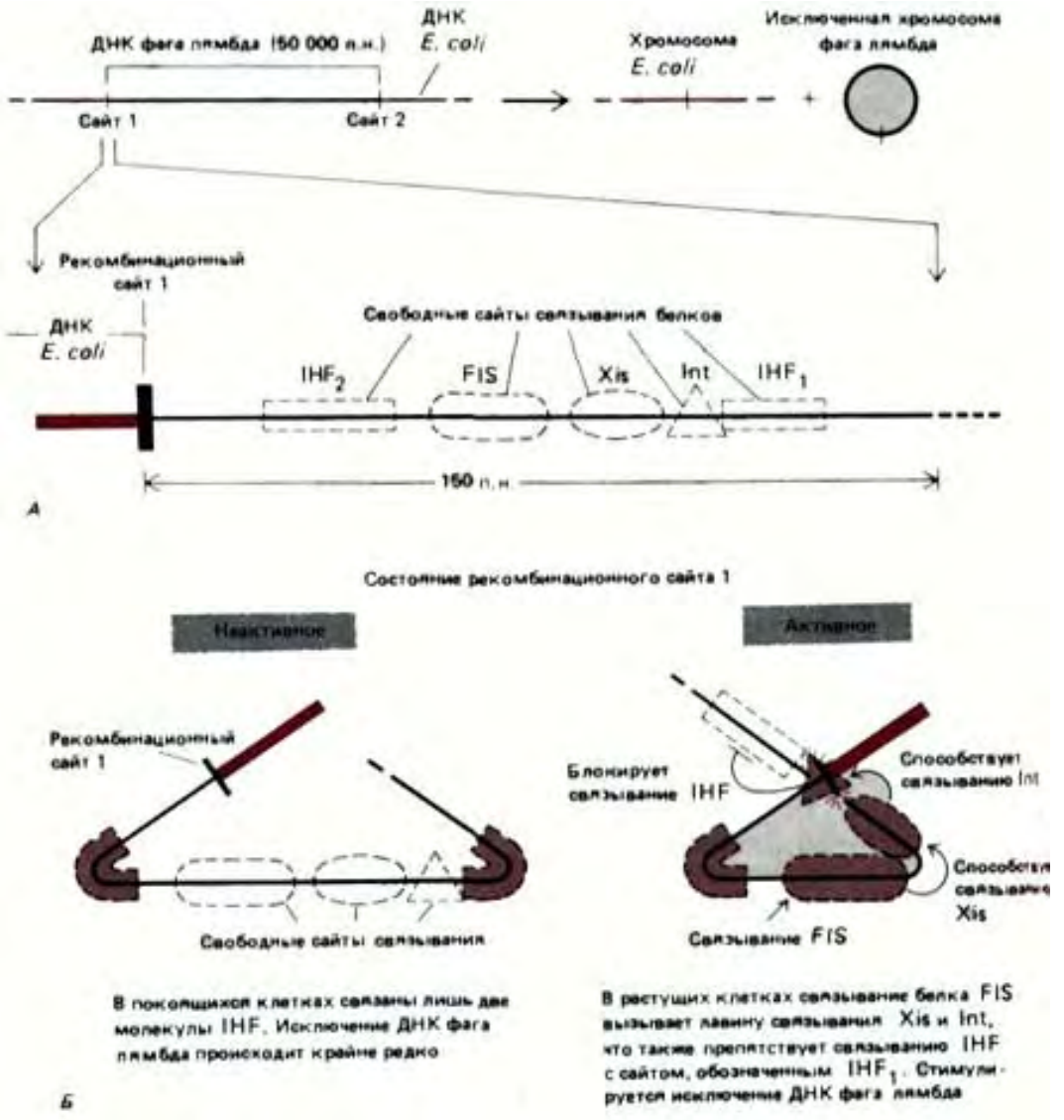


Рис. 9-20. Исключение бактериофага лямбда из хромосомы бактерии контролируется посредством кооперативного и конкурентного взаимодействия между сайт-специфическими ДНК-связывающими белками. Реакция катализируется интеразой фага лямбда и является противоположной по своему действию сайт-специфической рекомбинации, показанной на рис. 9-19. *А.* Общая схема реакции и некоторые участвующие в ней сайты связывания белков (указаны не все сайты). Для исключения необходимы разрыв и воссоединение двойной спирали ДНК в сайтах рекомбинации 1 и 2; при этом образуется кольцевая хромосома фага лямбда. Int-интеграза фага лямбда, Xis-эксцизионаза фага лямбда, а IHF и FIS -белки, образуемые бактериальной клеткой-хозяином. *Б.* Активация исключения белком FIS; указанные стадии, по-видимому, имеют место при низких концентрациях белков Int и Xis. Как показано, ряд белков при связывании сильно изгибают ДНК. Хотя белок Int катализирует реакцию сайт-специфической рекомбинации, его активность катализируется другими белками. (С любезного разрешения Arthur Landy.)

с определенными регуляторными последовательностями ДНК, аналогичные белковые комплексы могут принимать участие в контроле транскрипции ДНК и у эукариот (см. рис. 10-23).

Очевидно, что любые комплексы, имеющие отношение к регуляции определенных генов, должны встречаться относительно редко. В структуре хромосом эукариот присутствует главным образом другой тип нуклеопротеиновых частиц; речь идет о **нуклеосоме,** которая играет ведущую роль в упаковке и организации ДНК в клеточном ядре.

9.1.16. Гистоны - основные структурные белки хромосом эукариот [14]

Наиболее изученные структурные белки хромосом - это несомненно **гистоны,** которые имеются только в эукариотическвх клетках. Количество их в клетках столь велико, что у эукариот принято делить белки, связывающиеся с ДНК, на два класса: **гистоны и негистоновые белки хромосом.** Комплекс обоих классов белков с ядерной ДНК клеток эукариот известен под названием **хроматин.** Гистоны присутствуют в таких огромных количествах (около 60 млн. молекул каждого типа на клетку по сравнению с 10000 на клетку для типичного сайт-специфического белка), что их общая масса в хромосоме примерно равна содержанию ДНК.

Гистоны представляют собой относительно небольшие белки с очень

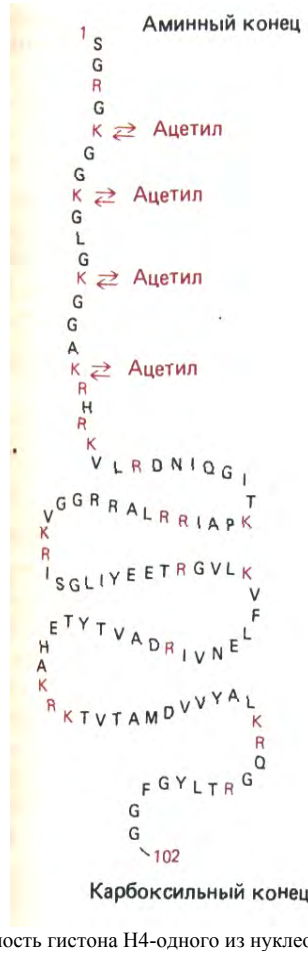


Рис. 9-21. Аминокислотная последовательность гистона Н4-одного из нуклеосомных гистонов. Аминокислоты обозначены однобуквенными сокращениями, положительно заряженные аминокислоты выделены цветом. Как и в случае других нуклеосомных гистонов, протяженная аминоконцевая последовательность молекулы обратимо модифицируется в клетке путем ацетилированиия отдельных остатков лизина. Приведенная последовательность соответствует гистону Н4 быка. У гороха этот гистон имеет почти такую же аминокислотную последовательность, за исключением того, что в нем один остаток валина замещен на изолейцин, а один остаток лизина - на аргинин.

высоким содержанием положительно заряженных аминокислот (лизина и аргинина). Суммарный положительный заряд позволяет им прочно связываться с ДНК независимо от ее нуклеотидного состава. Скорее всего гистоны постоянно находятся в комплексе с ДНК и, следовательно, играют существенную роль во всех процессах, связанных с функционированием генома.

Пять типов гистонов можно разделить на две основные группы: 1) нуклеосомные гистоны и 2) HI гистоны. Нуклеосомные гистоны - это небольшие белки (102-135 аминокислотных остатков), отвечающие за формирование нуклеосом. К ним относятся четыре гистона: H2A, H2B, H3 и H4. H3 и H4 образуют внутреннюю часть нуклеосомы и, как установлено, являются наиболее консервативными из известных белков: например, аминокислотные последовательности гистонов H4 у гороха и коровы различаются всего лишь по двум аминокислотным остаткам (рис. 9-21). Такая эволюционная стабильность предполагает, что почти каждая аминокислота, входящая в состав таких белков, играет важную роль, и изменение в любом положении может оказаться вредным для клетки.

Размер гистонов HI больше (около 220 аминокислотных остатков), и эти белки оказались эволюционно менее стабильными, чем нуклеосомные гистоны. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* HI, по-видимому, вообще отсутствует (см. разд. 10.3.15).

9-8
9-9

9.1.17. Связывание гистонов с ДНК приводит к образованию нуклеосом - частиц, представляющих собой единицу хроматина [15]

Если бы оказалось возможным растянуть нить ДНК каждой хромосомы человека, ее длина в тысячи раз превышала бы размер ядра. Гистоиы играют важную роль в упаковке очень длинной молекулы ДНК в ядре, диаметр которого составляет всего несколько микрон. Эти белки важны и по другой причине. Известно, что ДНК может быть упакована по-разному и способ упаковки какой-либо области генома в хроматин в определенной клетке может, по-видимому, влиять на активность содержащихся в этой области генов (см. разд. 10.3.8).

Начало углубленному изучению структуры хроматина положило открытие в 1974 г. его основной структурной единицы-нуклеосомы. Благодаря наличию нуклеосом частично декомпактизованныи хроматин на электронных микрофотографиях напоминает нитки бус (рис. 9-22). «Бусину»-нуклеосому можно отделить от длинной нити ДНК путем обработки препарата хроматина ферментами, расщепляющими ДНК. Ферменты, вызывающие деградацию как ДНК, так и РНК, называют *нуклеазами,* а ферменты, действующие только на ДНК,- *дезоксирибонуклеазами* или *ДНКазами.* Нуклеаза, с помощью которой выделяют индивидуальные нуклеосомы, получена из клеток микрококков (микрококковая нуклеаза). При непродолжительной обработке этим ферментом расщепляются только те участки ДНК, которые расположены между нуклеосомами; остальная ДНК защищена связанными с ней гистонами, вследствие чего вся молекула полимера распадается на двухцепочечные фрагменты длиной 146 пар оснований. Эти ДНК-гисто-новые комплексы на электронных микрофотографиях выглядят как частицы дисковидной формы, имеющие диаметр около 11 нм. Каждая нуклеосома содержит набор из восьми молекул гистонов - по две молекулы каждого из четырех высококонсервативных нуклеосомных гисто-

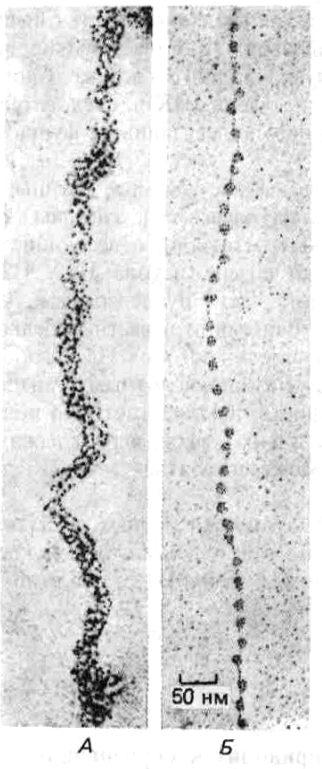


Рис. 9-22. Электронные микрофотографии хроматиновых нитей до и после обработки, приводящей к деконденсации нативной структуры и образованию «бус на нитке». *А.* Нативная структура, характерная для основных хроматиновых фибрилл диаметром 30 нм. *Б.* Деконденсированная форма хроматиновой фибриллы «бусы на нитке», показанная при том же увеличении. Схематическое изображение обеих форм хроматина приведено на рис. 9-38. Электронные микрофотографии получены с помощью модифицированной процедуры, описанной на рис. 9-71. *(А-с* любезного разрешения Barbara Hamkalo, *Б-с* любезного разрешения Victoria Foe.)

нов: H2A, H2B, H3 и H4. Этот **гистоновый октамер** является по сути белковой сердцевиной нуклеосомы или ее гистоновым кором, на который накручивается фрагмент двухцепочечной **ДНК** (рис. 9-23).

В интактном хроматине ДНК тянется в виде непрерывной нити от нуклеосомы к нуклеосоме. Каждая нуклеосомная бусина отделена от следующей **линкериой последовательностью,** длина которой варьирует от 0 до 80 нуклеотидных пар. В среднем нуклеосомные частицы (нуклеосом-ный кор плюс линкерная последовательность) повторяются через каждые 200 нуклеотидов (см. рис. 9-23). Таким образом, эукариотический ген, состоящий из 10000 нуклеотидных пар, связан с 50 нуклеосомами, а в каждой клетке человека, ДНК которой насчитывает *в* х 10^9 нуклеотидных пар, содержится 3 х 10^7 нуклеосом.

9-10

9.1.18. Некоторые нуклеосомы расположены на ДНК неслучайным образом [16]

Опыты, проведенные in vitro с изолированным хроматином, дают основание полагать, что при физиологических условиях гистоновые октамеры остаются зафиксированными в одном положении, поскольку их тесная связь с нуклеиновой кислотой препятствует перемещению по спирали ДНК. Остается открытым вопрос, случайно или нет расположены эти октамеры на ДНК (случайность следует понимать так, что в одной клетке определенная последовательность ДНК плотно обвита вокруг гистонового октамера, а в другой - та же последовательность отделяет друг от друга бусины нуклеосом).

Для того чтобы определить положение нуклеосом в клетках, нужно обработать их ферментом или реагентом, вносящим разрывы в ДНК, а затем изучить защищенные от воздействия участки методом, аналогичным футпринтингу ДНК (см. разд. 4.6.6). Хотя большинство нуклеосом, по-видимому, расположены случайным образом, известны поразительные примеры из неслучайного расположения. Так, у дрожжей *Saccharomy-ces cerevisiae* 15 нуклеосом строго фиксированным образом окружают ДНК центромеры (последовательность CEN) (разд. 13.5.3). Единственный сайт локализации имеет и нуклеосома, связанная с очень маленьким по размеру геном 5S-рРНК. Известно также, что по крайней мере одна нуклеосома расположена перед точкой начала синтеза РНК β-глобина,

Чем же объясняется такое неслучайное расположение нуклеосом? Показано, что в некоторых случаях (например, для нуклеосом, связанных с генами 5S-рРНК) смесь четырех очищенных гистонов, составляющих нуклеосому, in vitro образует ее точно на том же месте, где она расположена in vivo. Возможно, причина заключается в том, что нуклеосомы стремятся связаться таким образом, чтобы максимально заполнить богатую АТ малую бороздку ДНК. Такое предпочтение вызвано тем, что двойную спираль ДНК трудно уложить двумя плотными витками вокруг гистонового октамера, и для этого требуется значительное уплотнение на малой бороздке спирали ДНК (рис. 9-24). Как установлено на примере белка репрессора бактериофага (см. рис. 9-17), кластер, состоящий из двух или трех пар АТ и расположенный в малой бороздке, облегчает возникновение такого уплотнения. На характер расположения нуклеосом должны влиять и другие неизвестные пока свойства последовательности ДНК.



Рис. 9-23. Строение нуклеосом. Нуклеосомные частицы состоят из двух полных витков ДНК (83 нуклеотидных пары на виток), закрученных вокруг кора, представляющего собой гистоновый октамер, и соединяются между собой линкерной ДНК. Нуклеосом-ная частица выделена из хроматина путем ограниченного гидролиза линкерных участков ДНК микрококковой нуклеазой. В каждой нуклеосомнои частице фрагмент двойной спирали ДНК, имеющий в длину 146 пар оснований, закручен вокруг гистонового кора. Этот белковый кор содержит по две молекулы каждого из гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Полипептидные цепи гистонов насчитывают от 102 до 135 аминокислотных остатков, а общий вес октамера составляет приблизительно 100000 Да. В деконденсированной форме хроматина каждая «бусина» связана с соседней частицей нитевидным участком линкерной ДНК.



Рис. 9-24. Изгиб ДНК на нуклеосоме. Спираль ДНК делает два оборота вокруг гистонового октамера, причем на каждый виток приходится по 83 нуклеотидные пары. Соотношение ДНК и белка на схеме приближено к реальному, чтобы показать сдавливание малой бороздки на внутренней части витка. Как указывалось выше (см. рис. 9-17), в узкой малой бороздке расположены главным образом AT-пары оснований.

9.1.19. Определенные сайты на хромосомах не содержат нуклеосом [17]

На некоторых участках ДНК нукдеосомы отсутствуют, несмотря на то, что длина этих участков составляет сотни нуклеотидных пар. Такие области можно выявить, обработав ядро клетки следовыми количествами дезоксирибонуклеазы (ДНКаза 1). Использование минимальных концентраций фермента обеспечивает разрушение длинных областей безнуклеосомной ДНК, при этом короткие участки линкерной ДНК, расположенной между нуклеосомами, останутся целыми. Хроматин, обработанный таким образом, расщепляется преимущественно по участкам, которые, по-видимому, не содержат нуклеосом. Обычно такие сайты отстоят друг от друга на расстояние нескольких тысяч нуклеотидных пар.

Первое доказательство биологической значимости **сайтов, сверхчувствительных к нуклеазе,** было получено в экспериментах с вирусом SV40. Его хромосома помимо кольцевой ДНК содержит гистоны, продуцируемые клеткой-хозяин ом. В составе этой хромосомы имеется участок длиной 300 нуклеотидных пар, который свободен от нуклеосом и быстро разрушается под воздействием ДНКазы!. Этот участок расположен очень близко от последовательностей ДНК, с которых начинается как репликация ДНК вируса, так и синтез его РНК. Здесь же локализуются и несколько сайт-специфических ДНК-связывающих белков, которые защищают лишь небольшой участок этой молекулы, по-видимому, совершенно лишенный нуклеосом, от нуклеазной деградации. Аналогичным образом, многие участки хроматина в клетке, обладающие гиперчувствительностью к ДНКазе, расположены в регуляторных областях генов (рис. 9-25); в клетках, где эти гены активны, таких сайтов больше, нежели в других клетках. Полагают, что за удаление нуклеосом ответственны сайт-специфические ДНК-связывающие белки, которые принимают участие в регуляции эукариотических генов (см. рис. 9-27).

9.1.20. Нуклеосомы обычно упаковываются вместе, образуя при этом упорядоченные структуры высшего порядка [18]

В живых клетках хроматин, вероятно, редко имеет вид растянутых «бус на нитке». Напротив, нуклеосомы связаны друг с другом и образуют регулярные структуры, в которых ДНК еще больше конденсирована. Электронномикроскопический анализ лизированных прямо на сеточке ядер показывает, что большая часть хроматина имеет форму фибрилл диаметром около 30 нм (рис. 9-22, *А*). Один из возможных способов упаковки нуклеосом в **фибрилле хроматина** диаметром 30 нм приведен на рис. 9-26. Эта модель представляет идеальную структуру. В действи-

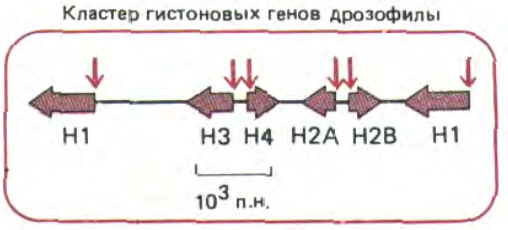


Рис. 9-25, Расположение сайтов, сверхчувствительных к нуклеазе *(цветные стрелки),* в регуляторных областях активных генов. Хотя такие участки хроматина обычно расположены на 5'-конце гена, как показано на этом рисунке на примере кластера генов, кодирующих гистоны (HI, H2A, H2B, H3 и H4) у дрозофилы, эти сайты могут находиться и в других областях (см. рис. 10-40, *А).*

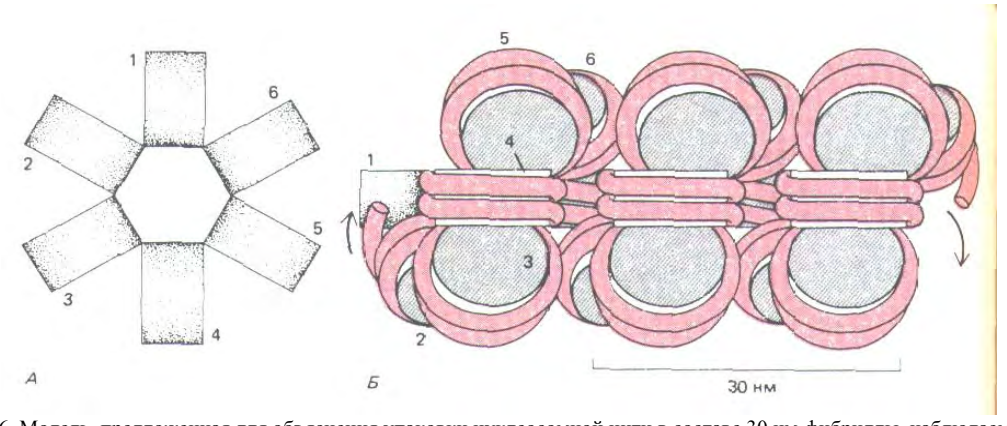


Рис. 9-26. Модель, предложенная для объяснения упаковки нуклеосомной нити в составе 30 нм-фибриллы, наблюдаемой под электронным микроскопом (см. рис. 9-22, *А). А.* Вид сверху. *Б.* Вид сбоку. При таком типе упаковки на нуклеосому приходится одна молекула гистона H1 (не указано). Хотя место прикрепления гистона H1 к нуклеосоме определено, расположение молекул H1 на этой фибрилле неизвестно (см. также рис. 9-27).

тельности и разброс длин линкерных участков (что связано с определенным расположением нуклеосом), и наличие образовавшихся случайным образом безнуклеосомных последовательностей придают различным участкам 30 нм-фибриллы различные свойства (рис. 9-27).

Если бы хроматин типичной хромосомы человека существовал в виде фибриллы диаметром 30 нм, то в растянутом состоянии он имел бы длину 0,1 см, т.е. в 100 раз превышал бы размеры ядра. Микроскопический анализ интактных хромосом дает основание полагать, что внутри клеток происходит дальнейшая упаковка фибрилл диаметром 30 нм, при этом образуются нити хроматина толщиной 100 нм. Как расположены нуклеосомы в такой структуре, неясно.

9.1.21. Гистоновые белки H1 помогают соединять нуклеосомы [19]

В клетках млекопитающих имеется приблизительно шесть близкородственных вариантов (подтипов) гистонов H1, которые несколько отличаются друг от друга по аминокислотной последовательности. По-видимому, эти молекулы ответственны за упаковку нуклеосом в фибриллу диаметром 30 нм. Молекулы H1 имеют эволюционно консервативную глобулярную центральную область, соединенную с выступающими аминоконцевыми и карбоксильными «ручками», аминокислотная последовательность которых эволюционирует быстрее. Каждая молекула H1 связывается своей глобулярной частью с уникальным сайтом на нуклеосоме, а «ручка», как полагают, захватывают область шире и контактируют с другими сайтами, расположенными на гистонах, входящих

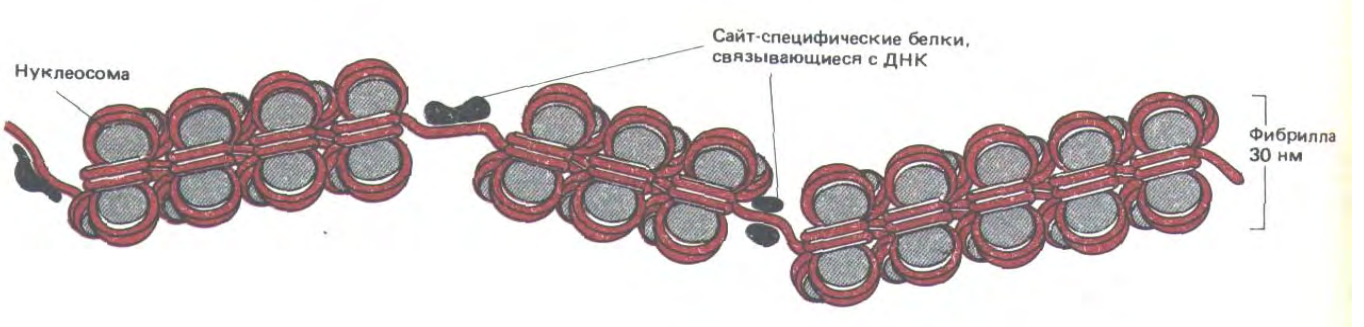


Рис. 9-27. Схема, иллюстрирующая прерывание правильной нуклеосом-нон структуры хроматина короткими областями, в которых ДНК необычно чувствительна к обработке ДНКазой I. В каждом из этих *сайтов, сверхчувствительных к нуклеазе,* нуклеосомы на ДНК, вероятно, замещены одним или несколькими сайт-специфическими ДНК-связывающими белками.



Рис. 9-28. Схема, показывающая, каким образом гистон H1 (220 аминокислот) мог бы обеспечить контакт соседних нуклеосом. Глобулярная часть H1I связывается с каждой нуклеосомой вблизи сайта, в котором спираль ДНК входит и выходит с гистонового октамера. В присутствии гистона H1 два полных витка ДНК (166 нуклеотидных пар) защищены от действия микрококковой нуклеазы (см. рис. 9-23). Однако до сих пор неизвестны ни трехмерная структура гистона H1I, ни точные области взаимодействия выступающих аминоконцевых и карбоксиконцевых плечей этого гистона с нуклеосомой.

в состав соседних нуклеосом. При этом нуклеосомы стягиваются вместе, образуя регулярную повторяющуюся структуру (рис. 9-28). Согласно разным гипотезам, молекулы H1 располагаются либо внутри хроматиновой 30 нм-фибриллы, либо снаружи.

Гистоновый октамер, образующий сердцевину каждой нуклеосомы, представляет собой симметричную структуру, а единственная молекула гистона H1, связывающаяся с каждой нуклеосомой, симметрией не обладает. Таким образом, связывание молекул H1 с хроматином создает локальную полярность (рис. 9-29).

Опыты, проведенные in vitro, показывают, что при связывании гистона H1 с ДНК к ней присоединяется сразу по восемь или более белковых молекул, что может служить примером кооперативного связывания. Весьма вероятно, что хроматин организован именно за счет кооперативных взаимодействий такого типа, а при их нарушении белками-регуляторами происходит локальная деконденсация хроматина (что и имеет место в области активных генов). Образовавшиеся области «активного хроматина», по-видимому, обладают необычайно низкой способностью связывать гистон H1. В этом отношении ограниченная область хроматина может напоминать крошечный кристалл, который способен в ходе процессов, приводящих к активации гена, менять свою конформацию по типу все или ничего (рис. 9-30).

9.1.22. Нуклеосомы не мешают синтезу РНК [20]

Результаты биохимических исследований свидетельствуют о том, что при транскрипции большая часть ДНК остается связанной с нуклеосомами; электронномикроскопическое изучение препаратов распластанного по специальной методике хроматина обычно выявляет одинаковое расположение нуклеосом как в транскрибируемых, так и в нетранскриби-

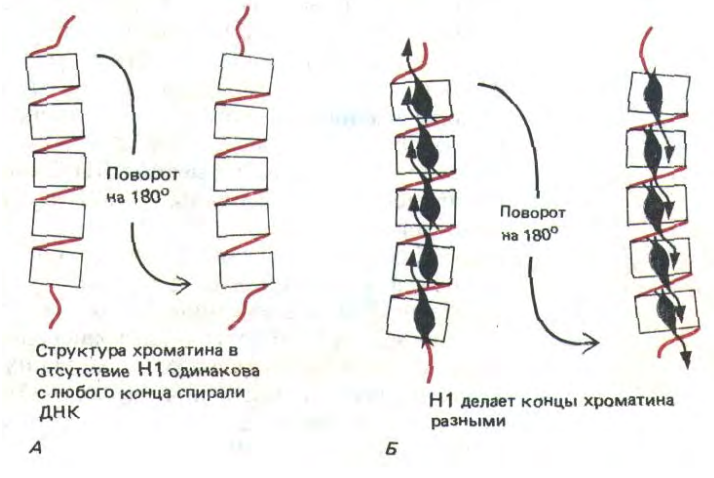


Рис. 9-29. Полярность хроматина обусловлена связыванием его с гистоном H1. *А*. В отсутствие гистона H1 хроматин не обладает полярностью, так как каждая нуклеосома симметрична. *Б*. В присутствии HI хроматин становится полярным. Остается неизвестным, для чего нужна такого рода полярность.

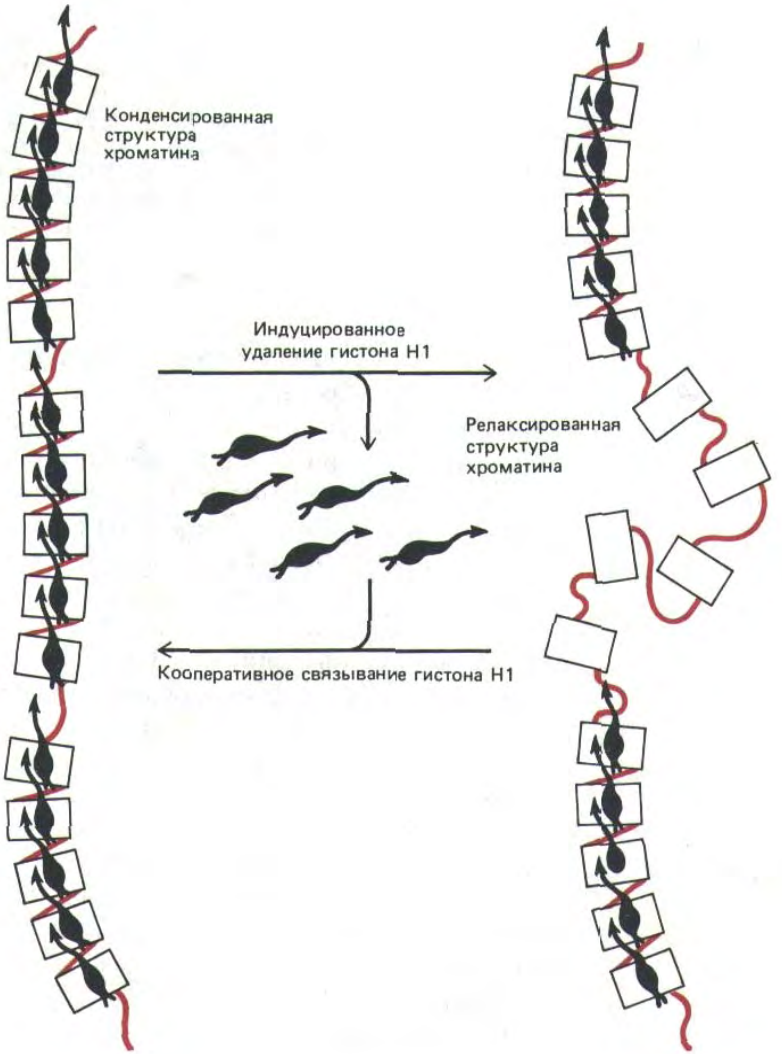


Рис. 9-30. Отдельные участки хроматина могут вести себя как структурные единицы вследствие кооперативного характера упаковки нуклеосом с помощью гистона H1. Приведенная схема показывает момент внезапной деконденсации такой единицы (фибриллы 30 им или более компактной структуры), вызванной внешним регуляторним сигналом. Деконденсация хроматина подобного типа может сопутствовать активации гена (см. рис. 9-50).

руемых областях (рис. 9-31). По-видимому, гистоновый октамер так прочно связан с ДНК, что остается на ней постоянно. Тем не менее трудно себе представить, как РНК-полимераза транскрибирует ДНК, связанную с нуклеосомой, не внося никаких временных изменений в строение нуклеосом. По мере прохождения РНК-полимеразы, ДНК, входящая в состав нуклеосомы, вероятно, раскручивается с гистонового октамера, не освобождая его полностью. Возможно, вся нуклеосома временно приоткрывается, разделяя гистоновый октамер на две половинки. Не исключено также, что октамер остается интактным, но как бы «покачивается», давая пройти полимеразе (рис. 9-32). Очевидная трудность подобных маневров может служить объяснением столь высокой консервативности, которая характерна для аминокислотных последовательностей гистонов. Если бы нуклеосома представляла собой лишь устройство для наматывания ДНК, было бы логично ожидать большей вариабельности аминокислотной последовательности у нуклеосомных гистонов.

Как уже обсуждалось выше, большая часть нуклеосом клетки упакована в хроматиновую фибриллу 30 нм, которая затем подвергается дальнейшей конденсации. Трудно себе представить, что хроматин, находящийся в таком состоянии, транскрибируется РНК-полимеразой, и при этом упаковка нуклеосом, входящих в его состав, не подвергается значительным изменениям (рис. 9-33). Некоторые эксперименты дают основание предполагать, что отчасти такое изменение структуры имеет место (см. рис. 9-50).

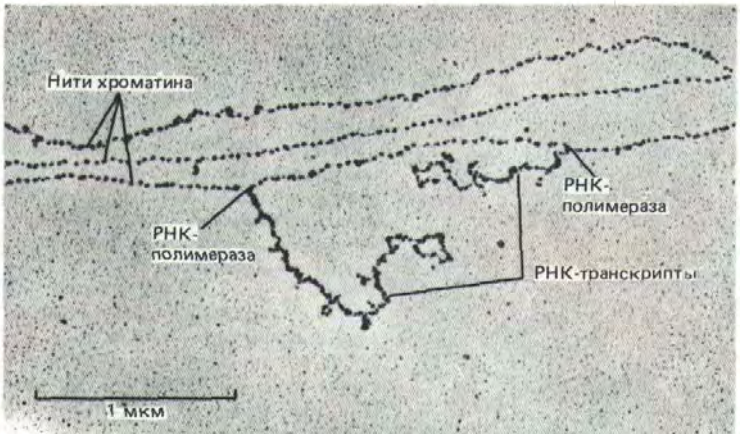


Рис. 9-31. Участок хроматина в форме нуклеосомной нити. Показаны три нити хроматина, на одной из которых две молекулы РНК-полимеразы транскрибируют ДНК. Большая часть хроматина в ядре высших эукариот не содержит активных генов, и, следовательно, свободна от РНК-транскриптов. Следует отметить, что нуклеосомы имеются как в транскрибируемых, так и в нетранскрибируемых областях, и что они связаны с ДНК непосредственно перед и сразу же за движущимися молекулами РНК-полимераз. (С любезного разрешения Victoria Foe.) .

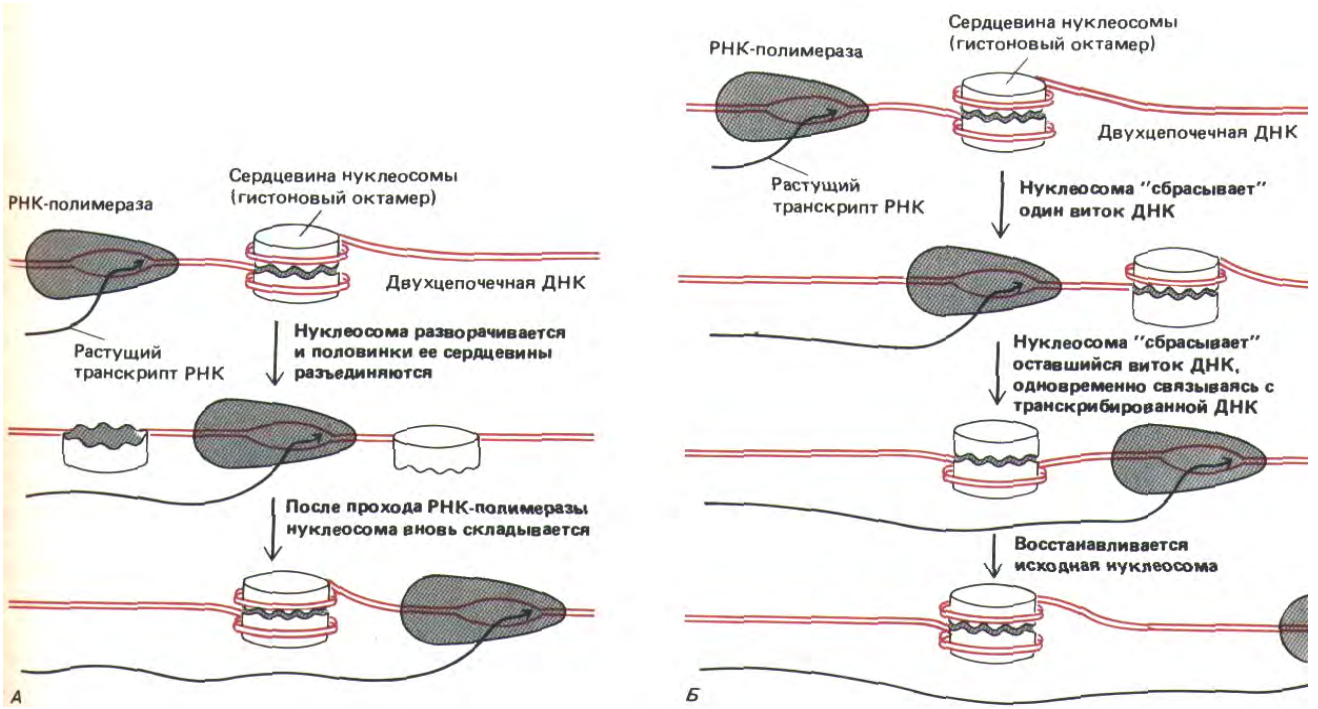


Рис. 9-32. Две возможные модели, объясняющие, как РНК-полимераза может транскрибировать хроматин, не вытесняя с него нуклеосомы. *А.* Транскрипция через временно приоткрытые полинуклеосомы. *Б.* Транскрипция через целый гистоновый октамер.

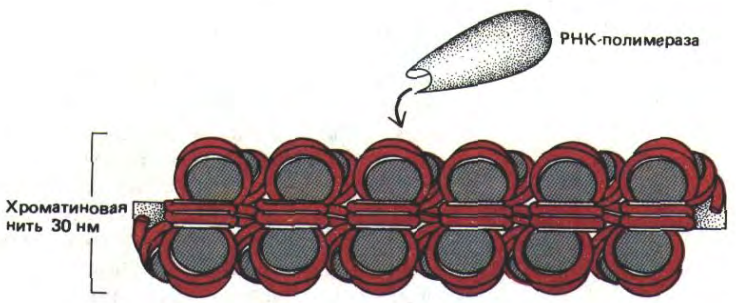


Рис. 9-33. Схема, представляющая молекулу РНК-лолимеразы, которая приближается к 30 нм-фибрил-ле хроматина. Число изображенных нуклеосом соответствует примерно 7000 парам оснований ДНК, что сопоставимо с геном среднего размера у человека (табл. 9-I). Вся эта ДНК, не соскальзывая с гистоновых октамеров хроматина, каким-то образом должна оказаться доступной для действия РНК-полимеразы. Очевидно, что для этого необходимо развернуть хроматин.

Заключение

Ген - это последовательность нуклеотидов, представляющая собой единицу активности для образования молекулы РНК. Хромосома состоит из одной-единственной невероятно длинной молекулы ДНК, содержащей множество генов. В молекуле хромосомной ДНК имеются и другие типы нуклеотидных последовательностей, необходимых для ее функционирования: сайт инициации репликации и теломера (они обеспечивают репликацию молекулы ДНК), а также центромера (она служит для прикрепления ДНК к митотическому веретену). Гаплоидный геном человека содержит 3 x 10^9 нуклеотидных пар, которые распределены между 22 различающимися аутосомами и 2 половыми хромосомами. По-видимому, лишь несколько процентов этой ДНК кодируют белки.

ДНК эукариот тесно связана с большим количеством гистонов, которые служат для образования множества повторяющихся частиц, содержащих белки и ДНК и называемых нуклеосомами. Нуклеосомы обычно упакованы вместе в регулярную структуру — фибриллу, имеющую диаметр 30 нм. Однако в областях ДНК, содержащих гены, гистоновый октамер, образующий каждую нуклеосому, должен конкурировать с разнообразными сайт-специфическими белками за участки связывания на ДНК. Такие участки, на которых нуклеосома замещена ДНК-связывающими белками, обычно выявляются как области более активной транскрипции ДНК.

В эукариотической клетке имеются сотни самых разнообразных сайт-специфических ДНК-связывающих белков. Каждый из них узнает короткую последовательность ДНК по водородным связям с парами оснований и по форме спирали. Эти белки при образовании белковых комплексов на определенных участках ДНК вступают друг с другом в кооперативное или конкурирующее взаимодействие.

9.2. Структура хромосомы

После обсуждения структуры ДНК и белков, входящих в состав хромосомы, рассмотрим ее строение в целом. Оказывается, ДНК в хромосоме не только упакована с помощью гистонов в регулярно повторяющиеся нуклеосомы, но, кроме того, хитроумным способом организована вместе с другими белками в серию субдоменов, обладающих различными свойствами. Эти структуры более высокого порядка являются удивительной особенностью хроматина эукариотических клеток; до сих пор остается загадкой, как именно такие домены функционируют.

9.2.1. Хромосомы, по-видимому, состоят из серии петель [21]

Диаметр ядра обычно не превышает 5 мкм (5 x 10^{-4} см). Поскольку упаковка ДНК в хроматиновой фибрилле позволяет уменьшить ее линейные размеры до 1 мм, должны существовать другие, более высокие, уровни компактизации. Один из принципов дальнейшей конденсации хроматина был подсказан внешним видом некоторых особых хромосом -так называемых *хромосом типа ламповых щеток* из ооцитов многих животных и *политенных хромосом* определенных клеток насекомых. Хромосомы этих двух типов обладают хорошо выраженной **петельной структурой,** т. е. имеют серию петельных доменов, которые под углом отходят от основной оси хромосомы. Установлено, что хромосома бактерии *E.coli* (кольцевая молекула ДНК длиной около 0,1 см, лишенная гистонов) также уложена в виде петель. Существующие в настоящее время данные позволяют считать петельную укладку общим принципом структурной организации хроматина.

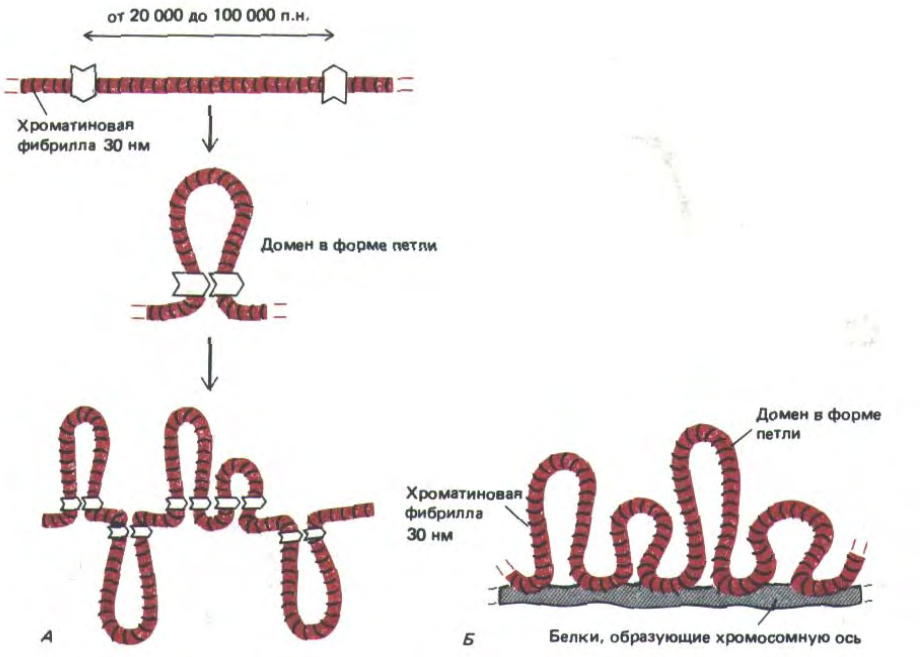


Рис. 9-34. Схематическое изображение участка хромосомы, имеющего петельную организацию. Каждая из петель содержит приблизительно от 20000 до 100000 пар оснований двухцепочечной ДНК, входящей в состав 30 нм-хроматиновой фибриллы. *А.* Модель упаковки, согласно которой на каждом конце петли находится сайт-специфический ДНК-связывающий белок. *Б.* Модель упаковки с участием хромосомной оси. В настоящее время неизвестно, как в действительности происходит упаковка, хотя цитологические данные свидетельствуют о том, что осевой участок изолированных митотических хромосом (место локализации концов петель) сильно обогащен ферментом, который в клетке содержится в большом количестве,-ДНК топоизоме-разой ll.

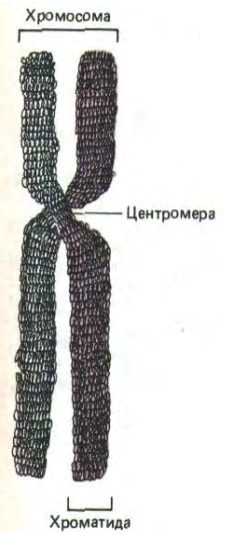


Рис. 9-35. Схематическое изображение типичной метафазной хромосомы. Каждая хроматида содержит одну из двух идентичных дочерних молекул ДНК (одна из них *выделена цветом],* образующихся в процессе репликации на более ранней стадии клеточного цикла.

Была выдвинута гипотеза, предполагающая, что петли хроматина формируются и поддерживаются с помощью ДНК-связывающих белков, которые узнают определенные нуклеотидные последовательности двух отдельных участков хроматиновой фибриллы и сближают их (рис. 9-34, *А).* В результате эти участки образуют устье петли. Петли могут сформироваться и иным путем при связывании ДНК с осью хромосомы (рис. 9-34, *Б).* По косвенным оценкам у таких таксономически отдаленных организмов, как дрозофила и человек, средняя длина петель весьма сходна, типичная петля содержит примерно от 20000 до 100000 пар оснований, что соответствует приблизительно 0,5 мкм фибриллы диаметром 30 нм. Если типичная хромосома человека состоит главным образом из петель, то в ее состав могло бы входить более 2000 таких доменов.

9.2.2. Митотические хромосомы состоят из максимально сконденсированного хроматина [22]

Большинство хромосом чрезвычайно растянуты и спутаны, что делает их невидимыми на всех фазах клеточного цикла за исключением митоза. В этот период хромосомы спирализуются, конденсируются и приобретают четкие формы. Эта суперспирализация, уменьшающая линейные размеры ДНК с 5 см по 5 мкм, сопровождается фосфорилированием всех молекул гистона HI, присутствующих в клетке, по пяти сериновым остаткам. В связи с тем, что гистон HI связывает между собой нукдеосомные частицы (см. рис. 9-28), его фосфорилирование может играть ключевую роль в конденсации хромосом в процессе митоза.

На рис. 9-3 5 изображена типичная митотическая хромосома на стадии метафазы. Две дочерние молекулы ДНК упаковываются порознь и образуют *сестринские хроматиды,* которые удерживаются вместе с помощью **центромеры.** Митотические хромосомы обычно несут на своей поверхности множество других молекул, в том числе большое количество рибонуклеопротеинов. Если удалить эту оболочку, на электронных микрофотографиях можно отчетливо увидеть, что каждая хро-

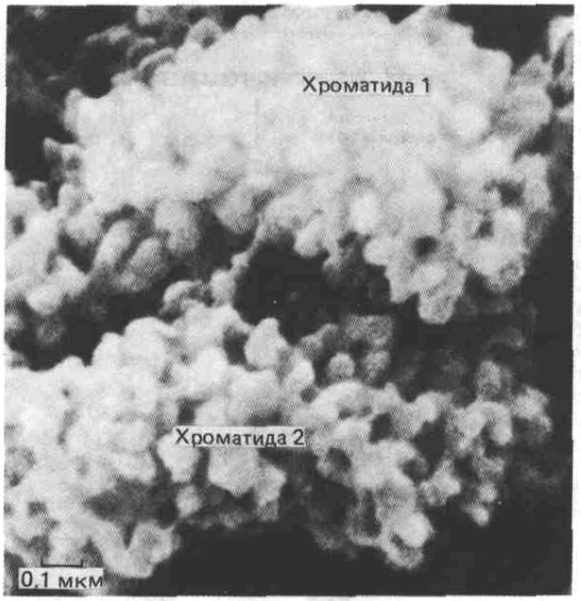


Рис. 9-36. Микрофотография участка типичной высококонденсированной митотическоЙ хромосомы, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Предполагается, что каждый выступ, напоминающий клубенёк, представляет собой конец отдельного петлевого домена. Обратите внимание, как хорошо различимы две идентичные спаренные хрома-тиды, схема которых представлена на рис. 9-35. (По Mardsen M. P., Laemmli U.K. Cell 17: 849-858, 1979.)

матида построена из хроматиновых петель, отходящих от центральной оси (рис. 9-36 и 9-37). Экспериментально доказано, что поперечная исчерченность, характерная для митотических хромосом, отражает в какой-то степени порядок расположения генов в молекуле ДНК. Различные способы упаковки длинной спирали ДНК представлены на рис. 9-38.

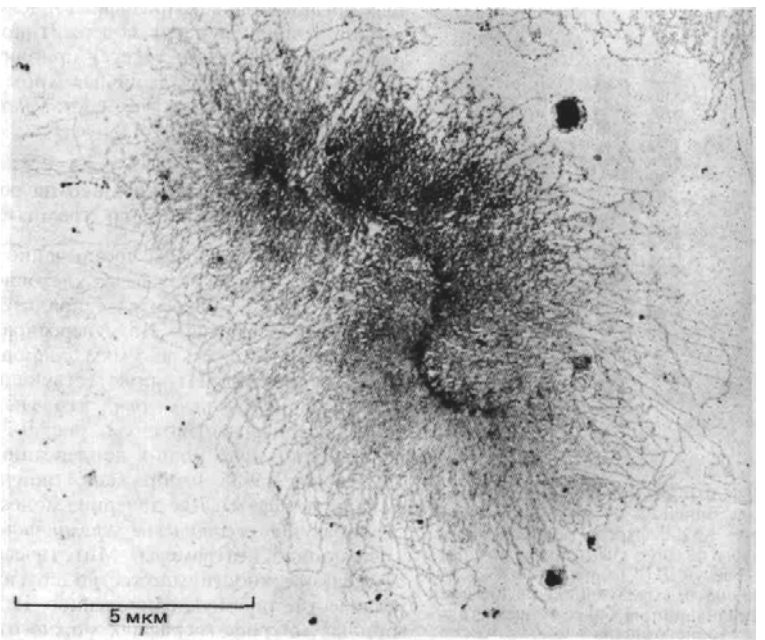


Рис. 9-37. Электронная микрофотография одиночной хроматиды митотическай хромосоми насекомого *(Oncopelfus).* Специальная обработка позволяет визуализировать петли хроматина, от&одящае от центральной оси хромагиды. (С любезного разрешения Victoria Foe.)

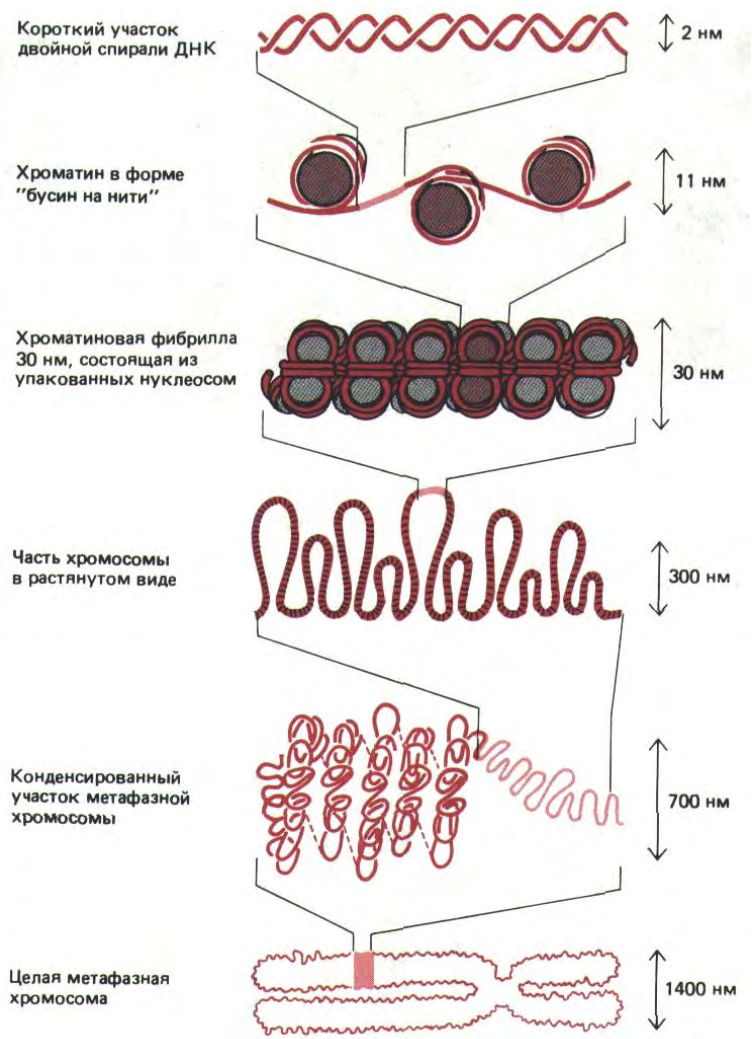


Рис. 9-38. Схема, иллюстрирующая различные уровни упаковки хроматина, которые, по-видимому, отражают последовательные этапы формирования высококонденсированной метафазной хромосомы.

В митотической хромосоме хроматин транскрипционно неактивен: синтез РНК с началом конденсации хромосом прекращается. По-видимому, РНК-полимераза не может в этих условиях продвигаться вперед по ДНК, хотя возможно это обусловлено и другими причинами.

9.2.3. Каждая митотическая хромосома содержит определенный набор очень больших доменов [23]

Набор из 46 митотических хромосом человека называют его **кариотипом.** Цитологические методы, разработанные в начале 70-х гг., позволяют безошибочно идентифицировать каждую хромосому в кариотипе человека. Для этого специально подготовленные препараты митотических хромосом обрабатывают красителями, способными флуоресцировать только при связывании с определенными типами последовательностей ДНК. Несмотря на то, что эти красители обладают очень низкой избирательностью [их использование позволяет в основном отличать участки ДНК, обогащенные АТ-парами (G-полосы) от участков с GC-богатыми последовательностями (R-полосы)], обработка ими митотических хромосом выявляет в каждой из них характерную картину чередования темных и светлых полос (сегментов) (рис. 9-39). Распределение

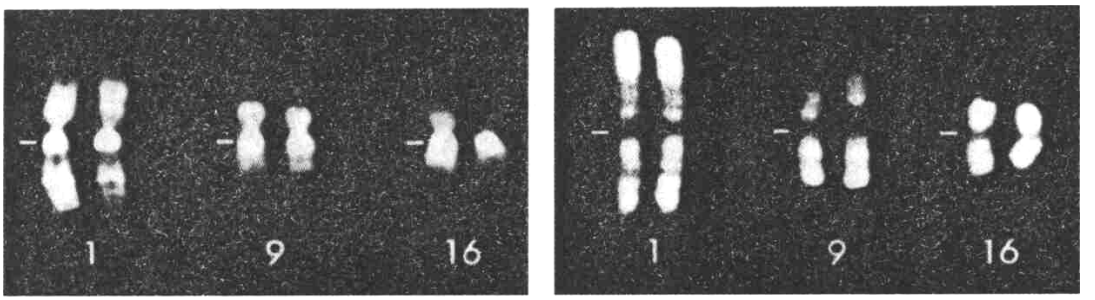


Рис. 9-39. Микрофотографии трех пар митотических хромосом человека, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа. *А.* Окрашивание хромосом АТ-специфичес-ким красителем Hoescht 33258 (G-полосы). *Б.* Окрашивание хромосом GC-специфическим красителем оливомицином (R-полосы). Черта указывает положение центромеры. Обратите внимание на то, что картины распределения сегментов (полос) в хромосомах на обеих фотографиях комплементарны: полосы, яркоокрашенные на А, на Б затемнены и наоборот. G-полосы проявляются и при окрашивании красителем Гимза (отсюда их название), а обозначение полос буквой R отражает тот факт, что они как бы обратны (reverse) G-полосам. (По K.F. Jorgenson, J.H. van de Sande and C. C. Zin, Chromosoma 68: 287-302, 1978.)

этих полос специфично для каждого типа хромосом, что делает возможной их однозначную идентификацию (рис. 9-40).

При анализе хромосом человека, проведенном с помощью флуоресцентных красителей, на ранних стадиях митоза, когда хромосомы значительно менее компактны, чем в метафазе, удалось подсчитать, что весь гашюидный набор содержит по меньшей мере 2000 четко выраженных полос, соответствующих АТ-богатым последовательностям ДНК.

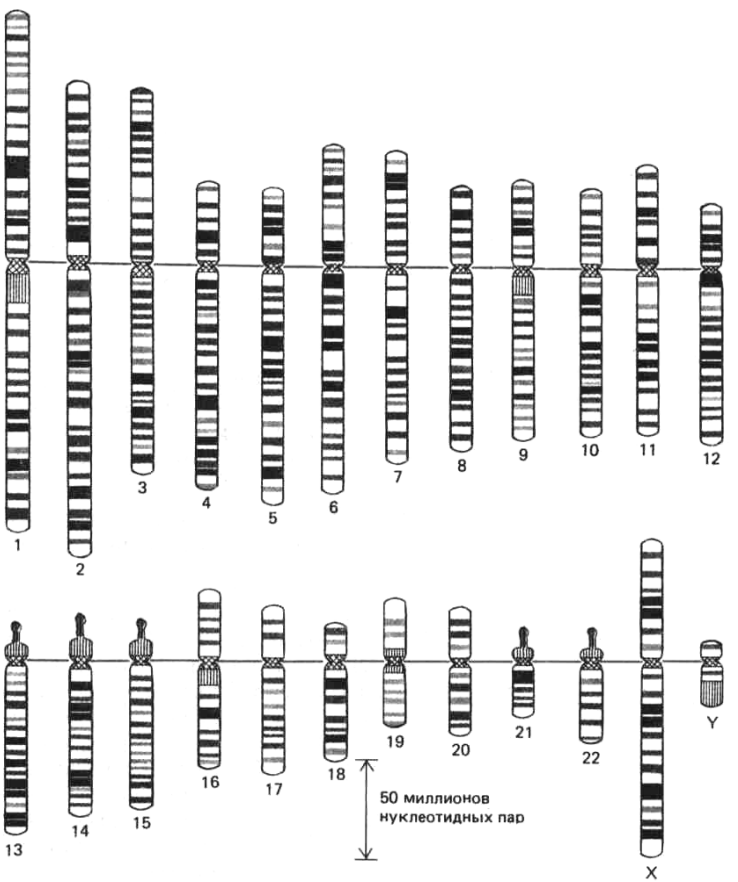


Рис. 9-40. Стандартная карта распределения сегментов в каждой из хромосом, составляющих человеческий кариотип, на стадии прометафазы митоза. Хромосомы от 1-й до 22-й пронумерованы в примерном соответствии с размером. Диплоидная клетка человека содержит по две хромосомы каждого типа плюс две Х-хромосомыт (у женщин) или Х- и Y-хромосомы (у мужчин). 850 полос, указанных на рисунке - это G-полосы, обнаруживаемые при окрашивании реагентами, специфичными к АТ-последова-тельностям ДНК. Выделенные цветом «головки» на хромосомах 13, 14, 15, 21 и 22 указывают на расположение генов, кодирующих большие рибосомные РНК, цветными линиями отмечено положение центромеры на каждой хромосоме. (С изменениями по U. Franke, Cytogenet. Cell Genet. 31: 24-32, 1981.)

В ходе митоза происходит дальнейшая конденсация хромосом и, как следствие, утолщение полос и уменьшение их числа.

Наличие поперечной исчерченности составляет общую черту миготических хромосом даже таких далеких друг от друга видов, как человек и дрозофила. Более того, картина распределения полос в хромосомах почти не изменилась за долгие периоды эволюции. Например, почти каждой хромосоме человека соответствует аналог в кариотипе шимпанзе, гориллы и орангутана (хотя в результате слияния одной пары хромосом у человека имеется 46, а не 48 хромосом, как у обезьян), причем картина распределения полос у них практически одинакова. Все это лишний раз указывает на большое значение пространственной организации ДНК в составе хромосом для экспрессии соответствующих генов, а само существование полос, возможно, отражает какие-то черты функциональной организации хроматина. **Почему** образуются такие полосы, до сих пор является загадкой. Даже наиболее тонкие полосы, изображенные на рис. 9-40, должны содержать не менее 30 петель, а суммарный нуклеотидный состав столь длинных последовательностей ДНК (более миллиона пар оснований, что соответствует размеру среднего бактериального генома), по-видимому, близок к среднестатистическому. Известно, что как АТ-богатые, так и GC-богатые полосы содержат гены.

9-13

9.2.4. ДНК хромосом типа ламповых щеток в интерфазе состоит из серии различающихся доменов [24]

Несмотря на высокий порядок упаковки хроматина, нити его в период интерфазы слишком тонки и спутанны, чтобы можно было ясно увидеть целиком всю хромосому. Тем не менее, существуют определенные типы клеток, в которых общую структуру интерфазных хромосом различить можно. Например, спаренные в мейозе хромосомы растущих ооцитов (незрелые яйцеклетки), активно синтезируют РНК и образуют необычайно жесткие и протяженные петли хроматина, покрытые вновь транскрибируемой РНК, которая упакована в плотные комплексы РНК-белок. В связи с тем, что ДНК покрыта такими комплексами, хромосомы (их называют **хромосомами типа ламповых щеток)** хорошо видны даже под световым микроскопом (рис. 9-41).

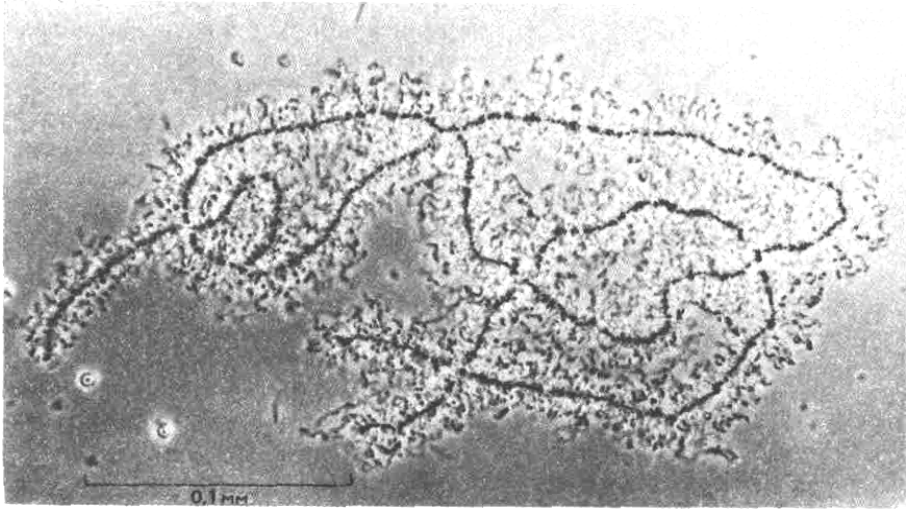


Рис. 9-41. Световая микрофотография хромосом типа ламповых щеток из ооцита земноводного. На ранних стадиях дифференцировки ооцитов каждая хромосома перед началом мейоза рсплицируется, ад гем гомологи спариваются с образованием четыреххроматидной протяженной структуры, изображенной на фотографии. Стадия хромосом типа ламповых щеток может длиться месяцы и даже годы. В это время в ооците создается запас мРНК и других веществ, необходимых для его последующего развития в новую особь. Обратите внимание, что каждая хромосомная ось имеет в длину приблизительно 400 мкм, тогда как длина большинства митотических хромосом составляет менее 10 мкм. (С любезного разрешения Joseph G. Gall.)

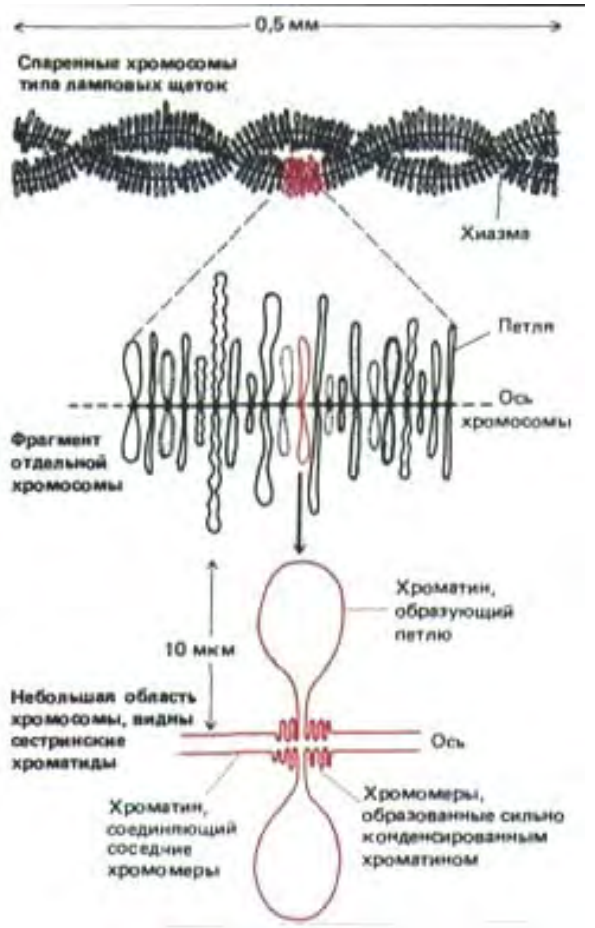


Рис. 9-42. Строение хромосомы типа ламповых щеток. У многих земноводных набор хромосом типа ламповых щеток содержит в сумме около 10000 петель хроматина, хотя большая часть ДНК остается в сильно конденсированном состоянии и располагается в хромомерах. Каждая петля соответствует определенной последовательности ДНК. В каждой клетке содержится по четыре копии каждой петли, поскольку структура, представленная в верхней части рисунка, состоит из двух спаренных гомологичных хромосом, а каждая хромосома представлена двумя сестринскими хроматидами. Такие структуры, состоящие из четырех нитей, характерны для данной стадии развития ооцита (стадия диплонемы мейоза).

Схема строения хромосом типа ламповых щеток приведена на рис. 9-42. Большие петли, состоящие из деконденсированного хроматина, отходят в стороны от оси хромосомы. Опыты по гибридизации нуклеиновых кислот показали, что определенная петля всегда содержит одну и ту же последовательность ДНК, которая во время роста ооцита располагается строго определенным образом. Следовательно, эти петли соответствуют фиксированным единицам упаковки хроматина, который деконденсировался и стал транскрипционно активным. Поскольку петля среднего размера содержит приблизительно 100 000 пар оснований, каждая петля может соответствовать одной петле хроматина, описанного выше (см. разд. 9.2.1). Многие петли постоянно транскрибируются по всей длине, другие содержат протяженные участки хроматина, который не транскрибируется вовсе. Большая часть хроматина не входит в состав петель и остается в сильно конденсированном состоянии в хромомерах; этот хроматин, как правило, не транскрибируется. Короткие области хроматина, которые не обладают высокой степенью конденсации и активно не транскрибируются, соединяют соседние хромомеры вдоль хорошо выраженной оси хромосомы.

Хромосомы типа ламповых щеток являются необычными в том отношении, что уровень их транскрипции выше, а большинство образующихся транскриптов РНК длиннее, чем те, которые синтезируются на других хромосомах. Однако есть данные, что молекула ДНК, входящая в состав любых интерфазных хромосом, тоже подразделяется на различные области, каждая из которых отделена от своих соседей границей. По-видимому, и в данном случае хроматин в разных областях упакован по-разному (например, в виде петель, хромомеров или хроматина, входящего в состав оси между хромомерами).

9.2.5. В политенных хромосомах также можно увидеть упорядоченные участки интерфазного хроматина [25]

Структура хроматина на уровне одиночных петель очень хорошо различима и в некоторых клетках насекомых. Многие клетки личинок мух вырастают до необычайно большого размера, претерпевая несколько циклов репликации ДНК, которые не сопровождаются клеточным делением. В результате они содержат в несколько тысяч раз больше ДНК, чем обычная клетка. Такие гигантские клетки называются *полиплоидными* в том случае, если число наборов хромосом у них превышает норму. Ситуация может быть и иной: гомологичные хромосомные пары могут не отделяться друг от друга, а формировать единые огромные хромосомы *(политенные хромосомы)*. Тот факт, что в отдельных гигантских клетках насекомых хромосомы могут переходить из политенного в по-

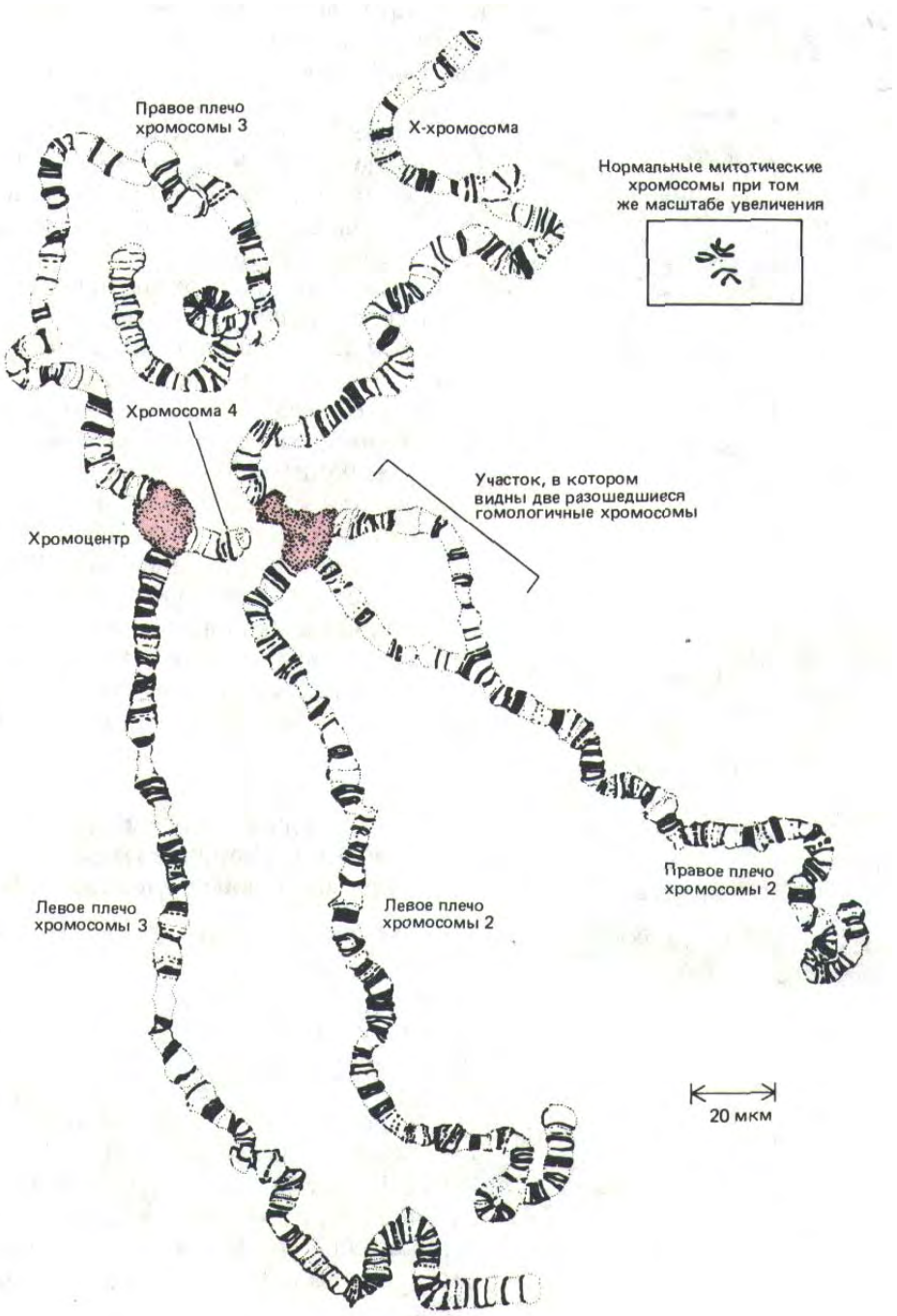


Рис. 9-43. Полный набор политенных хромосом из клетки слюнной железы дрозофилы. Эти хромосомы были расправлены и подготовлены для наблюдения путем «раздавливания» материала на предметном стекле. На рисунке представлены четыре пары хромосом. Каждая хромосома тесно спарена со своим гомологом (так, что каждая пара кажется единой структурой), чего не наблюдается в большинстве интерфазных ядер. Четыре пары хромосом связаны друг с другом своими центромерными зонами, образующими один большой «хромоцентр» *(окрашенная область)*. На данном препарате хромоцентр разделился на две части в процессе подготовки к микроскопированию. Необходимо отметить, что при выстраивании бок о бок многих нитей хроматина произошло значительное раскручивание каждой молекулы ДНК. (С изменениями по T. S. Painter, J.Hered. 25: 465-476, 1934.)



Рис. 9-44. Световая микрофотография участка политенной хромосомы из клетки слюнной железы дрозофилы. Видна характерная картина распределения дисков. Эти диски обнаруживаются в интерфазных хромосомах и являются отличительной чертой гигантских политенных хромосом; их не следует отождествлять с гораздо более «грубыми полосами, показанными на рис. 9-40, которые обнаруживаются в нормальных митотических хромосомах с помощью специальных красителей. (С любезного разрешения Joseph G. Gall.)

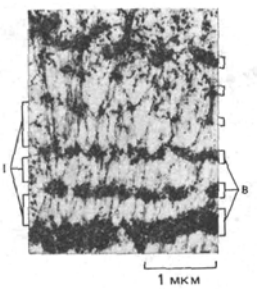


Рис. 9-45. Электронная микрофотография небольшого участка полигенной хромосомы дрозофилы. На тонком срезе видно, что разные хромосомные диски, весьма различающиеся по толщине (В), разделены междисковыми участками (I), хроматин которых гораздо менее сконденсирован. (С любезного разрешения Viekko Sorsa.)

лишюидное состояние, свидетельствует о том, что эти два хромосомных статуса тесно связаны между собой и что структура политенных хромосом в принципе аналогична структуре нормальных хромосом.

Благодаря своей большой величине, а также тому, что плотная и строго упорядоченная упаковка индивидуальных хроматшювых нитей в составе **политенной хромосомы** препятствует их запутыванию, эти хромосомы очень хорошо видны в световой микроскоп. Как и хромосомы типа ламповых щеток, политенные хромосомы в интерфазе активно синтезируют РНК. Явление политении наиболее глубоко было изучено на четырех хромосомах клеток слюнных желез личинок дрозофилы. В этих клетках ДНК реплицируется 10 раз подряд, дочерние хромосомы не разделяются, в результате чего образуются гигантские хромосомы, содержащие 1024 (2^{10}) тесно прилегающие друг к другу индивидуальные хроматиновые нити.

При наблюдении окрашенных политенных хромосом в световой микроскоп хорошо заметны перемежающиеся поперечные полосы: темные *(диски)* и светлые *(междисковые участки)* (рис. 9-43 и 9-44). Каждый диск и междисковый участок состоят из 1024 идентичных последовательностей ДНК, расположенных рядом друг с другом. Около 85% ДНК в политенных хромосомах содержится в дисках и 15%-в меж дисковых участках. Хроматин каждого диска при окрашивании выглядит более темным, так как он более конденсирован, чем хроматин междисковых участков (рис. 9-45). Полагают, что диск состоит из петли, которая многократно сложена (рис. 9-46). В зависимости от размера отдельные полосы содержат от 3000 до 300000 нуклеотидных пар. Поскольку каждый диск можно идентифицировать исходя из его толщины и расположения в хромосоме, все диски могут быть пронумерованы, что дает возможность составить «карту» политенной хромосомы. Во всем геноме дрозофилы содержится примерно 5000 дисков и 5000 междисковых участков.

9.2.6. Отдельные домены хроматина в политенных хромосомах могут разворачиваться и вновь упаковываться как отдельные единицы [26]

Задолго до того, как были получены первые данные о структуре хроматина, изучение политенных хромосом позволило сформулировать гипотезу, согласно которой транскрипция генов сопровождается значительными изменениями в упаковке ДНК: отдельный диск хромосомы вздувается при активации содержащихся в нем генов и вновь конденсируется, когда гены становятся неактивными.

Для того чтобы выявить транскрибируемые области на политенной хромосоме, можно ввести в клетки радиоактивный предшественник РНК [^{3}H]-уридин, а затем локализовать растущий транскрипт РНК с помощью радиоавтографии (рис. 9-47). Именно таким способом было установлено, что большая часть активного хроматина находится в де-конденсированном состоянии и образует характерные **хромосомные пуфы.**

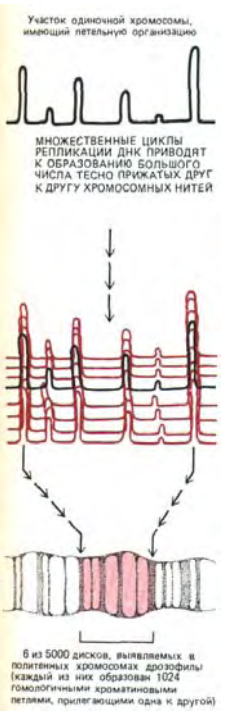


Рис. 9-46. Схема, показывающая, каким образом плотно прилегающие один к другому гомологичные петельные домены могут стать причиной появления дисков в политенных хромосомах. В составе каждого диска петли хроматиновых фибрилл находятся в очень тесном контакте друг с другом, формируя гораздо более конденсированную структуру, чем показано на этом рисунке.

Одним из основных факторов, контролирующих активность генов в политенных хромосомах дрозофилы, является гормон **экдизон,** встречающийся у насекомых. Уровень этого гормона в ходе развития личинки периодически поднимается и снижается, индуцируя транскрипцию разнообразных генов, которые кодируют белки, необходимые личинке для линьки и для окукливания. По мере прохождения через определенные стадии развития, возникают новые и исчезают старые пуфы, что связано с активацией и затуханием активности транскрипционных единиц и с синтезом разнообразных мРНК и белков (рис. 9-48). Изучение отдельного пуфа, размер которого относительно мал (но соответствующая ему полоса на хромосоме все-таки различима), дает основание предполагать, что каждый пуф образуется при разворачивании одного-единственного диска на хромосоме (рис. 9-49). Электронномикроскопический анализ показал, что ДНК пуфов находится в гораздо менее конденсированном состоянии, чем это свойственно хроматиновой фибрилле диаметром 30 нм (рис. 9-50). По-видимому, отдельная петля, которая, как полагают, упакована в диск на хромосоме (рис. 9-46), при транскрипции деконденсируется как самостоятельная единица.

9.2.7. Гены на политенной хромосоме расположены, вероятно, как в дисках, так и в междисковых участках [27]

Фиксированное расположение дисков и междисковых участков на политенной хромосоме дрозофилы навело цитогенетиков на мысль, что каждый диск, возможно, соответствует отдельному гену. Анализ мутаций не только подтвердил это предположение, но позволил генетикам подсчитать число жизненно важных генов у дрозофилы; их оказалось приблизительно 5000, т. е. столько же, сколько дисков на хромосомах. Например, при попытке индуцировать мутации, картируемые на небольшом участке хромосомы (содержащем около 50 различных дисков), генетическими методами было выявлено около 50 жизненно важных генов. Хотя данный метод и не позволяет определить, где именно локализован конкретный ген, в диске или в междисковом участке, эти наблюдения дают основание для следующего вывода: обычный диск может содержать последовательности ДНК, кодирующие один-единственный жизненно важный белок.

Однако последующие эксперименты заставили усомниться в правильности гипотезы «один диск - один ген». Например, была клонирована значительная область генома дрозофилы размером 315000 нуклеотидных пар, затем отдельные ее фрагменты использовали в качестве зондов для идентификации мРНК, синтезирующихся на этом участке. Количество отдельных мРНК, как выяснилось, в три раза превышает число дисков. Весьма вероятно, что большая часть этих мРНК соответ-



Рис. 9-47. Синтез РНК на гигантской политенной хромосоме из слюнных желез насекомого *Chironomus tentans*. На представленном радиоавтографе хромосомы, меченной [^{3}H]-уридином, области синтеза РНК покрыты темными гранулами серебра в соответствии с активностью каждого участка. (По C. Felling, Chromosoma 15: 71-122, 1964.)

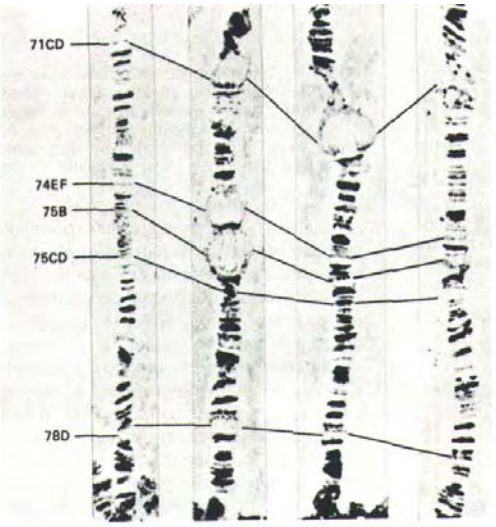


Рис. 9-48. Серия фотографий, иллюстрирующая последовательные стадии возникновения и регрессии пуфов в политенных хромосомах *Drosophila melanogaster*. Представлен фрагмент левого плеча хромосомы 3, содержащий пять крупных пуфов. Каждый из этих пуфов активен лишь в течение короткого периода: зафиксированная на фотографиях последовательность событий занимает 22 ч и повторяется в каждом поколении мух. (С любезного разрешения Michael Ashburner.)

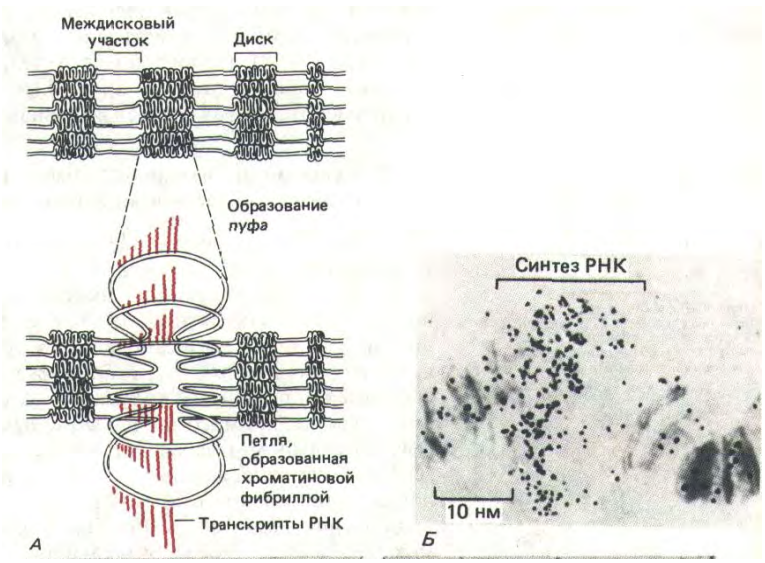


Рис. 9-49. *А.* Упрошенная схема процесса образования пуфа на политенной хромосоме. *Б.* Радиоавтограф отдельного пуфа, в котором на указанном участке синтезировалась РНК; в результате этот участок оказался меченным [^{3}H]-уридином. (С любезного разрешения Jose Bonner.)

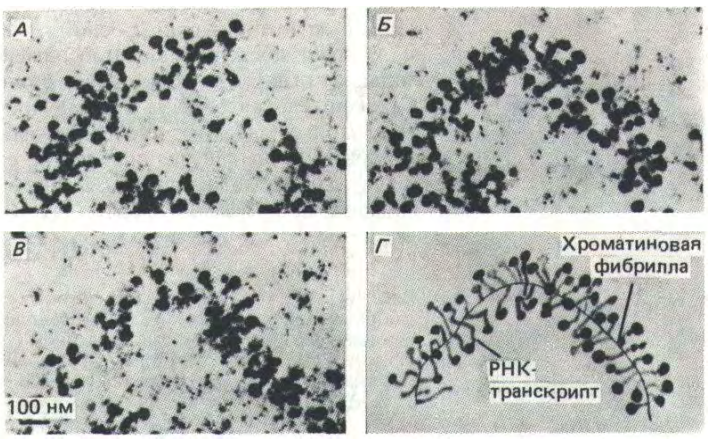


Рис. 9-50. Электронные микрофотографии серии тонких срезов крупного хромосомного пуфа, показывающие конформацию необычно длинной транскрипционной единицы. На схеме *Г* изображена пространственная модель исследуемого участка данной транскрипционной единицы. Концы транскриптов РНК, похожие на клубеньки, прикреплены к одиночной хроматино-вой фибрилле. «Клубеньки» на 5'-конце большинства транскриптов образуются вследствие упаковки молекулы РНК в рибонуклеопроте-иновые частицы. (По K. Andersson, B. Bjokroth and B. Daneholt, Exp. Cell Res. 130: 313-326, 1980.)

ствуют генам, влияющим на приспособленность мух именно в природных условиях. В лабораторных условиях, в отсутствие селективного отбора, мутации по многим из этих генов могут не улавливаться. Недавно было установлено, что мРНК синтезируется как в дисках, так и в междисковых участках.

Хотя структурная организация хромосом наиболее четко выявляется при исследовании необычных интерфазных хромосом, таких как политенные или хромосомы типа ламповых щеток, вероятно, все хромосомы высших эукариот имеют подобную организацию. Изучение политенных хромосом дрозофилы показало, что гены могут располагаться и в области конденсированного хроматина дисков, и в менее конденсированных междисковых участках; кроме того установлено, что в каждом диске может содержаться несколько генов. Для чего же в таком случае каждый длинный тяж хроматина в хромосоме подразделяется на большое число различающихся областей? Хотя ответ и неизвестен, вполне вероятно, что такое строение дает возможность: I) сохранять организацию ДНК; 2} отделять гены друг от друга, и таким образом избегать биологических «помех»; 3) регулировать транскрипцию генов (например, конститутивно экспрессируемые гены «домашнего хозяйства» могут располагаться в междисковых участках, тогда как гены, специфические для определенного типа клеток, могут находиться в дисках).

9-14

9.2.8. В транскрипционно активных областях хроматин менее конденсирован [28]

При обработке ядер клеток позвоночных ДНКазой I (той самой, которая при более низких концентрациях выявляет сверхчувствительные к нуклеазе области, лишенные нуклеосом) было показано, что опреде-

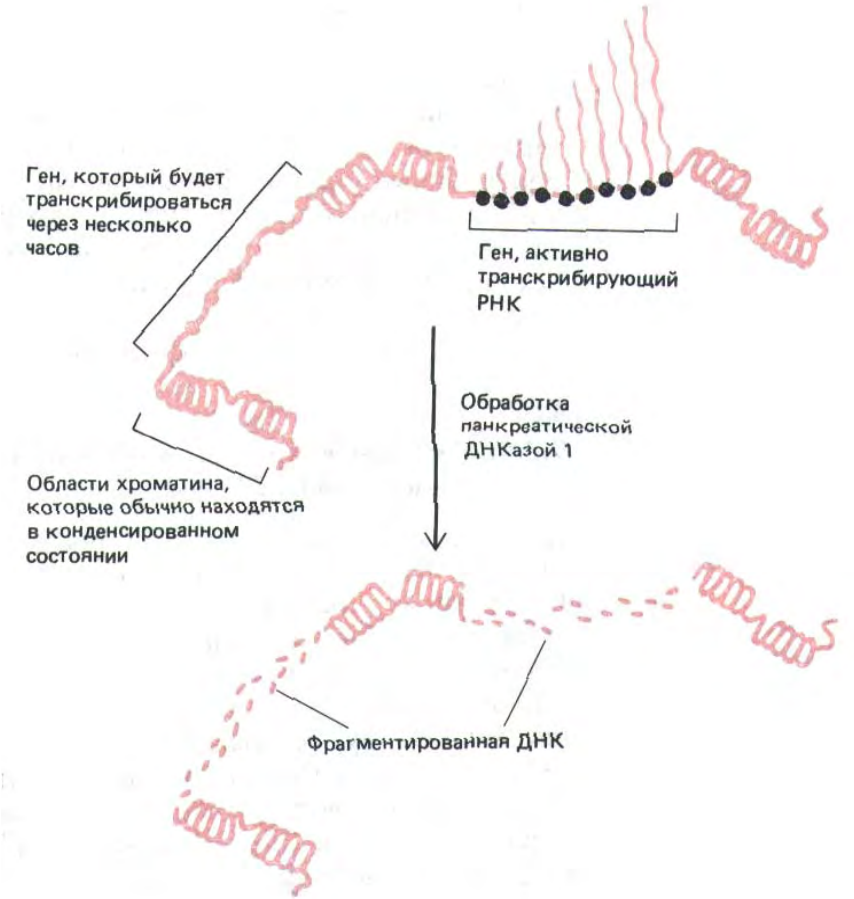


Рис. 9-51. Обработка хроматина панкреатической ДНКазой I. Вначале фермент разрезает сайты, обладающие повышенной чувствительностью к нуклеазе (не показано), затем деградации подвергается последовательность ДНК, в которую входят активно транскрибируемые и потенциально активные гены.



Рис. 9-52. Электронная микрофотография расправленного хроматина из клеток эмбриона насекомого *(Oncopeltus).* Видны значительные изменения в структуре хроматина двух тандемно расположенных генов рРНК. По-видимому, у этих эмбрионов синтезу рРНК предшествует переход хроматина из состояния «бусины на нитке» к гладкой форме. Возможно, гладкий хроматин представляет собой область, где ДНК «соскочила» с нук-леосом в ходе подготовки к транскрипции. Следует отметить, что структура хроматина, входящего в состав гена, расположенного левее от транскрибируемой области, подверглась изменениям, хотя в данный момент он не транскрибируется. (По V. E. Foe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 723-740, 1978.)

ленная часть хроматина, содержащего активные гены, находится в де-конденсированном состоянии. Этот вывод подтверждает результаты, полученные на политенных хромосомах насекомых. При определенной концентрации ДНКазы в первую очередь подвергается деградации около 10% генома позвоночных. В разных клетках одного и того же организма нуклеаза расщепляет различные последовательности ДНК, которые соответствуют различным типам продуцируемых этими клетками РНК. С помощью гибридизации со специфическими ДНК-зондами удалось выяснить, что деградировавшие последовательности относятся главным образом к тем областям генома, которые в данном типе клеток активно транскрибируются. Интересно, что даже гены, транскрибирующиеся в каждом поколении клеток лишь несколько раз, обладают чувствительностью к нуклеазе. Этот факт говорит о том, что сверхчувствительным к нуклеазе участок становится скорее всего вследствие особого состояния хроматина, а не собственно транскрипции (рис. 9-51). Хроматин в таком чувствительном к нуклеазе состоянии часто называют **активным** хроматином. Полагают, что нуклеосомы, входящие в его состав, упакованы менее плотно. Даже если нуклеазной обработке подвергаются митотические хромосомы, расщепленным оказывается преимущественно активный хроматин. По-видимому, и в митозе, несмотря на чрезвычайно плотную упаковку генома, между активным и неактивным хроматином сохраняются некоторые различия.

Электронномикроскопический анализ, как правило, не выявляет никаких изменений в строении нуклеосом, входящих в состав активного хроматина. Однако есть и поразительное исключение: у некоторых зародышей насекомых в области активных генов рРНК можно заметить протяженные участки хроматина, как будто лишенного нуклеосом (рис. 9-52). Согласно одной из гипотез, в таких участках каждая нуклеосома открывается, образуя развернутую структуру. Вероятно, при этом происходит раскручивание двух витков спирали ДНК, которые в обычном состоянии намотаны на нуклеосому. По-видимому, эти структурные изменения способствуют эффективности транскрипции.

9-15

9.2.9. Активный хроматин обладает особыми биохимическими свойствами [29]

Для того чтобы разобраться в строении хроматина, сконденсированного в разной степени, необходимо выделить и охарактеризовать хромосомные белки, присущие каждому из этих состояний. В отношении активного хроматина на этом пути были достигнуты определенные успехи. Установлено, что 1) гистон H1 не очень тесно связан по крайней мере с некоторой частью активного хроматина; 2) четыре гистона, образующие нуклеосому, содержатся в обычных количествах, но характеризуются необычно высоким уровнем ацетилирования лизиновых остатков, расположенных вблизи аминоконца этих белков. Ацетильные группы присоединяются к ним с помощью фермента *гистоновой ацетилазы* и удаляются *гистоновой деацетилазой,* причем каждая ацетильная груп-

па существует в среднем около 10 минут; 3) нуклеосомы в активном хроматине селективно связывают два близкородственных небольших хромосомных белка HMG14 и HMG17. Так как эти белки присутствуют только в активном хроматине, их количество строго соответствует тому, которое требуется для связывания примерно одной из каждой 10 нуклеосом. Аминокислотные последовательности обоих белков крайне консервативны, что свидетельствует о важности их функции; 4) у некоторых организмов, например у *Tetrahymena,* активный хроматин в значительной мере обогащен минорной формой гистона H2A. Подобная разновидность гистона найдена также у дрозофилы, курицы и человека. Любое из описанных свойств может играть важную роль в развора-чивании хроматина и таким образом способствовать синтезу РНК, однако для подтверждения этой гипотезы требуется проведение прямых экспериментов. Дальнейшие биохимические исследования можно проводить с использованием новых методов очистки активного хроматина на основе селективного связывания с аффинным матриксом, который содержит антитела, специфические либо к белку HMG, либо к ацетилиро-ванному лизину. В гл. 10 обсуждаются механизмы контроля образования активного хроматина.

9.2.10. Гетерохроматин сильно конденсирован и транскрипционно неактивен [30]

Доказательства существования второй необычной формы хроматина были получены в 1930 г., когда при наблюдении в световом микроскопе интерфазного ядра клетки высших эукариот была обнаружена особая конденсированная форма хроматина, названная **гетерохроматином** (менее конденсированная часть хроматина была названа *эухроматином).* Гетерохроматин в интерфазе остается необычайно компактным, сохраняя такую структуру, которую большая часть хроматина приобретает только в митозе. Позднее обнаружилось, что как и митотический хроматин, Гетерохроматин транскрипционно неактивен (рис. 9-53). Полагают, что в большинстве клеток около 90% хроматина транскрипционно неактивно. Хотя относительная устойчивость такого неактивного хроматина к обработке нуклеазой свидетельствует в пользу того, что этот хроматин более конденсирован, чем 10% в транскрипционно

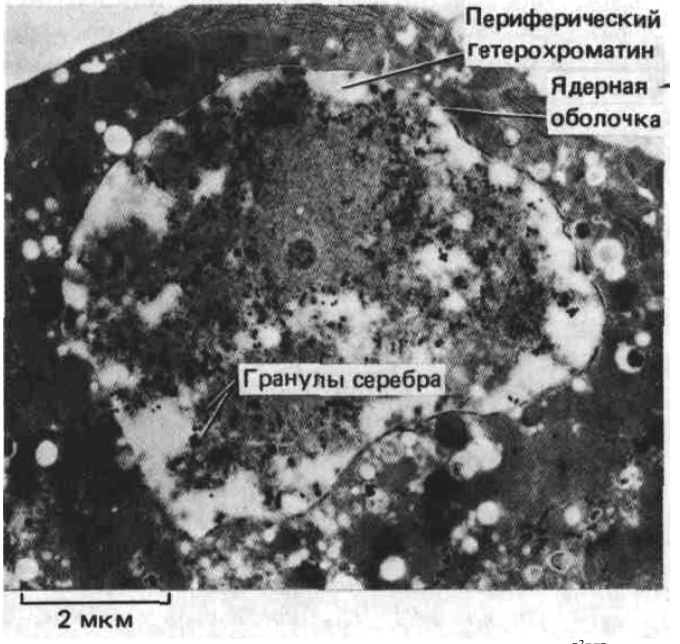


Рис. 9-53. Радиоавтограф тонкого среза ядра клетки, подвергнутой импульсному мечению [^{3}H]-уридином для выявления областей активного синтеза РНК (гранулы серебра). Светлые участки - области гетерохроматина, который обычно концентрируется вдоль внутренней поверхности ядерной оболочки. Светлая окраска участков гетерохроматина обусловлена особенностями метода приготовления препарата. Синтез РНК наблюдается главным образом в эухроматино-вых участках, окружающих области гетерохроматина. (С любезного разрешения Stan Fakan.)

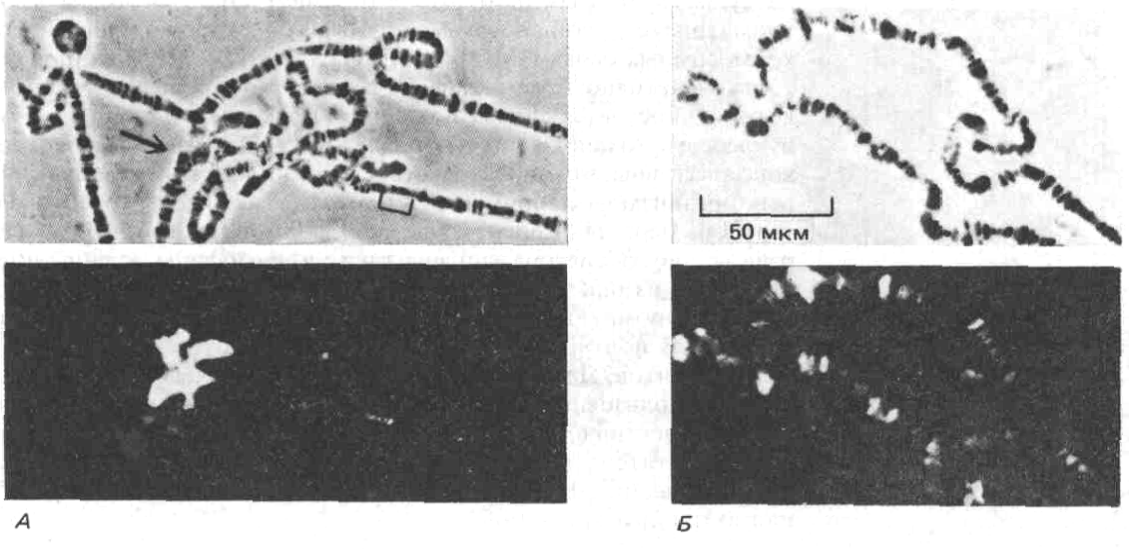


Рис. 9-54. Участок политенной хромосомы дрозофилы в фазово-контрастном *(вверху)* и флуоресцентном *(внизу)* микроскопе после иммунофлуоресцентного мечения гетерохроматина *(слева)* и активного хроматина *(справа)*. *А.* Окрашивание моноклональными антителами, специфичными к белкам, содержащимся в гетерохроматиновых областях. Окрашены хромоцентр (указан *стрелкой)* и несколько отдельных дисков. *Б.* Окрашивание моноклональными антителами, специфичными к белкам, содержащимся в активном хроматине. Окрашивается часть дисков. (Л-по T.C. James and S.C.R. Elgin, Mol. Cell Biol. 6: 3862 3872, 1986; Я-по G.C. Howard, S.M Abmayr, Z.A. Shinefeld, V.Z. Sato and S.C.R. Elgin, J. Cell Biol. 88: 219-225, 1981. © 1981 Rockefeller University Press.)

активных областях, лишь часть его (возможно от 10 до 20%) обладает сильно конденсированной конформацией, известной под названием гетерохроматин. Таким образом, гетерохроматин, вероятно, представляет собой особый класс транскрипционно инертного хроматина, несущего определенные функции. У млекопитающих и многих других высших эукариот ДНК, окружающая каждую центромеру, состоит из относительно простых повторяющихся нуклеотидных последовательностей; именно такие «сателлитные ДНК» составляют основную часть гетерохроматина этих организмов.

У дрозофилы в виде гетерохроматина организованы как хроматин центромеры, так и случайно разбросанные короткие участки. Подобные гетерохроматиновые области недореплицируются на ранних стадиях синтеза ДНК, т. е. в тот период, когда происходит образование политенной хромосомы. Таким образом, эти последовательности в политенных хромосомах представлены в относительно меньших количествах. Биохимические особенности этого типа гетерохроматина можно изучать на молекулярном уровне, проводя связывание с антителами, выявляющими белки хромосом, которые присутствуют только в гетерохроматине (рис. 9-54). Перспективным для биохимического анализа гетерохроматина представляется и клонирование генов, кодирующих специфические для него белки.

Заключение

Все хромосомы во время митоза подвергаются значительной конденсации. Специальное окрашивание выявляет на митотических хромосомах полосы, благодаря которым можно совершенно точно идентифицировать каждую хромосому. Эти полосы, насчитывающие миллионы нуклеотидных пар ДНК, выявляют в хромосоме значительную гетерогенность, природа которой пока еще неясна.

Во время интерфазы хромосомы обычно подвергаются деконденсации в такой степени, что их структура становится трудноразличимой. Замечательным исключением являются специализированные хромосомы типа ламповых щеток в ооцитах позвоночных и политенные хромосомы гигантских секреторных клеток насекомых. Изучение этих двух разновидностей интерфазных хромосом показало, что каждая длинная молекула ДНК, входящая в состав хромосомы, состоит из большого числа

дискретных, по-разному упакованных доменов. Основная характерная черта этих хромосом — наличие значительного количества петель хроматина, большая часть которых содержит от 20 000 до 100 000 нуклеотидных пар. Как в хромосомах типа ламповых щеток, так и в политенных хромосомах наименее конденсированными являются области, наиболее активно синтезирующие РНК. Судя по чувствительности к ДНКазе, лишь 10% ДНК находится в относительно деконденсированном состоянии и транскрибируется. Такой «активный» хроматин имеет иные биохимические свойства, нежели те, которыми обладают более конденсированные участки.

9.3. Репликация хромосом

Перед каждым делением клетка должна синтезировать копии всех своих хромосом. Таким образом, делению клетки предшествует ее переход из состояния интерфазы (фазы G1) в фазу синтеза ДНК (S-фаза). В типичной клетке высших эукариот S-фаза длится 8 часов. После ее окончания каждая хромосома представлена двумя копиями, которые продолжают оставаться соединенными в области центромер до наступления М-фазы. (см. рис. 9-35). Для удвоения хромосомы необходима репликация ее ДНК и последующая сборка на этой молекуле хромосомных белков, образующих хроматин. В гл. 5 мы обсуждали ферменты, участвующие в репликации ДНК, и строение **репликационной вилки,** обеспечивающей синтез (см. рис. 5-39). Переход клетки в S-фазу будет рассмотрен в гл. 13 как часть более общей проблемы контроля клеточного цикла. В данном разделе мы изложим принципы механизма репликации эукариотической хромосомы, укажем время, необходимое для этого, и, кроме того, проанализируем взаимосвязь процесса репликации и структуры хромосомы.

9-18

9.3.1. В хромосомах высших эукариот сайты инициации репликации активируются группами [31]

Как отмечалось ранее, репликационные вилки возникают на бактериальной хромосоме в участках с определенной последовательностью ДНК, называемых *точками начала репликации (сайтами инициации репликации)* (см. разд. 5.3.9). В каждом таком сайте образуется две вилки, которые движутся в противоположных направлениях со скоростью около 500 нуклеотидов в секунду пока не закончится репликация всей кольцевой ДНК бактериальной хромосомы. Бактериальный геном столь мал, что эти две репликационные вилки могут его полностью удвоить менее, чем за 40 минут.

В начале 60-х гг. был разработан метод, позволяющий в общих чертах изучать репликацию хромосом эукариот. В культуру клеток человека на короткое время вводят радиоактивную метку (Н-тимидин), затем клетки мягко лизируют и ДНК дают расправиться на поверхности предметного стекла, покрытого фоточувствительной эмульсией; после чего радиоавтограф изучают в световом микроскопе. Реплицировавшаяся ДНК выявляется в виде цепочки гранул серебра. Этим методом можно определить как скорость, так и направление движения репликационной вилки (рис. 9-55). Исходя из скорости, с которой увеличивается длина треков реплицировавшейся ДНК эукариот при увеличении времени мечения, репликационные вилки у этих организмов перемещаются примерно на 50 нуклеотидов в секунду, т. е. в десять раз медленнее, чем у бактерий. Возможно, это связано с тем, что ДНК, упакованную в хромосому, реплицировать труднее.



Рис. 9-55. Схема эксперимента, позволяющего судить о характере перемещения в течение S-фазы. Вновь синтезированную ДНК в культуре клеток человека подвергали импульсному мечению [^{3}H]-тимидином. *А.* Клетки лизировали и ДНК растягивали на предметном стекле, которое затем покрывали светочувствительной эмульсией. Через несколько месяцев светочувствительный слой проявляли, при этом становился видимым ряд серебряных зерен вдоль радиоактивной ДНК. *Б.* Тот же эксперимент с последующей инкубацией в среде, не содержащей метку. Синтезированная в этих условиях дополнительная ДНК характеризуется пониженным уровнем радиоактивности. Оказалось, что гранулы серебра в паре темных треков (Б) как бы расходятся в противоположных направлениях, что свидетельствует о продвижении вилки в разные стороны от точки начала репликации (см. рис. 5-49). ДНК на данном рисунке выделена цветом только для того, чтобы облегчить понимание радиоавтографа. В действительности немеченая ДНК в таких экспериментах не видна.

Согласно современным представлениям, средняя хромосома человека состоит из единственной молекулы ДНК, содержащей около 150 млн. пар нуклеотидов. Для репликации такой молекулы от начала до конца репликационной вилки, движущейся со скоростью 50 нуклеотидов в секунду, потребуется 0,02 x 150 x 10^6 = 3,0 x 10^6 с (около 800 ч). При анализе радиоавтографов выяснилось, однако, что по каждой эукариоти-ческой хромосоме движется одновременно много вилок. Более того, часто в одной и той же области ДНК обнаруживается много вилок, тогда как в других участках той же хромосомы их нет совсем. Дальнейшие более детальные эксперименты выявили следующее: 1) сайты инициации репликации обычно активируются группами по 20-80 сайтов (их называют *репликационными единицами);* 2) в ходе S-фазы, по-видимому, активируются всё новые решшкационные единицы, пока вся ДНК не будет реплицирована; 3) отдельные точки начала репликации внутри репликационной единицы отстоят друг от друга на расстояние от 30000 до 300000 нуклеотидных пар, следовательно, в среднем на одну петлю хроматина может приходиться одна такая точка; 4) у эукариот, как и у бактерий, образуется сразу пара репликационных вилок, а по мере их расхождения от сайта инициации репликации формируется *репликацион-*

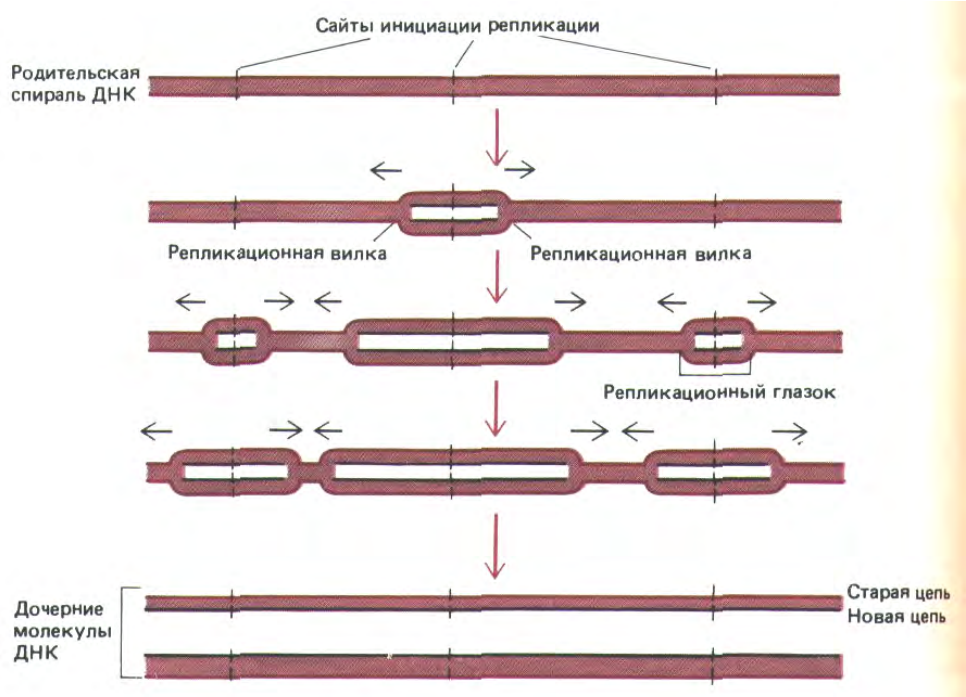


Рис. 9-56. Особенности репликации ДНК в хромосомах эукариот. Точки начала репликации в большинстве клеток расположены на расстоянии от 30000 до 300000 нуклеотидных пар друг от друга. Полагают, что репликационные вилки останавливаются только при встрече с аналогичной структурой, двигающейся в противоположном направлении или по достижении конца хромосомы. В результате вся ДНК оказывается реплицированной.

ный глазок. Остановка вилки происходит только при столкновении с репликационной вилкой, движущейся в противоположном направлении (или при достижении конца хромосомы). Таким образом, по каждой хромосоме может двигаться независимо друг от друга много реплика-ционных вилок, образующих две целые дочерние спирали ДНК (рис. 9-56).

9-19
9-21

9.3.2. Сайтами инициации репликации служат определенные последовательности ДНК [32]

У бактерий и ряда вирусов животных в роли **сайтов инициации репликации** (точек начала репликации) выступают вполне определенные последовательности ДНК. Можно предположить, что и у эукариот точками начала репликации служат конкретные последовательности ДНК. Наибольшим успехом завершились поиски таких участков у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.* Для их обнаружения использовали клетки, дефектные по жизненно важному гену. Эти клетки могут расти на селективной среде лишь при условии, что они несут плазмиду, содержащую активную копию отсутствующего гена. Если бактериальную плазмиду, несущую жизненно важный ген переносят в дефектную клетку дрожжей, то плазмида не реплицируется, поскольку сайт инициации репликации бактерии в составе плазмидной ДНК не способен инициировать репликацию в клетке дрожжей. Однако если встроить в плазмиду (до ее переноса в клетки дрожжей) случайные фрагменты дрожжевой ДНК, то небольшая часть молекул плазмидной ДНК получит дрожжевой сайт инициации репликации и, следовательно, сможет реплицироваться. Клетки дрожжей, несущие такие плазмиды, способны расти, так как они получили жизненно важный ген (рис. 9-57). Последовательности ДНК дрожжей, присутствующие в плазмидах, которые выделены из этих клеток, названы *автономно реплицирующимися (*autonomously replicating

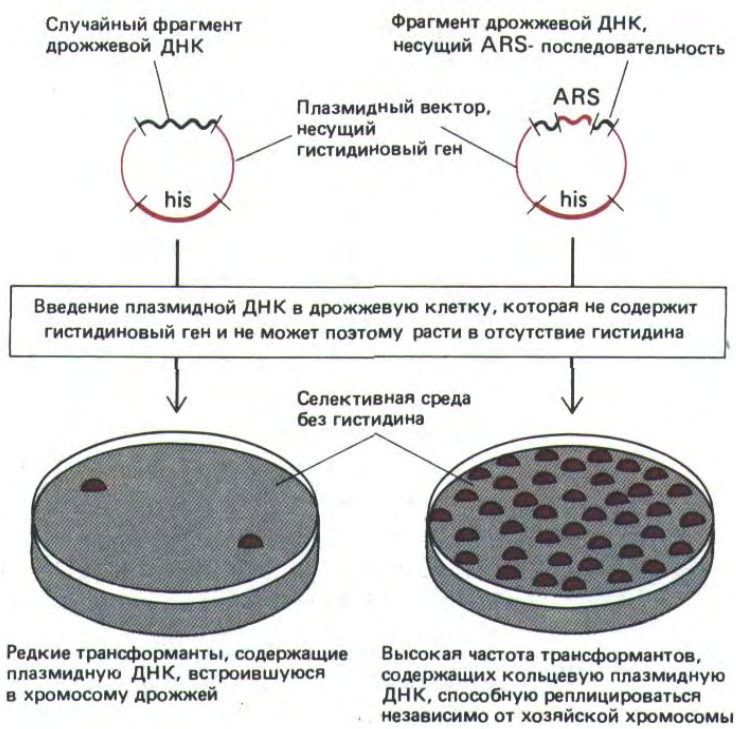


Рис. 9-57. Метод выявления автономно реплицирующихся последовательностей (ARS-элементов) у дрожжей. Эти последовательности выступают в роли точек начала репликации, содержащие их плазмиды способны самостоятельно реплицироваться в хозяйской клетке, не включаясь в состав хромосом.

sequences, ARS). ARS-последовательности встречаются в геноме дрожжей примерно с той же частотой, которая постулируется для точек начала репликации (приблизительно одна на каждые 40000 нуклеотидных пар). Для функционирования ARS необходима консенсусная последовательность, состоящая из 11 нуклеотидов [(A или T) TTTAT (A или G)TTT(A или T)]. Искусственно сконструированный тандем, состоящий из таких последовательностей, при встраивании в плазмиду функционирует в дрожжевой клетке как ARS. Отсюда следует, что инициаторный белок, чтобы начать репликацию, должен узнать расположенные рядом друг с другом копии этой последовательности. Были сделаны попытки идентифицировать участки ДНК, которые в клетках высших эукариот выступают в роли сайтов инициации репликации, однако подобные последовательности еще недостаточно хорошо изучены.

9-20

9.3.3. Хромосома вируса SV40 реплицируется в бесклеточной системе млекопитающих [33]

В репликационных системах прокариот движение репликационной вилки обеспечивает комплекс, состоящий из нескольких ферментов: ДНК-полимеразы, ДНК-праймазы и ДНК-геликазы (см. разд. 5.3.6). Этот комплекс собирается в точке начала репликации в результате реакции с участием инициаторного белка, который специфически связывается с точкой начала репликации ДНК (см. рис. 5-50). Чтобы выявить все ферменты, участвующие в репликации ДНК млекопитающих, было предпринято много попыток реконструировать этот процесс in vitro. В наиболее удачных системах in vitro, разработанных до сих пор, удалось реплицировать небольшую кольцевую хромосому вируса обезьяны (SV40). Все белки, необходимые для его репликации (за исключением одного), обеспечиваются клеткой-хозяином. Исключение составляет **Т-антиген** SV40, большой многофункциональный белок (90000 дальтон), который позволяет этому вирусу избежать блокировки повторной репликации ДНК (см. разд. 9.3.11) и, таким образом, реплицироваться быстрее, чем ДНК клетки-хозяина. Множественные копии Т-антигена специфически связываются с точкой начала репликации SV40 и действуют одновременно и как инициаторный белок, и как ДНК-геликаза для того, чтобы раскрыть спираль ДНК в этом сайте. Затем к одной из цепей в этом участке присоединяется комплекс ДНК-полимеразы (ДНК-поли-мераза а) и ДНК-праймазы (оба фермента принадлежат клетке-хозяину). Образующаяся репликационная вилка напоминает репликационную вилку прокариот, но отличается от нее тем, что в ней функционируют два типа ДНК-полимераз: **ДНК-полимераза а** на отстающей цепи и **ДНК-по-лимераза 5** на ведущей цепи. У прокариот же на обеих сторонах репликациониой вилки действуют разные молекулы одной и той же ДНК-полимеразы (см. разд. 5-47).

Белок, инициирующий репликацию на хромосомах эукариотических клеток, еще не обнаружен. Таким образом, остается неизвестным, действует ли этот белок подобно Т-антигену в качестве ДНК-геликазы или же, как у прокариот, инициаторные и геликазные функции берут на себя разные белки.

9.3.4. По мере репликации ДНК новые гистоны образуют хроматин [34]

Для образования нового хроматина в каждом клеточном цикле требуется огромное количество гистонов, масса которых примерно равна массе вновь синтезированной ДНК. В связи с этим у большинства

организмов для каждого из гистонов имеется много копий генов. Например, в клетках позвоночных обнаружено приблизительно 20 одинаковых генных блоков, каждый из которых содержит все пять гистоновых генов.

В отличие от большинства клеточных белков, которые синтезируются во время интерфазы, гистоны образуются главным образом в S-фазе. За это время в результате усиления транскрипции и уменьшения распада гистоновой мРНК ее содержание в клетке увеличивается примерно в 5 раз. Вследствие необычного строения 3'-конца (см. разд. 10.4.13) основные гистоновые мРНК чрезвычайно нестабильны и подвергаются распаду через несколько минут после окончания синтеза ДНК в конце S-фазы (или при добавлении ингибитора, прерывающего синтез ДНК). В противоположность этому сами молекулы гистонов очень стабильны и могут существовать в течение всей жизни клетки. Тесная связь между синтезом гистонов и синтезом ДНК может быть, по крайней мере отчасти, обусловлена механизмом обратной связи, который контролирует уровень свободных гистонов, чтобы обеспечить соответствие количества гистонов количеству вновь синтезированной ДНК.

После сборки нуклеосом молекулы гистонов редко либо вообще никогда не покидают ДНК, с которой они связаны. Следовательно, по мере своего продвижения решгакационная вилка должна преодолевать родительские нуклеосомы, которые, по-видимому, устроены так, чтобы не препятствовать ходу транскрипции и репликации. В соответствии с одной из гипотез каждая нуклеосома при репликации ДНК временно раскрывается с образованием двух «полунуклеосом», что дает возможность ДНК-полимеразе копировать развернувшуюся молекулу (рис. 9-58).

Вновь синтезированная ДНК, остающаяся позади регшикационной вилки, наследует старые гистоны, и кроме того, чтобы завершить

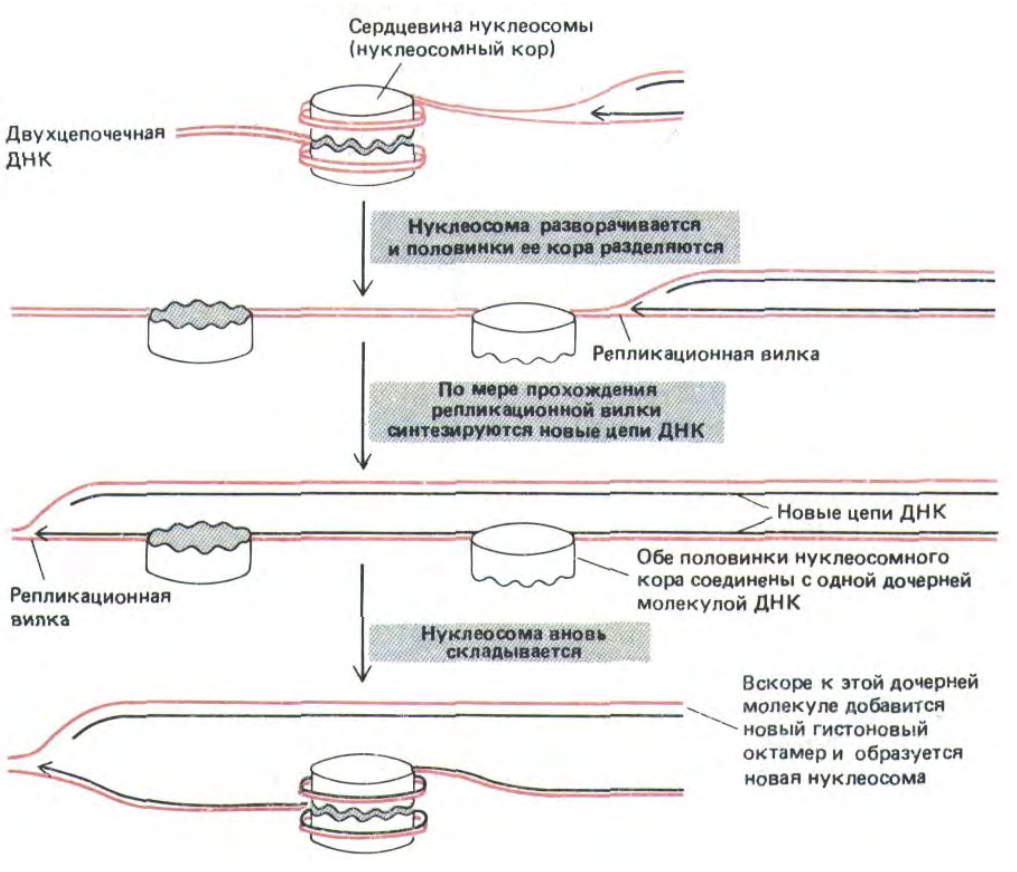


Рис. 9-58. Гипотетическая схема, показывающая, как нуклеосома может открываться для репликации ДНК и затем вновь собираться после прохождения репликационной вилки. При этом гистоны, входящие в состав нуклеосомы, остаются постоянно связанными с ДНК. На данном рисунке старая нуклеосома наследуется в прежнем виде спиралью ДНК, образовавшейся на ведущей цепи, однако в действительности пока неизвестно, как она наследуется. Представлена лишь одна из многих возможных моделей.

упаковку в хроматин, требует такого же количества новых гистонов (см. рис. 9-58). Новые гистоны обычно связываются в первые несколько минут после прохождения репликационной вилки. Однако для полного формирования вновь образованному хроматину необходим целый час. Именно в этот период новые гистоны проявляют большую чувствительность к модифицирующим ферментам, чем старые гистоны. Неизвестно, чем отличается по своему химическому составу зрелый хроматин от незрелого; полагают, что для созревания необходимы как ковалентная модификация гистонов, так и изменения в способности связываться с другими белками, входящими в состав хроматина.

9-5

9.3.5. Теломеры состоят из коротких G-богатых повторов, которые добавляются к концам хромосом [35]

Как отмечалось выше, невозможность полностью реплицировать конец молекул линейных ДНК с помощью ДНК-полимеразы привела к появлению на концах эукариотических хромосом специфических последовательностей ДНК, названных **теломерами** (см. разд. 9.1.2). У таких разных организмов, как простейшие, грибы, растения и млекопитающие, эти участки имеют одинаковое строение. Они состоят из многих, расположенных друг за другом повторов одной короткой последовательности, которая содержит блок G-нуклеотидов (рис. 9-59, *А*). G-богатая теломерная последовательность всегда расположена на 3'-конце молекулы ДНК и, по-видимому, складывается в специальную структуру, которая защищает конец хромосомы. Предполагаемый механизм репликации ДНК теломеры ресничного простейшего *Tetrahymena* приведен на рис. 9-59, *Б*.

9.3.6. Различные области одной и той же хромосомы в S-фазе реплицируются в разное время [36]

Учитывая скорость движения репликационной вилки и расстояние, отделяющее две соседние точки начала репликации, можно сделать вывод, что синтез ДНК на этом участке, по-видимому, в норме занимает около часа. Несмотря на это, S-фаза в клетках млекопитающих обычно длится примерно 8 часов. Отсюда следует, что не все точки начала репликации активируются одновременно, и время репликации каждой группы этих сайтов (20-80 сайтов) занимает лишь небольшую часть всей S-фазы.

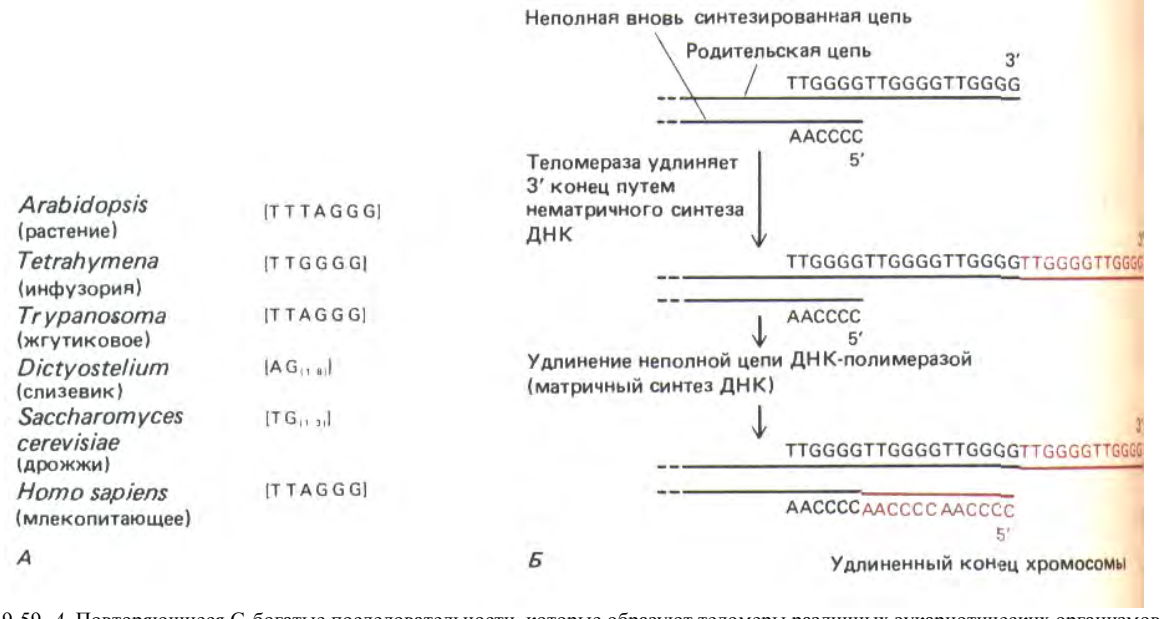


Рис. 9-59. *А*. Повторяющиеся G-богатые последовательности, которые образуют теломеры различных эукариотических организмов. *Б*. Возможный путь образования тело-мер (по данным, полученным на *Tetrahymena)*. На отстающей цепи матричной молекулы ДНК синтезируется неполная цепь (см. рис. 5-39). При соединении с теломерой, теломераза *Tetrahymena* узнает структурную особенность G-богатой последовательности. Поскольку в качестве субстрата этот фермент использует нуклеозидтрифосфаты, нуклеотид на 3'-конце должен сигнализировать теломеразе, какой нуклеотид G или T присоединять на данной стадии. Реакции, сокращающие и удлиняющие последовательность теломеры, не совсем сбалансированы, в результате концы хромосом состоят из разного числа повторов (примерно сотни нуклеотидных пар).

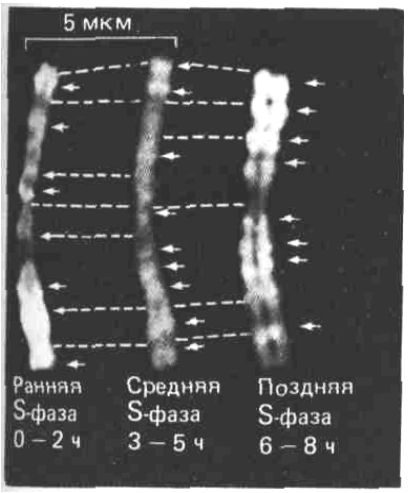


Рис. 9-60- Световая микрофотография окрашенных митотических хромосом. Реплицирующуюся ДНК метили в предшествующей митозу S-фазе. Для этого клетки выращивали в присутствии синтетического нуклеозида 5'-бромдезоксиуридина (BrdU), а затем в течение коротких промежутков времени метили ти-мидином в ранней, средней или поздней S-фазе. Поскольку у ДНК, синтезировавшейся в период пульс-мечения, одна из цепей несет тимидин, а другая BrdU, эти участки окрашиваются более интенсивно, чем остальная ДНК, у которой BrdU входит в состав обеих цепей. Пунктиром соединены соответствующие участки на трех копиях хромосомы. (С любезного разрешения Elton Stubblefield.)

Активируются ли различные единицы репликации случайным образом или же существует строгий порядок, согласно которому и удваиваются определенные области генома? Для того, чтобы ответить на этот вопрос, была проведена серия экспериментов. Синхронизированную клеточную культуру, находящуюся в S-фазе, в течение коротких промежутков времени метили аналогом тимидина 5-бромдезоксиуридином (BrdU). Области митотических хромосом, включившие метку в свою ДНК, можно обнаружить в М-фазе по снижению окрашивания определенным красителем или по связыванию со специфическими антителами. Такие опыты показали, что области хромосом реплицируются в виде больших единиц, а очередность их удвоения в S-фазе для каждой хромосомы строго регламентирована (рис. 9-60).

9.3.7. Высококонденсированный хроматин реплицируется в поздней S-фазе [37]

В клетках высших эукариот некоторые участки ДНК более конденсированы по сравнению с другими. Например, в интерфазе *гетерохроматин* остается в сильно конденсированном состоянии (которое сходно с кон-формацией хромосом в митозе), тогда как *активный хроматин* становится менее компактным, что, по-видимому, необходимо для синтеза РНК (см. разд. 10.3.11).

Для понимания механизма, определяющего момент репликации конкретного участка, очень важны данные о том, что гетерохроматиновый блок (включая околоцентромерные области), остающийся конденсированным в интерфазе, реплицируется в поздней S-фазе. По-видимому, поздняя репликация связана с упаковкой ДНК в хроматин. Такой вывод подтверждается хронометрированием репликации двух X-хромосом в клетках самок млекопитающих. Известно, что эти две хромосомы содержат одинаковые последовательности ДНК, но одна из них активна, а другая нет (см. разд. 10.3.9). Почти все неактивные X-хромосомы состоят из гетерохроматина и их ДНК реплицируется в поздней S-фазе; активная X-хромосома менее конденсирована и реплицируется, как оказалось, в течение всей S-фазы. Напрашивается вывод, что менее конденсированный в интерфазе хроматин более доступен для реплика-ционной машины и состоящие из него области реплицируются в первую очередь.

С другой стороны, по данным радиоавтографии все репликационные вилки в течение S-фазы движутся со сравнимыми скоростями; таким образом, степень конденсации хромосом, вероятно, не влияет на работу этой вилки, если она уже образовалась. Однако порядок активации точек начала репликации, по-видимому, по крайней мере отчасти зависит от структуры хроматина данного участка.

9.3.8. Гены в составе активного хроматина реплицируются в ранней S-фазе [38]

Связь между строением хроматина и временем репликации ДНК подтверждается данными о времени репликации отдельных генов. Популяцию растущих клеток метили бромдезоксиуридином, после чего клетки тут же разделяли по размеру центрифугированием. Так как рост клеток связан с клеточным циклом, клетки большего размера окажутся «старше», и их ДНК, таким образом, будет помечена на более поздней стадии S-фазы. Из клеток каждого типа выделяли ДНК, меченную BrdU, и гибридизовали ее с серией известных ДНК-зондов, чтобы определить, какие гены она содержит. Поскольку ДНК, в состав которой входит BrdU, более плотная, ее легко можно отделить от обычной ДНК пу-

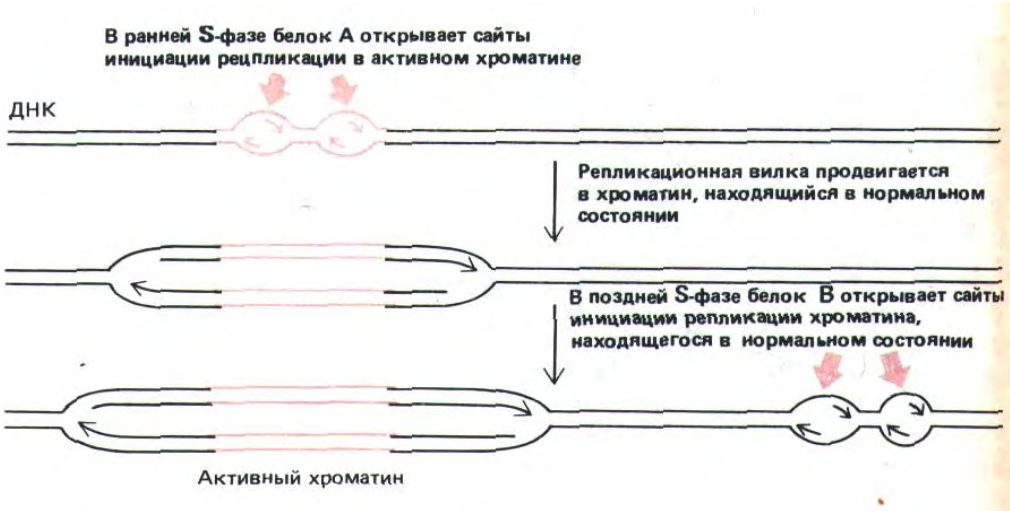


Рис. 9-61. Одна из моделей, объясняющих почему активный хроматин *(выделен цветом)* реплицируется в ранней S-фазе, а неактивный-в поздней S-фазе. Предполагают, что в точке начала репликации на активный и неактивный хроматин действуют различные инициаторные белки. Согласно другой гипотезе, два типа сайтов инициации репликации используют один и тот же молекулярный механизм, но в различное время, просто потому, что конденсированная структура обычного хроматина затрудняет доступ необходимых для репликации белков.

тем центрифугирования в градиенте плотности хлористого цезия (см. разд. 4.4.1).

Таким образом, исследователи владеют эффективным методом, позволяющим определить время репликации любого гена, для которого имеется ДНК-зонд. Оказалось, что во всех изученных клетках гены «домашнего хозяйства» (т. е. те, которые активны во всех клетках) реплицируются в ранней S-фазе. Напротив, гены, активные в некоторых типах клеток, реплицируются рано лишь в тех клетках, где они активны, и позже в других типах клеток. Например, при изучении таким способом длинных последовательностей гена иммуноглобулина размером 300000 нуклеотидных пар оказалось, что в клетках, где этот ген активен, все области хроматина, в состав которого он входит, завершают свою репликацию в начале S-фазы. Вероятно, это связано с существованием внутри гена нескольких точек начала репликации, активирующихся примерно в одно и то же время. Иная картина наблюдается в тех клетках, где синтез иммуноглобулина отсутствует. С помощью ДИК-зондов была выявлена единственная репликационная вилка, которая возникла на одном конце этого участка хромосомы примерно через час после начала S-фазы и затем двигалась вдоль ДНК с постоянной скоростью около 3000 нуклеотидов в минуту.

На рис. 9-61 представлена простая модель, объясняющая эти результаты. Согласно этой модели, все точки начала репликации, расположенные в активном хроматине, начинают работать в самом начале S-фазы. Затем репликационные вилки, возникшие на этих участках, обязательно передвинутся в соседние области хромосомы, где хроматин характеризуется более конденсированной структурой, поэтому любой ген, расположенный менее, чем за миллион нуклеотидных пар от точки начала репликации, будет реплицироваться в середине S-фазы. Чтобы стало понятным, как могут реплицироваться неактивные области хромосомы, расположенные далеко от активного хроматина, необходимо допустить, что в середине или в поздней S-фазе активируется вторая группа точек начала репликации, которые могут инициировать возникновение репликационных вилок в хроматине, обладающем любой структурой.

9.3.9. Поздно реплицирующиеся участки совпадают с АТ-богатыми полосами на метафазных хромосомах [23]

Вероятно, многие репликационные единицы соответствуют различным сегментам хромосом, выявляемым с помощью специальных методов фиксации и окрашивания, которые используются для кариотипирования.

Как отмечалось выше (см. разд. 9.2.3), в гаплоидном наборе митотических хромосом млекопитающих при окрашивании можно обнаружить приблизительно 2000 темных АТ-богатых сегментов (G-полосы), разделенных светлыми GC-богатыми участками (R-полосы). Примечательно, что АТ-богатая и GC-богатая ДНК различаются по времени репликации в S-фазе. Эксперименты, подобные приведенному на рис. 9-60, показали, что большая часть GC-богатых полос реплицируются в первой половине S-фазы, а большинство АТ-богатых - во второй ее половине. Отсюда можно сделать вывод, что гены «домашнего хозяйства» (конститутивные) находятся главным образом в GC-богатых полосах, а гены, активность которых характерна для специализированных клеток, относятся к АТ-богатым сегментам. Остается загадкой, почему геном млекопитающих должен подразделяться на такие большие чередующиеся блоки хроматина, многие из которых по размеру приближаются к целому бактериальному геному. Неизвестно также, сколько точек начала репликации из каждой репликационной единицы активируется одновременно. Возможно, в поздно реплицирующихся репликонах хроматин остается в конденсированном состоянии даже после окончания М-фазы и деконденсируется лишь в середине S-фазы, открывая в репликоне сразу все точки начала репликации. В таком случае координированная репликация ДНК в пределах одной репликационной единицы, проходящая по принципу «все или ничего», может отражать кооперативную природу процесса деконденсации хроматина (см. разд. 9.1.21).

9.3.10. Для чего необходим контроль времени включения точек начала репликации? [39]

S-фаза завершается необычайно быстро в дробящихся яйцеклетках многих видов, где запасено большое количество компонентов хроматина (таких как гистоны), необходимых для быстрого снабжения ими новых ядер. Как показано на рис. 9-62, короткая S-фаза требует использования чрезвычайно большого числа точек начала репликации, расположенных на расстоянии всего нескольких тысяч нуклеотидных пар (а не десятков или сотен тысяч нуклеотидов, разделяющих соответствующие сайты на более поздних стадиях развития). Поскольку любая чужеродная ДНК, введенная в оплодотворенную яйцеклетку шпорцевой лягушки (включая небольшие кольцевые фрагменты ДНК бактерий) реплицируется, можно сделать вывод, что в качестве точки начала репликации в этой клетке функционирует очень короткая простая последовательность, имеющаяся в любой молекуле ДНК.

Репликация ДНК представляет собой процесс, который может протекать с довольно высокой скоростью и который в большинстве клеток регулируется сложной системой, обеспечивающей такой механизм возникновения репликационных вилок, при котором различные части генома реплицируются в совершенно разное время. Возможно, время репликации влияет на структуру хроматина. Например, согласно одной из гипотез, хроматин, реплицирующийся рано, собирается из специального запаса хромосомных белков, синтезированных в течение Gl-фазы, кото-

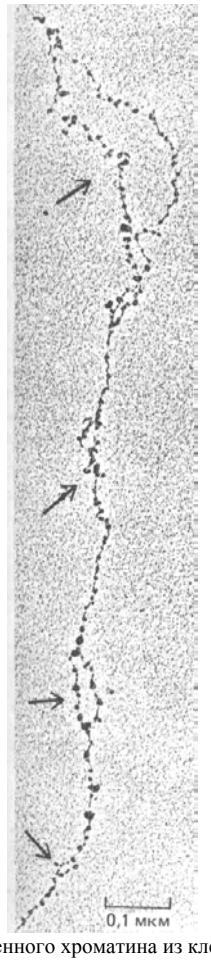


Рис. 9-62. Электронная микрофотография расправленного хроматина из клеток эмбриона дрозофилы. Обратите внимание, что репликационные глазки расположены очень близко друг к другу (указано *стрелками}*. У этих эмбрионов между делениями ядер проходит лишь 10 мин. Точки начала репликации, которые мы видим на микрофотографии, расположены так близко (их разделяют несколько тысяч нуклеотидных пар), что для репликации ДНК, заключенной между ними, требуется только одна минута. (С любезного разрешения Victoria Foe.)

рые способствуют поддержанию хроматина в активном состоянии и, таким образом облегчают транскрипцию экспрессируемых генов.

9-21
9-22

9.3.11. Факторы, связанные с хроматином, обеспечивают однократную репликацию ДНК в каждой S-фазе, блокируя повторение этого процесса [40]

У нормальной клетки в S-фазе весь геном должен реплицироваться только один раз. Как было показано выше, репликация ДНК в большинстве эукариотических клеток протекает асинхронно в течение определенного промежутка времени. В связи с тем, что точки начала репликации в разных участках хромосомы активируются в разное время, к середине S-фазы некоторые части хромосом еще не начинают реплицироваться, тогда как другие уже реплицированы полностью. Таким образом, в середине и в поздней S-фазе возникает сложная «бухгалтерская» задача. К этому времени некоторые точки начала репликации уже удвоились, тогда как другие (вероятно, с аналогичной последовательностью ДНК) ещё не были задействованы. Однако известно, что каждая точка начала репликации в каждой S-фазе может использоваться только один раз. Как же это достигается?

Ключ к решению данной проблемы дали опыты по слиянию клеток. Если клетки, находящиеся в S-фазе, слить с клетками, находящимися в Gl-фазе, то в Gl-ядре индуцируется синтез ДНК. Можно предположить, что переход из фазы G1 в S-фазу обусловлен действием диффундирующего активатора синтеза ДНК. Иная картина имела место, когда с клетками, находящимися в S-фазе, сливали клетки на стадии G2 (т.е. только что закончившие S-фазу). В этом случае в G2-ядре синтез ДНК не начинался, а в ядре, находящемся в S-фазе, он по-прежнему шел. Таким образом, ядро, находящееся на стадии G2 (его ДНК уже реплици-ровалась), ведет себя так, как будто оно защищено от вхождения в последующие циклы репликации неким недиффундирующим ингибитором, тесно связанным с ДНК. Подобный ингибитор, если бы он действительно существовал, мог бы помочь каждой репликационной

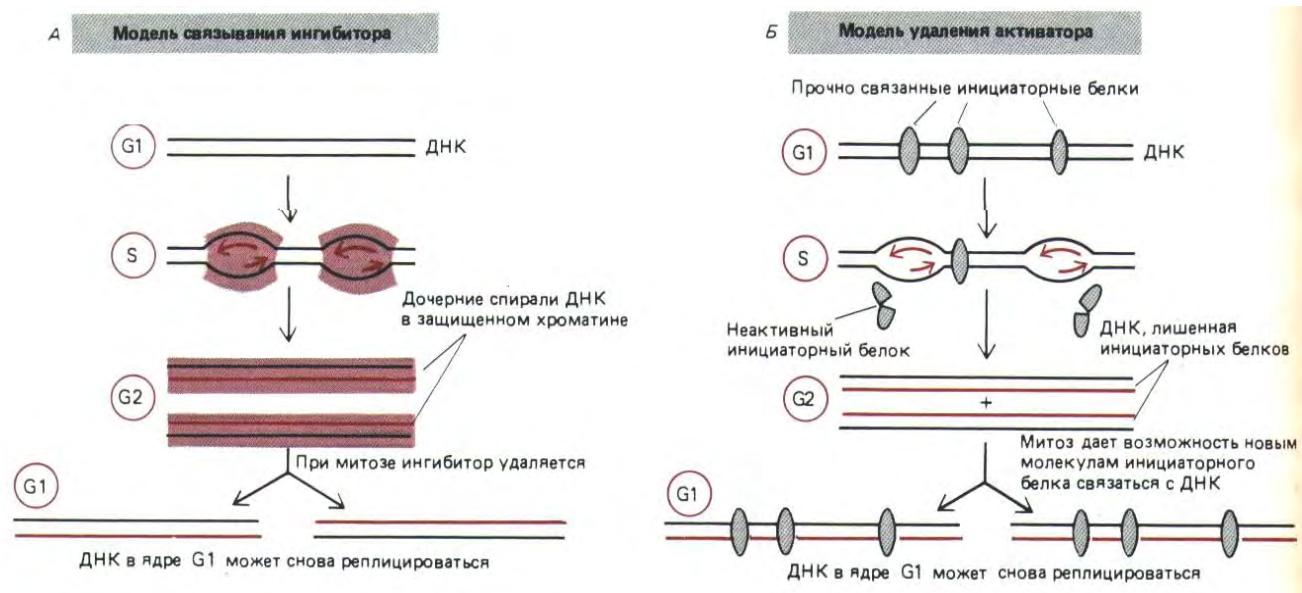


Рис. 9-63. Два возможных механизма блокировки повторной репликации ДНК, которая препятствует удвоению в данном клеточном цикле уже реплицированной ДНК. Отсутствие такой блокировки в некоторых типах клеток (например, в клетках слюнных желез дрозофилы) приводит к образованию гигантских политенных хромосом *А.* Модель, согласно которой с вновь синтезировавшимся хроматином соединяется ингибитор. *Б.* Модель, предполагающая существование инициаторных белков, действующих однократно и связывающихся с ДНК лишь во время митоза.

вилке решить «бухгалтерскую» задачу: модифицируя хроматин вновь синтезированной ДНК, он предотвращал бы повторную репликацию уже реплицировавшейся ДНК в одной и той же S-фазе (рис. 9-63, *А).* В качестве альтернативы можно также предположить существование иного механизма, основанного на том, что с ДНК тесно связаны инициаторные белки, которые после прохождения репликационной вилки инактивируются (рис. 9-63, *Б).* Чем бы ни объяснялась *блокировка повторной репликации ДНК,* она должна исчезнуть к началу митоза или во время его, так как после деления клетки ДНК, попадающая в дочернюю клетку, ядро которой находится на стадии G1, уже не защищена. Оказалось, что механизм блокировки повторной репликации действует и на фрагменты бактериальной ДНК, инъецированные в оплодотворенную яйцеклетку лягушки. Следовательно, механизм, ответственный за блокировку, не требует присутствия высокоспецифической точки начала репликации. Блокировка не действует на вирус SV40, вероятно, потому, что его Т-антиген обладает как инициаторной, так и геликазной активностью и замещает собой аналогичные компоненты хозяйских клеток, функция которых еще не ясна (см. разд. 9.3.3.)

Заключение

Использование различных модельных систем при изучении репликации ДНК показало, что у эукариот, как и у прокариот, этот процесс начинается с посадки геликазы на ДНК с помощью инициаторного белка, связывающегося с точкой начала репликации. По мере удаления двух репликационных вилок друг от друга образуется репликационный глазок. У *высших эукариот в течение S-фазы соседние точки начала репликации, по-видимому, активируются группами (их называют репликационными единицами). Так как репликационная вилка движется со скоростью около 50 нуклеотидов в секунду, для завершения репликации ДНК в пределах одной единицы требуется приблизительно час. В ходе S-фазы, длящейся 8 ч, по очереди активируются различные кластеры сайтов начала репликации. Порядок активации определяется отчасти структурой их хроматина, наиболее конденсированные области хромосом реплицируются последними. Взаимосвязь между единицами репликации и сегментами на митотических хромосомах эукариот позволяет предположить, что единицы репликации могут соответствовать структурно различающимся доменам интерфазного хроматина.*

После прохождения репликационной вилки структура хроматина переформируется путем добавления новых гистонов и других хромосомных белков к старым гистонам, унаследованным дочерней молекулой ДНК. Для предотвращения второго цикла репликации, следующего непосредственно за первым (т.е. до того, как хромосома вступит в митоз), в клетке предусмотрена блокировка. Она необходима для того, чтобы в каждой S-фазе любая область ДНК реплицировалась только один раз.

9.4. Синтез и процессинг РНК [41]

До сих пор мы говорили о хромосоме, как об очень крупном комплексе ДНК и белка, который перед делением клетки реплицируется. Однако главное предназначение хромосомы - служить матрицей для синтеза молекул РНК, поскольку только в таком виде генетическая информация, заключенная в хромосомах, непосредственно используется клеткой. РНК синтезируется весьма интенсивно: общая скорость включения нуклеотидов в РНК во время интерфазы примерно в 20 раз превышает скорость включения нуклеотидов в ДНК в S-фазе.

Синтез РНК **(транскрипция ДНК)** обладает высокой специфичностью. Например, в большинстве клеток млекопитающих функциональные последовательности РНК копируются приблизительно с 1% последовательностей ДНК (зрелая матричная РНК или структурная РНК). Отбор происходит на двух уровнях, которые будут по очереди обсуждаться в этом разделе: 1) для образования ядерных РНК транскрибируется лишь часть последовательности ДНК и 2) только меньшая часть нуклеотидных последовательностей ядерной РНК остается после процес -синга, который предшествует экспорту молекул РНК в цитоплазму. Начнем с описания РНК-полимеразы - фермента, катализирующего всю транскрипцию ДНК.

9.4.1. РНК-полимераза, начиная каждую новую цепь РНК, меняет субъединицы [42]

Общее описание транскрипции ДНК дано в гл. 5. Транскрипция начинается, когда молекула РНК-полимеразы связывается с последовательностью промотора в ДНК. В ходе инициации две цепи ДНК локально расходятся, образуя *открытый комплекс,* в котором матричная цепь оказывается экспонированной. После образования этого комплекса по-лимераза начинает движение вдоль ДНК, удлиняя растущую цепь РНК в направлении от 5' к 3' путем последовательного добавления рибонуклеозидтрифосфатов. Так происходит до тех пор, пока не будет достигнут сигнал остановки (терминации), где вновь синтезированная цепь РНК и полимераза отсоединяются от ДНК, Таким образом, каждая молекула РНК - это одноцепочечная копия нуклеотидной последовательности ДНК, представляющей относительно короткий участок генома (см. рис. 5-1).

РНК-полимеразы обычно состоят из нескольких полипептидных цепей и имеют мол. массу 500000 дальтон и более. У бактерий и эукариот эти ферменты эволюционно близки (рис. 9-64). В связи с тем, что бактериальный фермент изучать гораздо легче, его свойства послужили основой для понимания того, как функционирует аналогичный фермент эукариот. РНК-полимераза *E.coli* содержит пять субъединиц: α, β, ,β`, σ и ω, (по две копии α и по одной каждой из субъединиц). По нуклеотидной последовательности гена реконструирована полная аминокислотная последовательность каждой субъединицы, а данные футпринтинга ДНК свидетельствуют о том, что при соединении с ДНК фермент закрывает 60 нуклеотидных пар.

Сигма (σ)-субъединица РНК-полимеразы *E.coli* имеет специфическую функцию и служит **фактором инициации** транскрипции. Эта субъединица дает возможность ферменту найти консенсусные последовательности промотора. РНК-полимеразы, узнающие разные промоторы, содержат различные формы *σ* -субъединицы. Связавшись с промотором, фермент, для того чтобы начать синтез РНК, вступает в ряд реакций (рис. 9-65). После того, как синтезировано примерно восемь нуклеотидов молекулы РНК *(стадия 4,* рис. 9-65), *σ* -субъединица диссоциирует, а вместо нее с молекулой фермента соединяется несколько *факторов элонгации,* необходимых для удлинения и терминации цепи. К факторам элонгации



Рис. 9-64. Сходство аминокислотной последовательности бактериальных и эукариотических РНК-по-лимераз дает основание предположить, что эти ферменты имеют общее эволюционное происхождение. Полагают, что с ДНК связываются самые большие субъединицы РНК-полимераз из клеток *E. coli,* дрожжей и дрозофилы (они сравниваются на рисунке). Закрашенные участки последовательности гомологичны более, чем на 70% у дрожжей и дрозофилы и более, чем на 40% -у дрозофилы и *E. coli.* Показано, что на карбоксильном конце эукариотических субъединиц имеется уникальная последовательность Ser-Pro-Ser Tyr-Scr-Pro-Thr, функция которой неизвестна: у дрожжей она повторяется 26 раз, а у лрозофилы-более 40 раз (обозначено кружками), (По A. Z. Green-leaf et al., In: RNA Polymerase and the Regulation of Transcription [W.S. Reznikoff et al., eds.] pp. 459-464. New York: Elsevier, 1987.)

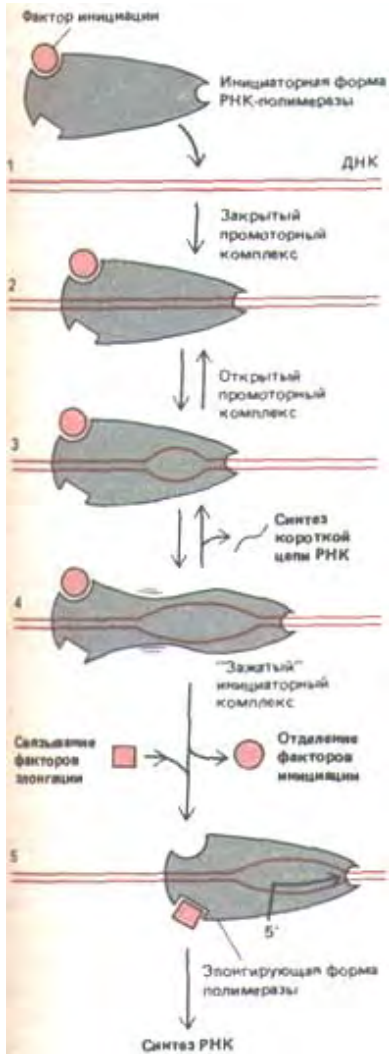


Рис. 9-65. Условная схема инициации синтеза РНК, катализируемого РНК-полимеразой. Указанные стадии выявлены при изучении фермента у *E. coli.* Показана молекула ДНК, несущая последовательность промотора для полимеразы *E. coli* (см. рис. 5-6). Вначале фермент образует *закрытый комплекс, в* котором две цепи ДНК остаются спаренными по всей длине. На следующей стадии фермент катализирует открытие немногим более одного витка спирали ДНК, при этом образуется *открытый комплекс,* в котором матрица доступна для инициации синтеза цепи РНК. Полимераза, содержащая связанную с ней ситма-субъединицу, однако, ведет себя так, как будто она прикреплена к области промотора: она не способна осуществлять элонгацию цепи РНК и часто опять превращается в закрытый комплекс. Как показано на рисунке, для превращения фермента в полимеразу, активно осуществляющую элонгацию, необходимо, чтобы от него отделились факторы инициации {в случае *E. coli*-сигма-фактора) и присоединились другие белки, выполняющие роль факторов элонгации (например, белок nusA у *E. coli).* (С изменениями по D.C. Staney and D. M. Crothers, J. Moï. Biol. 193: 267-278, 1987.)

относится несколько белков, свойства которых хорошо изучены, хотя еще не совсем ясно, как они действуют.

У всех организмов различные гены транскрибируются с разной скоростью. На некоторых промоторах новая цепь РНК инициируется каждые 1-2 секунды, тогда как на других для начала синтеза РНК требуется час. Обычно уровень транскрипции каждого гена определяется *белками-регуляторами генетической активности,* влияющими на инициацию транскрипции (гл. 10). В целом, действие этих белков основано на ускорении или замедлении одной или более стадий, указанных на рис. 9-65.

9-25

9.4.2. Синтез РНК у эукариот осуществляют три различные РНК-полимеразы [43]

Хотя транскрипция у эукариот и такого прокариота, как *E.coli,* в чем-то схожа, в эукариотических клетках этот механизм гораздо сложнее. И у дрожжей, и у человека имеется три типа РНК-полимераз, каждый из которых ответствен за транскрипцию разных генов. Структура этих ферментов, обозначенных как РНК-полимеразы I, II и III, близка, некоторые их субъединицы одинаковы, а некоторые отличаются (рис. 9-66). Каждый из них сложнее РНК-полимеразы *E.coli* и, как полагают, содержит 10 или более полипептидных цепей. Наиболее важное различие между бактериальными и эукариотическими РНК-полимеразами состоит в следующем. У бактерий этот фермент связывается непосредственно с промотором, а у эукариот РНК-полимеразы присоединяются к промоторам только в присутствии дополнительных белковых факторов. Отчасти по этой причине лишь в 1979 г. удалось разработать системы, позволяющие изучать механизм инициации транскрипции у эукариот in vitro. Изначально три эукариотические РНК-полимеразы были идентифицированы на основании различия в их чувствительности к а-аманитину, высокотоксичному веществу, выделенному из бледной поганки. Как оказалось, а-аманитин не действует на РНК-полимеразу I, РНК-полимераза II к нему очень чувствительна, а у РНК-полимеразы III этот признак выражен умеренно. Чувствительность синтеза РНК к а-аманитину до сих пор используется для определения того, какой именно полимеразой транскрибируется ген. Так было установлено, что только **РНК-полимераза II** транскрибирует гены, РНК которых затем транслируется в белки. Две другие полимеразы синтезируют лишь те РНК, которые имеют структурные или каталитические функции: **РНК-по-**

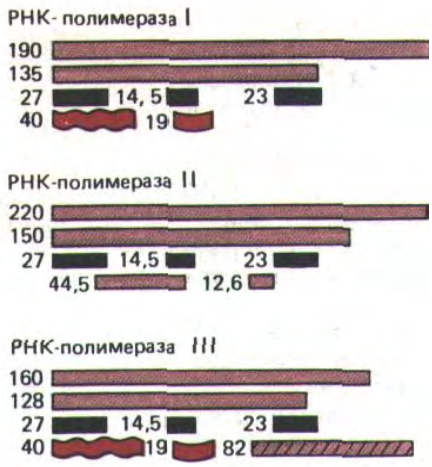


Рис. 9-66. Некоторые белковые субъединицы, входящие в состав трех эукариотических РНК-полиме-раз дрожжей. Показаны лишь наиболее хорошо изученные субъединицы. Родственные субъединицы окрашены одинаково, их молекулярная масса приведена в килодаль-тонах. Все три фермента имеют три субъединицы с одинаковой массой (выделены *черным).*

лимераза 1 синтезирует большие рибосомные РНК, РНК-полимераза III - разнообразные короткие стабильные РНК, включая малую рибосомную 5S-РНК и транспортные РНК. Однако большая часть малых РНК, образующих мяРНК, синтезируются полимеразой II.

В клетках млекопитающих обычно содержится около 40 000 молекул РНК-полимеразы II, примерно такое же число РНК-полимеразы I и приблизительно 20000 молекул РНК-полимеразы III. Изучение культивируемых клеток показало, что концентрация РНК-полимераз регулируется no-отдельности, в зависимости от скорости роста клетки.

9-26
9-27

9.4.3. Факторы транскрипции образуют стабильные комплексы на эукариотических промоторах [44]

Как отмечалось выше, РНК-полимеразы эукариот не узнают свои промоторы на очищенных молекулах ДНК. Чтобы это произошло, с ДНК должны связаться один или более сайт-специфических белков. Такие белки называют факторами транскрипции (TF). Они отличаются от сигма-факторов прокариот (а-факторы) тем, что могут связываться с ДНК независимо от РНК-полимеразы. Полимеразы I, II и III требуют присутствия разных факторов транскрипции, обозначенных TFI, TFII и TFIII соответственно. Латинская буква, которая обычно следует за римской цифрой в названии фактора транскрипции, указывает, каким по счету был выделен данный фактор. Например, TFIIIA - это первый охарактеризованный фактор транскрипции, который действует на ген, транскрибируемый полимеразой III (ген 5S-рРНК).

По-видимому, in vitro факторы транскрипции образуют довольно стабильные транскрипционные комплексы, которые избирательно притягивают молекулы РНК-полимеразы к своим промоторам. Различные факторы присоединяются к ДНК в разных местах относительно положения сайта начала транскрипции. Полимераза I и полимераза II образуют комплекс с тем фактором транскрипции, который связывается непосредственно перед сайтом начала транскрипции. Между тем основной фактор транскрипции для генов, считываемых полимеразой III, присоединяется к ДНК сразу за сайтом начала транскрипции, и таким образом, РНК-полимеразе III приходится осуществлять свою функцию, не смещая этот белок с ДНК (рис. 9-67). Полагают, что данный фактор (TFIIIC) накручивает ДНК на себя, образуя большую нуклеопротеино-вую частицу.

О транскрипционной активности ДНК судят по её взаимодействию с РНК-полимеразой. При этом сравнивают молекулы ДНК, которые были предварительно проинкубированы с факторами транскрипции, и молекулы, не прошедшие такой обработки. Оказалось, что РНК-полимераза охотно использует для синтеза РНК молекулы ДНК, связан-

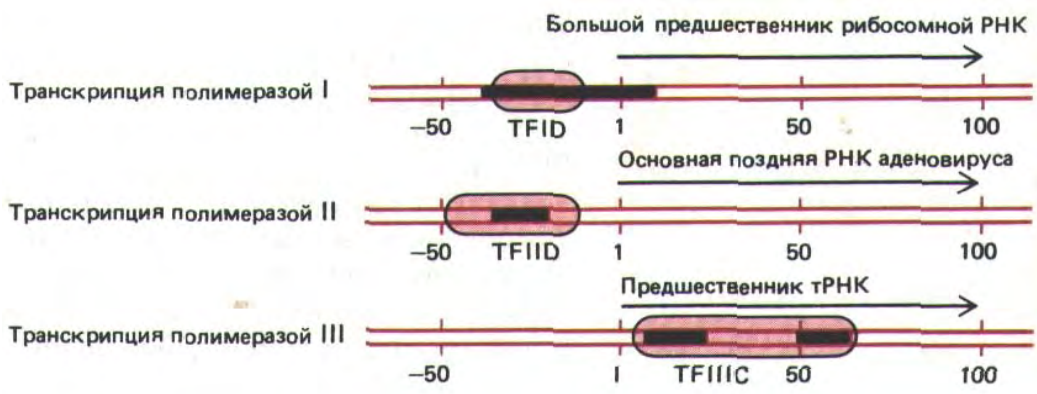


Рис. 9-67. Некоторые стабильные комплексы, образуемые факторами транскрипции с эукариотическими генами. *Черным цветом* обозначены определенные последовательности ДНК, которые, как полагают, необходимы для функционирования промоторов. У каждого гена цветом выделены области, которые „закрываются" присоединившимися факторами (на основании данных футпринтинга ДНК, см. рис. 4-69). Факторы транскрипции представляют собой молекулу белка, которая, вероятно, состоит из нескольких субъединиц, хотя доподлинно строение этих факторов неизвестно. Цифрами обозначено положение на молекуле ДНК (в нуклеотидных парах) относительно сайта начала транскрипции, принятого за +1.

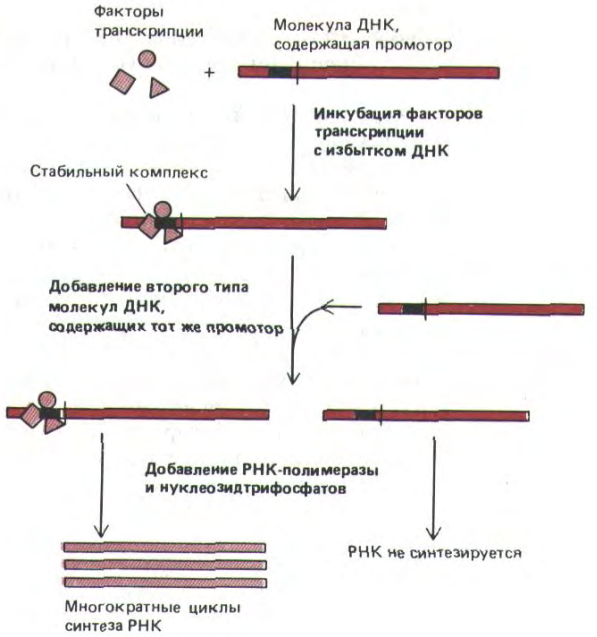


Рис. 9-68. Опыты in vitro, демонстрирующие важность образования стабильного транскрипционного комплекса на эукариотическом промоторе. Эксперименты проводили с факторами транскрипции и с промоторами, специфичными к каждой из трех эукариотических РНК-полимераз. Примеры клонированных генов, используемых в этих опытах, представлены на рис. 9-67.

ные с определенными факторами, тогда как во втором случае, хотя сами по себе молекулы ДНК идентичны первым, связывания РНК-полимеразы не происходит (рис. 9-68). Аналогичная ситуация характерна для молекул ДНК, инъецированных в ооцит *Xenopm,* следовательно, такой же механизм действует и in vivo.

Важным фактором транскрипции для многих промоторов РНК-полимеразы II служит TFI1D. Он представляет собой большой белковый комплекс, который обычно называют **ТАТА-фактор,** так как он может связываться с консервативной АТ-богатой последовательностью, называемой **ТАТА-бокс,** которая расположена примерно за 25 нуклеотидов до сайта начала транскрипции. Механизм действия ТАТА-фактора, стимулирующего транскрипцию полимеразой II, представлен на рис. 9-69.

В связи с тем, что именно РНК-полимераза II отвечает за образование всех предшественников мРНК, и таким образом определяет, какие конкретно белки будут образовываться в клетке, в дальнейшем мы будем обсуждать синтез и судьбу транскриптов РНК, синтезируемых только этим ферментом

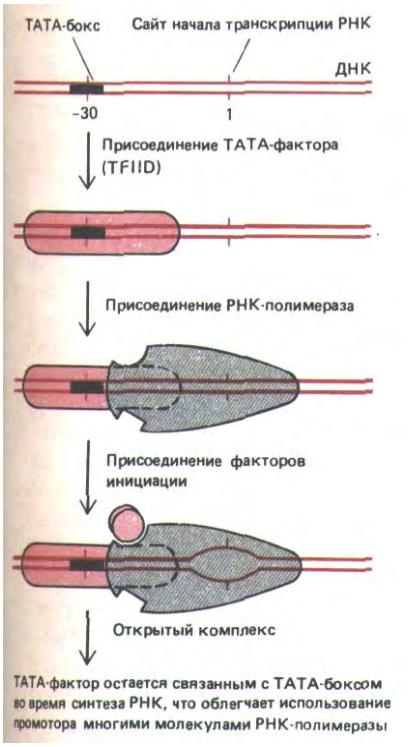


Рис. 9-69. Минимальные условия для узнавания промотора молекулой эукариотической РНК-полимеразы II. Чтобы промотор был узнан полимеразой, необходимо, чтобы фактор связывания с ТАТА-боксом (TFIID) образовал стабильный транскрипционный комплекс. Консенсусная последовательность ТАТА-бокса следующая: $T_{82}A_{9}7T_{93}A_{85}$ (А или Т)$_{83}$; числа указывают на вероятность (в процентах) присутствия указанного нуклеотида. См. также рис. 10-27. (По J.2. Workman and R.G. Roeder, Cell 51: 613-622, 1987.)



Рис. 9-70. Электронная микрофотография типичного препарата клеточного ядра. Видна невероятно сложная сеть из переплетенных нитей хроматина, высвободившегося из подвергнутого лизису ядра. Лишь на самом краю этой сети хроматин имеет достаточно низкую плотность, чтобы его можно было исследовать при большом увеличении. (С любезного разрешения Victoria Foe.)

9-28

9.4.4. РНК-полимераза II транскрибирует некоторые последовательности ДНК гораздо чаще других [45]

Эксперименты, проводимые с очищенными препаратами подимераз и факторами транскрипции in vitro, безусловно важны для изучения условий протекания транскрипционных процессов, однако многие сведения о транскрипции ДНК могут быть получены только с помощью электронной микроскопии, которая позволяет наблюдать активные гены вместе с транскрибирующей их РНК-полимеразой.

Обычная электронная микроскопия тонких срезов выявляет лишь гранулированные глыбки хроматина, указывая на наличие развитой внутриядерной структуры (рис. 9-100), но дает очень мало информации о том, как именно транскрибируются гены. Гораздо более информативны в этом отношении снимки изолированного ядерного содержимого, непосредственно наносимого на электронномикроскопическую сеточку после разрушения ядер (рис. 9-70 и 9-71). На достаточном удалении от центра разрушенного ядра концентрация хроматина относительно низка, что позволяет рассмотреть индивидуальные хроматиновые фибриллы, имеющие характерный вид «бус на нитке».

Транскрипционно активные молекулы РНК-полимеразы выглядят как большие глобулярные частицы, за каждой из которых тянется длинная молекула новосантезированной РНК. При этом молекулы РНК-полимеразы II, как правило, представлены одиночными частицами. Это свидетельствует о том, что большинство генов транскрибируется в предшественники мРНК относительно редко, так что одна РНК-полимераза успевает завершить транскрипцию до того момента, когда ее начнет следующая. Впрочем, в некоторых случаях можно увидеть множество РНК-полимеразных частиц (и РНК-транскриптов), собранных в одном месте. Подобные кластеры типичны лишь для относительно небольшого числа генов, транскрибирующихся с высокой частотой (рис. 9-72). Длина молекул РНК, прикрепленных к такому кластеру, увеличивается в направлении движения молекул полимеразы, что придает всей структуре характерный вид. Каждый такой участок несет специфические сигналы начала и окончания транскрипции для РНК-полимеразы II и представляет собой **транскрипционную единицу** (рис. 9-73).

Биохимические исследования подтвердили результаты, полученные с помощью электронной микроскопии и позволили сформулировать три основных вывода.

1. Эукариотические РНК-полимеразы, как и прокариотические ферменты, начинают и оканчивают транскрипцию лишь в определенных точках хромосомы.

2. Средняя длина новообразованной молекулы РНК, синтезированной РНК-полимеразой на транскрипционной единице, составляет около 8000 нуклеотидов, однако» не редкость и молекулы РНК, насчитывающие от 10 до 20000 нуклеотидов. Это намного больше, чем 1200 нуклеотидов, т. е, больше той величины, которая достаточна для синтеза средней белковой молекулы, содержащей 400 аминокислотных остатков; такая большая длина молекул РНК отражает особенности строения эукариотических генов, которые мы подробно обсудим в дальнейшем.

3. Хотя большая скорость удлинения цепи (около 30 нуклеотидов в секунду) характерна для всех РНК, различные точки начала транскрипции для РНК-полимеразы II обладают очень разной эффективностью, и, таким образом, одни гены транскрибируются гораздо быстрее других. Данные электронномикроскопического исследования хорошо согласуются с результатами биохимического анализа, которые свидетельствуют



Рис. 9-71. Метод электронномикроскопического исследования хроматина, основанный на мягком лизисе и последующей очистке лизированного ядра от клеточных обломков.

о том, что хотя в клетке накапливается множество молекул мРНК различных типов, большая их часть представлена относительно малым числом копий (табл. 9-2).

9.4.5. Предшественники информационной РНК ковалентне модифицированы *с* обоих концов [46]

Транскрипты, синтезированные в ядре РНК-полимеразой II, называют **гетерогенной ядерной РНК (гяРНК),** поскольку важнейшим признаком, отличающим эти молекулы от других ядерных РНК, служит гетерогенность их размеров. Многие гетерогенные ядерные транскрипты впоследствии покинут ядро, превратившись в молекулы **информационной** или матричной РНК **(мРНК).** Однако прежде чем выйти из ядра, молекулы мРНК претерпевают серию ковалентных модификаций, наделяющих эти молекулы свойствами, которые отличают их от транскриптов, синтезированных всеми другими РНК-полимеразами. Эти модификации окажутся им необходимыми позже, при функционировании в качестве мРНК в цитоплазме.

5'-конец молекулы РНК (конец, синтезируемый при транскрипции первым) прежде всего *кэпируется,* т. е. достраивается *с* образованием особой структуры, ответственной за последующее связывание молекулы мРНК с рибосомой. Кэпирование (добавление метилированного G-нуклеотида) происходит почти сразу после синтеза первых 30 нуклеотидов РНК и осуществляется путем соединения трифосфатной группы молекулы GTP с дифосфатом на 5'-конце первичного транскрипта (рис. 9-74). Помимо важной роли, которую играет 5'-кэп в инициации белкового синтеза, его функция состоит в том, чтобы защищать транскрипт РНК от деградации.

3'-конец большинства транскриптов, синтезируемых РНК-полимеразой II, образуется не в результате терминации транскрипции (соответствующий сайт расположен дальше), а в результате вторичной модификации, при которой растущий транскрипт расщепляется в определенном месте и к 3'-концу в точке разреза специальная полимераза добавляет **polyA-последовательыюсть.** Сигналом к разрезанию служит появление на цепи РНК участка AAUAAA (за 10-30 нуклеотидов до сайта расщепления) и еще одной, хуже изученной последовательности. Сделав разрез, фермент роїуА-полимераза присоединяет от 100 до 200 остатков адени-ловой кислоты (так называемый ро!уА-„хвост") к 3'-концу цепи РНК, чем завершает образование **первичного транскрипта РНК,** А тем временем РНК-полимераза продолжает транскрипцию и делает это до тех пор, пока не встретит на своем пути сайт терминации. Но дополнительные фрагменты транскрипта РНК лишены кэпа и, вероятно, поэтому быстро распадаются (рис. 9-75).

Функция polyA-„хвоста" до сих пор не очень ясна. Согласно одной из гипотез, эта последовательность участвует в транспорте зрелой мРНК из ядра. Имеются также данные, свидетельствующие о том, что polyA-конец замедляет деградацию в цитоплазме некоторых молекул мРНК, что способствует их стабилизации.

Хотя транскрипты, синтезированные РНК-полимеразой II, составляют более половины РНК, образующейся в клетке, мы уже убедились в том, что большая часть РНК этих транскриптов нестабильна и, следовательно, существует в клетке недолго. В итоге, гяРНК, содержащаяся в ядре, и образовавшаяся из нее цитоплазматическая мРНК составляют лишь малую часть всей РНК клетки (табл. 9-3). Несмотря на то, что молекулы гяРНК относительно редки, выделить их довольно легко благодаря присутствию на 3'-конце длинной polyA-последователь-ности. Если пропустить всю РНК клетки через колонку, заполненную

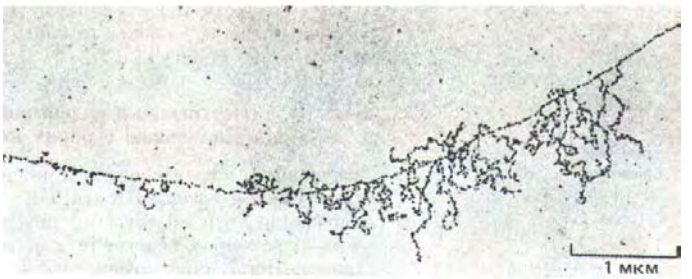


Рис. 9-72. Необычная область хроматина, в которой один из генов транскрибируется с высокой частотой; хорошо видно большое число молекул РНК-полимеразы II вместе с растущими цепями РНК-транскриптов. Транскрипция направлена слева направо (см. рис. 9-73). По V. E. Foe, Z. E. Wilkinson and CD. Zaird, Cell 9: 131-146. © 1976 Cell Press.)



Рис. 9-73. Схематическое изображение идеальной транскрипционной единицы, показывающее, как на основе электронномикроскопических данных можно определить направление синтеза цепи РНК и идентифицировать сайты начала и конца этой единицы.

polyT-связанным матриксом, молекулы с polyA-„хвостом" будут избирательно задерживаться на такой колонке вследствие комплементарного спаривания Т и А. Этот метод широко используется для отделения гяРНК и мРНК от молекул рибосомной и транспортной РНК, составляющих основную массу РНК клетки.

9-30

9.4.6. Для кэпирования и добавления polyA требуется РНК-полимераза II [47]

5'-Кэпы и 3'-po1yA-последовательности имеются только в тех молекулах, которые транскрибированы РНК-полимеразой II. Методы генетической инженерии сегодня позволяют отделить ген, транскрибируемый в норме РНК-полимеразой II, от своего промотора и поставить под промотор, узнаваемый РНК-полимеразами I или III. Оказалось, что если такой модифицированный ген вновь ввести в клетку, то он будет транскрибироваться одной из этих полимераз, но при этом вновь синтезированные молекулы РНК не будут ни кэпированы, ни полиаденилированы. Следовательно, и кэпирование, и полиаденилирование осуществляются с участием ферментов, которые избирательно связываются с РНК-полимеразой II и активны лишь в комплексе с ней. Такие ферменты можно рассматривать как факторы элонгации РНК-полимеразы II. Вероятно, именно необходимость кэпировать и полиаденилировать предшествен-

Таблица 9-2. Популяция молекул мРНК в типичной клетке млекопитающих

Класс	**Общее число копий каждой индивидуальной последовательности мРНК на клетку**		**Число индивидуальных последовательностей мРНК в каждом классе**		**Общее число молекул мРНК в каждом классе**
Богатый	12000	×	4	=	48 000
Средний	300	×	500	=	150000
Бедный	15	×	1 1 000	=	165000

Подобное деление клеточной мРНК на три дискретных класса в известной степени искусственное: в ряде случаев наблюдается более плавное распределение различных молекул мРНК в соответствии с их содержанием в клетке. В сумме в каждой нормальной клетке насчитывается от 10000 до 20000 разных видов мРНК, большинство из которых представлено малым числом копий (от 5 до 15 молекул на одну клетку). Обычно общая цитоплазм этическая РНК представлена в основном рРНК, а на долю мРНК остается всего лишь от 3 до 5%, так что на одну молекулу мРНК приходится примерно 10 рибосом. Клетка данного типа содержит в сумме около 360 000 молекул цитоплазматической мРНК.

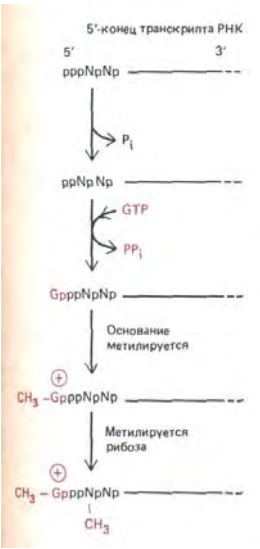


Рис. 9-74. Кэпирование 5'-концов молекул РНК, синтезированных РНК-полимеразой II. Присоединенный кэп содержит новую связь 5' →• 5' между положительно заряженным остатком 7-метил-G- и исходным 5'-коицом транскрипта РНК (см. рис. 5-24). Полагают, что по крайней мере некоторые ферменты, участвующие в этом процессе, связаны с полимеразой II, так как транскрипты, образуемые полимеразами I и II не кэпируются. Буквой N обозначается любой из четырех рибонуклеотидов, хотя цепь РНК обычно начинается с пурина (А или G). (По A, J. Shatkin, Bioessays 7: 275-277, 1987.)

ники мРНК можно объяснить, почему у эукариот эти молекулы синтезируются специальной РНК-полимеразой.

О том, что для реакции разрезания и полиаденилирования, по-видимому, необходим фактор элонгации, связанный с РНК-полимеразой, свидетельствовали следующие факты. В нескольких работах было показано, что каждая транскрибирующая молекула РНК-полимеразы II способна образовать только один полиаденилированный 3'-конец, т. е. все сигналы AAUAAA, встречаемые полимеразой после первого такого сайта, игнорируются. Это дает основание для гипотезы, что полимераза содержит фактор, который после завершения реакций разрезания и полиаденилирования, теряется (рис. 9-75).

9.4.7. Большая часть РНК, синтезированной РНК-полимеразой II, в ядре быстро распадается [48]

Первые данные о нестабильности в ядре транскриптов, синтезированных РНК-полимеразой II, были получены в опытах на культуре клеток. В среду для культивирования на короткое время вводили [^{3}H]-уридин. При этом радиоактивная метка включается в молекулы гяРНК, за

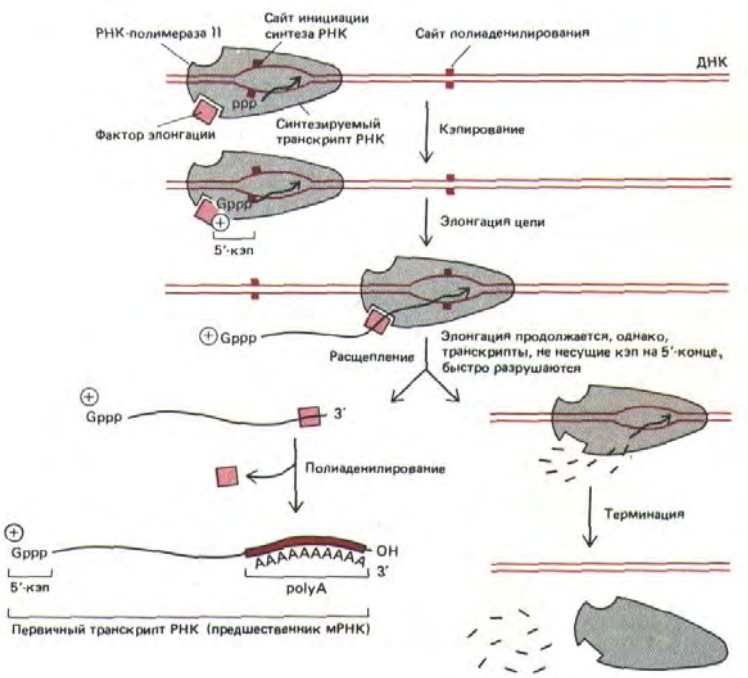


Рис. 9-75. Синтез молекулы гяРНК (предшественника мРНК) с помощью РНК-полимеразы II. Полимераза на рисунке только начала синтез цепи РНК (стадия 5, рис. 9-65). Узнавание дополнительного сигнала полиаденилирования на растущем транскрипте РНК приводит к разрыву и полиаденили-рованию цепи. У дрожжей полимераза сразу же после этого заканчивает синтез РНК, однако у высших эукариот транскрипция часто продолжается. Представляется вероятным, что свойства полимеразы меняются, как только происходит расщепление одной цепи РНК; таким образом, полимераза не может участвовать в полиаденили-ровании транскриптов, считываемых после этого. Весьма возможно, что в таком виде полимераза лучше распознает последовательности, определяющие терминацию и высвобождение полимеразы. Самое простое объяснение, представленное на этом рисунке, заключается в том, что после разрезания транскрипта от полимеразы отделяется фактор (или факторы) элонгации.

Таблица 9-3. Содержание различных видов РНК в типичной клетке млекопитающих.

	Относительное содержание клеточной РНК)	«Удельный вес» биосинтеза каждого вида РНК (в % от всей каждого вида РНК, %
Ядерные предшественники рРНК	4	39
↓		
Цитоплазматические рРНК	71	-
Гетерогенная ядерная РНК	7	58
↓		
Цитоплазматическая мРНК	3	-
Низкомолекулярные стабильные РНК (главным образом тРНК)	15	3

Приведенные данные получены на основе анализа культивируемых фибробластов мыши (L-клетки). Каждая такая клетка содержит 26 пг РНК (5 x 10^{10} рибонуклеотидов), причем 14% этого количества находится в ядре. (Таким образом, ядро клетки содержит вдвое больше ДНК, чем РНК.) Это приблизительно в 20 раз превышает среднюю скорость синтеза ДНК в S-фазе. Следует подчеркнуть, что хотя гяРНК составляет большую часть всей синтезируемой в клетке РНК, лишь очень небольшое ее количество избегает деградации в ходе ядерного процессинга РНК. Поэтому образующаяся из гяРНК мРНК представляет собой минорную фракцию клеточной РНК {по Brandhorst B. P., McConkey E. H. J. Mol. Biol. 85; 451-563, 1974)

судьбой которых затем можно следить в течение более длительного времени. Эти эксперименты позволили сформулировать два важных вывода.

1. Длина вновь синтезированных молекул гяРНК быстро уменьшается, достигая размеров цитоплазматической РНК примерно за 30 минут. Первичные транскрипты РНК содержат в среднем около 6000 нуклеотидов, тогда как длина молекул мРНК составляет приблизительно 1500 нуклеотидов.

2. Примерно через 30 минут радиоактивно меченные молекулы РНК начинают покидать ядро в виде молекул мРНК. Однако всего лишь около 5% всей меченой гяРНК достигает цитоплазмы клетки. Оставшиеся молекулы примерно в течение часа распадаются в ядре на маленькие фрагменты.

Когда в начале 70-х гг. было обнаружено, что и мРНК, и гяРНК на 3'-конце содержат polyA, естественно было предположить, что мРНК образуется путем значительной деградации гяРНК на 5'-концах, другими словами, что молекулы гяРНК состоят из очень длинной «5'-лидер-ной последовательности», расположенной перед кодирующей частью. Однако от этой гипотезы пришлось отказаться, когда на 5'-конце были обнаружены кэпы, которые, как выяснилось, при превращении молекул гяРНК в мРНК по большей части сохраняются. По-видимому, уже тогда можно было догадаться о том, что удаляется *середина* молекулы РНК, а ее 3'- и 5'-концы остаются интактными. Но в то время такое предположение сочли бы абсурдным. Более того, исследователи терялись в догадках, почему клетка должна избавляться от большей части вновь синтезированной РНК. Эта загадка была разгадана лишь тогда, когда стало возможным сравнивать нуклеотидную последовательность отдельной молекулы мРНК с последовательностью кодирующей ее геномной ДНК.

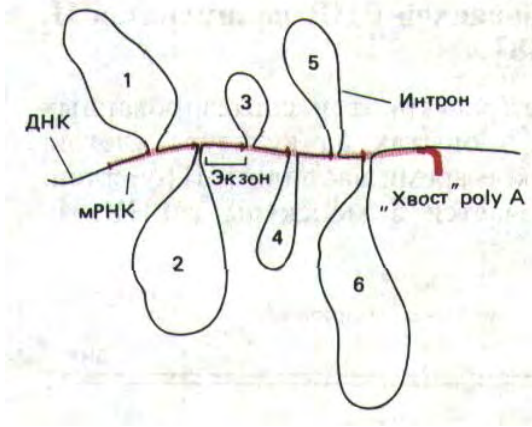


Рис. 9-76. Первые данные, свидетельствующие о существовании интронов *в* генах эукариот, получены при использовании метода «R-петель». Комплекс, содержащий спаренные основания молекул мРНК и ДНК, визуализировали с помощью электронного микроскопа. Молекулы мРНК, содержащиеся в очень больших количествах, такие, как мРНК р-глобина или овальбумина, легко выделить из синтезирующих их специализированных клеток. При гибридизации таких препаратов одноцепочечной мРНК с клонированной двухцепочечной ДНК, которая содержит ген, кодирующий эту мРНК, РНК может заместить ДНК на участке гомологии с образованием спирали РНК-ДНК. Области, в которых спаривания не произошло, хорошо различимы: они выглядят как большие петли. Каждая из этих петель, пронумерованных от 1 до 6, представляет собой интрон, входящий в состав последовательности гена.

9.4.8. В ходе процессинга РНК из середины молекулы удаляются длинные последовательности нуклеотидов [48]

Открытие в 1977 г. прерывистых генов было совершенно неожиданным. Предшествовавшее этому событию многолетнее изучение бактерий привело исследователей к выводу, что гены состоят из непрерывных последовательностей, необходимых для кодирования аминокислотных остатков белка. Не было никаких причин полагать, что гены эукариот могут быть организованы как-то иначе. Первое указание на то, что в отличие от генов бактерий гены эукариот не являются непрерывными, получено при изучении РНК, синтезируемых *аденовирусом* человека (крупный ДНК-содержащий вирус). Оказалось, что в той области вирусной ДНК, на которой синтезируются эти мРНК, присутствуют последовательности, никогда не встречающиеся в зрелой РНК. Предположение о том, что это явление присуще только вирусам, было быстро отвергнуто после того, как аналогичную прерывистость обнаружили в генах овальбумина и β-глобина позвоночных. Как уже упоминалось выше, последовательности, присутствующие в ДНК, но не входящие в состав мРНК, были названы **нитронами,** а последовательности, присутствующие в зрелой мРНК, - **экзонами** (рис. 9-76 и 9-77).

Теперь известно, что первичный транскрипт РНК - это точная копия гена, содержащая как экзоны, так и интроны. Последовательности нитронов вырезаются из середины транскрипта РНК, в результате чего образуется молекула мРНК, непосредственно кодирующая белок (рис. 3-13). Поскольку кодирующие последовательности с обеих сторон интро-на после его удаления соединяются друг с другом, эту реакцию назвали **сплайсингом РНК** (to splice-сращивать). Сплайсинг РНК протекает в клеточном ядре вдали от рибосом и РНК переносится в цитоплазму только после завершения этого процесса.

В настоящее время известно, что гены млекопитающих содержат гораздо больше интронных последовательностей, чем экзонов (см. табл. 9-1). Вот почему очень длинные молекулы гяРНК (более 50000 нуклеотидов) после сплайсинга превращаются *в* более короткие молекулы цито-плазматической мРНК (от 500 до 3000 нуклеотидов).

Перед тем как обсудить закономерности распределения нитронов внутри эукариотических генов, а также их значение для клеток эукариот, необходимо объяснить, как последовательности нитронов узнаются и удаляются при сплайсинге.

9-31

9.4.9. К транскриптам гяРНК сразу же присоединяются белки и мяРНП [49]

У эукариот в отличие от бактерий, вновь синтезированная РНК, по-видимому, сразу же конденсируется с образованием множества рядом

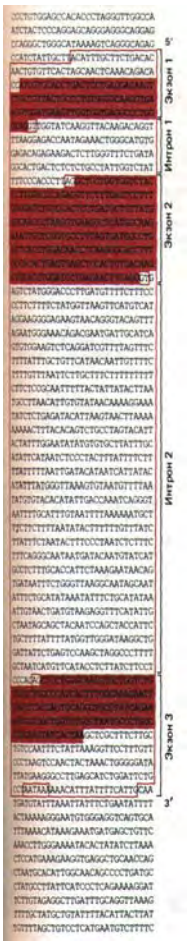


Рис. 9-77. Транскрибируемая часть гена р-глобина человека. Приведена последовательность той цепи ДНК, которая соответствует последовательности мРНК. Первичный транскрипт РНК обведен цветной линией, а нуклеотиды, входящие в состав трех кодирующих областей (экзонов), выделены цветом. Следует отметить, что экзон 1 содержит 5`-*лидерную последовательность,* а экзон *У* включает в себя 3`-*трейлерную* (дополнительную) последовательность. Хотя эти последовательности и входят в состав мРНК, они не кодируют аминокислоты. Высококонсервативные нуклеотиды GT и AG на концах каждого интрона обведены (см. рис. 9-79); обведены также сигналы разрезания и полиаденилирования вблизи 3'-конца гена (AATAAA, см. рис. 9-75).



Рис. 9-78. Аминокислотная последовательность, присутствующая во многих эукариотических РНК-связывающих белках. Эта последовательность обнаруживается у столь различных организмов, как дрожжи, дрозофила и человек. Она входит в состав белков гяРНП-частиц; белков, связывающихся с polyA-«хвостом» гяРНК; белков, образующих мяРНП; присутствует в нуклеолине-белке, который в избытке имеется в ядре. Выявление такой последовательности в белке, функция которого неизвестна, дает основание предполагать, что этот белок связывается с РНК.

расположенных частиц, содержащих белок. В состав этих частиц входит РНК длиной приблизительно 5000 нуклеотидов, нить которой намотана на белковый остов. **Гетерогенное ядерные рибонуклеопротеиновые частицы (гяРНП-частицы)** можно выделить путем обработки ядер рибонуклеазой. Концентрация фермента должна быть подобрана таким образом, чтобы разрушить РНК, связывающую эти частицы. Константа седиментации гяРНП-частиц около 30S, а их диаметр примерно в два раза превышает диаметр нуклеосом (20 нм). Соответственно и белковая сердцевина этих частиц больше и сложнее по составу, в нее входит по крайней мере 8 различных белков массой от 34000 до 120000 дальтон. Все они принадлежат к классу наиболее часто встречающихся белков клеточного ядра. Охарактеризованные к настоящему времени белки этой частицы, как оказалось, содержат одну или более копий короткой последовательности аминокислот, которая часто встречается в составе многих белков, связывающихся с РНК (рис. 9-78).

Применение стандартных методик распластывания, благодаря которым транскрибирующиеся гены можно наблюдать под электронным микроскопом, к сожалению, часто приводит к разрушению частиц гяРНП (см. рис. 9-70). Тем не менее на этих препаратах удается обнаруживать необычного вида частицы. Их расположение достаточно убедительно доказывает участие в сплайсинге РНК. Стабильные частицы очень быстро образуются в местах соединения последовательностей нитронов и экзонов и по мере элонгации транскрипта РНК они сливаются в пары с образованием больших агрегатов. Предполагают, что эти агрегаты представляют собой **сплайсосомы,** катализирующие сплайсинг РНК (рис. 9-79).

Биохимический анализ выявил в клеточном ядре еще один класс частиц, состоящих из белка и маленьких молекул РНК (250 нуклеотидов или меньше), которые произвольно были обозначены U1, U2, ..., U12-РНК. Эти комплексы, названные **малыми ядерными рибонуклеопротеинами (мяРНП),** напоминают рибосомы в том отношении, что каждая из этих частиц содержит набор белков, связанных со стабильной молекулой РНК. По размеру, однако, эти частицы гораздо меньше рибосом (около 250000 дальтон по сравнению с 4,5 млн. дальтон рибосомы),

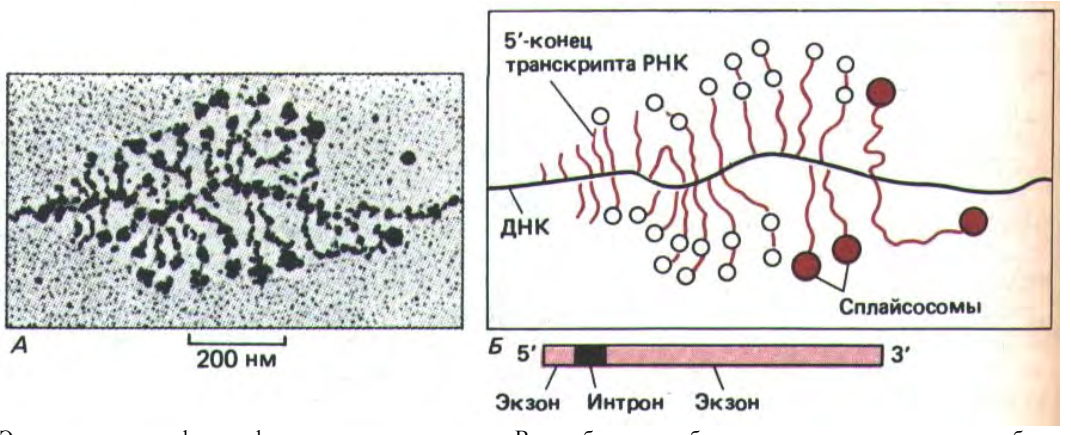


Рис. 9-79. Электронная микрофотография растянутого хроматина. Видны большие рибонуклеопроте-иновые частицы, собирающиеся на 5'- и 3'-сайтах сплайсинга и образующие сплайсосомы. На фотографии *(А)* представлен ген, кодирующий белок хориона дрозофилы; . положение сайтов сплайсинга на его первичных транскриптцх известно. *Б.* Большинство транскриптов РНК вблизи своих 5'-концов содержит одну или две большие РНП-частицы. Если на транскрипте присутствует две частицы (пустые кружки на схеме Б), то они, как правило, имеют диаметр 25 нм и расположены вблизи или в самих 5'- и 3'-сайтах сплайсинга отдельных небольших последовательностей нитронов (длиной 228 нуклеотидов) в области У-концов транскриптов. Более длинные, более зрелые транскрипты двух генов часто несут единственную частицу большего размера (цветные кружки на схеме *Б)* в области интрона. Вероятно, она возникает в результате стабильной ассоциации двух меньших частиц и представляет собой объединенную сплайсосому. Поскольку в ряде случаев сплайсинг происходит тогда, когда 3'-конец РНК еще транскрибируется, можно сделать вывод, что для сплайсинга не нужна polyA-последовательность на 3'-конце молекулы гяРНК. (С изменениями по I. N. Osheim, O. Z. Miller and A.Z. Beyer, Cell 43: 143-151, 1985.)

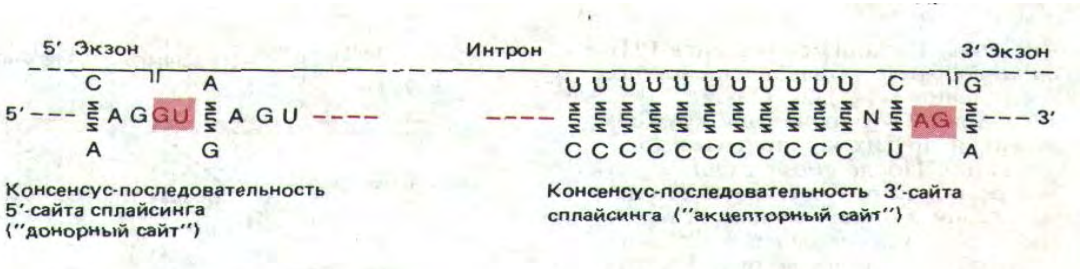


Рис. 9-80. Консенсусные последовательности 5'- и 3'-сайтов сплайсинга РНК. Приведенная последовательность дана для цепи РНК. Обязательные динуклеотиды GU и AG на каждом конце интрона выделены цветом (см. также рис. 9-77).

кроме того, в этих частицах отношение белок/РНК выше, чем у рибосом. Некоторые белки входят в состав различных типов мяРНП, другие присуши только одному типу частиц. Впервые это удалось показать в опытах с сывороткой крови, полученной от больных *системной красной волчанкой.* У таких больных в крови имеются антитела к одному или более белку, входящему в состав мяРНП. Например, оказалось, что одно и то же антитело связывает U1-, U2--, U5- и U4/6-мяРНП. По-видимому, это объясняется тем, что в их состав входит один и тот же белок. Полагают, что отдельные мяРНП на основе комплементарности узнают специфические последовательности нуклеиновой кислоты. Некоторые частицы, вероятно, участвуют в сплайсинге РНК; какие-то мяРНП вовлечены в реакции расщепления, в ходе которых образуется 3'-конец вновь синтезированных РНК; функция других мяРНП неизвестна. Доказательства участия мяРНП в сплайсинге получены в опытах по изучению процессинга РНК in vitro.

9.4.10. Последовательности нитронов удаляются в виде лассо-подобных РНК-структур [50]

Длина **нитронов** варьирует от 80 до 1000 и более нуклеотидов. Интроны принципиально отличаются от экзонов тем, что для них, по-видимому, не так важна строго определенная последовательность нуклеотидов. В ходе эволюции, вероятно, именно в них накапливаются мутации; часто удается изменить большую часть последовательности интрона, не затрагивая активности гена. На основании этих данных было высказано предположение, что последовательности нитронов функционально неактивны и служат главным образом генетическими «связками». Единственными высококонсервативными областями в интронах являются последовательности, необходимые для их удаления. На каждом конце

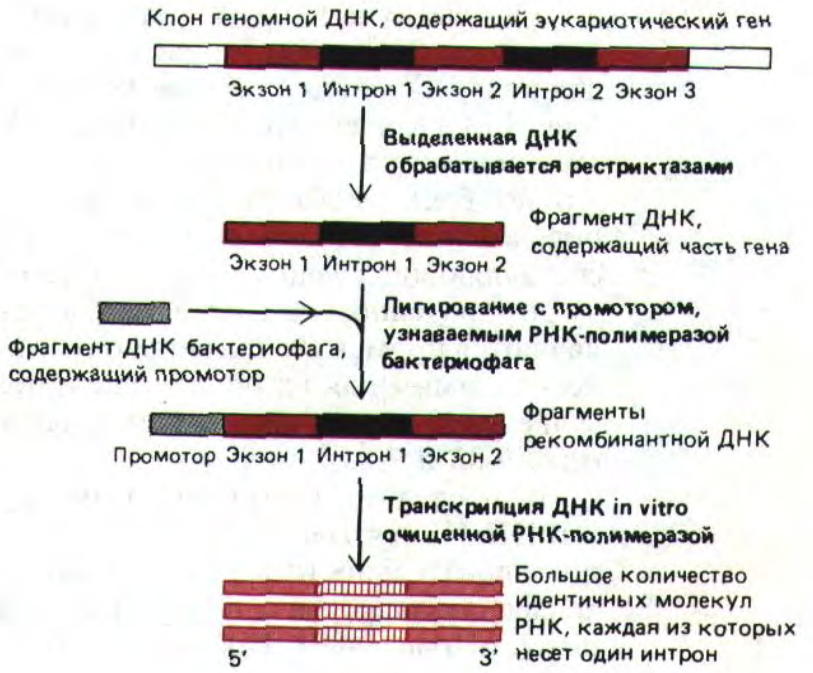


Рис. 9-81. Метод получения РНК, пригодной для анализа сплайсинга РНК in vitro. Прежде всего, необходимо иметь большое количество соответствующей последовательности ДНК (сконструировать ее методом генетической инженерии и клонирования); кроме того, нужны относительно простые РНК-полимеразы из бактериофагов T7 или SP6, с высокой активностью транскрибирующие РНК in vitro. Если соединить фрагмент эукариотической ДНК с промотором бактериофага, то РНК-полимераза может синтезировать in vitro большое количество РНК, кодируемой фрагментами эукариотической ДНК. 5'-кэп, входящий в состав гяРНК и необходимый для инициации транскрипции, можно присоединить к таким РНК, используя искусственно синтезированный кэпированный нуклеотид (не показано).

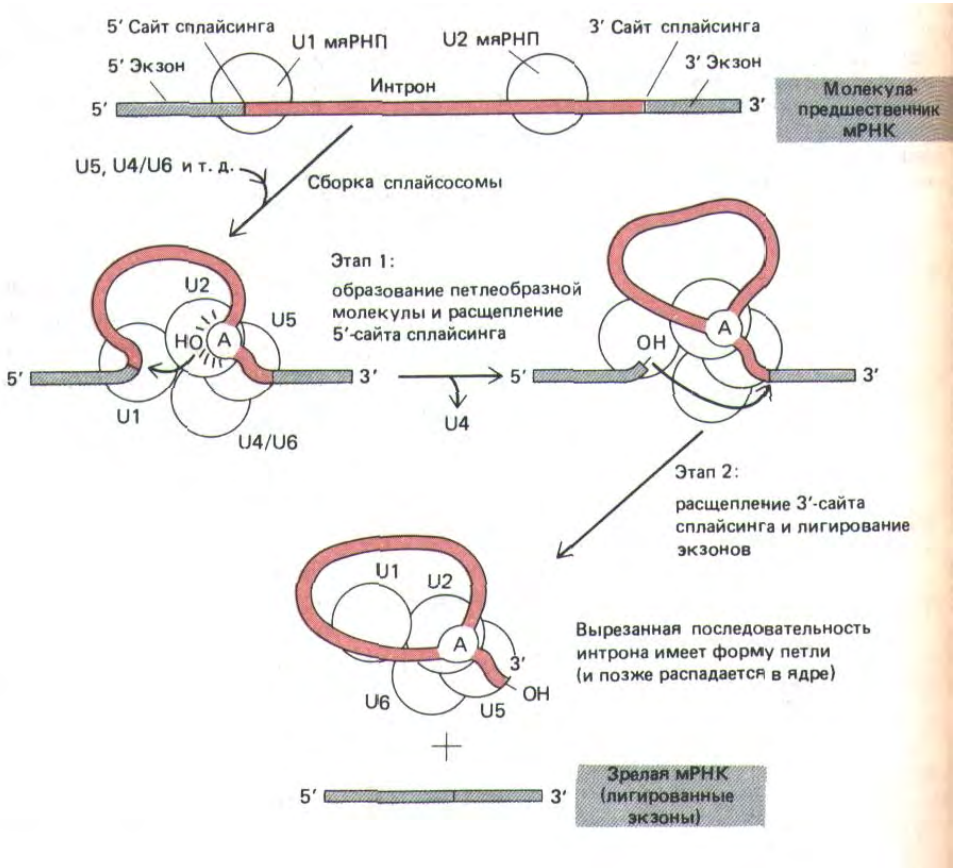


Рис. 9-82. Катализ сплайсинга РНК сплайсосомой, образовавшейся при соединении U1-, U2-, U5- и U4/6-мяРНП (обозначены кружочками), и других компонентов (не указаны). После сборки сплайсосо-мы реакция проходит в две стадии: на стадии 1 определенный А-нуклеотид, расположенный в последовательности интрона вблизи 3'-сайта сплайсинга, атакует 5'-сайт сплайсинга, который в результате разрезается. Разрезанный 5'-конец последовательности интрона ковалентне связывается с этим А-нуклеотидом, образуя разветвленную структуру, представленную на рис. 9-83. На стадии 2 3'-ОН-конец первого экзона, образовавшийся на первой стадии, соединяется с началом второго экзона, разрезая при этом молекулу РНК по 3'-сайту сплайсинга. Таким образом, две последовательности экзонов соединяются вместе, а последовательность интрона высвобождается в виде лассо-подобноЙ структуры. Полный комплекс, образующий сплайсосому седиментирует при 60S; следовательно, по размерам он приближается к рибосоме. Процессинг РНК происходит в ядре, в результате этих событий из первичных РНК-транскриптов (предшественники мРНК) образуются молекулы **мРНК.**

интрона имеются консенсусные области, которые во всех нитронах почти одинаковы. Изменение этих последовательностей влияет на процесс сплайсинга, в результате которого из первичного транскрипта РНК удаляются последовательности нитронов. На рис. 9-80 показаны такие консервативные последовательности для **5'-сайта сплайсинга (донорныи сайт) и 3'-сайта сплайсинга (акцепторный сайт).** Реакция разрыва и воссоединения РНК должна происходить абсолютно точно, так как ошибка даже в один нуклеотид сместит рамку считывания в образовавшейся молекуле РНК и сделает бессмысленной закодированную в ней информацию.

Механизм удаления нитронов из первичных транскриптов анализировали в опытах in vitro. Для этого соответствующим образом сконструированную ДНК инкубировали с высокоочищенной РНК-полимеразой для получения индивидуальных РНК, содержащих единственный нитрон (рис. 9-81). Когда такие молекулы РНК добавляли к клеточному экстракту, происходил сплайсинг. Реакция носила одноступенчатый характер, для нее были необходимы продолжительная инкубация с АТР, наличие определенных белков в экстракте и мяРНП U1, U2, U5 и U4/6. Эти составляющие соединяются с образованием многокомпонентного рибо-нуклеопротеинового комплекса или **сплайсосомы.** Анализ РНК, которые являются промежуточными продуктами в этой реакции, а также мяРНП, необходимых для их образования, привел к следующему выводу: вырезание интрона сопровождается образованием лассо-подобной структуры (рис. 9-82 и 9-83).

В последнее время уточнена функция ряда мяРНП. Например, мяРНП U1 связывается с 5'-сайтом сплайсинга благодаря нуклеотидной последовательности в РНК U1, которая комплементарна консенсусной последовательности сигнала сплайсинга, состоящей из девяти нуклеота-дов (см. рис. 9-80). Поскольку известно, что молекула РНК обладает

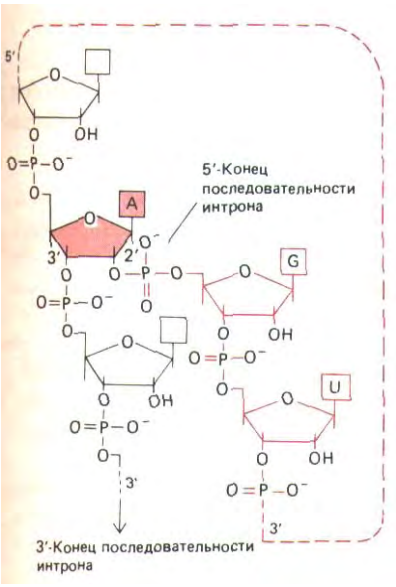


Рис. 9-83. Строение разветвленной цепи РНК, образующейся при сплайсинге РНК. А-нуклеотид, выделенный цветом, - это тот же самый нуклеотид, который фигурировал на рис. 9-82; здесь показано ответвление, образующееся на первой стадии реакции сплайсирова-ния. На этой стадии 5'-конец последовательности интрона разрезается и его фосфатная группа ковалентно связывается с 2'-ОН-рибозной группой А-нуклеотида, расположенного на расстоянии 30 нуклеотидов от 3'-конца последовательности интрона. Разветвленная цепь остается в вырезаемой последовательности интрона и обусловливает его лассо-образную форму (см. рис. 9-82).

ферментативной активностью (см. разд. 3.2.11), катализировать разрыв и образование ковалентных связей, необходимых для сплайсинга РНК, может либо она сама, либо белковый компонент сплайсосомы.

9-32

9.4.11. Из каждого транскрипта РНК обычно удаляется несколько интронных последовательностей [51]

В связи с тем, что сплайсосома главным образом узнает консенсусную последовательность на границах интрона, существует опасность, что 5'-донорный сайт на конце любого интрона соединится с 3'-сайтом сплайсинга не своего, а другого интрона. Когда 5'- и 3'-половинки двух разных нитронов в эксперименте соединяют вместе, получающиеся в результате последовательности гибридного интрона узнаются ферментом РНК-сплайсинга и удаляются.

Принимая во внимание эти данные может показаться странным, что гены позвоночных содержат иногда до 50 нитронов (см. табл. 9-1). Ведь если случайно по ошибке соединятся любые два 5'- и 3'-сайта сплайсинга, это приведет к потере неких функционально активных последовательностей мРНК, что может иметь катастрофические последствия. Каким-то образом подобные ошибки не допускаются: механизм процессинга в норме гарантирует, что каждый 5'-сайт сплайсинга спарится именно с ближайшим к нему 3'-сайтом сплайсинга, расположенным в направлении от 5' к 3` на линейной последовательности РНК (рис. 9-84). Пока неизвестно, как осуществляется такое последовательное соединение. Вероятно, важную роль в этом играет сборка сплайсосом в ходе роста транскрипта РНК (см. рис. 9-79). Имеются также данные, свидетельствующие о том, что для правильного спаривания сайтов сплайсинга очень важна точная трехмерная конформация последовательностей интрона и экзона.

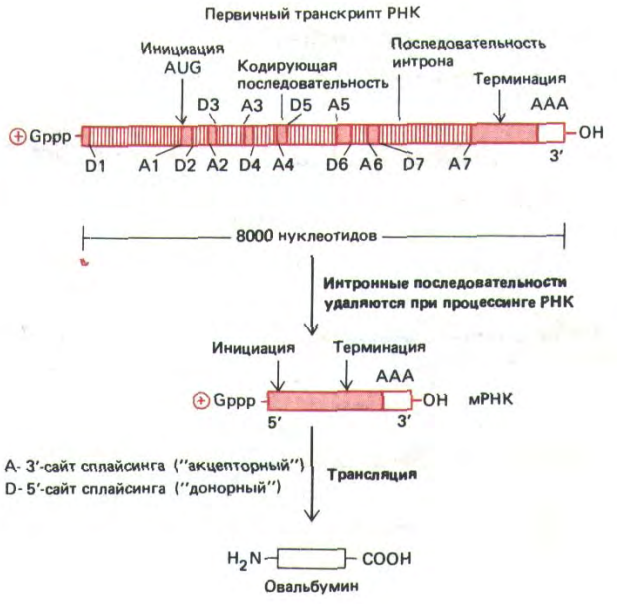


Рис. 9-84. Первичный транскрипт гена овальбумина курицы. Для получения активной молекулы мРНК из него удаляется семь нитронов. 5'-сайты сплайсинга (до-норные сайты) обозначены буквой D, а 3'-сайты сплайсинга (акцепторные сайты) обозначены буквой А.

9-33
10-23

9.4.12. Один и тот же транскрипт РНК может сплайсироваться по-разному, при этом образуются мРНК, кодирующие разные белки [52]

Хотя большинство интронных последовательностей сами по себе, по-видимому, не обладают специфическими функциями, в ходе сплайсинга могут образоваться несколько различных мРНК. Следовательно, один и тот же транскрипт способен дать начало нескольким различным белкам, что сообщает клетке дополнительную генетическую пластичность. В гл. 10 будет показано, что в процессе дифференцировки клетки происходит изменение схемы сплайсинга многих транскриптов РНК, и таким образом по мере развития клетки, одни и те же кодирующие последовательности ДНК могут использоваться в разных целях (см. разд. 10.4.2).

Пластичность, обусловленная сплайсингом РНК, впервые была обнаружена у аденовирусов, у которых, собственно, и был открыт этот процесс. Геном аденовирусов детерминирует синтез очень длинных транскриптов РНК, кодирующих различные белки. В нормальной эукариотической клетке этого не происходит. Здесь каждая отдельная молекула мРНК кодирует лишь один белок, трансляция инициируется только вблизи 5'-кэпа и останавливается на первом же терминирующем кодоне. Однако у аденовируса существует определенный механизм сплайсинга РНК, который может использовать кодирующие последовательности в качестве нитронов и удалять их, при этом один и тот же 5'-кэп способен соединяться с любой из лежащих за ним кодирующих последовательностей, образуя различные мРНК в соотношениях, необходимых для жизнедеятельности вируса. Такой **альтернативный сплайсинг РНК** дает возможность использовать один и тот же 5'-кэп в качестве сигнала инициации синтеза различных белков (рис. 9-85). Этот способ широко используется вирусами, что позволяет небольшому числу различных транскриптов РНК кодировать значительное количество белков.

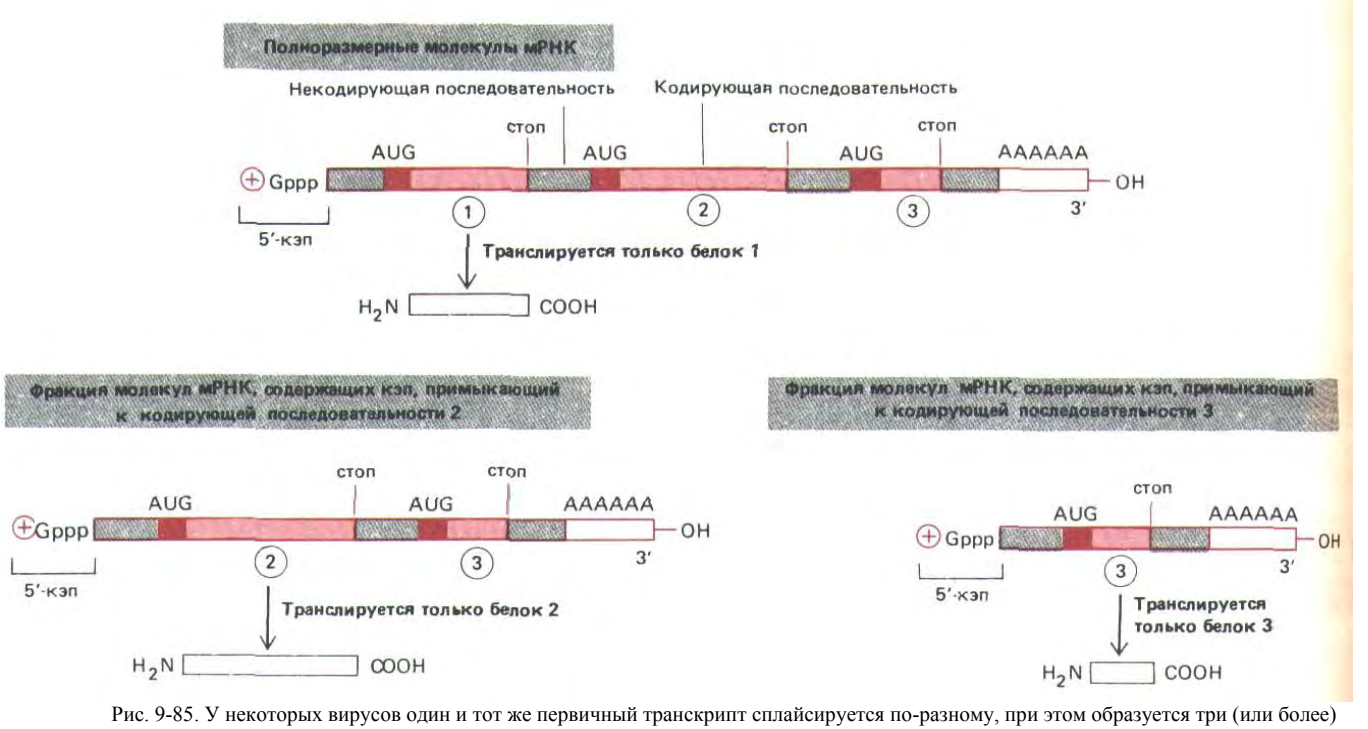


Рис. 9-85. У некоторых вирусов один и тот же первичный транскрипт сплайсируется по-разному, при этом образуется три (или более) молекулы мРНК, каждая из которых кодирует свой белок. Во всех случаях транслируется лишь кодирующая последовательность, примыкающая к 5'-кэпу.

9-34

9.4.13. Изменения мРНК при талассемии демонстрируют механизм возникновения новых белков при сплайсинге [53]

Благодаря методам генной инженерии исследователи получили возможность использовать для изучения клеточных механизмов мутации человека. Например, известно, что группа наследственных заболеваний крови, объединяемых под названием *талассемии,* характеризуется резким падением уровня гемоглобина. Секвенирование ДНК 50 больных талассемией показало, что в большинстве случаев снижение уровня гемоглобина было вызвано нарушением в сплайсинге РНК. Единичные замены нуклеотидов, обнаруженные в ДНК, либо инактивировали сайт сплайсинга, либо приводили к возникновению нового такого сайта. Удивительно, но анализ мРНК этих же больных показал, что потеря сайта сплайсинга не ведет к его отменению; оставшийся нормальным второй, участвующий в сплайсинге сайт, «ищет» поблизости подходящий участок и соединяется с ним. При этом может реализоваться несколько вариантов сплайсинга, т. е. мутантный ген способен детерминировать несколько измененных белков (рис. 9-86). Таким образом, сплайсинг представляет собой весьма пластичный процесс. Итак, мутация в эукариотической клетке может привести к тому, что с одного гена будет синтезироваться несколько разных новых белков, следовательно, клетка обладает возможностью весьма эффективно опробовать заложенные в ней генетические варианты. Благодаря этому сплайсинг РНК может играть решающую роль в эволюции высших эукариот. Сплайсинг у низших эукариот, например дрожжей, регулируется значительно более строго, что ограничивает вероятность появления новых мРНК в результате нарушения этого процесса. Следовательно, скорость дивергенции форм и функций у низших эукариот должна быть более медленной, чем у высших эукариот.

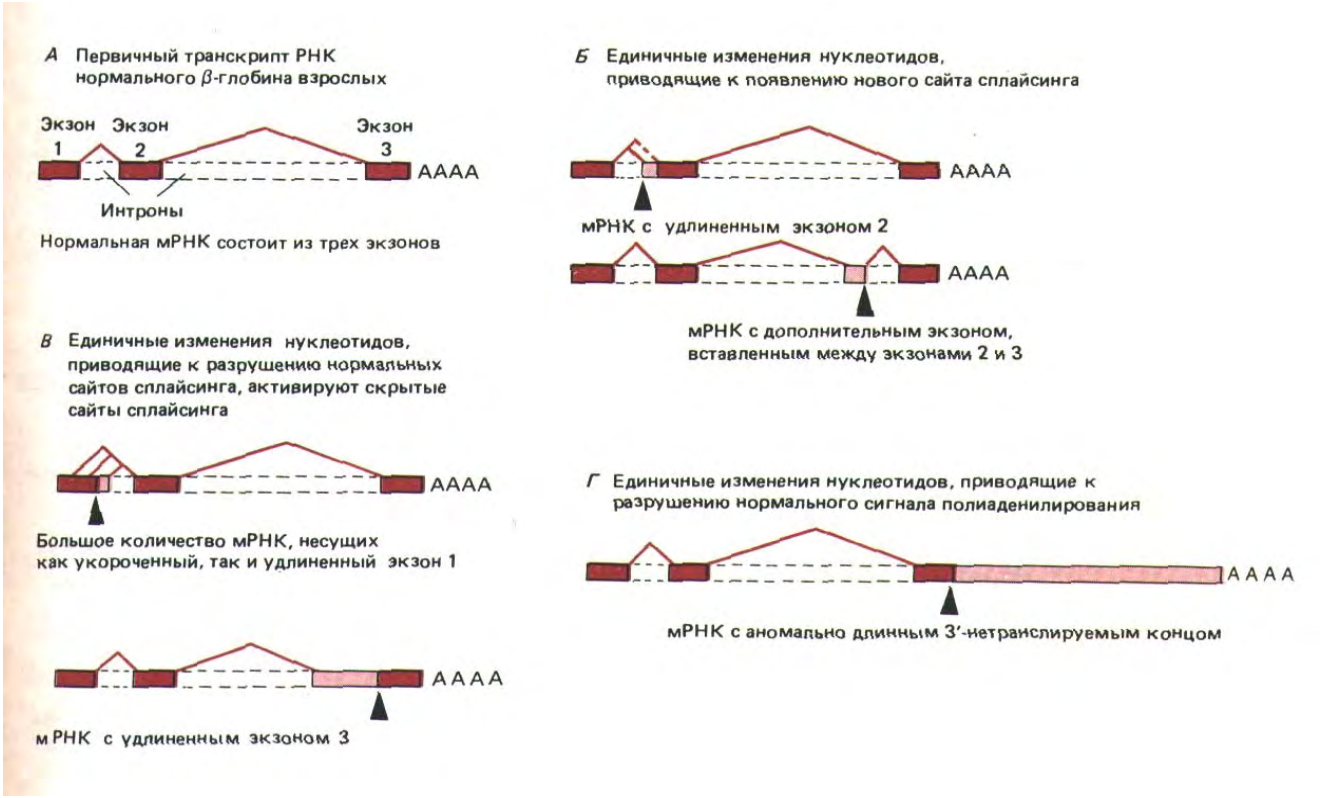


Рис. 9-86. Примеры аномального процессинга первичных транскрип-тов РНК р-глобина у больных талассемией. Мутантные сайты обозначены черными стрелками. Цветные прямоугольники соответствуют трем нормальным экзонам, изображенным на рис. 9-77. Цветные линии соединяют 5'- и 3'-сайты сплайсинга, участвующие в процессинге первичного транскрипта РНК. Незакрашенные участки представляют новые последовательности нуклеотидов, которые включаются в конечную молекулу мРНК в результате мутации. Следует отметить, что если при мутации нормальный сайт сплайсинга остается без партнера, то в качестве партнера используется один из аномальных «скрытых» сайтов сплайсинга, расположенных рядом. (По S. H. Orkin, In: The Molecular Basis of Blood Diseases. [G, Stanato-gannopoulos et al., eds.] pp. 106-126, Philadelphia: Saunders, 1987.)

9.4.14. Сплайсинг РНК, катализируемый сплайсосомами, возможно, возник из самосплайсинга [54]

Открытие промежуточных структур, имеющих форму лассо, при сплайсинге ядерной РНК озадачило молекулярных биологов. Зачем клетке использовать такой причудливый способ сплайсинга, почему в ней не происходит простого соединения соответствующих 5'- и 3'-сайтов? По-видимому, ответ на этот вопрос можно найти, рассмотрев путь возникновения сплайсосом.

Согласно гипотезе, о которой шла речь в гл. 1, первые клетки в качестве основных катализаторов использовали молекулы РНК, а не белка, и генетическую информацию хранили в виде РНК, и не ДНК. Возможно, сплайсинг, катализируемый РНК, в этих первых клетках играл важную роль, а некоторые самосплайсирующиеся нитроны сохранились до сих пор, например в ядерных генах рРНК у *Telrahymena,* у бактериофага Т4 и в некоторых генах митохондрий и хлоропластов. В этих случаях большие фрагменты последовательностей нитронов продемонстрировали крайне высокую консервативность, вероятно, в связи с тем, что для образования каталитической поверхности на молекуле РНК они должны были складываться. Хорошо различимы два класса самосплайсирующихся интронов: *нитроны I группы* начинают реакцию сплайсинга, связываясь с гуаниновым нуклеотидом в последовательности нитрона, при этом G активируется и образует *ударную* группу, которая разрывает первую из фосфодиэфирных связей, расщепляемых при сплайсинге (связь на 5'-сайте сплайсинга). У *интронов II группы* эту роль выполняет адениновый нуклеотид; в результате его действия образуется структура, напоминающая лассо. Иными словами, ход реакции в этих двух случаях одинаков, и оба они, по-видимому, представляют собой составные части существовавших некогда механизмов (рис. 9-87).

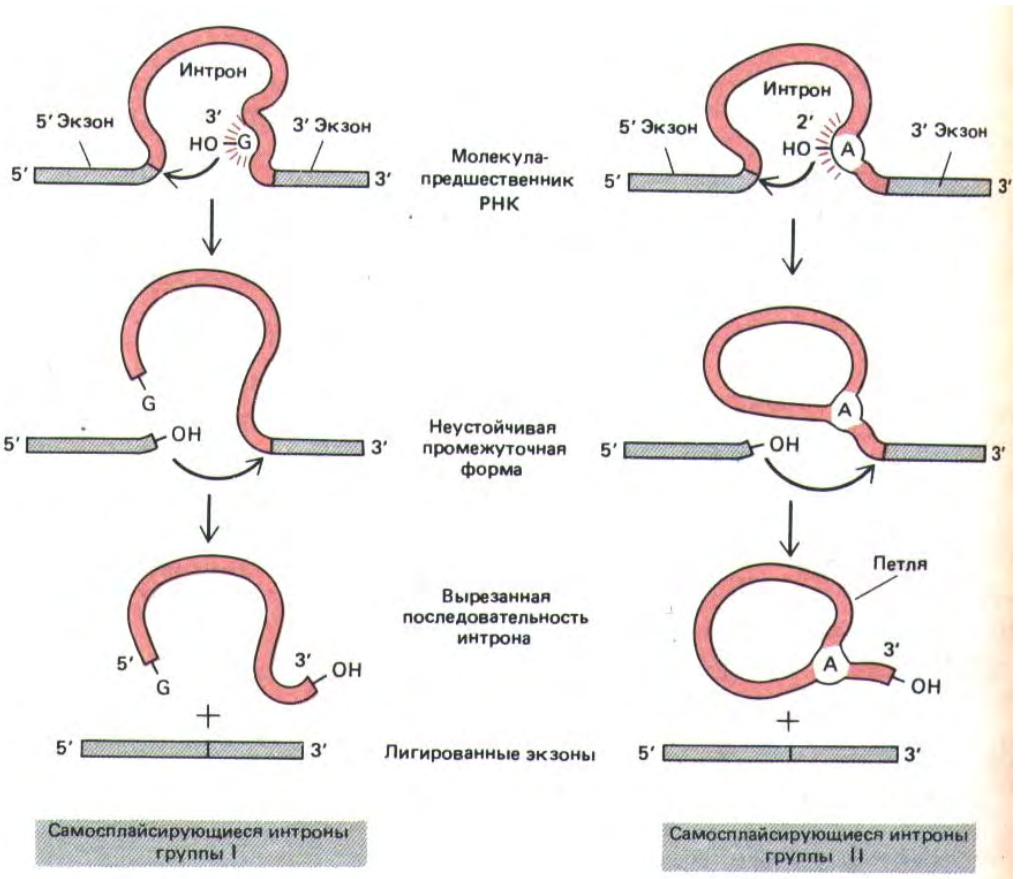


Рис. 9-87. Два известных класса самосплайсирующихся интронов. У интронов группы I для инициации сплайсинга с определенным сайтом связывается свободный G-нуклеотид (см. рис. 3-19), а у интронов группы II используется особым образом активированный А-нуклеотид. Эти две группы интронов изображены таким образом, чтобы были видны их общие свойства. В обоих случаях ускорение реакции определяется белками, но в катализе участвует и РНК, входящая в состав интрона. Механизм, используемый нитронами группы II, приводит к образованию лассо-подобных структур и напоминает реакцию, катализируемую сплайсосомой (ср. рис. 9-82). (По T.K. Cech, Cell 44: 207-210, 1986.)

В ходе *эволюции сплайсинга* ядерной *РНК* сохранились реакции, используемые самосплайсирующимися нитронами II группы, однако каталитическая функция последовательностей нитронов перешла к отдельным компонентам сплайсосом. Следовательно, маленькие РНК U1 и U2 вполне могут быть остатками, например, последовательностей катализаторов. Передача функций катализа от интрона к сплайсосоме, вероятно, сняла большинство ограничений с эволюции интронов и сделала возможным появление новых интронных последовательностей.

9.4.15. Экспорт мРНК в цитоплазму происходит только после завершения сплайсинга [55]

Согласно общепринятой гипотезе (гл. 8), зрелые молекулы мРНК узнаются рецепторными белками (входящими в состав ядерных пор), которые способствуют продвижению мРНК в цитоплазму посредством активного переноса. Однако основные белки, входящие в состав гяРНП, и различные процессирующие молекулы, связанные в ядре с РНК, по-видимому, никогда не покидают ядро и, вероятно, соскальзывают с РНК по мере ее продвижения через ядерные поры (рис. 9-88). Изучение мутантов дрожжей показало, что в случае РНК, имеющей сайты сплайсинга, процесс переноса может начаться лишь после завершения сплайсинга. У условно летальных мутантов дрожжей, не способных сплайси-ровать свою РНК при высокой температуре, все несплайсированные предшественники мРНК остаются в ядре, тогда как мРНК, не требующие сплайсинга (а таких большинство у этого одноклеточного эукарио-тического организма), нормально переносятся в цитоплазму. Это наблюдение ВПОЛНе согласуется с гипотезой, согласно которой РНК задерживаются связанными с ними сплайсосомами, образующими многочисленные агрегаты внутри ядра высших эукариот. Такие агрегаты могут служить «островками сплайсинга», хотя, как они образуются и функционируют, пока неизвестно (рис. 9-89). Возможно, они представляют собой аналоги *ядрышка,* значительно большей и заметной структуры в ядре, чья организация и функция изучены хорошо.

Известно, что ядрышко - это место в ядре, где из РНК-предшественника образуются молекулы рибосомной РНК (рРНК), которые связываются с соответствующими белками и собираются в рибосомные частицы. Однако перед тем, как обсуждать строение ядрышка, необходимо рассмотреть синтез молекул-предшественников рРНК на генах рРНК.

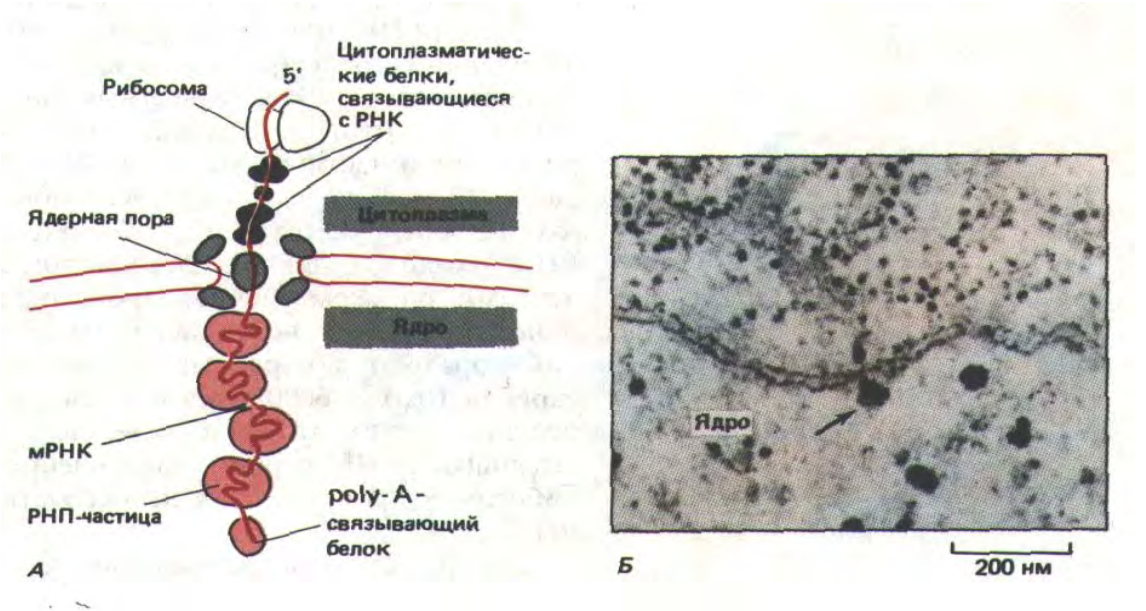


Рис. 9-88. Перемещение молекул мРНК через ядерные поры. *А.* Изменения, происходящие в белках, связанных с молекулой РНК при ее выходе из ядра. *Б.* Электронная микрофотография большой молекулы мРНК, образовавшейся в глетке слюнной железы насекомого. Очевидно, эта молекула «поймана» в момент выхода в цитоплазму (указано стрелкой). (По B. J. Stevens and H. Swift, J. Cell Biol. 31: 55-77, 1966.)

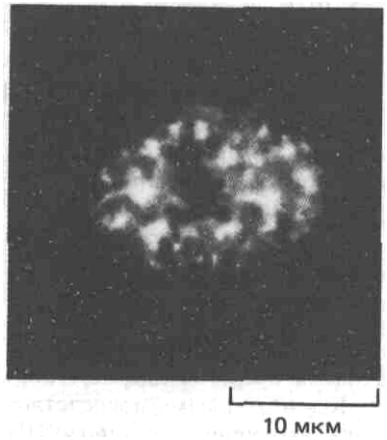


Рис. 9-89. Иммунофлуоресцентное мечение ядра фибробласта человека моноклональными антителами к мяРНП-частицам, участвующим в сплайсинге молекул-предшественников мРНК. Частицы мяРНП образуют большие агрегаты, которые могут функционировать как «островки сплайсинга». Антитела выявляют определенные белки, присутствующие в ряде мяРНК и участвующие в работе сплайсосомы. (С любезного разрешения N. Ringertz.)

10-23

9.4.16. Рибосомные РНК синтезируются на тандемно расположенных копиях идентичных генов [56]

Многие белки, присутствующие в дифференцирующейся клетке в больших количествах (например, гемоглобин в эритроцитах и миоглобин в клетках мышц), синтезируются с генов, представленных в гаплоидном геноме лишь одной копией. Количество этих белков в клетке велико благодаря тому, что с каждой из многих молекул мРНК, транскрибируемых с кодирующих их генов, за минуту может транслироваться до 10 белков. В норме в каждом клеточном поколении это приводит к образованию более 10000 молекул белка на одну молекулу мРНК. Однако такого рода амплификация невозможна в случае рибосомной РНК, так как эти молекулы и являются конечным продуктом гена. Тем не менее, в растущей клетке высших эукариот для того, чтобы получить необходимые 10 млн рибосом за каждую генерацию, должно синтезироваться 10 млн копий каждого типа молекул рибосомной РНК. Такие количества могут образоваться лишь в том случае, если клетка содержит множественные копии генов, кодирующих рибосомную РНК **(гены рРНК).**

Даже *E.coli* для обеспечения клетки нужным количеством рибосом должна иметь семь копий гена рРНК. В клетках человека содержится около 200 копий гена рРНК на гаплоидный геном, причем эти копии распределены небольшими кластерами по пяти различным хромосомам, В клетках шпорцевой лягушки *Xenopus* обнаружено приблизительно 600 копий гена рРНК на одной хромосоме. Множественные копии высококонсервативных генов рРНК в любой хромосоме расположены в виде серии тандемных повторов, отделенных друг от друга нетранскрибируемым участком ДНК, который называется *спейсером.* В гл. 10 мы изложим современные представления о механизме возникновения таких тандемно расположенных генов.

Благодаря тому, что кластеры тандемно повторяющихся генов рРНК сгруппированы и очень активно транскрибируются, они хорошо видны на электронномикроскопических препаратах хроматина. Молекулы РНК-полимеразы и ассоциированные с ними новообразованные транскрипты (на один ген их приходится до 100 и более) упакованы таким образом, что структура приобретает вид «елочки» (рис. 9-90). Как отмечалось ранее (см. рис. 9-73), верхушка каждой такой елочки представляет собой точку инициации транскрипции; конец же гена рРНК четко определяется по внезапному исчезновению молекул РНК-полиме-разы и соответствующих транскриптов.

Гены рРНК транскрибируются РНК-полимеразой I с образованием идентичных транскриптов. В клетках человека такие первичные транскрипты генов рРНК, известные как 45S-РНК, имеют в длину около 13000 нуклеотидов. Прежде чем покинуть ядро в составе собранной рибосомной частицы, молекула 45S-РНК подвергается специфическому расщеплению, в результате чего образуется по одной копии 28S-РНК (около 5000 нуклеотидов), 18S-РНК (около 2000 нуклеотидов) и 5,88-РНК (около 160 нуклеотидов), которые, собственно, и являются компонентами рибосом. Общее происхождение всех трех типов рРНК из одного и того же первичного транскрипта служит гарантией того, что они образуются в равных количествах. Остальная часть этого транскрипта (около 6000 нуклеотидов) деградирует в ядре (рис. 9-91). Не исключено, что эти «излишние» последовательности молекулы-предшественника рРНК играют определенную роль на ранних этапах сборки рибосомы, происходящих непосредственно по завершении синтеза 45S-РНК.

Другие тандемно повторяющиеся гены, также разделенные нетранс-

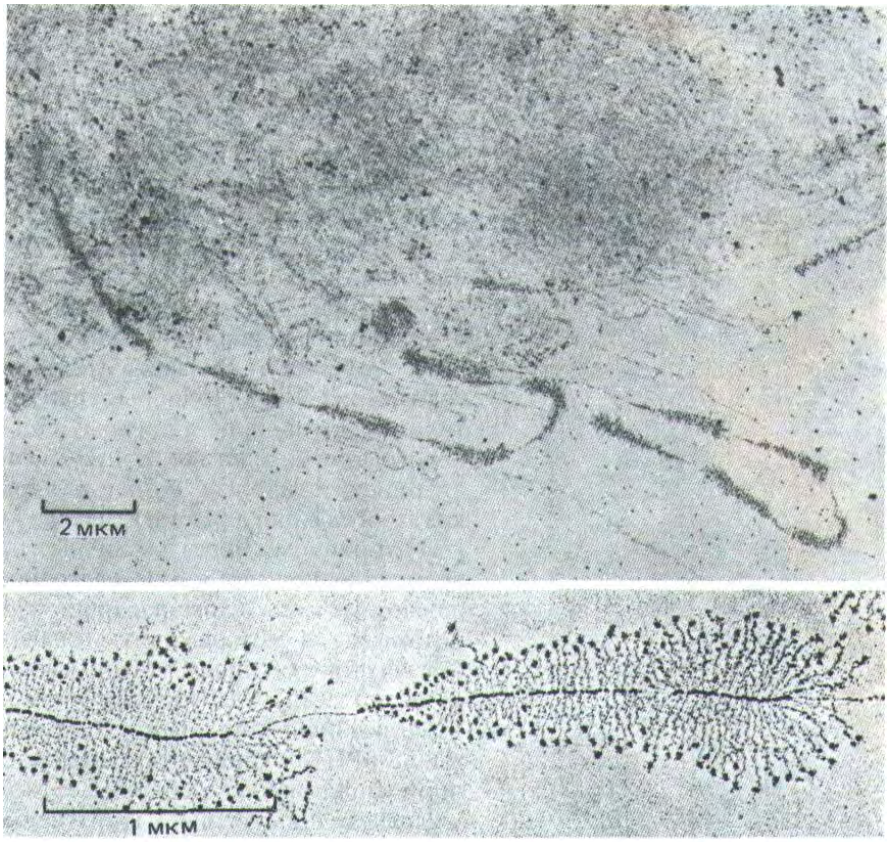


Рис. 9-90. Транскрипция тандемно расположенных генов рРНК, визуализированная с помощью электронного микроскопа. На верхней микрофотографии при меньшем увеличении хорошо различимы чередующиеся транскрибируемые гены и нетранскрибируемые спейсе-ры. Большие частицы на 5'-конце каждого транскрипта рРНК (нижняя фотография), как полагают, связаны с началом сборки рибосом. Хорошо видны также молекулы РНК-полимераз. (Верхний снимок V. E. Foe, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 42: 723-740, 1978, нижний снимок-с любезного разрешения Ulrich Scheer.)

лируемыми спейсерами, представлены генами 5S-РНК большой рибо-сомнои субъединицы (это единственная рРНК, которая транскрибируется отдельно от других). Гены 5S-рРНК насчитывают в длину всего лишь около 120 нуклеотидных пар и как большинство других генов, кодирующих маленькие стабильные РНК (наиболее известные из них-это гены тРНК), транскрибируются РНК-полимеразой III. У человека имеется приблизительно 2000 генов 5S-рРНК, которые тандемно расположены внутри единственного кластера, локализованного совершенно в другой области, чем остальные гены рРНК. Остается неизвестным, почему этот тип рРНК транскрибируется отдельно.

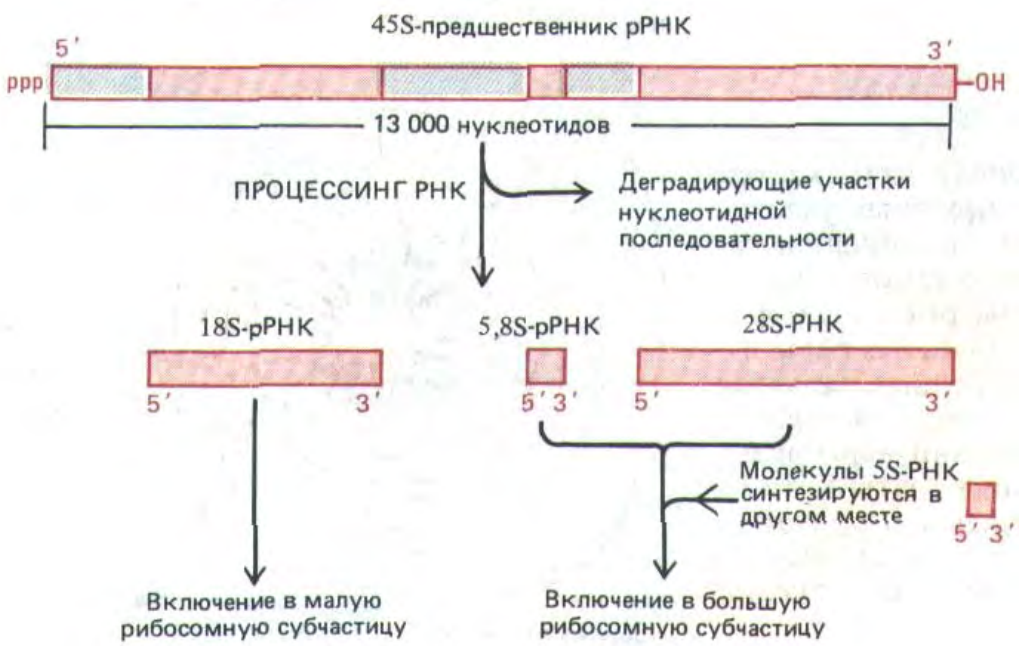


Рис. 9-91. Процессинг 45S-предшественника рибосомных РНК с образованием молекул РНК трех типов. Обратите внимание, что почти половина нуклеотидноЙ последовательности пре-рРНК деградирует в ядре.

9.4.17. Ядрышко-это центр образования рибосом [57]

Непрерывная транскрипция дуплицированных **генов** обеспечивает клетку достаточным количеством рРНК. Новосинтезированные транскрипты незамедлительно связываются с рибосомными белками с образованием рибосом. Сборка рибосом происходит в ядре, а именно в той его специфической области с диффузной структурой, которая называется **ядрышком.** В составе ядрышка выявляются большие петли ДНК, содержащие гены **рРНК,** которые с необычайно высокой скоростью транскрибируются РНК-полимеразой I. Эти петли носят название **«ядрышковые организаторы».** Самое начало процесса сборки рибосомы можно увидеть в электронный микроскоп: 5'-концы рРНК-транскриптов, составляющих крону «елочек», компактизуются с образованием белок-содержащих гранул (рис. 9-90). Подобные гранулы не образуются на РНК-транскриптах других типов, по-видимому, они отражают первые стадии РНК-белкового взаимодействия, происходящего в ядрышке.

Биосинтетические функции ядрышка можно изучать с помощью кратковременного радиоактивного мечения вновь синтезированной РНК [^{3}H]-уридином. Через различные промежутки времени, прошедшие со времени включения метки, клеточное содержимое фракционируют и выделяют меченые ядрышки (рис. 9-92). Эти эксперименты показали, что интактные 455-транскрипты сначала образуют крупные комплексы, связываясь с большим количеством различных белков, импортируемых из цитоплазмы, где синтезируются все клеточные белки. Большая часть из 70 различных полипептидных цепей, формирующих рибосому, а также 5S-рРНК включаются именно на этой стадии. Для правильного протекания процесса сборки необходимы и иные молекулы. Например, в ядрышке присутствуют и другие белки, связывающиеся с РНК, а также определенные маленькие рибонуклепротеиновые частицы (включая U3-мяРНП), которые, как полагают, катализируют сборку рибосом. Эти компоненты остаются в ядрышке, а субъединицы рибосом в готовом виде транспортируются в цитоплазму. Особенно заметным компонентом ядрышка является **нуклеолин,** хорошо изученный белок, который присутствует в больших количествах, и по-видимому, связывается только с транскриптами рибосомной РНК. Нуклеолин особым образом окрашивается серебром. Такое окрашивание характеризует и все ядрышко в целом.

Во время процессинга 45S-РНК этот гигантский рибонуклеопротеиновый комплекс постепенно теряет часть белков и последовательностей

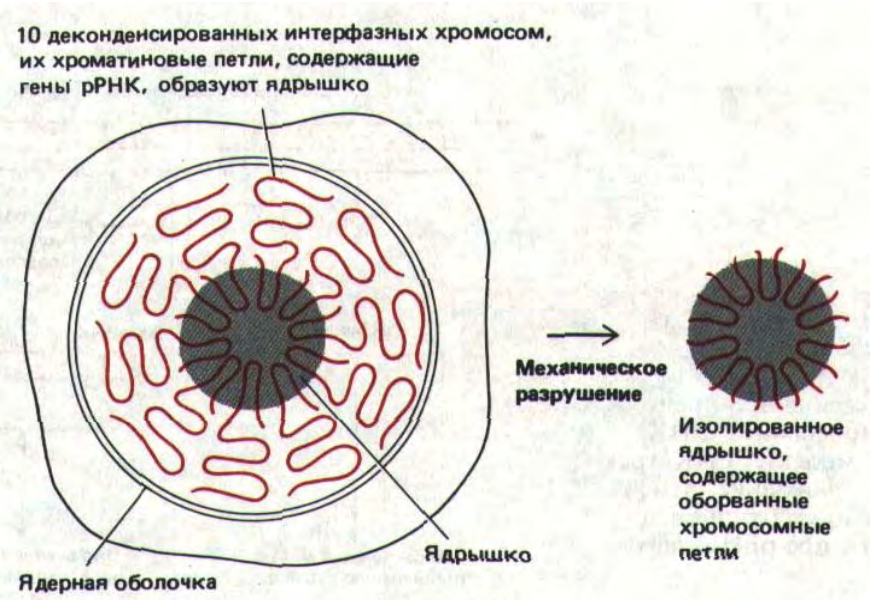


Рис. 9-92. Упрощенная схема клетки человека, иллюстрирующая участие хроматиновых петель, принадлежащих 10 отдельным хромосомам и содержащих гены рРНК, в образовании одного большого ядрышка. Препараты очищенных ядрышек весьма полезны в биохимических исследованиях функций ядрышка; получают такие препараты путем механического отделения образующих ядрышко хроматиновых петель от хромосом, как показано на рисунке.

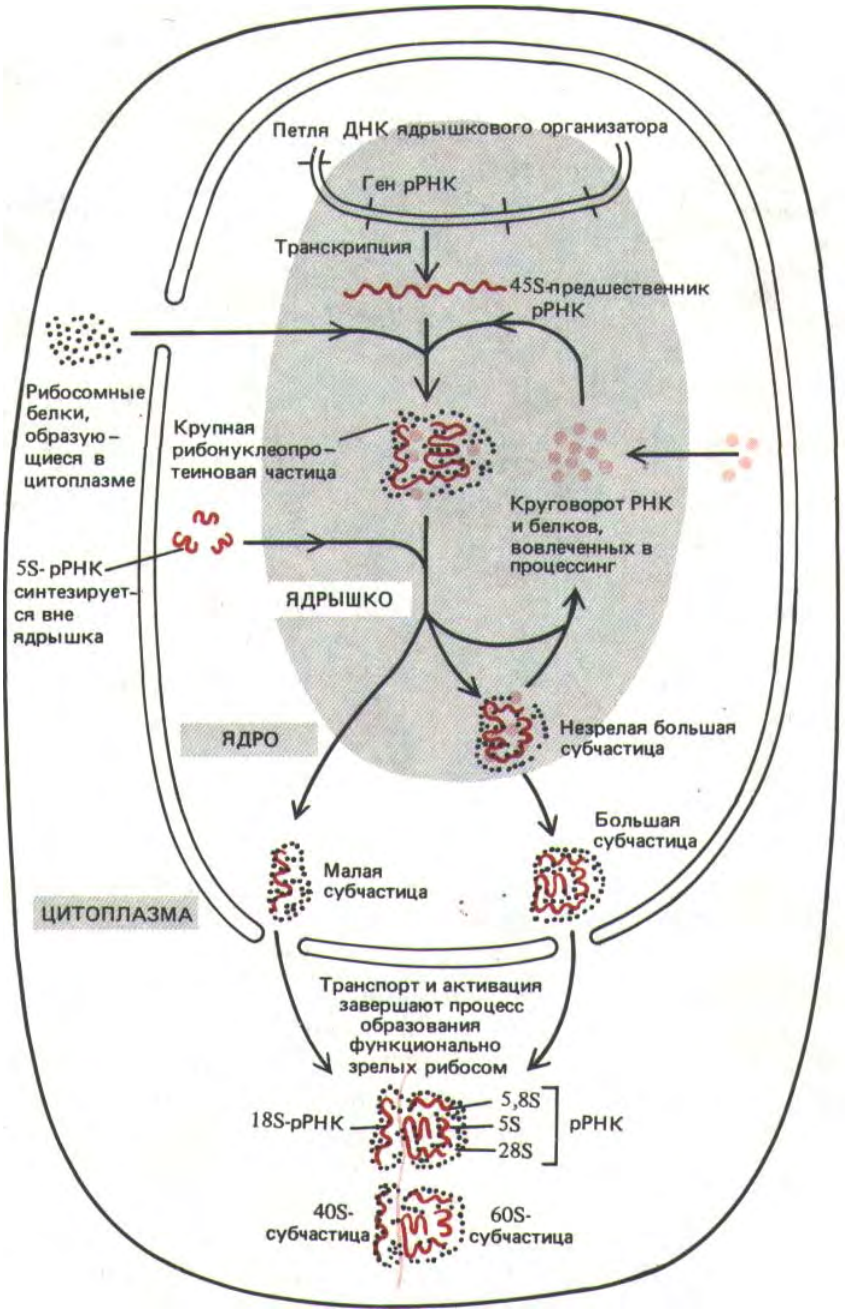


Рис. 9-93. Схема, иллюстрирующая функции ядрышка в биосинтезе рибосом. 458-рРНК-транскрипт упакован в составе крупной рибонуклеопротеиновой частицы, содержащей много рибосомных белков, импортированных из цитоплазмы. В ходе процессинга этой РНП-частицы, протекающего в ядрышке, формируются предшественники большой и малой рибосомных субъединиц; часть гигантского РНП-комплекса при этом деградирует. Предполагается, что окончательное созревание рибосомных субъединиц происходит лишь после того, как они (каждая индивидуально) транспортируются через ядерные поры в цитоплазму.

РНК и затем специфически расщепляется, образуя самостоятельные предшественники большой и малой рибосомных субъединиц (рис. 9-93). Через 30 мин после введения радиоактивной метки первые зрелые малые субъединицы рибосом, содержащие меченую 18S-рРНК, выходят из ядрышка и появляются в цитоплазме. Сборка больших рибосомных субъединиц, содержащих 28S, 5,85, и 5S-РНК, требует несколько больше времени (около 1ч), поэтому в ядрышке накапливается гораздо больше недостроенных больших субъединиц, чем малых.

Заключительные стадии созревания рибосом осуществляются только после выхода рибосомных субъединиц из ядра в цитоплазму. Этим достигается изоляция функционирующих рибосом от незрелых ядерных транскриптов.

9.4.18. Ядрышко-это высокоорганизованная структура внутри ядра [57]

По данным световой микроскопии большое сфероидальное ядрышко-наиболее легко выявляемая структура в ядре немитотической клетки. Неудивительно поэтому, что оно было столь скрупулезно исследовано

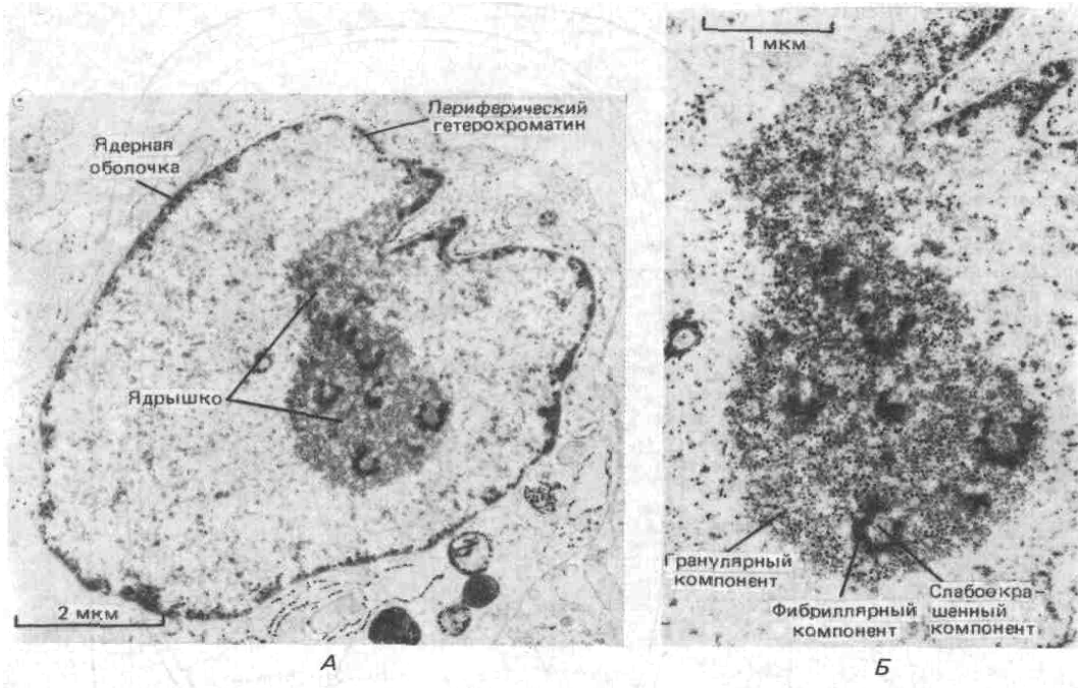


Рис. 9-94. Электронная микрофотография тонкого среза ядрышка в фибробласте человека. Хороню видны три дискретные зоны. *А.* Общий вид ядрышка. *Б.* Детализация. (С любезного разрешения E. G. Jordan and J. McGovern.)

первыми цитологами: обзор по данной теме, датированной 1898 г., содержал около 700 ссылок. К 1940 г. выяснилось, что в ядрышке находится большое количество РНК и белков, однако его биологическая роль, связанная с синтезом рибосомных РНК и сборкой рибосом, оставалась неизвестной вплоть до 60-х годов.

Некоторые детали строения ядрышка можно увидеть с помощью электронной микроскопии. В отличие от цитоплазматических органелл ядрышко не имеет мембраны, которая окружала бы его содержимое. Похоже, что оно образовано недозрелыми предшественниками рибосом, специфически связанными друг с другом неизвестным образом. На типичной электронной микрофотографии ядрышка можно различить три дискретные зоны (рис. 9-94): 1) *слабоокрашенный компонент,* содержащий ДНК из области ядрышкового организатора хромосомы, 2) *гранулярный компонент,* в состав которого входят частицы диаметром 15 нм, представляющие наиболее зрелые предшественники рибосомных частиц, и 3) *плотный фибриллярный компонент,* состоящий из множества тонких (5 нм) рибонуклепротеиновых фибрилл, представляющих собой РНК-транскрипты.

Размер ядрышка отражает степень его функциональной активности, которая широко варьирует в различных клетках и может изменяться в индивидуальной клетке. Так, в некоторых покоящихся клетках растений ядрышко очень мало, тогда как в клетках, продуцирующих большое количество белков, оно может занимать до 25% объема всего ядра. Изменение размеров ядрышка связано главным образом с уменьшением или увеличением доли гранулярного компонента, что, в свою очередь, вероятно, контролируется на уровне транскрипции рибосомных генов: по данным электронной микроскопии доля активных рибосомных генов, равно как и эффективность транскрипции каждого гена, изменяется в зависимости от обстоятельств.

9.4.19. После каждого митоза ядрышко образуется заново из специфических участков хромосомы [58]

Внешний вид ядрышка заметно меняется в зависимости от фазы клеточного цикла. *С* началом митоза ядрышко уменьшается в размерах, а затем вовсе исчезает по мере того, как происходит конденсация хромосом и прекращается синтез всех типов РНК; как правило, в метафазной клетке ядрышко не обнаруживается. В конце митоза (в телофазе), когда возобновляется синтез рибосомных РНК, миниатюрные ядрышки вновь возникают на участках хромосом, содержащих гены рибосомной РНК (рис. 9-95).

В клетках человека гены рРНК локализуются на концах пяти пар хромосом, т.е. на 10 хромосомах из имеющихся 46 (см. рис. 9-40). Поэтому сразу после митоза в клетке человека образуется 10 маленьких ядрышек; их редко удается увидеть, так как они быстро растут и сливаются друг с другом в одно большое ядрышко, типичное для многих интерфазных клеток (рис. 9-96).

Что же происходит с РНК и белковым компонентом дезагрегировавшего в процессе митоза ядрышка? По-видимому, какая-то часть их распределяется по всем метафазным хромосомам и переносится в ядра дочерних клеток. В телофазе митоза при деконденсации хромосом эти «старые» ядрышковые компоненты могут участвовать в построении новых ядрышек.

9.4.20. Во время интерфазы отдельные хромосомы находятся на определенных местах в ядре [59]

Как отмечалось выше, при образовании ядрышка нужные для этого гены интерфазных хромосом собираются вместе в определенной области ядра. В связи с этим возникает вопрос, а не расположены ли хромосомы в ядре неслучайным образом? Этот важнейший вопрос был впервые поставлен биологами еще в конце XIX в, но до сих пор убедительный ответ на него не получен.

Некоторая упорядоченность в расположении хромосом связана с конфигурацией, которую они имеют в конце митоза. Известно, что непосредственно перед делением клетки конденсированные хромосомы растаскиваются к полюсам микротрубочками, которые прикреплены к центромерам. Таким образом, центромеры идут впереди, а дистальные плечи хромосом, оканчивающиеся теломерами, оказываются позади. Хромосомы во многих ядрах в течение всей интерфазы стремятся сохранить эту так называемую *Рабль-ориентацию,* при которой их

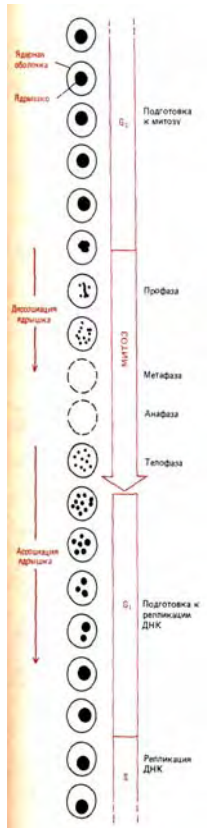


Рис. 9-95. Внешний вид ядрышка в клетках человека изменяется на разных стадиях клеточного цикла. На схеме изображено только клеточное ядро.

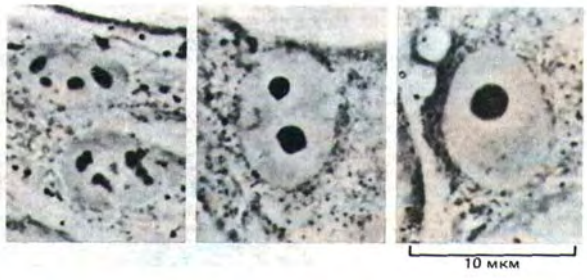


Рис. 9-96. Микрофотографии культивируемых фибробластов человека, демонстрирующие различные стадии ассоциации ядрышка. (С любезного разрешения E. G. Jordan and J. McGovern.)



Рис. 9-97. Поляризованная ориентация хромосом в интерфазных клетках раннего эмбриона дрозофилы. *А.* Рабль-ориентация: все центромеры направлены к одному полюсу ядра, а все теломеры-другому. Обратите внимание, что у эмбриона все ядра имеют удлиненную форму. *Б.* Полученная при небольшом увеличения световая микрофотография эмбриона дрозофилы на стадии клеток бластодермы; хромосомы окрашены флуоресцирующим красителем. Следует отметить, что области, окрашенные ярче всего (хромоцентры), ориентированы к наружной поверхности зародыша, и, следовательно, обращены в сторону апикальной плазматической мембраны каждой клетки. (С любезного разрешения John Sedat.)

центромеры обращены к одному полюсу ядра, а теломеры направлены к противоположному полюсу (рис. 9-97, *А).* В некоторых случаях полюсы ядра определенным образом ориентированы в клетке: например, в ранних зародышах дрозофилы все центромеры направлены к верхушке (рис. 9-97, £). Подобная фиксированная ориентация ядра может в значительной мере влиять на полярность клетки, однако непонятно, какой эксперимент следует провести для проверки этого предположения.

В большинстве интерфазных клеток различные хромосомы невозможно отличить друг от друга, и, следовательно, трудно определить их расположение точнее, чем это описано выше. Исключение составляют гигантские политенные хромосомы интерфазных клеток личинок дрозофилы. На этих хромосомах отдельные диски различаются достаточно хорошо, чтобы в интактном ядре можно было точно определить положение конкретных генов. Исследования показали, что набор интерфазных хромосом в целом не характеризует высокая упорядоченность, хотя Рабль-ориентация сохраняется. В двух на вид идентичных клетках по соседству часто расположены разные хромосомы.

Анализ политенных хромосом свидетельствует о том, что в интерфазном ядре каждая хромосома расположена отдельно, т.е. разные хромосомы не сильно перевиты друг с другом (рис. 9-98). Более того, установлено, что в интерфазном ядре и другие типы хромосом, а не только политенные, стремятся занять дискретные домены. Например, методом гибридизации in situ с соответствующими ДНК-зондами можно выявить отдельную хромосому в гибридных млекопитающих, растущих в культуре (рис. 9-99). Замечено, что большая часть ДНК такой хромосомы занимает очень небольшую часть интерфазного ядра. Этот факт свидетельствует о том, что каждая отдельная хромосома остается компактной и структурированной, благодаря чему отдельные ее части могут активно участвовать в синтезе РНК.

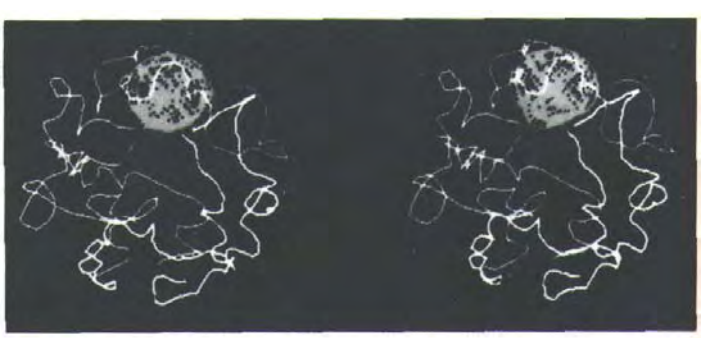


Рис. 9-98. Стереоизображение политенных хромосом в отдельном ядре клетки слюнных желез дрозофилы. Большой шар-это ядрышко. Тело-меры обычно располагаются на поверхности ядерной оболочки напротив той его области, под которой расположено ядрышко; вблизи ядрышка расположены все центромеры. Хромосомы в ядре никогда не перепутываются, однако детали их укладки и соседи в одинаковых ядрах различаются. (С любезного разрешения Mark Hoch-strasser and John W. Sedat.)

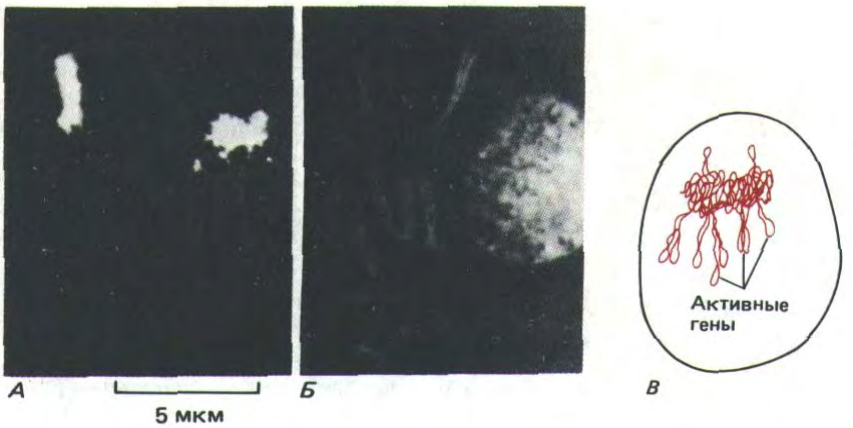


Рис. 9-99. Селективное мечение отдельной хромосомы в ядре культивируемых клеток млекопитающих в интерфазе. *А.* Результаты гибридизации in situ (с использованием флуоресцирующего зонда), позволяющей идентифицировать отдельные хромосомы человека в гибридной линии клеток человек - хомяк. *Б.* Тот же препарат, вся ДНК которого помечена флуоресцирующей меткой. *В.* Схема хромосомы человека в интерфазном ядре, представленном в части *А. (А* и *Б-с* любезного разрешения Joyce A. Kobori and David R. Cox.)

9.4.21. Насколько сильно структурировано ядро? [60]

Внутренняя часть ядра-это не случайно перемешанные молекулы РНК, ДНК и белков, входящих в его состав. Выше уже шла речь о том, что ядрышко представляет собой эффективное устройство для сборки рибосом, а кластеры сплайсосом, по-видимому, организованы в виде дискретных островков, где и происходит сплайсинг РНК (см. рис. 9-89). Упорядоченность структур хорошо видна и на электронных микрофотографиях ядерных пор: хроматин расположен вдоль внутренней ядерной мембраны, но отсутствует вокруг каждой ядерной поры и под ней (т. е. проход между цитоплазмой и нуклеоплазмой свободен (рис. 9-100). Более того, оказалось, что в некоторых случаях положение ядерных пор на ядерной оболочке не случайно, а строгим образом упорядочено (рис. 9-101). Подобная упорядоченность свидетельствует о соответствующей организации ядерной ламины, к которой и прикреплены поры.

Существует ли какая-либо внутриядерная структура, аналогичная цитоскелету, на которой и расположены ядерные компоненты? Многие биологи, изучающие клетку, убеждены, что такая структура существует. *Ядерным матриксом* или *скелетом* называют нерастворимый материал, остающийся в ядре после ряда биохимических экстракций. Можно показать, что белки, входящие в его состав, связывают определенные последовательности ДНК, называемые SAR или MAR (области, связанные со скелетом - scaffold -associated regions или с мятриксом - matrix-associated regions). Предполагают, что такие последовательности образуют основание петли ДНК (см. рис. 9-34). Благодаря сайтам прикрепления хромосом матрикс может участвовать в организации



Рис. 9-100. Электронная микрофотография ядра клетки млекопитающего. Отчетливо видно, что конденсированный хроматин, выстилающий ядерную оболочку, отсутствует вокруг ядерных пор. (С любезного разрешения Zarry Gerace.)



Рис. 9-101. Электронная микрофотография ядерной оболочки споры папоротника, полученная с помощью метода «замораживание - скалывание». Видно упорядоченное расположение комплексов ядерных пор, лежащих параллельными рядами. На ядерной оболочке других клеток наблюдались либо сконцентрированные в одной области кластеры ядерных пор, либо необычные зоны, лишенные ядерных пор (они определенным образом ориентированы относительно других структур клетки). (С любезного разрешения Don H. Northcote, по K. Roberts and D. H. Northcote, Microsc. Acta 71: 102-120, 1971.)

хромосом, определять локализацию генов, регулировать транскрипцию и репликацию ДНК в ядре. Однако в связи с тем, что структурные компоненты матрикса еще не идентифицированы, остается неизвестным, представляет ли собой матрикс, полученный в ходе экспериментов, структуру, идентичную той, которая присуща интактным клеткам.

Заключение

РНК-полимераза, фермент, катализирующий транскрипцию ДНК, представляет собой сложную молекулу, состоящую из многих полипептидных цепей. В эукариотических клетках обнаружено три РНК-полимеразы I, II и III. Эти ферменты эволюционно связаны друг с другом и с бактериальной РНК-полимеразой, у них имеются одинаковые субъединицы. По-видимому, после инициации транскрипции от каждого фермента отделяются одна или несколько субъединиц, называемых факторами инициации. Вместо них к ферментам присоединяются субъединицы, называемые факторами элонгации. Они необходимы для удлинения цепи РНК, ее терминации и модификации. Вероятно, факторы элонгации у различных типов полимераз разные, именно этим можно объяснить, почему транскрипты, синтезируемые каждым ферментом, модифицируются по-разному.

Большая часть мРНК клетки образуется в результате сложного процесса, начинающегося с синтеза гетерогенной ядерной РНК. Первичные транскрипты гяРНК синтезируются РНК-полимеразой II. Эти транскрипты затем кэпируются путем добавления к 5'-концу специального нуклеотида и после этого полиаденилируются на 3'-конце. Модифицированные молекулы РНК обычно затем подвергаются процессингу, в ходе которого из середины гяРНК удаляются последовательности интронов. Эта реакция катализируется большим рибонуклепротеиновым комплексом, известным под названием сплайсосома. При этом значительная часть первичного транскрипта РНК удаляется и распадается в ядре. Хотя обычно гяРНК составляет около половины всей РНК, синтезированной клеткой, образующаяся в результате процессинга мРНК,-это всего лишь 3% РНК клетки.

В отличие от генов, кодирующих белки и транскрибирующихся поли-меразой U, гены, кодирующие большую часть структурных РНК, транскрибируются полимеразами I и 111. Эти гены обычно амплифицированы, собраны в тандемные кластеры. РНК-полимераза III синтезирует стабильные небольшие РНК, включая тРНК и 5S-рРНК. РНК-полимераза I ответственна за образование большой молекулы-предшественника рРНК (45S-рРНК). Все рибосоми клетки, за исключением митохонд-риальных и хлоропластных, собираются в ядрышке-отдельной ядерной органелле, формирующейся вокруг тандемно расположенных генов рРНК, которые собираются вместе из нескольких хромосом.

Литература

Общая

Lewin B. Gene expression, Vol. 2. Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed. New York, Wiley, 1980.

Levfin B. Genes, 3rd ed. New York, Wiley, 1987.

Newport J. W., Forbes D. J. The nucleus:structure, function, and dynamics. Annu. Rev. Biochem, 56, 535--566, 1987.

Watson J. D., Hopkins N. H.. Roberts J. W., Sleitz J. A., Weiner A. M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1987.

Цитированная

1. *Adolph K. W.,* ed. Chromosomes and Chromatin, Vols. 1-3. Boca Raton FL, CRC Press, 1988.
Felsenfeld G. DNA. Sci. Am., 253 (4), 58-67, 1985.
Hsu T.C. Human and Mammalian Cytogenetics:A Historical Perspective. New York, Springer-Verlag, 1979.
2. *Kacenoff R, Klotz L. C., Zimm B. H.* On the nature of chromosome-sized DNA molecules. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 1-8, 1974.
3. *Burke D. T., Carle G. F., Olson M. V.* Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. Science, 236, 806-812, 1987.
Murray A. W. Chromosome structure and behavior. Trends Biochem. Sci., 10, 112-115, 1985.
4. *Gall J. G.* Chromosome structure and the C-value paradox. J. Cell Biol., 91, 3s-14s,1981.
Ohta T., Kimura M. Functional organization of genetic material as a product of molecular evolution. Nature, 233, 118-119, 1971.
5. Mapping and Sequencing the Human Genome. Washington DC, National Academy Press, 1988.
Wilson A. C., Ochman H., Prager E. M., Molecular time scale for evolution. Trends Genet., 3, 241-247, 1987.
6. *Fried, M., Crothers D. M.* Equilibria and kinetics of lae-repressor-operator interaction by polyacrylamide gel electrophoresis. Nucleic Acids Res., 9, 6505-6525, 1981.
7. *Kadonaga J. T., Tjian R.* Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 5889-5893, 1986.
Rosenfeld P.J., Kelly T.J. Purification of nuclear factor I by DNA recognition site affinity chromafography. J. Biol. Chem., 261, 1398-1408, 1986.
Staudt L. M. et al. Cloning of a lymphoid-specific cDNA encoding a protein binding the regulatory octamer DNA motif. Science, 241, 577-580, 1988.
8. *Pabo C. T., Sauer R. T.* Protein-DNA interactions. Annu. Rev. Biochem., 53, 293-321, 1984. *Schief R.* DNA binding by proteins. Science, 241, 1182 1187, 1988.
9. *Ptashne M. A.* Genetic Switch: Gene Control and Phage Lambda. Palo Alto CA, Black well, 1986.
Takeda Y, Ohlendorf D.H., Anderson, W.F., Matthews R. W. DNA-binding proteins. Science, 221, 1020-1026, 1983.
10. *Berg 0. G., van Hippel P. H.* Selection of DNA binding sites by regulatory proteins. Trends Biochem. Sci., 13, 207-211, 1988.
von Hippel P.H., Bear D.G., Morgan W.D., McSwiggen J.A., Protein-nucleic acid interaction in transcription. Annu. Rev. Biochem., 53, 389-446, 1984.
11. *Dickerson R.E.* The DNA helix and how it is read. Sci. Am., 249(6). 94-111, 1983.
Drew H.R., McCall M.J., Callandine C.R. Recent studies of DNA in the crystal. Annu. Rev. Cell Biol,. 4, 1-20, 1988.
12. *Koo H. S., Crothers D. M.* Calibration of DNA curvature and a unified description of sequence-directed bending. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 1763-1767, 1988.
Lilley D. Bent molecules-how and why? Nature, 320, 487, 1986.
Marini J. C., Levene S. D., Crothers D. M., Englund P. T. Bent helical structure in kinetoplast DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7678-7682, 1982.
13. *Echols H.* Multiple DNA-protein interactions governing high-precision DNA transactions. Science, 233, 1050-1056, 1986.
Thompson J. F., de Vargas L. M., Koch C., Kahmann R., Landy A. Cellular factors couple recombination with growth phase: characterization of a new component in the lambda site-specific recombination pathway. Cell, 50, 901 -908, 1987.
14. *Isenberg I.* Histones. Annu. Rev. Biochem., 48, 159-191, 1979.
van Holt C. Histones in perspective. Bioessays, 3, 120-124, 1985.
Wells D. E. Compilation analysis of histones and histone genes. Nucleic Acids Res., 14, rll9-rl49, 1986.
Wu R. S., Panusz H. T., Hatch C. L., Banner W. M. Histones and their modifications. CRC Crit. Rev. Biochem., 20, 201-263, 1986.
15. Chromatin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., Vol. 42, 1978.
Kornberg R.D., Klug A. The nucleosome. Sci. Am., 244 (2), 52-64, 1981.
McGhee, J.D., Felsenfeld G. Nucleosome structure. Annu. Rev. Biochem., 49, 1115-1156, 1980.
Richmond T.J., Finch J.T., Rushton B., Rhodes D., Klug A. Structure of the nucleosome core particle at 7 A resolution. Nature, 311, 532-537, 1984.
16. *Simpson R. T.* Nucleosome positioning in vivo and in vitro. Bioessays, 4, 172-176, 1986. *Trovers A. A.* DNA bending and nucleosome positioning. Trends Biochem. Sci., 12, 108-112, 1987.

17. *Eissenberg J.C., Cartwright I.L., Thomas G.H., Elgin S.C.* Selected topics in chromatin structure. Annu. Rev. Genet., 19, 485-536, 1985.
Emerson B. M. Lewis C. D., Felsenfeld G. Interaction of specific nuclear factors with the nuclease-hypersensitive region of the chicken adult p-globin gene: nature of the binding domain. Cell 41, 21-30, 1985.
Gross D. S., Garrad W. T. Nuclease hypersensitive sites in chromatin. Annu. Rev. Biochem., 57, 159-198, 1988.
18. *Belmont A.S., Sedat J.W., Agard D.A.* A three-dimensional approach to mitotic chromosome structure: evidence for a complex hierarchial organization. J. Cell Biol., 105, 77-92, 1987.
Pederson D.S., Thoma F., Simpson R. Core particle, fiber, and transcriptionally active chromatine structure. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 117-147, 1986.
19. *Allan J., Hartman P. G., Crane-Robinson C., Aviles F. X. The structure ofhistone HI and its location in chromatin. Nature,* 288, 675-679, 1980.
Clark D.J., Thomas J.O. Salt-dependent cooperative interaction ofhistone HI with linear DNA. J. Moï. Biol., 187, 569-580, 1986.
Coles L.S., Robins A.J., Madley L.K. Wells J.R. Characterization of the chiken histone HI gene complement: generation of a complete set of vertebrate HI protein sequences. J. Biol. Chem, 262, 9656 9663, 1987.
Thoma F., Koller T., Klug A. Involvement of histone HI in the organization of the nucleosome and of the salt-dependent superstructures of chromatin. J. Cell Biol., 83, 403-427, 1979.
20. *De Bernardin W., Koller T., Sogo J. M.* Structure of in vivo transcribing chromatin as studied in simian virus 40 minichromosomes. J. Moï. Biol. 191, 469-482, 1986.
Losa R., Brown D.D. A bacteriphage RNA polymerase in vitro through a nucleosome core without displacing it. Cell, 50, 801-808, 1987.
21. *Benyajati C., Worcel A.* Isolation, characterization, and structure of the folded interphase genome of *Drosophila melanogaster.* Cell, 9, 393-408, 1976.
Gasser S. M., Laemmli U. K. A glimpse at chromosomal order. Trends Genet., 3, 16-22, 1987.
Schmid M. B. Structure and funcfion of the bacterial chromosome. Trends Biochem. Sci., 13, 131-135, 1988.
22. *Marsden M., Laemmli U. K.* Metaphase chromosome structure: evidence for a radial loop model. Cell, 17, 849-858, 1979.
Georgiev G.P., Nedospasov S.A., Bakaev V. V. Supranucleosomal levels of chromatin organization. In: The Cell Nucleus (H. Busch, ed.), Vol. 6, pp. 3-34. New York, Academic Press, 1978.
23. *Holmquist G.* DNA sequences in G-bands and R-bands. In: Chromosomes and Chromatin Structure (K.W. Adolph, ed.), Vol. 2, pp. 75-122. Boca Raton, FL, CRC Press, 1988.
Lewin B. Gene Expression, Vol. 2. Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 428-440, New York, Wiley, 1980.
24. Bostock C. J., Sumner A. T. The Eucaryotic Chromosome, pp. 347-374. Amsterdam, North-Holland, 1978. *Callan H.G.* Lampbrush chromosomes. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 214, 417-448, 1982.
Roth M.B., Gall J.G. Monoclonal antibodies that recognize transcription unit proteins on newt lampbrush chromosomes. J. Cell Biol., 105, 1047-1054, 1987.
25. *Agard D. A., Sedat J. W.* Three dimensional architecture of a polytene nucleus.Nature, 302, 676-681, 1983.
Beermann W. Chromosomes and genes. In: Developmental Studies on Giant Chromosomes (W. Beermann, ed.), pp. 1-33. New York, Springer-Verlag, 1972.
26. *Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., Richards G.* Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol, 38, 655-662, 1974.
Lamb M. M., Daneholt B., Characterization of active transcription units in Balbiani rings of *Chironomus tentans.* Cell, 17, 835-848, 1979.
27. *Bossy B., Hall L.M., Spierer P.* Genetic activity along 315 kb of the *Drosophila*chromosome. EMBO J., 3, 2537-2541, 1984.
Hill R.J., Rudkin G. Polytene chromosomes: the status of the band-interband question. Bioessays, 7, 35-40, 1987.
Judd B. H., Young M. W. An examination of the one cistron: one chromomere concept. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 573-579, 1974.
28. *Garel A., Zolan M., Axel R.* Genes transcribed at divers rates have a similar conformation in chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4867-4871, 1977.
Weintraub H., Groudine M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. Science, 193, 848-856, 1976.
Yaniv M., Cereghini S. Structure of transcriptionally active chromatin. CRC Crit. Rev. Biochem. 21, 1-26, 1986.
29. *Allis C.D. et al.* hvl is an evolutionary conserved H2A variant that is preferentially associated with active genes. J. Biol. Chem., 261, 1941-1948, 1986.

Dorbic T., Wittig B. Chromatin from transcribed genes contains HMG17 only downstream from the starting point of transcription. EMBO J., 6, 2393-2399, 1987.
Hebbes T.R., Thorne A. W., Crane-Robinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. EMBO J., 7, 1395-1402, 1988.
Rose S. M., Garrard W. T. Differentiation-dependent chromatin alterations precede and accompany transcription of immunoglobulin light chain genes. J. Biol. Chem., 259, 8534-8544, 1984.

30. *Brown S. W.* Heterochromatin. Science, 151, 417-425, 1966.
James T. C., Elgin S. C. R. Identification of a nonhistone chromosomal protein associated with heterochromatin in *Drosophila melanogaster* and its gene. Mol. Cell Biol., 6, 3862-3872, 1986.
Pimpinelli S., Bonaccorsi S., Gatti M., Sandier L. The peculiar genetic organization of *Drosophila* heterochromatin. Trends Genet., 2, 17-20, 1986.
31. *Hand R.* Eucaryotic DNA: organization of the genome for replication. Cell, 15, 317-325, 1978.
Huberman J. A., Riggs A. D. On the mechanism of DNA replication in mammalian chromosomes. J. Moï. Biol., 32, 327-341, 1968.
32. *Campbell J.* Eucaryotic DNA replication: yeast bares its ARSs. Trends Biochem. Sci., 13, 212-217, 1988.
Palzkill T. G., Newlon C. S. A yeast replication origin consists of multiple copies of a small conserved sequence. Cell, 53, 441-450, 1988.
Struhl K., Stinchcomb D. T., Sherer S., Davis R. W. High-frequency transformation of yeast: autonomous replication of hybrid DNA molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1035-1039, 1979.
33. *Dodson M., Dean F. B., Bullock P., Echols H, Hurwitz J.* Unwinding of duplex DNA from the SV40 origin of replication by T antigen. Science, 238, 964-967, 1987.
Li J. J., Kelly T.J. Simian virus 40 DNA replication in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6973-6977, 1984.
So *A. G., Downey K. M.* Mammalian DNA polymerases alpha and delta: current status in DNA replication. Biochemistry, 27, 4591-4595, 1988.
Stahl H, Droge P., Knippers R. DNA helicase activity of SV40 large T antigen. EMBO J. *5,* 1939-1944, 1986.
34. *Russev G., Hancock R.* Assembly of new histones into nucleosomes and their distribution in replicating chromatin. Proc. Natl. Acad Sci. USA, 79, 3143-3147, 1982.
Sariban E.R., Wu R.S., Erickson L.C., Banner W.M. Interrelationships of protein and DNA synthesis during replication in mammalian cells. Moï. Cell. Biol. 5, 1279-1286, 1985.
Weintraub H., Worcel A., Alberts B.M. A model for chromatin based upon two symmetrically paired half-nucleosomes. Cell, 9, 409-417, 1976.
Worcel A., Han S., Wong M. L. Assembly of newly replicated chromatin. Cell, 15, 969-977, 1978.
35. *Blackburn E. H., Szostak J. W.* The molecular structure of centromeres and telomeres. Annu. Rev. Biochem., 53, 163-194, 1984.
Greider C. W., Blackburn E. H. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. Cell, 51, 887-898, 1987.
36. *Stubblejield E.* Analysis of the replication pattern of Chiese hamster chromosomes using 5-bromodeoxyuridine supression of 33285 Hoechst fluorescence. Chromo-soma, 53, 209-221, 1975.
37. *Lima-de-Faria A., Jaworska H.* Late DNA synthesis in heterochromatin. Nature, 217, 138-142, 1968.
38. *Brown E. H., et al.* Rate of replication of the murine immunoglobulin heavy-chain locus: evidence that the region is part of a single replicon. Moï. Cell. Biol., 7, 450-457, 1987.
39. *Ca/lan H. G.* DNA Replications in the chromosomes of eukaryotes. Cold Sprind Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 195-203, 1974.
Kriegstein H.J., Hogness D.S. Mechanism of DNA replication in *Drosophila* chromosomes: structure of replication forks and evidence for bidirectionality. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 135-139,
1974.
Mechali M., Kearsey S. Lack of specific sequence requirement for DNA replication in *Xenopus* eggs compared with high sequence specifity in yeast. Cell, 38, 55-64, 1984.
40. *Blow J. J., Laskey R. A.* A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. Nature, 332, 546-548, 1998.
Harland R. Initiation of DNA replication in eukaryotic chromosomes. Trends Biochem. Sci. 6, 71-74, 1981.

Rao P. N.. Johnson R. T. Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. Nature, 225, 159-164, 1970.

41. *Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J.W., Steitz J.A., Weiner A.M.* Molecular Biology of the Gene, 4th ed. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1987. (Chapters 13, 20 and 21).
42. *Chamberlin M.* Bacterial DNA-dependent RNA polymerases. In: The Enzymes, 3rd ed. (P. Boyer, ed.), Vol. 15B, pp. 61-108, New York, Academic Press, 1982.
Greenblatt J., Li J. Interaction of the sigma factor and the *nusA* gene protein of *E.coli* with RNA polymerase in the initiation-termination cycle of transcription Cell, 24, 421-428, 1981.
McClure W. Mechanism and control of transcription initiation in prokaryotes. Annu. Rev. Biochem., 54, 171-204, 1985.
Yager T.D., van Hlppel P.H. Transcript elongation and termination in *E.coli.* In: *Escherichia coll* and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology (F.C. Neidhardt, ed.), pp. 1241-1275. Washington DC, American Society for Microbiology, 1987.
43. *Chambon P.* Eucaryotic nuclear RNA polymerases. Annu. Rev. Biochem., 44, 613-638, 1975.
Geiduschek E. P., Tocchim Valentini G.P. Transcription by RNA polymerase III. Annu. Rev. Biochem., 57, 873-914, 1988.
Sentenac A. Eucaryotic RNA polymerases. CRC Crit. Rev. Biochem., 18, 31-91, 1985.
Sollner-Webb B., Tower J. Transcription of cloned eucaryotic ribosomal RNA genes. Annu. Rev. Biochem,. 55, 801-830, 1986.
44. *Brown D. D.* The role of stable complexes that repress and activate eucaryotic genes. Cell, 37, 359-365, 1984.
Workman J. L., Roeder R. G., Binding of transcription factor TFIID to the major late promotor during in vitro nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA polymerase II. Cell, 51, 613-622, 1987.
45. *Foe V. E., Wilkinson L. E., Laird C. D.* Comparative organization of active transcription units in *Oncopeltus fasciatus.* Cell, 9, 131 146, 1976.
Hastie N.D., Bishop J.O. The expression of three abundance classes of mRNA in mouse tissues. Cell, 9, 761-774, 1976.
Lewin B. Gene Expression, Vol. 2. Eucaryotic Chromosomes, 2nd ed., pp. 708-719. New York, Wiley, 1980.
Miller 0. L. The nucleolus, chromosomes, and visualization of genetic activity. J. Cell Biol. 91, 15s-27s, 1981. (A review.)
46. *Birnstiel M. L., Busslinger M., Struh K.* Transcription termination and 3' processing: the end is in site! Cell, 41, 349-359, 1985.
Friedman D.I., Imperiale M.J., Adhya S.L. RNA 3' end formation in the control of gene expression. Annu. Rev. Genet., 21, 453-488, 1987.
Nevins J. R. The pathway of eukaryotic mRNA formation. Annu. Rev. Biochem. 52, 441-466, 1983.
Takagaki Y., Ryner L. C., Manley J. L. Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. Cell, 52, 731-742, 1988.
47. *Sisodia S.S., Sollner-Webb B., Cleveland D.W.* Specificity of RNA maturation pathways: RNAs transcribed by RNA polymerase III are not substrates for splicing or polyadenylation. Mol. Cell.. Biol., 7, 3602-3612, 1987.
Smale S. T., Tjian R. Transcription of herpes simplex virus tk sequences under the control of wild-type and mutant human RNA polymerase I promoters. Mol. Cell. Biol. 5, 352-362, 1985.
48. *Chambon P.* Split genes. Sci. Am. 244(5), 60-71, 1981.
Crick F. Split genes and RNA splicing. Science, 204, 264-271, 1979.
Darnell J. E., Jr. Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. Nature, 297, 365-371, 1982. *Perry R. P.* RNA processing comes of age. J. Cell Biol., 91, 28s-38s, 1981. (Includes a historical review.)
49. *Guthrie C., Patterson B.* Splice-ossomal snRNAs. Annu. Rev. Genet., 22, 387-419, 1988.
Dreyfuss G., Swanson M.S., Pinol-Roma S. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. Trends Biochem. Sci. 13, 86-91, 1988.
Osheim Y. N.. Miller O. L., *Beyer A. L.* RNP particles at splice junction sequences on *Drosophila* chorion transcripts. Cell, 43, 143-151, 1985.
Samarina O.P., Krichevskaya A.A., Georgiev G.P. Nuclear ribonucleoprotein particles containing messenger ribonucleic acid. Nature, 210, 1319-1322, 1966.
Steitz J.A., "Snurps". Sci. Am. 258 (6). 56-63, 1988.
50. *Edmonds M.* Branched RNA. Bioessays, 6, 22-216, 1987.
Maniatis T., Reed R. The role of small nuclear ribonucleoprotein particles in pre-mRNA splicing. Nature, 325, 673-678, 1987.

Padgett R. A., Grabowski P. J., Konarska M. M., Seller S., Sharp P. A. Splicing of mRNA precursors. Annu. Rev. Biochem. 55, 1119-1150, 1986.

51. *Aebi M., Weissman C.* Precision and orderliness in splicing. Trends Genet., 3, 102-107, 1987.
52. *Andreadis A., College M.E., Nadal-Ginard B.* Generation of protein isoform diversity by alternative splicing: mechanistic and biological implications. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 207-242, 1987.
53. *Orkin S. H., Kazazian H. H.* The mutation and polymorphism of the human p-globin gene and its surrounding DNA. Annu. Rev. Genet., **18,** 131-171, 1984.
54. *Cech T. R.* The generality of self-splicing RNA: relationship to nuclear RNA splicing. Cell, **44,** 207-210, 1986.
Ringertz N. et al. Computer analysis of the distribution of nuclear antigenes: studies on the spatial and functional organization of the interphase nucleus. J. Cell Sci. Suppl. 4, 11-28, 1986.
Warner J. Applying genetics to the splicing problem. Genes Dev., 1, 1-3, 1987.
56. *Long E. 0., Dawid I. B.* Repeated genes in eucaryotes. Annu. Rev. Biochem., 49, 727-764, 1980.
Miller O. L. The nucleolus, chromosomes and visualization of genetic activity. J. Cell Biol., **91,** 15s-27s, 1981.
57. *Hadjiolov A. A.* The Nucleolus and Ribosome Biogenesis. New York, Springer-Verlag, 1985.
Jordan E. G., Cullis C. A., eds. The Nucleolus. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1982.
Sommerville J. Nucleolar structure and ribosome biogenesis. Trends Biochem. Sci., **11,** 438-442, 1986.
58. *Anastassova-Kristeva M.* The nucleolar cycle in man. J. Cell Sci., 25, 103, 1977.
McClintock B. The relation of a particular chromosomal element to the develope-ment of the nucleoli in Zea Mays. Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat., 21, 294-323, 1934.
59. *Comings D.E.* Arrangement of chromatin in the nucleus. Hum. Genet., 53, 131-143, 1980.
Cremer T. et al. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. Hum. Genet., **60,** 46-56, 1980.
Hochstrasser M., Sedat J. W. Three-dimensional organization of *Drosophila melano-gaster* interphase nuclei. II. Chromosome spatial organization and gene regulation. J. Cell Biol., 104, 1471-1483, 1987.
Manuelidis L. Individual interphase chromosome domains revealed by in situ hubridization. Hum. Genet., 71, 288-293, 1985.
60. *Gasser S. M., Laemmli U. K.* A glimpse at chromosome order. Trends Genet., 3, 16-22, 1987.
Gerace L., Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 335-374, 1988.
Newport J. W., Forbes D. J. The nucleus: structure, function, and dynamics. Annu. Rev. Biochem., 56, 535-566, 1987.

10 Контроль генной экспрессии

ДНК любого организма кодирует все молекулы РНК и белков, которые входят в состав его клеток. Однако само по себе полное описание последовательности геномной ДНК, будь это несколько миллионов нуклеотидов, как у бактерии, или три миллиарда-у человека, мало говорит о том, как устроен этот организм. Геном можно сравнить со словарем, в котором содержатся все «слова», употребляемые данной особью. Однако понять логику построения организма, исходя из такого словаря не легче, чем написать пьесу Шекспира по словарю английского языка. Во всех случаях необходимо знать, как пользоваться словарными единицами, а число их возможных сочетаний столь велико, что составление самого словаря следует признать наиболее простой частью работы и лишь начальной ступенью в изучении данной проблемы.

Мы, конечно, еще весьма далеки от возможности «расписать» строение организма, исходя из последовательностей его генома. Для этого необходимо более глубокое понимание биологии клетки, понимание того, что делают тысячи больших и малых молекул после их синтеза. В данной главе обсуждается лишь одна из сторон этого вопроса. Мы рассмотрим правила, согласно которым определенные наборы генов избирательно активируются в каждой клетке. Будет показано, что механизмы контроля генной экспрессии действуют на самых разных уровнях, каждому из них посвящен отдельный раздел этой главы. Наконец, мы рассмотрим проблему возникновения сложной регуляторной системы генов. Однако начать следует с обзора некоторых основных принципов генетического контроля в высших организмах.

10.1. Стратегии генетического контроля

Морфология и функция у различных типов клеток, входящих в состав высшего организма, часто довольно сильно отличаются. Например, нейрон и лимфоцит млекопитающего так мало похожи друг на друга (см. рис. 13-29), что трудно себе представить их владельцами одного и того же генома. Столь большая разница между клетками дала основание для гипотезы, согласно которой гены в процессе дифферен-цировки клеток могут селективно утрачиваться. Однако теперь известно, что это не так; дифференцировка клеток определяется изменением экспрессии генов, а не их потерей.

10.1.1. В различных типах клеток многоклеточного организма содержится одинаковая ДНК [1]

Разные типы клеток многоклеточного организма отличаются друг от друга тем, что синтезируют и накапливают различные наборы молекул РНК и белков. Эти процессы происходят без необратимых изменений в ДНК. Лучшее доказательство сохранения генома при дифференцировке клеток получено в классических экспериментах на лягушке. Если



Рис. 10-1. Схема эксперимента, который может быть выполнен на различных растениях. Многие дифференцированные растительные клетки сохраняют способность к «дедифференцировке»: в определенных условиях они дают начало клону клеток, который может развиться в целый организм (см. гл. 20).

ядро полностью дифференцированной клетки лягушки ввести в ооцит, ядро которого удалено, инъецированное «донорное» ядро детерминирует развитие из реципиентной яйцеклетки нормального головастика. Поскольку у головастика имеются самые разные дифференцированные клетки, получившие свои последовательности ДНК из ядра исходной донорной клетки, можно сделать вывод, что дифференцированная клетка донора не потеряла никаких важных последовательностей ДНК. Аналогичный вывод следует и из опытов, проведенных на различных растениях. В этом случае кусочки дифференцированной ткани культивировали на искусственной среде, после чего эту ткань разделяли на отдельные клетки. Оказалось, что такая изолированная клетка способна регенерировать целое взрослое растение (рис. 10-1).

Другим доказательством того, что в ходе развития позвоночных большие блоки ДНК не теряются и не перестраиваются, служит следующий факт. Митотические хромосомы из разных типов клеток после специального окрашивания имеют одинаковую поперечную исчерченность (см. рис. 9-40). Если исходить из этого критерия, следует признать, что набор хромосом в дифференцированных клетках человеческого тела идентичен. Более того, при сравнении геномов различных клеток методами генной инженерии оказалось, что изменения в экспрессии генов, сопутствующие развитию многоклеточных организмов, как правило, не сопровождаются изменениями в последовательностях ДНК соответствующих генов (некоторые важные исключения приведены в разд. 18.4.2).

10.1.2. В различных типах клеток синтезируются разные наборы белков [2]

Чтобы понять механизм клеточной дифференцировки, прежде всего необходимо знать, насколько отличаются друг от друга разные типы клеток. Полный ответ на этот фундаментальный вопрос еще не получен, но определенные выводы уже сделаны.

1. Существует множество процессов, общих для всех клеток, и, следовательно, все клетки имеют много одинаковых белков. Часть таких белков содержится в больших количествах и легко поддается анализу. Среди них основные структурные белки цитоскелета и хромосом, некоторые белки, входящие в состав эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи, рибосомные белки и так далее. Многие белки, встречающиеся реже, например, различные ферменты, участвующие в основных реакциях метаболизма, также присутствуют во всех типах клеток.

2. Некоторые белки обнаруживаются в больших количествах лишь в специализированных клетках, а в других типах клеток их нельзя выявить даже самыми чувствительными методами. Например, гемоглобин имеется только в эритроцитах.

3. Если методом двумерного электрофореза в полиакриламидном геле сравнить примерно 2000 наиболее часто встречающихся белков (т. е.

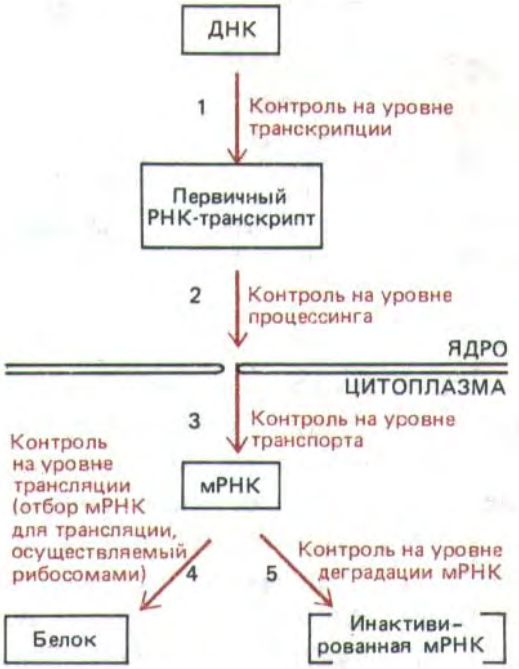


Рис. 10-2. Пять уровней контроля генной экспрессии у эукариот. После синтеза белка его активность может контролироваться за счет регулируемой деградации (G), обратимых модификаций (например, фосфорилирования) и путем перемещения молекулы белка в определенное место клетки.

белков, содержащихся в количестве 50000 молекул на клетку) в различных типах клеток, то выявляется довольно мало отличий, Проводится ли сравнение двух клеточных линий, выращенных в культуре (например, мышечные и нервные клетки), или клеток двух дифференцированных тканей грызунов (например, печени и легкого), результат оказывается сходным. Большинство белков синтезируется во всех исследованных типах клеток, причем эффективность синтеза различается в зависимости от типа клеток не более, чем в пять раз. Лишь для нескольких процентов белков эта закономерность не соблюдается.

Судя по имеющемуся числу различных последовательностей мРНК, типичная клетка высших организмов синтезирует от 10000 до 20000 разных белков (см. табл. 9-2), многие из которых присутствуют в настолько низкой концентрации, что их не удается обнаружить даже с помощью двумерного гель-электрофореза. Если эти минорные белки в разных клетках различаются в такой же степени, как и белки, относящиеся к более обильным классам, следует признать, что относительно небольшие изменения в спектре синтезируемых клеткой белков способны очень сильно изменять все ее поведение и структуру.

10-3

10.1.3. Экспрессия гена может регулироваться на каждом этапе пути от ДНК к РНК и к белку [3]

Если различия между клетками разных типов обусловлены тем, какие белки экспрессируются в них, важно знать, на каком уровне осуществляется контроль белкового синтеза. На пути, ведущем от ДНК к белку, этот контроль может реализоваться практически на любом этапе (рис. 10-2). Основными «контрольными точками» могут служить: 1) время и характер транскрипции данного гена **(контроль на уровне транскрипции),** 2) характер процессинга первичного РНК-транскрипта **(контроль ва уровне процессинга),** 3) отбор в ядре зрелых мРНК, предназначенных для экспорта в цитоплазму **(контроль на уровне транспорта),** 4) отбор в цитоплазме мРНК для трансляции на рибосомах **(контроль на** уровне **трансляции),** 5) избирательная дестабилизация определенных типов мРНК в цитоплазме **(контроль на уровне деградации** мРНК), 6} селективная активация, инактивация или компартментация молекул белка после их синтеза **(контроль на уровне активности** белка).

Для большинства генов наиболее важен контроль на уровне транскрипции. Первые данные о той роли, которую играет контроль на уровне транскрипции в развитии позвоночных, были получены при сравнении молекул мРНК печени с мРНК мозга. Некоторые из этих РНК присутствовали только в клетках печени. С помощью кДНК-зон-дов показано, что в клетках мозга нет не только соответствующих мРНК, но также и первичных транскриптов, из которых она образовывалась. Для того, чтобы убедиться в этом, из клеток печени и мозга выделяли ядра, а затем их инкубировали с высоко радиоактивными

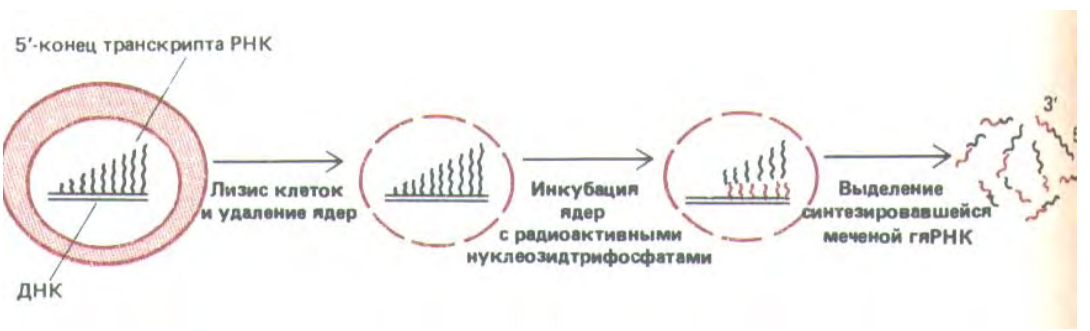


Рис. 10-3. Получение радиоактивно меченной гяРНК. Молекулы РНК-полимеразы после введения метки и лизиса клетки продолжают элонгацию тех же молекул РНК in vitro, при этом исследователь получает высокоактивный препарат тех последовательностей, которые транскрибируются в клетке *(первичные транскрипты РНК).*



Рис. 10-4. Схема стандартного метода выявления радиоактивно меченных молекул РНК, имеющих определенную нуклеотидную последовательность. В том случае, если молекулы РНК могут образовать гибридный РНК/ДНК дуплекс с од-ноцепочечным фрагментом ДНК, используемым в качестве специфического зонда, эти молекулы остаются неповрежденными в процессе нуклеазной обработки и легко обнаруживаются по радиоактивной *метке.* В экспериментах, описанных в тексте, очищенные сегменты ДНК, соответствующие разным генам, были получены с помощью клонирования молекул кДНК, которые, в свою очередь, были синтезированы путем обратной транскрипции суммарной мРНК печени. Каждый из этих фрагментов ДНК использовали в качестве зонда в отдельном эксперименте (см. рис. 10-5).

РНК-предшественниками (рибонуклеозидтрифосфатами). В результате все РНК-транскрипты, синтезированные за это время, оказывались радиоактивно меченными. Этот процесс, известный под названием «продолжающегося синтеза в ядре», схематически представлен на рис. 10-3. Меченые молекулы РНК затем тщательно анализировали (рис. 10-4 и 10-5). Достоверно показано, что в гяРНК клеток мозга нет участков гомологии с какой-либо из 11 различных мРНК, специфичных для клеток печени. В этих опытах гяРНК из клеток печени служила положительным контролем, поскольку она заведомо содержит последовательности, гибридизующиеся с кДНК печени. Отсутствие мРНК, специфичных для печени (и следовательно, кодируемых ими белков) в цитоплазме клеток мозга можно отнести в первую очередь за счет блокирования транскрипции соответствующих генов в этих клетках. Другими словами, данные о случайно отобранных специфичных для печени мРНК, свидетельствуют о том, что различия между клетками печени и мозга контролируются в основном на уровне транскрипции.

10-4

10.1.4. Белки-регуляторы могут либо активировать, либо подавлять транскрипцию генов

Клетки эукариот содержат большое количество сайт-специфических ДНК-связывающих белков, основная функция которых состоит во включении или выключении генов. Каждый из этих **белков-регуляторов,** присутствующих в количестве нескольких копий на клетку (~ I молекула на 3000 нуклеосом или 10^4 копий на клетку млекопитающего), узнает определенные последовательности ДНК, длиной 8-15 нуклеоти-дов. Присоединение таких белков к ДНК может либо вызвать транскрипцию расположенного рядом гена **(позитивная регуляция),** либо подавить ее **(негативная регуляция)** (рис. 10-6). Далее мы расскажем о некоторых механизмах, участвующих в этих процессах (см. разд. 10.2.7). Различные типы клеток многоклеточного организма обладают разными белками-регуляторами, в результате каждый тип клеток транскрибирует свой собственный набор генов.

10.1.5. Комбинации нескольких регуляторных белков, контролирующих активность генов, могут определять развитие многих типов клеток [4]

Принципиальная схема **комбинационной регуляции активвости гена** приведена на рис. 10-7, где каждый пронумерованный элемент соответствует отдельному белку-регулятору. На этой чисто гипотетичной схеме одна материнская клетка дает начало двум типам клеток А и В, различающимся лишь тем, что в одной из них происходит синтез регуляторного белка 1, а в другой-нет. В ходе дальнейшего развития этих клеток в некоторых из них появляются регуляторные белки 2 и 3, а затем 4 и 5. В результате формируются 8 типов клеток (они обозначены буквами от G до N), характеризующиеся различными сочетаниями пяти регуляторных белков. Добавление к приведенной схеме еще двух белков-регуляторов (6 и 7) повлечет за собой образование на следующей стадии 16 типов клеток. Еще 10 подобных стадий в сумме дадут 10000 различных клеточных типов-и все это за счет взаимодействия только 25 регуляторных белков.

Таким образом, комбинационная регуляция активности гена весьма эффективна: малое число регулирующих элементов может детерминировать нормирование сложных биологических объектов В гл. 16 будет показано, как эта система функционирует в ходе развития

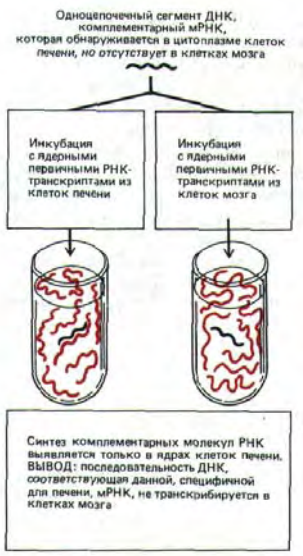


Рис. 10-5. Схема эксперимента, демонстрирующего, что экспрессия генов в клетках млекопитающих контролируется главным образом на уровне транскрипции (см. рис. 10-4).

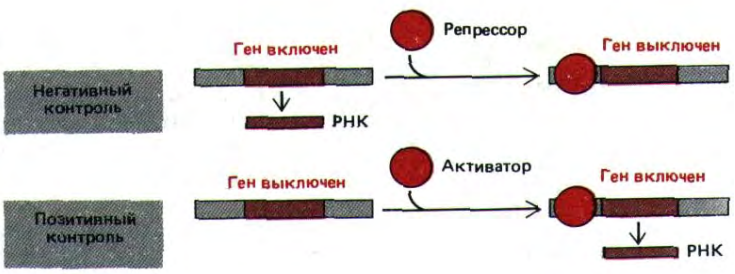


Рис. 10-6. Сравнение позитивной и негативной регуляции. В данном примере показан контроль на уровне транскрипции, однако те же два типа контроля могут быть задействованы на любом из этапов регуляции, представленных на рис. 10-2.

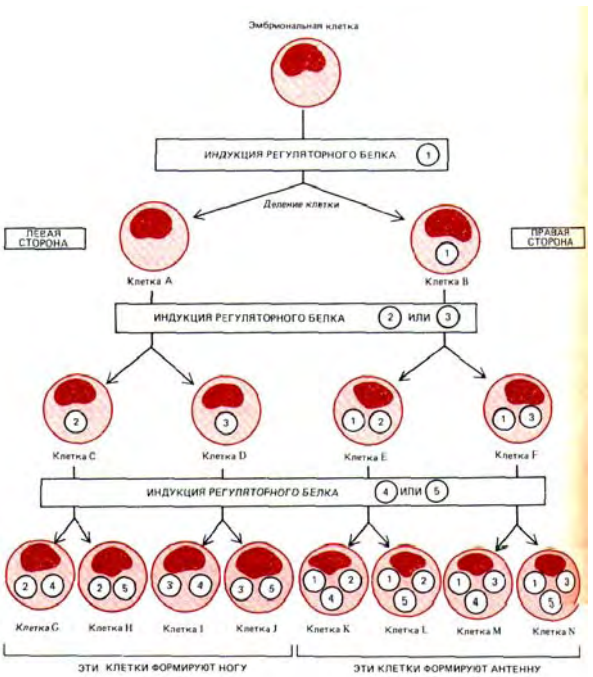


Рис. 10-7. Упрощенная схема дифференцировки клеток эмбриона, иллюстрирующая, каким образом разные комбинации небольшого числа белков-регуляторов могут обеспечить возникновение клеток многих типов.

Эта предельно упрощенная схема предполагает, что после каждого деления происходит выбор в пользу синтеза какого-либо одного из двух белков-регуляторов (обозначенных пронумерованными кружочками). При этом сообразно занимаемой условной позиции дочерние клетки, отходящие влево относительно общего плана строения эмбриона (и относительно страницы этой книги), всегда индуцируют синтез белков с четными номерами, тогда как дочерние клетки, отходящие вправо-синтез белков с нечетными номерами. Считается, что синтез каждого белка-регулятора - самоподдерживающийся процесс (см. рис. 10-33 и 10-35). Таким образом, клетки разрастающегося клона будут содержать все увеличивающееся число различных белков-регуляторов, каждый из которых контролирует целую «батарею» генов.

зародыша дрозофилы. Набор регуляторных генов определяет последовательное подразделение эмбриона на отличающиеся друг от друга участки (см. разд. 16.5.5).

10.1.6. Активность гена обычно зависит от действия нескольких регуляторных белков [5]

На первый взгляд схема комбинационной регуляции активности генов, представленная на рис. 10-7, дает основание для вывода о постепенно накапливающихся различиях между клетками последующих поколений. Например, можно предположить, что добавление регуляторного белка 2 к клеткам С и Е приведет к появлению в этих клетках одного и того же набора дополнительных белков (тех, которые кодируются генами, активируемыми белком-регулятором 2). Подобная точка зрения неверна по очень простой причине. Комбинационная регуляция гена гораздо сложнее этой схемы потому, что различные регуляторные белки взаимодействуют друг с другом. Даже у бактерий для включения одного-единственного гена иногда бывает необходимо взаимодействие двух различных регуляторных белков (см. разд. 10.2.2). У высших эукариот транскрипция какого-либо гена обычно требует совместного действия целого кластера активаторных белков (см. разд. 10.2.9). Например, белок 2 при взаимодействии с активаторным белком 1 может включать в клетке Е иной набор генов, нежели тот, который он включает в клетке С. По-видимому, именно поэтому единственный белок-рецептор стероидного гормона (пример белка-регулятора) в различных типах клеток млекопитающих определяет синтез разных наборов белка (см. разд. 12.2.2). В целом, специфические изменения в экспрессии гена, возникающие в результате синтеза регуляторного белка, зависят от предыстории клеток, так как именно эти предыдущие события и определяют, какие белки-регуляторы уже имеются в клетке (рис. 10-8).

10.1.7. Главные белки-регуляторы активируют сразу много генов [6]

Как отмечалось ранее, в клетке содержится много регуляторных белков, каждый из которых, действуя в комбинации с другими белками этого класса, контролирует многочисленные гены. Вероятно, существует разветвленная схема взаимодействий белков, согласно которой каждый

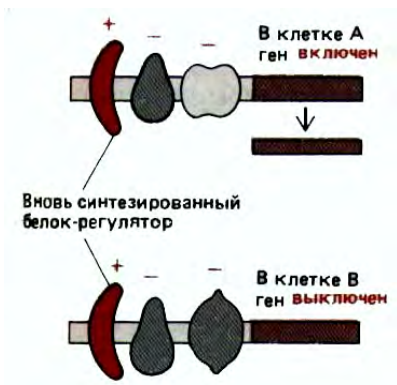


Рис. 10-8. Воздействие вновь синтезированных белков-регуляторов на клетку. Подобное воздействие зависит от того, какие белки-регуляторы уже имеются в клетке и, следовательно, от ее предыстории. На схеме один и тот же ген изображен в клетках А и В. Изначально этот ген в обеих клетках выключен. Однако в клетке А продуцируется белок, изображенный крайним слева и отсутствующий в клетке В. Для простоты принимается, что каждый белок-регулятор либо положительно, либо отрицательно воздействует на транскрипцию, которая определяется их совместным воздействием. В действительности же общее воздействие не обязательно осуществляется по принципу аддитивности. Например, в некоторых случаях два белка-регулятора при связывании с ДНК взаимодействуют друг с другом, причем происходит изменение активности каждого из них.

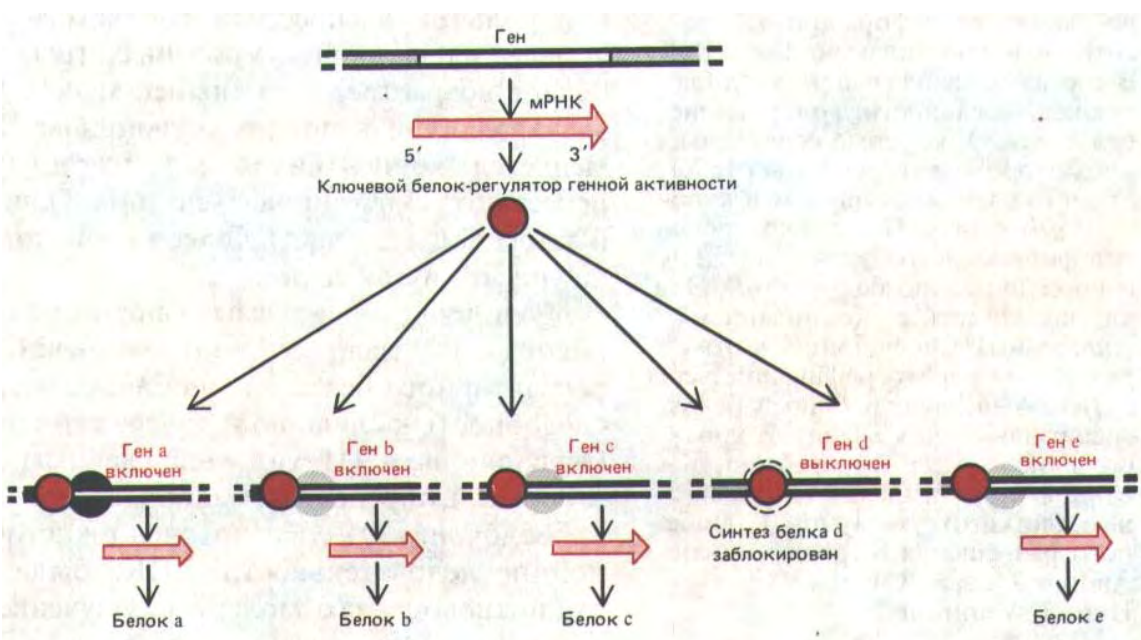


Рис. 10-9. Схема, иллюстрирующая, как «решение» синтезировать один-единственный главный белок-регулятор может воздействовать на образование самых разных белков в клетке.

из регуляторных белков контролирует гены, кодирующие другие белки-регуляторы и так далее.

Однако не все регуляторные белки равны. Некоторые из них (главные белки-регуляторы) обладают решающим, координирующим действием на активность многих генов (рис. 10-9). Например, в гл. 16 будет показано, как ряд мутаций одного-единственного гена у Drosophila превращает одну часть тела мухи в другую. Мутации, вызывающие подобные изменения, известны под названием гомеотических (или гомеозисных). Одна из таких мутаций, названная Antennapedia, обусловливает синтез абберантного главного белка-регулятора. В результате целая группа клеток, в норме образующих антенну, коренным образом меняет свое поведение и формирует ногу; в итоге на свет появляется муха с растущей на голове ногой. О существовании главных регуляторных белков у позвоночных (включая человека) может свидетельствовать следующий факт. Отсутствие одного-единственного белка (рецептора стероидного гормона тестостерона) приводит к тому, что эмбрион с мужским генотипом (XY) развивается в фенотипически почти нормальную женщину (см. разд. 12.2.3). Прямое доказательство участия главных регуляторных белков в развитии позвоночных получено недавно при исследовании клеток скелетной мышцы.

10-5

10.1.8. Один-единственный главный белок-регулятор может превратить фибробласт в миобласт [7]

Клетка скелетной мышцы млекопитающих обычно очень велика и содержит много ядер. Она образуется в результате слияния многих клеток-предшественников, называемых миобластами (см. разд. 17.6.1). Зрелая мышечная клетка отличается от других клеток большим числом присущих только ей белков, включая специфические типы актина, миозина, тропомиозина и тропонина (входящих в состав сократительного аппарата), креатинфосфокиназу (обеспечивающую специализированный метаболизм мышечной клетки) и ацетилхолиновые рецепторы (необходимые для того, чтобы мембрана была чувствительна к нейростимуляции). В пролиферирующих миобластах такие специфичные для мышц белки и соответствующие им мРНК отсутствуют либо обнаруживаются в очень небольших количествах. По мере слияния миобластов в образующихся клетках одновременно увеличивается концентрация мышечно-специфичных белков и их мРНК. Следовательно, контроль за экспрессией соответствующих генов осуществляется на уровне транскрипции. Уровень синтеза многих специфичных для мышцы белков возрастает по меньшей мере в 500 раз. С помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле показано, что одновременно меняется концентрация многих других белков: некоторые из них перестают синтезироваться, продукция других достигает максимума и затем падает, у части белков происходит сдвиг с одного уровня синтеза на другой и так далее.

Если в культивируемые фибробласты кожи (клетки, которые в норме никогда не экспрессируют мышечно-специфичные гены) ввести ген регуляторного белка из миобласта (myo D1), такие клетки приобретают способность к слиянию и другие свойства мышечных клеток (рис. 10-10). Очевидно myo D1 является главным регуляторным белком, который в норме и определяет «миобласт».

Белок myo D1 сосредоточен в клеточном ядре. Исходя из нуклеотидной последовательности ДНК, была определена последовательность аминокислот в его молекуле. Изучение белка myo D1 показало, что он

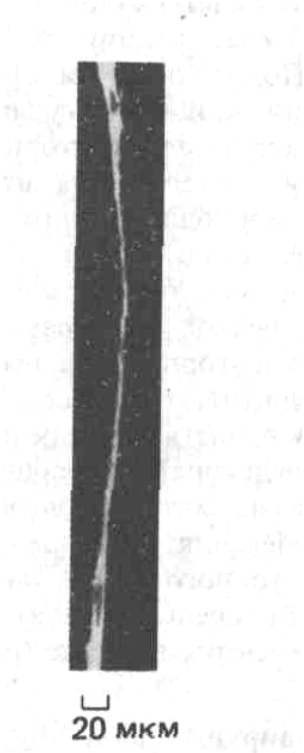


Рис. 10-10. Иммунофлуоресцентная микрофотография фибробластов кожи куриного эмбриона, превратившихся в клетки мышц при экспрессии в них гена myoD1, которая была вызвана искусственным путем. Эти фибробласты выращивали в культуре и за три дня до съемки трансформировали рекомбинантной плазмидной ДНК. В состав этой плазмиды входили последовательности, кодирующие белок myoD, которые соединены с промотором/энхансером вирусного происхождения, активным в куриных эмбрионах. Несколько процентов фибробластов включало ДНК и продуцировало белок myoD. Эти клетки слились с образованием удлиненных миофибрилл, которые на этой фотографии помечены антителами, выявляющими белок, специфичный для мышц. В контрольной культуре, трансфицированной другой плазмидой, мышечные клетки отсутствуют. (С любезного разрешения Stephen Tapscott, Andrew Lassar, Robert Davis и Harold Weintraub.)

связывается с регуляторними участками генов, специфичных для мышц. Свойства этого замечательного белка подтверждает предположение о том, что главные регуляторные белки способны детерминировать превращение клеток.

Заключение

У многоклеточных организмов дифференцировка клеток происходит в результате экспрессии разных генов одного и того же генома, хотя типы клеток на удивление мало отличаются друг от друга по содержанию белков. Экспрессия большинства генов контролируется на уровне транскрипции, что не исключает существенной роли посттранскрипционного контроля. Контроль на уровне транскрипции зависит от регуляторных белков, связывающихся с определенными последовательностями ДНК. В результате присоединения таких белков соответствующие гены либо включаются (позитивный контроль) либо выключаются (негативный контроль). Гены высших эукариот обычно регулируются путем комбинационного воздействия нескольких белков-регуляторов, осуществляющих позитивный и негативный контроль. Главные регуляторные белки играют в системе регуляции активности генов особую роль благодаря тому, что они влияют на активность сразу многих генов: например, экспрессия гена myo D1 может превратить фибробласт в миобласт.

10.2. Контроль инициации транскрипции [8]

Всего лишь 40 лет назад мысль о том, что ген можно включать или выключать, казалась абсурдной. Гипотеза, сыгравшая такую важную роль в понимании работы клеток, была выдвинута на основании изучения E. coli, растущей на смеси глюкозы и лактозы (дисахарид). Если бактерии предоставляли выбор источника углерода, она сначала использовала всю глюкозу и лишь затем начинала метаболизировать лактозу. Переключение на лактозу сопровождалось остановкой роста, в течение которой синтезировался фермент β-галактозидаза, гидролизирующий лактозу до глюкозы и галактозы. Выделение и характеристика мутантных бактерий, обладающих определенными дефектами в регуляции такого переключения, дало толчок биохимическим исследованиям, которые в 1966 г. привели к идентификации и выделению белка-репрессора лактозного оперона.

В результате биохимического и генетического изучения белка-репрессора лактозного оперона, репрессора бактериофага лямбда, а также других регуляторных белков у бактерий была сформулирована общая модель регуляции транскрипции у прокариот. Предполагалось, что сайт-специфические белки либо ингибируют, либо стимулируют транскрипцию какого-либо гена, присоединяясь к ДНК рядом с промотором-участком, с которого РНК-полимераза начинает синтез РНК. Считали, что изменение в положении таких регуляторных белков по отношению к ДНК (связывание или отсоединение) включает и выключает гены.

В течение многих лет оставалось неизвестным, можно ли применять эту модель контроля генетической активности к клеткам эукариот. Известно, что ДНК эукариотической клетки упакована с помощью гистоновых белков в нуклеосомы, масса которых равна массе ДНК. Присутствие нуклеосом предполагает существование каких-то иных путей регуляции генов. Об этом же свидетельствует и тот факт, что у эукариот регуляторные белки часто связываются в участках, удаленных на тысячи нуклеотидных пар от промотора, на который они

действуют. Возможности изучения механизма регуляции генов эукариот были ограничены главным образом из-за того, что большинство белков-регуляторов присутствует в клетке в очень малых количествах (примерно один из 50000 молекул белка). Только в 1983 г. удалось охарактеризовать два необычно многочисленных (и, возможно, нетипичных) белка -регулятора - большой Т-антиген вируса SV40 и фактор транскрипции TF1IIA гена 5S-рРНК.

В последнее время ситуация в корне изменилась. Благодаря новым методам генной инженерии для биохимического и генетического анализа стало доступным большое число белков-регуляторов эукариот. Кроме того, у бактерий были выявлены белки-регуляторы, осуществляющие свое действие на расстоянии. Данный раздел посвящен тому общему, что объединяет механизмы регуляции транскрипции генов у прокариот и у эукариот. Процессы, которые могут оказаться характерными только для эукариот, мы обсудим позднее в связи с проблемой дифференцировки клеток (см. разд. 10.3.8).

10-8

10.2.1. Белки-репрессоры бактерий связываются вблизи промоторов и подавляют транскрипцию определенных генов [9]

Хромосома E, coli состоит из единственной кольцевой молекулы ДНК, насчитывающей ~ 4,7 x 10^6 нуклеотидных пар. В принципе такого количества достаточно для кодирования примерно 4000 различных белков, однако в конкретный момент времени в клетке синтезируется лишь определенная часть этих белков. Экспрессия многих генов E.coli зависит от внутриклеточного уровня специфических метаболитов.

Изучение генетического контроля утилизации лактозы в клетках E. coli привело исследователей к выводу о существовании белка-репрессора, который в отсутствие лактозы в среде выключает синтез β-галактозидазы. Выделение, очистка этого белка и использование его в опытах in vitro позволили расшифровать механизм такой регуляции. Оказалось, что репрессор ингибирует транскрипцию lac-оперона, связываясь с так называемым оператором - последовательностью ДНК длиной 21 нуклеотид, которая перекрывается с расположенным по соседству участком связывания РНК-полимеразы (промотором). До тех пор, пока репрессор

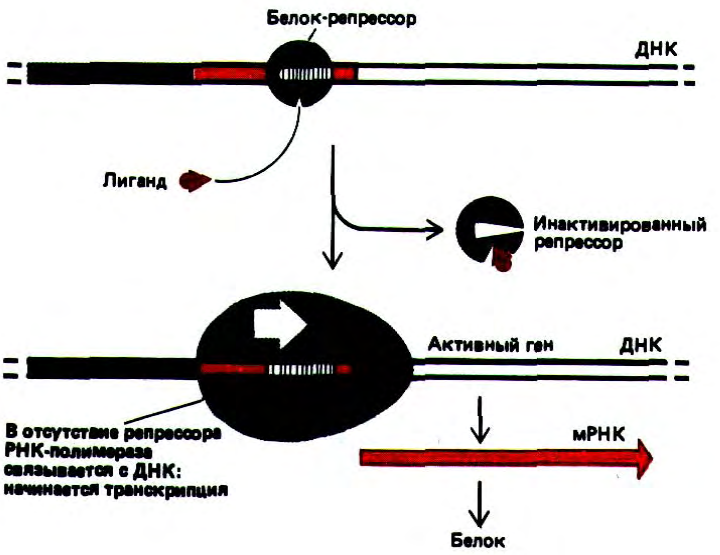


Рис. 10-11. Схема дерепрессии у бактерий. Небольшая специфическая молекула связывается с белком-репрессором, в результате чего происходит изменение его конформации и отделение от ДНК, при этом расположенные рядом гены могут начать транскрибироваться. В случае примера, описанного в тексте, аллолактоза связывается с белком-репрессором лактозного оперона, в результате чего синтезируется единственный транскрипт РНК, кодирующий три белка, которые участвуют в метаболизме лактозы (β-галактозидаза, галакто-зидпермеаза и галактозидацетилаза). Поскольку три гена, кодирующие эти белки, расположены рядом друг с другом и их регуляция осуществляется строго координирование, кластер этих генов называют лактозным опероном.

остается связанным с оператором, доступ РНК-полимеразы к ее участку связывания закрыт и транскрипция близлежащих областей ДНК не происходит (см. рис. 10-14).

Белок-репрессор лактозного оперона отвечает за то, чтобы уровень синтеза β-галактозидазы - фермента, необходимого для расщепления лактозы, соответствовал потребностям клетки. Лактозный репрессор в свою очередь находится под контролем небольшой углеводной молекулы аллолактозы, которая образуется в клетке в присутствии лактозы. Когда внутриклеточное содержание аллолактозы достигает достаточно высокого уровня, она, выполняя функцию аллостерического регулятора, индуцирует конформационные изменения в молекуле репрессора. При этом его связь с ДНК ослабляется настолько, что он отделяется от нее, освобождая промотор и давая возможность РНК-полимеразе транскрибировать прилежащие области ДНК. В этом случае говорят о дерепрессии гена. Такая система регуляции позволяет E.coli производить фермент, необходимый для расщепления лактозы, лишь тогда, когда это необходимо (рис. 10-11).

В настоящее время известно много других примеров специфической репрессии бактериальных генов. В каждом случае связывание белка-репрессора с определенной последовательностью ДНК приводит к выключению гена. Процесс связывания всегда регулируется определенными сигнальными молекулами, аналогичными аллолактозе. Иногда, как в случае репрессора лактозного оперона, присутствие сигнальных молекул в клетке включает ген или единицу транскрипции, уменьшая сродство белка-репрессора к определенной последовательности ДНК. Но сигнальная молекула может использоваться и для выключения гена с помощью белка-репрессора. Например, аллостерическое изменение, вызванное связыванием сигнальной молекулы с репрессором, может повысить, а не понизить способность репрессора связываться с определенной последовательностью ДНК. Такой механизм действует в случае контроля активности пяти расположенных рядом генов, которые кодируют ферменты, необходимые для синтеза триптофана в клетках E.coli (trp-оперон). Синтез единственной длинной молекулы мРНК, кодирующей эти пять белков, контролируется белком-репрессором, который «садится» на ДНК лишь в том случае, если он связан с триптофаном (сигнальная молекула, включающая этот оперон) (рис. 10-12).

В случае lac-оперона повышение концентрации сигнальных молекул

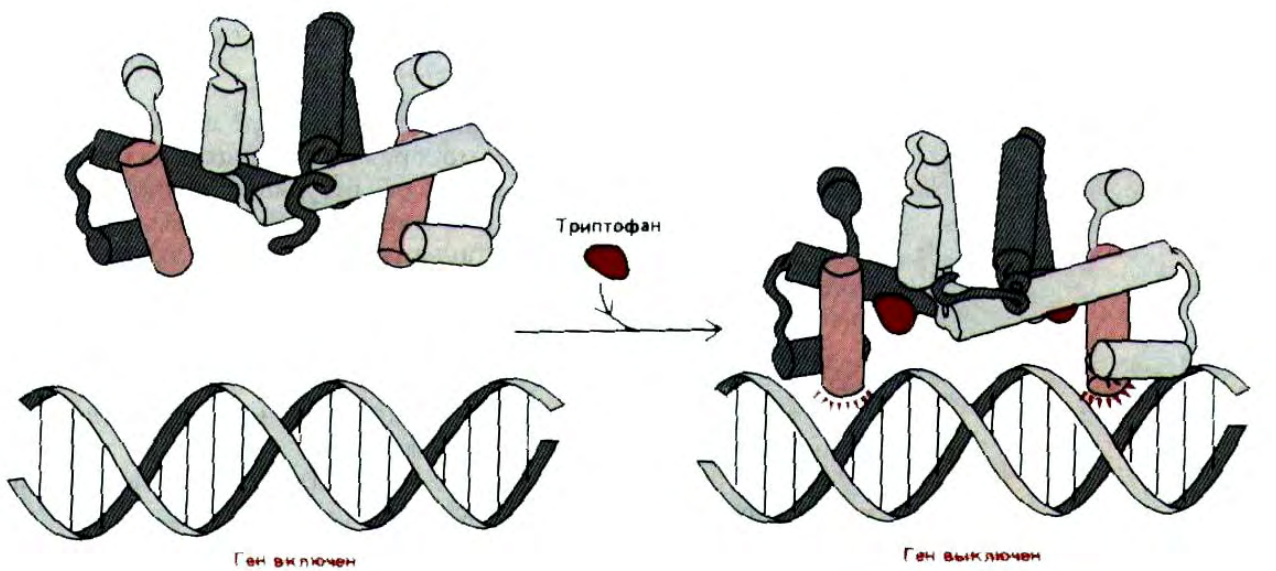


Рис. 10-12. Соединение триптофана с белком-репрессором триптофанового оперона изменяет конформацию репрессора. Конформационные изменения дают возможность этому регуляторному белку тесно связываться со специфической последовательностью ДНК, и, таким образом, блокировать транскрипцию генов, которые кодируют белки, участвующие в синтезе триптофана (trp-оперон). Трехмерная структура этого бактериального белка (спираль-виток-спираль) определена с помощью метода рассеивания рентгеновских лучей и показана как в случае связывания триптофана, так и без него. Связывание триптофана приводит к увеличению расстояния между двумя узнающими спиралями (цветные цилиндры) в димере, что способствует образованию симметрично расположенных водородных связей, изображенных на схеме в виде цветных лучей. (По R. Zhang et al., Nature, 327: 591-597, 1987.)

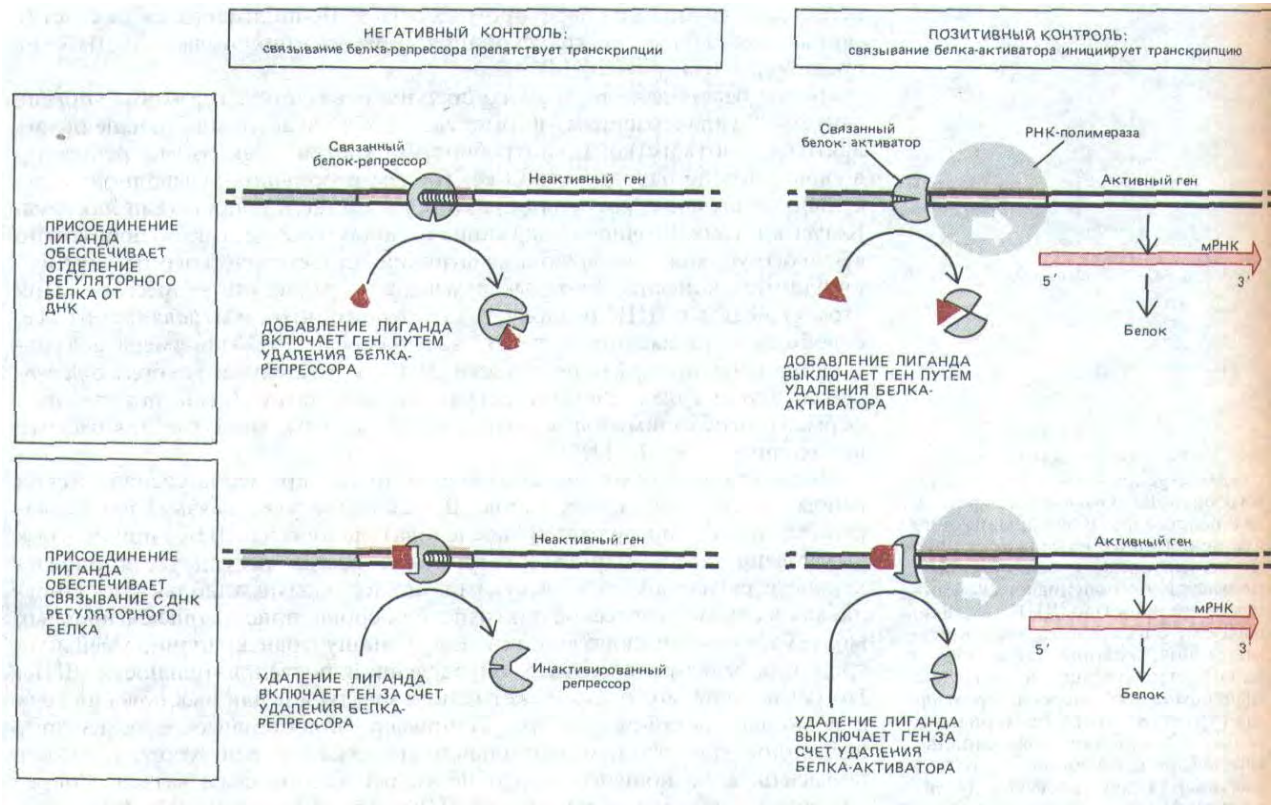


Рис. 10-13. Обобщенная схема различных механизмов, с помощью которых специфические регуляторные белки контролируют транскрипцию генов у прокариот. А. Негативный контроль; Б. Позитивный контроль. Обратите внимание, что лиганд-индуктор может включить ген, либо обеспечивая удаление белка-репрессора (слева вверху), либо способствуя присоединению к ДНК белка-активитора (справа внизу). Аналогичным образом лиганд-ингибитор может выключить ген как путем удаления белка-активатора (справа вверху), так и путем связывания белка-репрессора с ДНК (слева внизу).

способствует освобождению ДНК от репрессора и активации транскрипции, а в случае trp-оперона вызывает связывание репрессора с ДНК и, таким образом, подавляет транскрипцию. Следует, однако, подчеркнуть, что оба описанных механизма в принципе одинаковы: и в том, и в другом случае транскрипция осуществляется в отсутствие регуляторного белка. Генетический контроль такого типа называется негативной регуляцией (рис. 10-13, А).

10-10

10.2.2. Бактериальный белок-активатор взаимодействует с РНК-полимеразой и способствует инициации транскрипции [10]

В случае негативной регуляции белок-рецептор связывается с участком, расположенным рядом с промотором, и подавляет активность РНК-полимеразы. Альтернативный способ регуляции генной активности основан на действии белков-активаторов, усиливающих активность РНК-полимеразы. У E. coli такая позитивная регуляция играет важную роль в активации транскрипционных единиц, обладающих относительно слабыми промоторами, которые сами по себе плохо связываются с полимеразой. Присоединение белка-активатора к специфической последовательности ДНК, расположенной недалеко от промотора, облегчает «посадку» РНК-полимеразы, что в конечном итоге приводит к повышению вероятности транскрипции.

Несмотря на разницу в действии белков-активаторов и белков-репрессоров, по многим свойствам они близки. Более того, оказалось, что определенные бактериальные белки-регуляторы способны функ-

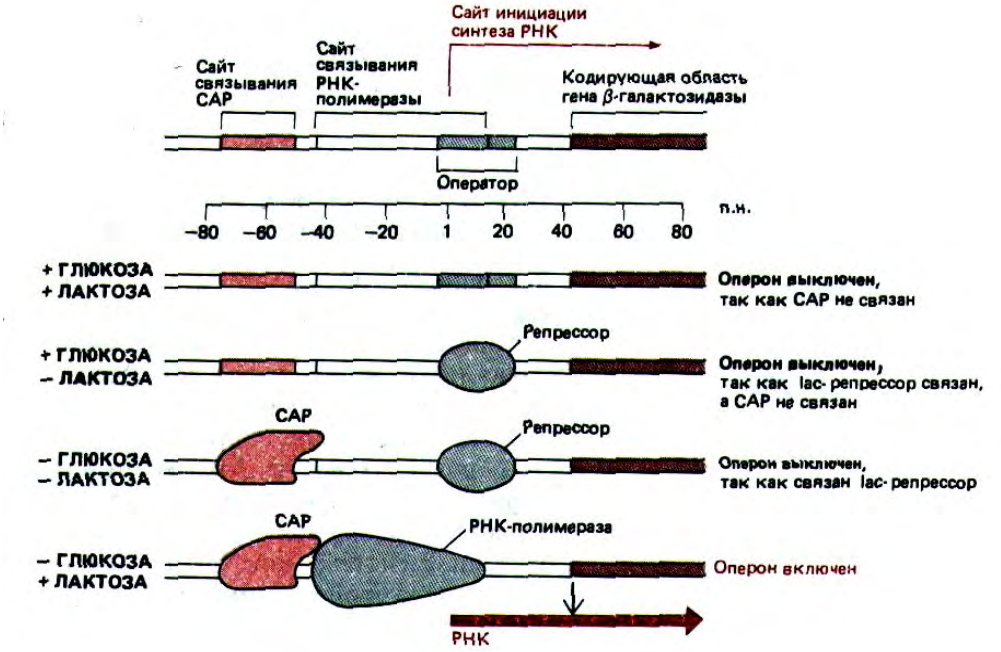


Рис. 10-14. Концентрация глюкозы и лактозы контролирует инициацию транскрипции lac-оперона путем воздействия на белок-репрессор лактозного оперона и САР. При добавлении лактозы происходит увеличение концентрации аллолактозы, которая удаляет белок-репрессор с ДНК (см. рис. 10-11). Добавление глюкозы вызывает уменьшение концентрации cAMP, и поскольку cAMP больше не связывается с САР, этот активаторный белок отделяется от ДНК, выключая таким образом оперон. Связывающие сайты и белки изображены в масштабе. Как показано на схеме, полагают, что САР соприкасается с полимеразой, что помогает ей начать синтез РНК.

ционировать и как репрессоры, и как активаторы: они связываются с различными сайтами и в некоторых из них подавляют транскрипцию, а в других активируют. Активаторы, как и репрессоры, часто соединяются со специфическими сигнальными лигандами, которые либо повышают, либо понижают их сродство к ДНК, и таким путем, соответственно, включают или выключают гены. Такая регуляция транскрипционной активности генов носит название позитивной регуляции, поскольку эффективность синтеза РНК повышается в присутствии регуляторного белка (рис. 10-13, Б),

Наиболее изученный пример белка-актива тора - белок-активатор катаболизма (САР) E. coli. Этот белок позволяет бактерии использовать альтернативные источники углерода, если глюкоза - основной его источник, отсутствует.

В случае lac-оперона взаимодействие репрессора и САР-белка обусловливает характерную картину экспрессии гена. Как отмечалось выше, в присутствии лактозы аллолактоза разъединяет репрессор и ДНК. Однако этого оказывается недостаточно для активации транскрипции lac-оперона, в связи с тем, что его промотор лишь отдаленно напоминает консенсусную последовательность промоторов E. coli и, следовательно, обладает очень слабым сродством к РНК-полимеразе. Для транскрипции с этого промотора необходимо, чтобы его связывание с РНК-полимеразой было дополнено присоединением САР-белка на участке, расположенном прямо перед промотором (рис. 10-14). Такая же ситуация характерна для промоторов многих генов, участвующих в метаболизме Сахаров.

Связывание ДНК с САР регулируется глюкозой, это приводит к тому, что другие источники углерода используются клеткой только в отсутствие глюкозы. Недостаток глюкозы обусловливает повышение внутриклеточной концентрации cAMP, выполняющего роль сигнальной молекулы у бактерий и у эукариот. При связывании cAMP с САР-белком последний меняет свою конформацию, в результате чего приобретает способность присоединяться к определенной последовательности ДНК и активировать транскрипцию близлежащих генов. Если глюкозы много, уровень cAMP падает, его молекула отделяется от САР-белка,

который при этом превращается в неактивную форму, не способную более связываться с ДНК; в результате клетка переключается на утилизацию глюкозы (см. рис. 10-14).

10-9

10.2.3. Изменения в фосфорилировании белков могут влиять на активность генов [11]

Все ранние работы по белкам-репрессорам были выполнены на бактериях. Выяснилось, что и у лактозного, и у триптофанового оперона активность этих белков контролируется посредством обратимого связывания небольших специфических молекул. В клетках эукариот белки-регуляторы тоже находятся под контролем небольших сигнальных молекул, таких, например, как cAMP. Эти молекулы осуществляют свое воздействие непрямым путем, влияя на фосфорилирование и дефосфорилирование белка. Хотя у бактерий фосфорилирование не играет такой важной роли в регуляции, и у них существует одна хорошо изученная система контроля, зависящая от фосфорилирования белков. На примере этой системы мы рассмотрим некоторые аспекты регуляции генов, знание которых способствует пониманию более сложной системы регуляции высших эукариот.

Известно, что у бактерий родственные белки контролируют азотный и фосфатный обмен, синтез белков мембраны, хемотаксис и споруляцию. Здесь будет рассмотрен азотный обмен у E. coli, в котором синтез ряда белков усиливается при нехватке азота. К таким белкам относится глутаминсинтетаза - фермент, играющий наиболее важную роль в усвоении азота и катализирующий реакцию: глутаминовая кислота + аммиак → глутамин.

В активации генов азотного обмена участвует два основных регуляторных компонента: белок ntrC, активирующий белок, способный включать гены лишь тогда, когда он фосфорилирован (ntrC-фосфат), и белок ntr B, который может либо фосфорилировать (благодаря своей киназной активности), либо дефосфорилировать (благодаря своей фосфатазной активности) белок ntrC. Фосфорилирование ntrC происходит в ходе реакций, запускающихся снижением уровня азота, при этом остатки уридинмонофосфата (UMP) присоединяются к регуляторной субъединице ntr B. Такая модификация повышает относительную киназную активность фермента ntr B.

Потребность в азоте определяется соотношением α-кетоглутарата и глутамина, повышение этого показателя стимулирует фосфорилирование ntr C и, таким образом индуцирует транскрипцию гена глутаминсинтетазы (рис. 10-15). Аналогичные цепочки реакций модификации белков происходят и в клетках эукариот, они тоже приводят к фосфорилированию или дефосфорилированию белков-регуляторов, хотя детали этого процесса изучены гораздо хуже.

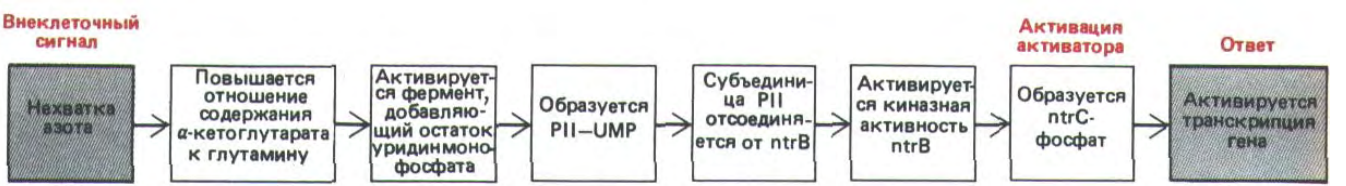


Рис. 10-15. Часть регуляторного каскада, который при нехватке азота активирует гены, участвующие в метаболизме азота у бактерий. Белок P II служит регуляторной субъединицей белка ntrB. Преимущество подобной многоступенчатой регуляции состоит в том, что она может вызывать значительные изменения в метаболизме в ответ на относительно небольшие изменения в содержании азота. Побочные ответвления этой цепи также обратимо модифицируют другие ферменты, контролируя их каталитическую активность в ответ на изменения концентрации азота.

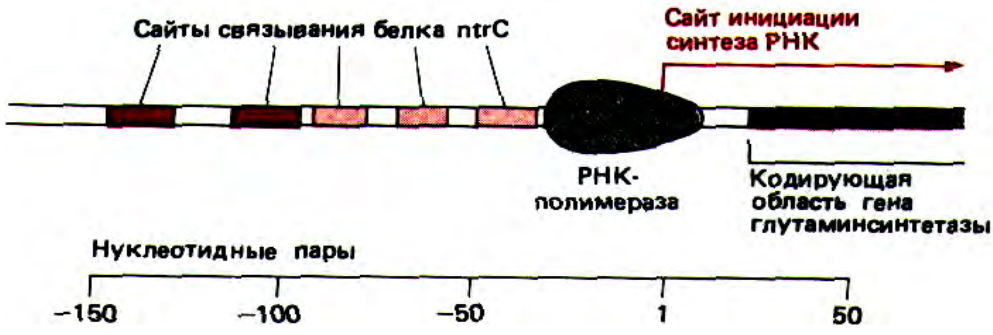


Рис. 10-16. Регуляторная область бактериального гена глутамин-синтетазы. Глутамин-синтетаза катализирует реакцию глутаминовая кислота + аммиак → глутамин. Два ярко окрашенных на рисунке сайта связывают белок ntrC особенно сильно и необходимы для активации транскрипции.

10-10

10.2.4. Гибкость ДНК позволяет регуляторным белкам, связывающимся с отдаленными участками, влиять на транскрипцию генов [11, 12]

Только что описанная двухкомпонентная регулирующая система у бактерий имеет много общего с системой контроля эукариотических генов. Дело в том, что в ДНК существует два сильных участка связывания для белка ntrC, которые расположены на расстоянии 100 или более нуклеотидных пар перед промотором гена глутаминсинтетазы (рис. 10-16). В фосфорилированной форме ntrC (ntrC-фосфат) связывается с ними, и эти два сайти эффективно стимулируют транскрипцию. Более того, стимуляция наблюдается, даже если эти участки «отодвинуть» (методами генетической инженерии) от промотора более чем на ТОО нуклеотидных пар.

Если в отношении прокариот такое «действие на расстоянии» нельзя назвать чем-то необычным, а отношении эукариот этот феномен следует признать широкораспространенным. У прокариот имеется надежное доказательство того, что белки, связавшиеся с отдаленными участками ДНК, действуют по преимуществу так же, как и белки, присоединенные к соседним областям. Например, белок nlrC усиливает способность РНК-полимеразы связываться с промотором и образовывать открытый инициаторный комплекс (см. рис. 9-65). Разделяющая эти сайты ДНК формирует петлю, что позволяет белкам, связавшимся в отдаленных участках, взаимодействовать с полимеразой (рис. 10-17). Такое взаимодействие происходит довольно легко, поскольку ДНК действует как «ограничитель» и белок, связавшийся даже на расстоянии нескольких тысяч нуклеотидных пар, постоянно сталкивается с промотором (рис. 10-18).

10.2.5. Различные сигма-факторы позволяют бактериальной РНК-полимеразе узнавать разные промоторы [11, 13]

В гл. 9 шла речь о том, что у бактерий существует еще один тип контроля генной активности на уровне транскрипции. При обсуждении строения бактериальной РНК-полимеразы отмечалось, что одна из составляющих ее пяти основных полипептидных цепей-сигма (δ) фактор - функционирует как фактор инициации. Этот фактор отделяется от ДНК в гот момент, когда полимераза начинает синтез РНК (см. разд. 9.4.1). У бактерий консенсусная последовательность транскрибируемого промотора узнается основной формой РНК-полимеразы, содержащей субъединицу δ70. Однако существуют и минорные формы полимераз, в состав которых входят δ-субъединицы, узнающие другие последовательности промотора. Например, субъединица δ54 является продуктом гена ntrA и наряду с белками ntr B и ntr C необходима именно для

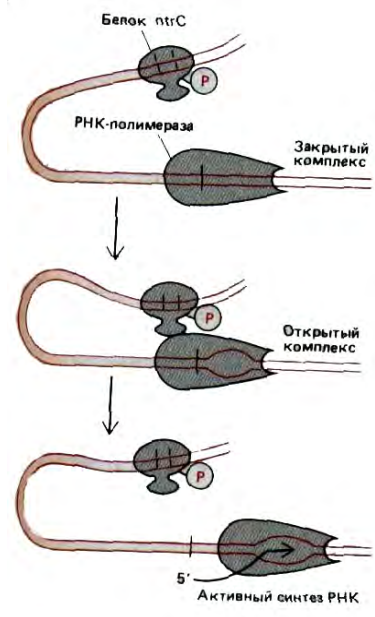


Рис. 10-17. Схема энхансерного воздействия белка ntrC на синтез РНК гена глутамин-синтетазы E. coli. Связываясь с расположенными перед геном последовательностями ДНК, этот регуляторный белок повышает скорость транскрипции РНК-полимеразой. Хотя белок присоединяется к этим сайтам даже когда он не фосфорилирован, лишь фосфорилированная форма (ntrC-фосфат) может активировать транскрипцию. Вероятно, для функционирования белка необходимы контакты с полимеразой, которые увеличивают присущую этому ферменту способность раскручивать ДНК и образовывать открытый комплекс (см. рис. 9-65), как показано на рисунке (см. рис. 10-18).

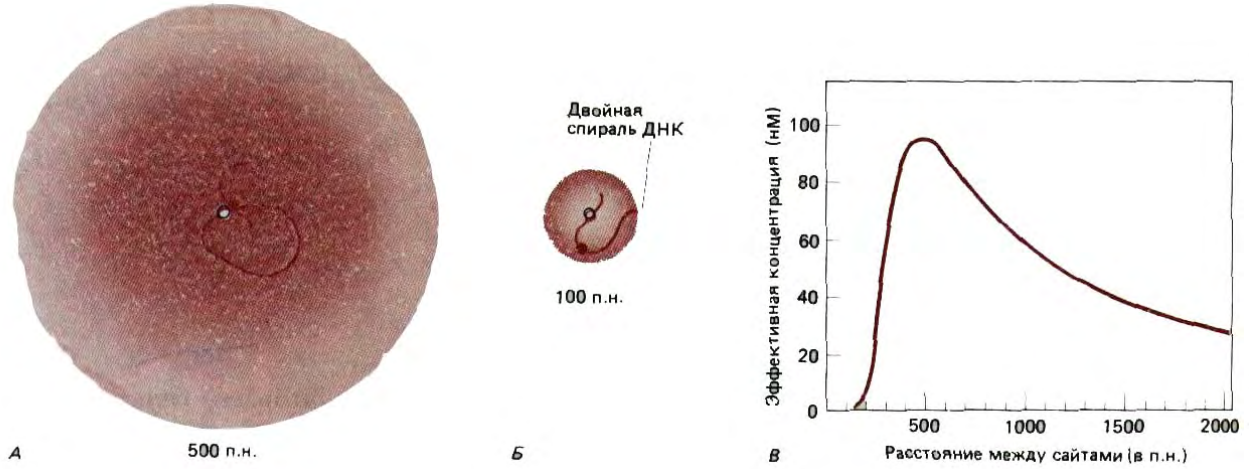


Рис. 10-18. Присоединение двух белков к отдельным сайтам на двойной спирали ДНК может в значительной мере повысить вероятность их взаимодействия. А. Связывание белков с помощью петли ДНК размером 500 нуклеотидных пар повышает частоту их сталкивания. Интенсивность цвета отражает вероятность того, что окрашенный белок будет располагаться в каждой из точек пространства, окружающего белок, обозначенный белым кружочком. Б. Гибкость ДНК такова, что обычная последовательность образует плавный изгиб под углом 90° (изогнутый виток) примерно один раз на каждые 200 нуклеотидных пар. Следовательно, если два белка разделены всего лишь 100 нуклеотидными парами, их контакты относительно ограничены. В таких случаях взаимодействие белков облегчается, если они расположены на одной и той же стороне спирали ДНК (содержащей 10 нуклеотидов на виток). В. Эффективность концентрации окрашенного белка в сайте связывания белого белка как функция разделяющего их расстояния. (С любезного разрешения Gregory Bellomy, по M.C. Mossing and M.T. Record, Science 233: 889-892, 1986.)

транскрипции гена глутаминсинтетазы. Вполне возможно, что изменения в окружающей среде могут включать специфический набор генов благодаря синтезу определенного сигма-фактора.

Как отличить фактор инициации РНК-полимеразы, например, δ54, влияющий на узнавание промотора, от белка-регулятора, такого например, как ntrC? Один из подходов к решению этой задачи основан на том, что δ-факторы прочно соединяются с РНК-полимеразой, но сами по себе не способны связаться с определенными последовательностями ДНК. В отличие от них белки-регуляторы связываются именно с ДНК, но не с РНК-полимеразой. Другой подход учитывает тот факт, что в определенный момент времени с молекулой РНК-полимеразы объединяется лишь одна σ-субъединица. Меняя соотношение известного σ-фактора, например σ70, и испытуемого белка в опытах по транскрипции in vitro, можно прийти к определенному выводу. Если σ70 подавляет транскрипцию пропорционально этому соотношению (кон-



Рис. 10-19. Механизм, посредством которого белки контролируют инициацию транскрипции РНК в бактериальных клетках. Белки могут воздействовать либо стимулируя, либо блокируя ряд стадий, необходимых для начала продуктивного синтеза РНК (см. рис. 9-65). Механизм (Г) был впервые открыт при изучении арабинозного оперона E. coli. Он представляет собой комбинацию механизмов А и Б, и это единственный из четырех механизмов, до сих пор не обсуждавшийся в тексте. Данный вариант будет разобран ниже на примере эукариот (см. рис. 10-27).

курентное подавление), то исследуемый белок выполняет функцию σ-субъединицы.

Основные типы механизмов, регулирующих инициацию транскрипции генов у бактерий, представлены на рис. 10-19. Бактериальные системы будут рассмотрены и при обсуждении того, как при конкурентном взаимодействии между белками-регуляторами, может осуществляться молекулярное переключение.

10-11

10.2.6. Потребность в общих факторах транскрипции приводит к появлению дополнительных элементов в системе контроля транскрипции эукариотических генов [14]

Транскрипция у эукариот - гораздо более сложный процесс, чем транскрипция в прокариотических клетках. Три РНК-полимеразы эукариот (полимеразы I, II и III) эволюционно родственны ферменту бактерий, но содержат большее число субъединиц. До сих пор эти ферментативные комплексы охарактеризованы неполностью. Кроме того, бактериальная полимераза узнает последовательность ДНК, а эукариотический фермент обычно ориентируется на комплекс ДНК-белок, образуемый факторами транскрипции.

Здесь и дальше в этом разделе мы будем в основном рассматривать РНК-полимеразу II, синтезирующую все предшественники мРНК. Важной частью комплекса ДНК—белок, который узнается этой полимеразой, является ТАТА-фактор, известный также как фактор транскрипции IID(TFIID). Этот белок связывается с консенсусной последовательностью «ТАТА-боксом»-ТАТААА. Обычно эта последовательность расположена на участке — 25 - — 30 по отношению к сайту инициации транскрипции. Для многих генов, кодирующих белки, положение этой последовательности очень важно как для активности промотора, так и для точного определения сайта инициации цепи РНК. Подобно белкам-регуляторам, ТАТА-фактор представляет собой белок, специфически связывающийся с ДНК. Так как этот белок необходим для транскрипции большинства (а возможно и всех) генов, транскрибируемых полимеразой II, считают, что он служит составной частью общего механизма транскрипции, а не является белком-регулятором. Результаты опытов, проведенных in vitro, свидетельствуют о том, что после связывания ТАТА-фактора с ДНК в области промотора, этот фактор обычно остается в составе стабильного транскрипционного комплекса, участвующего в многократных циклах транскрипции, осуществляемой РНК-полимеразой II (см. рис. 9-69).

Представляется вероятным, что все механизмы, используемые бактерией для контроля активности РНК-полимеразы, реализуются и в эукариотических клетках (см. рис. 10-19). Однако образование стабильного транскрипционного комплекса на ДНК с участием ТАТА-фактора несомненно усложняет регуляцию генов у эукариот. На основании опытов in vitro можно сделать вывод, что основная функция некоторых активирующих белков у эукариот состоит в том, что они помогают ТАТА-фактору соединиться с ДНК в области промотора.

10-11

10.2.7. Большинство генов эукариот находится под контролем промоторов и энхансеров [15]

Методы генной инженерии значительно расширили наши возможности при изучении генов эукариот. Исследователь может по своему усмот-

рению перестроить нуклеотидную последовательность любого фрагмента ДНК, получить множество копий этой последовательности и присоединить ее к любому другому гену, создав, таким образом, новый ген. Для того, чтобы судить о функции сконструированного гена, его либо вводят путем трансфекции в культивируемые клетки, либо (что гораздо сложнее) получают трансгенное животное, у которого этот ген стабильно включился в одну из хромосом.

Использование всех этих методик позволило идентифицировать регуляторные области эукариотических генов даже в отсутствие каких-либо прямых данных о связывающихся с ними белках-регуляторах. Оказалось, что участок ДНК вблизи сайта инициации синтеза РНК чрезвычайно важен для успешной транскрипции (элемент, расположенный перед промотором). Обычно он насчитывает в длину около 100 нуклеотидных пар и включает в себя ТАТА-бокс. Еще большее удивление вызвал тот факт, что для эффективной транскрипции нужны последовательности, довольно значительно удаленные от промотора (энхансеры). Как и в случае сайта связывания белка ntrC у бактерий, энхансеры у эукариот воздействуют на транскрипцию, находясь на расстоянии.

Первый изученный энхансер представляет собой небольшой фрагмент генома вируса SV40, усиливающий транскрипцию вирусных генов, продукт которых необходим на ранних стадиях инфекции. В 1981 г. было показано, что если к гену -глобина присоединить этот небольшой фрагмент вируса, то уровень транскрипции гена β-глобина повышается более чем в 100 раз. Меняя положение и ориентацию этого участка вируса SV40, удалось сформулировать следующие выводы. Энхансер - это регуляторная последовательность ДНК, которая:

1) активирует транскрипцию со связанного с ней промотора, причем транскрипция начинается с обычного сайта инициации синтеза РНК;

2) действует в двух ориентациях (нормальная или инвертированная);

3) оказывает влияние, находясь на расстоянии более 100 нуклеотидных пар в обе стороны от промотора.

В настоящее время известно, что в регуляции большинства генов высших эукариот участвуют элементы, расположенные непосредственно перед промотором, и один или два энхансера, лежащие вдали от сайта инициации синтеза РНК (см. рис. 10-22, А). Хотя обычно энхансеры находятся на расстоянии нескольких тысяч нуклеотидных пар от регулируемого ими промотора, некоторые из них могут быть удалены более чем на 20000 нуклеотидных пар. Как энхансеры, так и элементы, расположенные перед промотором, соединяются с сайт-специфическими ДНК-связывающими белками, которые и опосредуют их действие. Часть этих регуляторных белков, по-видимому, присутствует во всех тканях, тогда как другие обнаруживаются только в определенных типах клеток.

10-11

10.2.8. Большинство энхансеров и элементов, расположенных перед промотором, - это последовательности, которые связывают белки, участвующие в комбинационном контроле [15, 16]

Активность каждого энхансера и элемента, расположенного перед промотором, обычно направлена на участок последовательности длиной от 100 до 200 нуклеотидных пар. Элемент такого размера содержит сайты связывания многих белков, и, как правило, может быть разделен методами генетической инженерии на меньшие, частично сохраняющие активность фрагменты ДНК. Функционирование обоих типов регуляторных последовательностей зависит от связывания специфических бел-



Рис. 10-20. А, Конструирование ряда мутантов по регуляторной области путем олигонуклеотиднаправленного мутагенеза. У каждого мутанта изменен блок из четырех нуклеотидных пар. Таким образом, для изучения 108 нуклеотидов в энхансере β-глобина необходимо получить 27 последовательных мутантов. Б. Встраивание мутантного энхансера β-глобина в специальную тест-плазмиду. Олигонуклеотид и клонирующий сайт «сшиваются» ДНК-лигазой. Белок, образуемый рекомбинантным геном, представляет собой бактериальный фермент хлорамфениколацетилтрансферазу (САТ), активность которого легко определить. В. Исследование мутантных энхансеров по их воздействию на синтез РНК. Синтез РНК измеряется косвенным образом по количеству белка, образуемого рекомбинантным геном (т. е. по активности САТ).

ков и потому часто ограничено тем типом клеток, в которых эти белки имеются. Лишь некоторые регуляторные элементы (такие, как энхансер вируса SV40) могут проявлять активность почти во всех клетках. Большинство энхансеров характеризуются ярко выраженной специфичностью и активны в клетках, экспрессирующих именно тот ген, с которым они обычно связаны. Примером может служить энхансер гена β-глобина курицы.

Энхансер β-глобина курицы расположен позади транскрипционной единицы β-глобина. В последовательных поколениях эритроцитов (и только в них), он образует гиперчувствительный к нуклеазе сайт. Этот факт свидетельствует о том, что в эритроцитах с энхансером связаны белки-регуляторы. Для того чтобы идентифицировать их, следует определить, какая именно последовательность нуклеотидов необходима для проявления активности энхансера. Для этого мутантные последовательности энхансера объединяли с маркерным геном. Продукт такого гена легко определить; это дает возможность судить о влиянии любой мутации энхансера на транскрипцию: каждую рекомбинантную конструкцию вводили в эритроциты курицы и регистрировали эффективность экспрессии гена-маркера (рис. 10-20). Те нуклеотиды, которые при таком тестировании оказываются необходимыми для активности энхансера, можно считать участками связывания специфических белков. С помощью данной методики было установлено, что таких белков-три (рис. 10-21). Содержание каждого из них в клетке очень мало, но благодаря тому, что сайты их связывания известны, можно клонировать кодирующие последовательности ДНК и, следовательно, получать эти регуляторные белки в неограниченном количестве (см. разд. 9.1.7).

Результаты, полученные при изучении энхансеров и элементов, лежащих перед промотором, позволили сформулировать следующие выводы.

1. Регуляторные элементы имеют модульное строение и состоят из серии определенных последовательностей нуклеотидов. Каждая такая серия содержит по 8-15 нуклеотидов и соединяется с соответствующей ей серией белков-регуляторов. Некоторые из этих белков присутствуют лишь в отдельных типах клеток, но есть и такие, которые присущи клеткам всех типов,

2. Существуют белки-регуляторы, связывание которых способствует активации транскрипции, другая группа регуляторных белков, напротив, подавляет транскрипцию. Общее воздействие регуляторного элемента зависит от комбинации связавшихся белков, а для каждого отдельного элемента эффект может меняться по мере развития клетки. Например, энхансер способен не только активировать, но и подавлять транскрипцию (см. рис. 10-22, Б). Таким образом, первоначальное название, данное этим элементам, не совсем верно отражает их функцию.

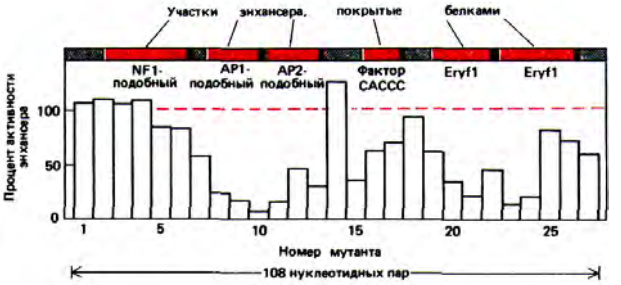


Рис. 10-21. Сопоставление данных по активности мутантного энхансера, описанного на рис. 10-20, В с расположением сайтов связывания белков с нормальным энхансером. Цветные полоски на рисунке соответствуют частям нормальной последовательности энхансера, которые закрываются указанными белками. Эти данные получены при смешивании нормальной последовательности энхансера с экстрактами эритроцитов курицы и последующем анализе смеси методами электрофореза и футпринтинга. Активность выражена как «процент активности энхансера»: цифра 100 означает, что данный мутант стимулирует синтез РНК также, как и нормальный энхансер; 0-синтез РНК не превышает транскрипцию в отсутствие энхансера. Результаты показывают, что наибольший вклад в стимуляцию транскрипции энхансером дают белки API-подобный, AP2-подобный и Eryfl, однако по отдельности ни один из этих белков не может обеспечить полноценную активность энхансера (рис. 10-23).

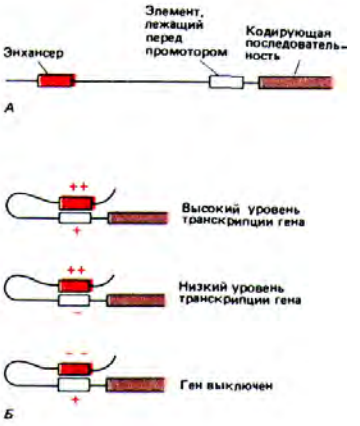


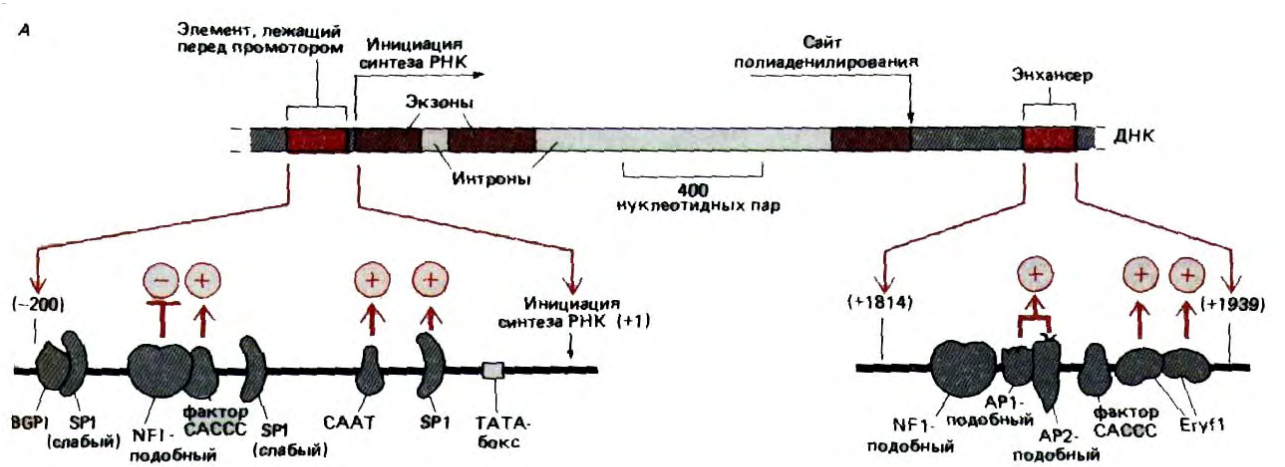
Рис. 10-22. Транскрипционная активность гена определяется совместным действием белков-регуляторов, связанных с элементом, расположенным перед промотором, и белков, связанных с энхансером. А. Типичное расположение двух типов регуляторных элементов относительно кодирующей последовательности. Б. Примеры совместного действия белков, связанных с этими двумя элементами. В зависимости от того, какие белки связались, каждый отдельный элемент в данном примере обладает либо слабым положительным (+), либо сильным положительным (+ +), либо слабым отрицательным (—), либо сильным отрицательным (— —) действием, как это показано на рисунке.

Таблица 10-1. Некоторые хорошо охарактеризованные белки-регуляторы млекопитающих и соответствующие специфические сайты связывания с ДНК.

Название белка	Масса белка. кДа[1)]	Сайт связывания с ДНК[2)]	Примечания
jun (или AP1)	36	TGANTCA ACTNAGT	Продукт протоонкогена, который может связываться с белком fos, продуктом другого протоонкогена. Активность индуцируется С-киназой; родственные белки, кодируемые множественными генами
AP2	48	CCCCAGGC GGGGTCCG	Активность индуцируется С-киназой
ATF (или CREB)	43	($T_{или}$G)($T_{или}$A)CGTCA (A C)(A T)GCAGT	Активность индуцируется А-киназой
SP1	85	GGGCGG CCCGCC	Связывается с промоторами многих генов «домашнего хозяйства»
OTF1	90	ATTTGCAT TAAACGTA	Встречается во всех клетках млекопитающих. Один из многих белков, связывающихся с одной и той же октамерной последовательностью
NF1 (или CTF)	52-66	GCCAAT CGGTTA	Многие белки, кодируемые альтернативно сплайсируемой РНК, считываемой с одного гена
SRF	67	GATGCCCATA CTACGGGTAT	Участвует в кратковременной активации транскрипции протоонкогена fos (и других генов) факторами роста. В виде димера связывается с симметричной последовательностью ДНК (указан лишь сайт связывания мономера)

[1)] ДНК, колирующая каждый из этих белков, была клонирована, и затем определена аминокислотная последовательность соответствующего белка.

[2)] Во многих случаях известна лишь часть распознаваемой последовательности ДНК. N обозначает любой нуклеотид.



Б

Белки и их воздействие на транскрипцию		Eryf1	BGP1	NF1-подобный	фактор CACCC	CAAT	SP1	AP1-подоб-ный	AP2-подоб-ный	РЕЗУЛЬТАТ
Содержание белка – в эритроцитах	4-х дневных	2	1	0	2	1	2	0	0	ГЕН ВЫКЛЮЧЕН
	9-ти дневных	2	2	1	2	1	2	2	2	ГЕН ВКЛЮЧЕН
	взрослых	2	2	2	1	1	2	2	2	ГЕН ВЫКЛЮЧЕН
– в других типах клеток		0	0	0	?	1	2	?	?	ГЕН ВЫКЛЮЧЕН

Рис. 10-23. Известные белки-регуляторы, контролирующие экспрессию гена β-глобина курицы в ходе нормального развития эритроцита. Здесь суммированы данные экспериментов, описанных на рис. 10-20 и 10-21; аналогичных опытов, проведенных с мутантными элементами, расположенными перед промотором, а также результаты анализа другого типа. А. Связывающие участки белков-регуляторов и их действие. Следует отметить, что энхансер у этого гена расположен за кодирующей последовательностью. Белки, не отмеченные + (активация) или — (подавление), по-видимому, не оказывают существенного влияния на транскрипцию, поскольку мутация их сайта связывания не сказывается на уровне транскрипции (см. рис. 10-21). Б. Относительные количества регуляторных белков на разных стадиях развития. Числами 0, 1 и 2 обозначено отсутствие, промежуточный и высокий уровень транскрипции соответственно, по нелинейной шкале. Имеющиеся в настоящее время данные не дают точного объяснения, почему ген включается между 4 и 9 днями развития. (С любезного разрешения Gary Felsenield.)

3. Энхансеры и элементы, лежащие перед промотором, по-видимому, связывают много одинаковых белков. Это может означать, что оба типа контролирующих элементов пользуются при воздействии на транскрипцию одним и тем же механизмом.

4. При анализе вновь обнаруженных регуляторных элементов генов позвоночных оказалось, что многие из соединяющихся с ними белков охарактеризованы ранее как регуляторы других генов. Возможно, это объясняется тем, что у высших эукариот транскрипция контролируется относительно небольшим числом белков-регуляторов (табл. 10-1). Белки, которые связываются с элементами, лежащими перед промотором, для выполнения своей функции кооперируются с белками, связанными с энхансером. Их суммарный эффект на активность гена - результат взаимоисключающих активирующих и подавляющих воздействий (рис. 10-22). Полагают, что изменение в балансе позитивно и негативно действующих белков-регуляторов обусловливает разную эффективность транскрипции гена β-глобина на разных стадиях развития эритроцита курицы (рис. 10-23).

10-12
10-13

10.2.9. Большинство регуляторных белков содержит домены, функция которых различна [17]

Механизм действия регуляторных белков на гены в большинстве случаев хорошо не изучен. Известно только, что одного связывания с ДНК для влияния на транскрипцию недостаточно. Например, у белка ga14 функции связывания с ДНК и активации транскрипции выполняют разные

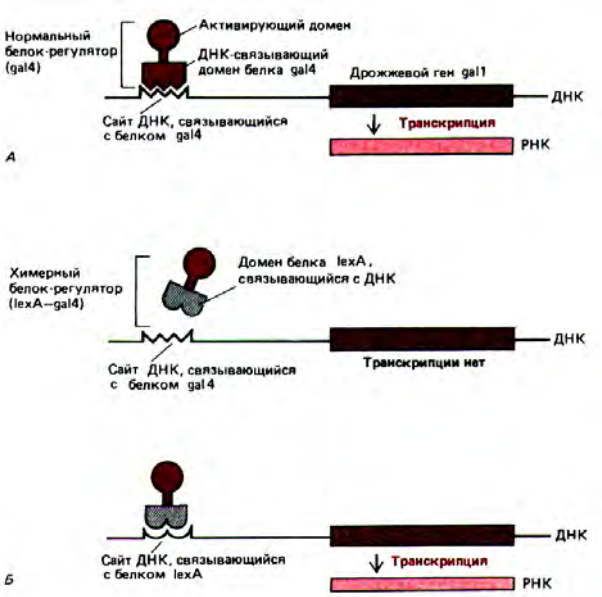


Рис. 10-24. Описание эксперимента, позволяющего выявить в составе белка-активатора ga14 у дрожжей, независимые ДНК-связывающие и активирующие транскрипцию домены. Функциональный белок-активатор может быть получен при соединении карбоксиконцевой части белка ga14 и ДНК-связывающего домена бактериального белка-регулятора (белок 1exA) методом слияния генов. Полученный таким образом бактериально-дрожжевой гибрид будет активировать транскрипцию дрожжевых генов, если перед этими генами встроить специфический сайт, необходимый для его связывания. А. Нормальная активация транскрипции белком ga14. Б. Химерный белок-регулятор для проявления своей активности нуждается в сайте ДНК, связывающем белок lexA. Аналогичные эксперименты продемонстрировали наличие отдельных доменов такого типа и у других эукариотических белков-регуляторов.

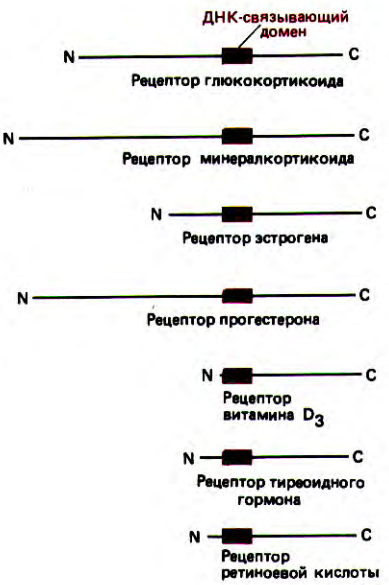


Рис. 10-25. Эволюционно родственные белки-регуляторы, принадлежащие к семейству рецепторов стероидных гормонов. Короткие домены, связывающие ДНК в каждом рецепторе, выделены цветом. Опыты по обмену доменов свидетельствуют о том, что многие гормон-связывающие, активирующие транскрипцию и ДНК-связывающие домены в этих рецепторах могут действовать как взаимозаменяемые модули.

домены. Этот белок-активатор включает транскрипцию многих дрожжевых генов, участвующих в превращении галактозы в глюкозу при выращивании клеток дрожжей на среде с галактозой. Белок ga14 соединяется со специфической последовательностью в 17 нуклеотидных пар, которая у дрожжей выполняет роль энхансера (UAS upstream activating sequence). Белок ga14 содержит около 900 аминокислотных остатков, а для связывания с этой специфической последовательностью размером 17 нуклеотидных пар достаточно аминоконца длиной 73 аминокислотных остатка, который образует серию «цинковых пальцев» (см. разд. 9.1.9). Однако сам по себе ДНК-связывающий домен не способен активировать транскрипцию. Но и в отсутствие этого домена остальная часть последовательности, по-видимому, тоже не активна. Эксперименты по «обмену доменов» показали, что в этом белке функция связывания с ДНК и активации транскрипции присущи разным доменам (рис. 10-24).

Сходные результаты получены и для регуляторных белков млекопитающих. Например, хорошо изучено действие белков-регуляторов, относящихся к семейству рецепторов стероидных гормонов. Эти рецепторные белки обеспечивают ответ клеток на различные липид-растворимые гормоны, активируя или подавляя активность определенных генов, В состав этих белков-рецепторов входит центральный ДНК-сязывающий домен, содержащий около 100 аминокислотных остатков. Как и в случае ga14, этот домен несет серию «цинковых пальцев» и узнает специфическую последовательность ДНК. У некоторых белков, входящих в состав семейства, домен, активирующий транскрипцию, находится на аминоконце. Кроме того, все рецепторы на карбоксильном конце белка содержат гормон-связывающий домен (рис. 10-25). Эксперименты по обмену доменов показали их взаимозаменяемость. Например, замена ДНК-связывающего домена рецепторного белка глюкокортикоида на ДНК-связывающий домен рецептора эстрогена приводит к тому, что

модифицированный глюкокортикоидный рецептор связывается с энхансером, который в норме активирует гены, чувствительные к эстрогену. В результате эти гены начинают транскрибироваться в ответ на воздействие глюкокортикоидов, а не эстрогенов. Аналогичным образом введение гормон-связывающего домена глюкокортикоидного рецептора в другой белок-регулятор, не принадлежащий к этому семейству, приводит к тому, что для активности такого модифицированного белка требуются глюкокортикоиды. Каждый из доменов этих рецепторных белков кодируется одним или несколькими отдельными экзонами. Анализ последовательностей ДНК, которые кодируют различные белки, входящие в семейство рецепторов стероидных гормонов (рис. 10-25), дает основание предположить, что каждый белок возник в результате случайных хромосомных обменов, при которых собрались вместе домены разных белков-регуляторов (см. разд. 10.5.4).

10-5

10.2.10. Эукариотические белки-регуляторы могут включаться и выключаться [18]

Подобно другим членам семейства рецепторных белков стероидных гормонов, рецепторы глюкокортикоида и эстрогена напоминают бактериальный белок CAP (см. разд. 3.3.6) в том отношении, что они могут активироваться в результате соединения небольших сигнальных молекул с отдельными доменами, которые связывают лиганды. Другие эукариотические белки-регуляторы, вероятно, активируются и инактивируются путем фосфорилирования либо при связывании с другими белками, изменяющими их активность (см. табл. 10-1). Эти и другие известные на сегодняшний день пути контроля активности белков, регулирующих экспрессию генов в клетках эукариот, представлены на рис. 10-26.

10.2.11. Механизм действия энхансера до конца не выяснен [15, 19]

Механизмы, регулирующие транскрипцию генов эукариот, демонстрируют высокую консервативность. Например, дрожжевой белок ga14 стимулирует транскрипцию генов млекопитающих в культуре клеток человека, если в этих генах содержится последовательность UAS гена ga14. Сходным образом, если в дрожжевых клетках синтезируется рецепторный белок эстрогена человека, то дрожжевые гены, связанные с энхансером человека, чувствительным к эстрогену, включаются при добавлении этого гормона.

Подобный консерватизм функций не связан с консерватизмом аминокислотной последовательности. Результаты секвенирования многих генов, детерминирующих регуляторные белки у дрожжей и человека, свидетельствуют о том, что домены, ответственные за активацию транскрипции у этих видов, не обладают явным сходством. Как в клет-

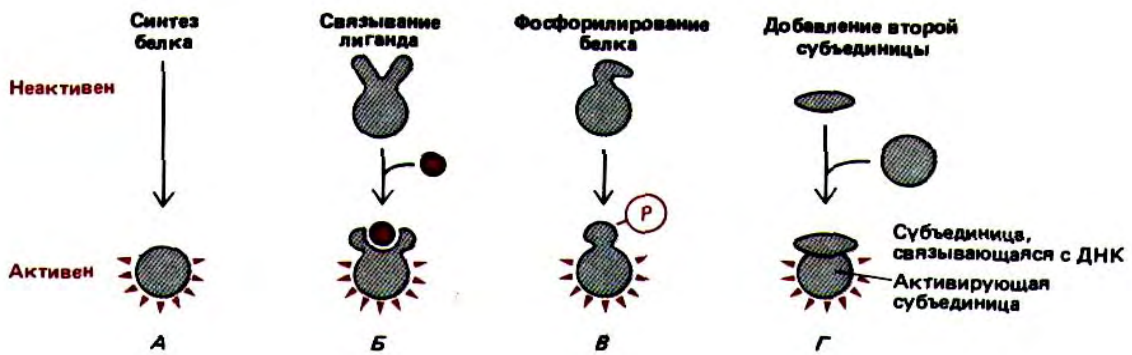


Рис. 10-26. Различные способы активации регуляторных белков в эукариотических клетках. Известны примеры для каждого из этих механизмов. А. Белок-регулятор синтезируется лишь в случае необходимости и быстро распадается при протеолизе, таким образом, его накопления не происходит. Б. Связывание с лигандом. В. Фосфорилирование либо другая ковалентная модификация. Г. Образование комплекса с отдельным белком, который выступает в роли домена, активирующего транскрипцию.

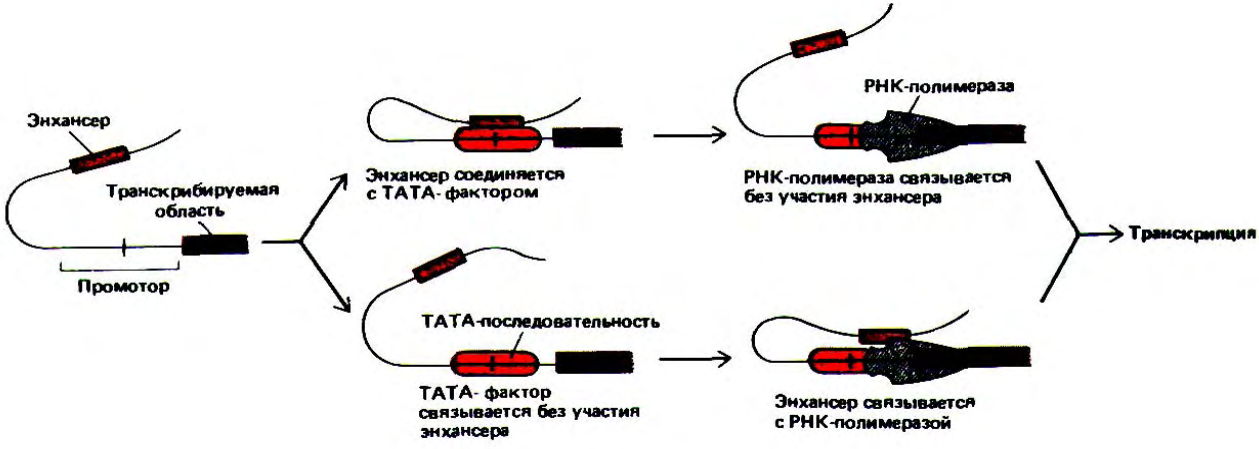


Рис. 10-27- Две модели действия энхансера в эукариотических клетках, основанные на образовании петли ДНК, наблюдаемой у бактерий (см. рис, 10-17). В данном примере энхансер расположен перед кодирующей последовательностью, однако петля может образоваться и если энхансер расположен позади кодирующей последовательности, как в случае гена β-глобина (см. рис. 10-23).

ках дрожжей, так и в клетках человека, достаточный уровень активации генов достигается и в том случае, если домен регуляторного белка, активирующий транскрипцию, замешен на область, богатую кислыми аминокислотами (глутаминовая кислота и аспарагиновая кислота). Этот факт может говорить о том, что механизм активации относительно прост.

Один из предполагаемых механизмов действия энхансера основан на результатах изучения бактериальных систем. Известно, что в клетках бактерий началу транскрипции способствует образование петли ДНК. Это согласуется с данными о том, что энхансеры обычно наиболее эффективны, когда они находятся вблизи промотора; с увеличением расстояния их активность постепенно падает. На рис. 10-27 приведена схема двух вариантов действия энхансера с образованием петли. Предложены и другие гипотезы о механизме действия этого регуляторного элемента. 1. Энхансер может действовать на большом расстоянии, активируя ДНК-топоизомеразу, которая вносит торсионное напряжение в большую петлю ДНК. используя для этого энергию гидролиза АТР. 2. Энхансер может влиять на транскрипцию, действуя как сайт посадки мобильных белков, которые связываются с ДНК и затем движутся вдоль ее молекулы. 3. Энхансер может связывать белки, которые способствуют присоединению близлежащего гена к определенной области ядра, где локализованы факторы транскрипции.

Позже будет показано, что некоторые сайты ДНК оказывают значительное воздействие на транскрипцию, будучи удаленными от промотора на расстояние 50000 и более нуклеотидных пар (см. разд. 10.3.12). Механизм действия таких сайтов, вероятно, отличается от механизма функционирования энхансеров.

Заключение

У прокариот регуляторные белки обычно связываются со специфическими последовательностями ДНК вблизи сайта инициации транскрипции и либо подавляют, либо активируют транскрипцию соседних генов. Благодаря гибкости ДНК ее молекула может образовывать петли, что позволяет белкам, присоединившимся на некотором расстоянии от промотора, влиять на РНК-полимеразу. Воздействие на расстоянии весьма распространено в клетках эукариот, где экспрессию генов часто контролируют энхансеры, удаленные от промотора на тысячи нуклеотидных пар.

У многих эукариотических генов, кодирующих белки и транскрибируемых РНК-полимеразой II, непосредственно перед сайтом инициации транскрипции находится последовательность, называемая «ТАТА-бокс».

Перед инициацией синтеза РНК необходимо, чтобы фактор, играющий важную роль в транскрипции (ТАТА-фактор, TFIID), образовал стабильный транскрипционный комплекс. Последовательности, примыкающие к ТАТА-боксу, формируют нужный для транскрипции элемент (элемент, расположенный перед промотором). И энхансер, и предпромоторный элемент содержат серию коротких нуклеотидных последовательностей, связывающихся с соответствующими регуляторными белками. Эти белки взаимодействуют друг с другом; в результате этого взаимодействия происходит включение или выключение генов. С помощью методов рекомбинантной ДНК показано, что регуляторные белки часто состоят из нескольких доменов, каждый из которых обладает своей функцией.

10.3. Молекулярно-генетические механизмы, участвующие в образовании разных типов клеток

В начале этой главы рассматривались разнообразные стратегии регуляции активности генов, позволяющие многоклеточному организму образовывать большое число разных типов клеток. Контролирующим генам свойственна некоторая «экономность». Она проявляется в том, что регуляторные белки образуют различные комбинации. Вероятно, этим можно объяснить тот факт, что с регуляторными последовательностями большинства генов высших эукариот связывается много белков. Существование дискретных типов клеток подразумевает, что активность белков-регуляторов в этой комбинаторной сети подчиняется сложной иерархии обратных связей, которые, по-видимому, управляются небольшим числом главных регуляторных белков. Однако логика построения этой сложной сети регуляции генов еще неясна. Например, непонятно, каким образом кратковременный синтез в неподходящем месте главного белка-регулятора гена Antennapedia у дрозофилы превращает антенну в ногу?

В данном разделе мы не ответим на этот конкретный вопрос, но постараемся проанализировать, как сеть, контролирующая активность генов, осуществляет переключения, которые сохраняются в последующих поколениях клеток. Клеточная память является основным условием образования и поддержания стабильности дифференцировавшихся клеток.

Начнем обсуждение этой проблемы с рассмотрения хорошо изученных механизмов дифференцировки в клетках бактерий и дрожжей, хотя некоторые из них, как установлено, не свойственны клеткам высших эукариот.

10-16

10.3.1. У многих бактерий некоторые последовательности ДНК перестраиваются, что приводит к включению и выключению генов [20]

Как отмечалось выше, дифференцировка клеток высших эукариот обычно происходит без заметных изменений в последовательности ДНК (см. разд. 10.1.2). Однако у многих прокариот стабильно наследуемый паттерн регуляции генов достигается путем специальной перестройки ДНК, активирующей или инактивирующей определенные гены. В связи с тем, что все изменения в последовательности ДНК будут точно скопированы в ходе последующих репликаций, изменение состояния активного гена унаследуется всеми потомками клетки, в которой произошла перестройка. Некоторые из таких перестроек в принципе обратимы, и через

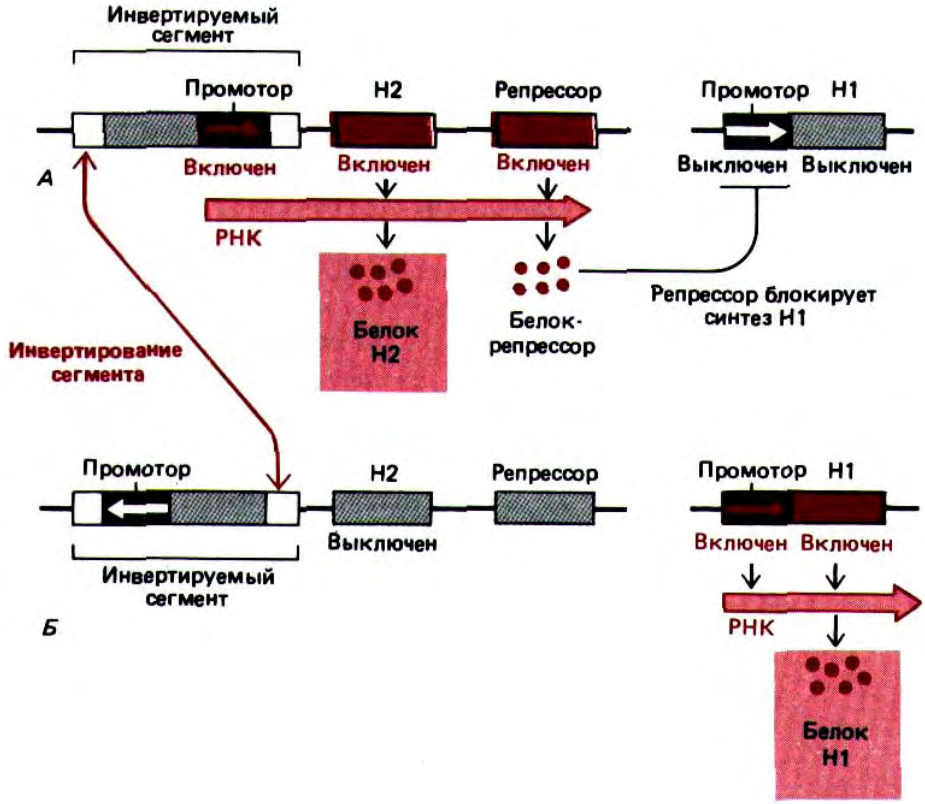


Рис. 10-28. Альтернативная транскрипция двух генов у бактерии Salmonella в результате сайт-специфической рекомбинации, приводящей к инверсии небольшого фрагмента ДНК. Механизм рекомбинации описан выше (см. разд. 5.4.7) и активируется лишь изредка (примерно один раз за каждые 10^5 клеточных делений). Таким образом, альтернативное образование флагеллина H12 (А) либо флагеллина H1 (Б) обычно строго наследуется в каждом клоне клеток.

какой-то достаточно длинный промежуток времени может произойти переключение гена на другой тип активности.

В качестве примера механизма такого типа дифференцировки клетки можно привести перестройку у бактерии Salmonella. В этом случае определенный фрагмент ДНК размером 1000 нуклеотидных пар инвертируется в ходе реакции, катализируемой ферментом сайт-специфической рекомбинации (рис. 10-28). Итак, ДНК в этом сайте может находиться в двух состояниях. Влияние инверсии на экспрессию гена объясняется тем, что внутри фрагмента размером 1000 нуклеотидных пар находится промотор, ответственный за синтез определенного белка (названного флагеллином), который локализован на поверхности бактериальной клетки. Если этот промотор находится в одной ориентации, то образуется белок одного типа, а если промотор оказывается в другой ориентации-синтезируется другой белок. Поскольку такое переключение происходит очень редко, клоны клеток растут с одним или другим типом флагеллина. Этот феномен носит название фазовой вариации. Скорее всего такой механизм дифференцировки помогает популяции бактерий защищаться от иммунного ответа организма хозяина. Если у хозяина образуются антитела к одному типу флагеллина, некоторые бактерии, флагеллин которых оказался измененным вследствие перестройки генов, смогут выжить и размножиться.

У бактерий из природных популяций часто наблюдается фазовая вариация по одному или нескольким фенотипическим признакам. Подобная «нестабильность» обычно исчезает у стандартных лабораторных штаммов, и поэтому изучено очень мало соответствующих механизмов. Не все из них связаны с инверсией ДНК. Например, бактерия, вызывающая гонорею у человека (Neisseria gonorrhoeae), защищается от иммунного ответа благодаря наследуемой вариабельности свойств клеточной поверхности, возникающей вследствие конверсии генов (см. разд. 5.4.6). Этот механизм зависит от белка recA, который участвует в рекомбинации, и основан на переносе определенной последовательности из молчащей «кассеты» в главный ген (см. разд. 10.3.2). При этом может образовываться более 100 вариантов основного белка поверхности бактериальной клетки.

10-17
10-18

10.3.2. Главный регуляторный лоrус определяет тип спаривания у дрожжей [21]

Дрожжи - это одноклеточные эукариоты, которые могут существовать как в гаплоидном, так и в диплоидном состоянии. Диплоидные клетки образуются в ходе спаривания, при котором две гаплоидные клетки сливаются (см. рис. 13-17). Чтобы это произошло, гаплоидные клетки должны различаться по типу спаривания (по полу). У обычных пекарских дрожжей Saccharomyces cerevisiae существуют два типа спаривания а и а. Клетки двух типов приспособлены для спаривания друг с другом: каждая из них образует диффундирующие сигнальные и рецепторные молекулы, благодаря которым клетки противоположного типа спаривания способны узнавать друг друга и сливаться. Образовавшиеся в результате диплоидные клетки, обозначаемые α/а, обладают иными свойствами и отличаются от каждого из родительских типов. Диплоидные клетки не способны спариваться, но могут формировать споры, которые при мейозе дают начало гаплоидным клеткам.

Генетические изменения, обусловливающие существование трех типов дрожжевых клеток, основаны на действии главных генов-регуляторов. Главные регуляторные белки кодируются единственным локусом, который называется локусом типа спаривания (mating type locus, MAT). Совместное действие этих белков детерминирует тип клетки, определяя транскрипцию многих генов. Механизм действия главных регуляторных белков в данном случае известен (рис. 10-29), и на его примере можно проиллюстрировать принцип комбинационного контроля, описанного выше (см. разд. 10.1.5).

Образование трех главных регуляторных белков, определяющих тип спаривания у дрожжей (белки α_1 α_2 и a_1 само по себе также контролируется, поскольку гаплоидные клетки дрожжей регулярно переключают свой тип спаривания. Молекулярный механизм, ответственный за такое переключение в ходе развития, по-видимому, характерен только для дрожжей: тип клетки зависит от того, какая из двух последовательностей ДНК а (кодирующая белки α_1 и α_2) или а (кодирующая белок a_1 находится в данный момент в локусе MAT; изменение типа спаривания возникает в результате замены ДНК в этом локусе. Всякий раз, когда

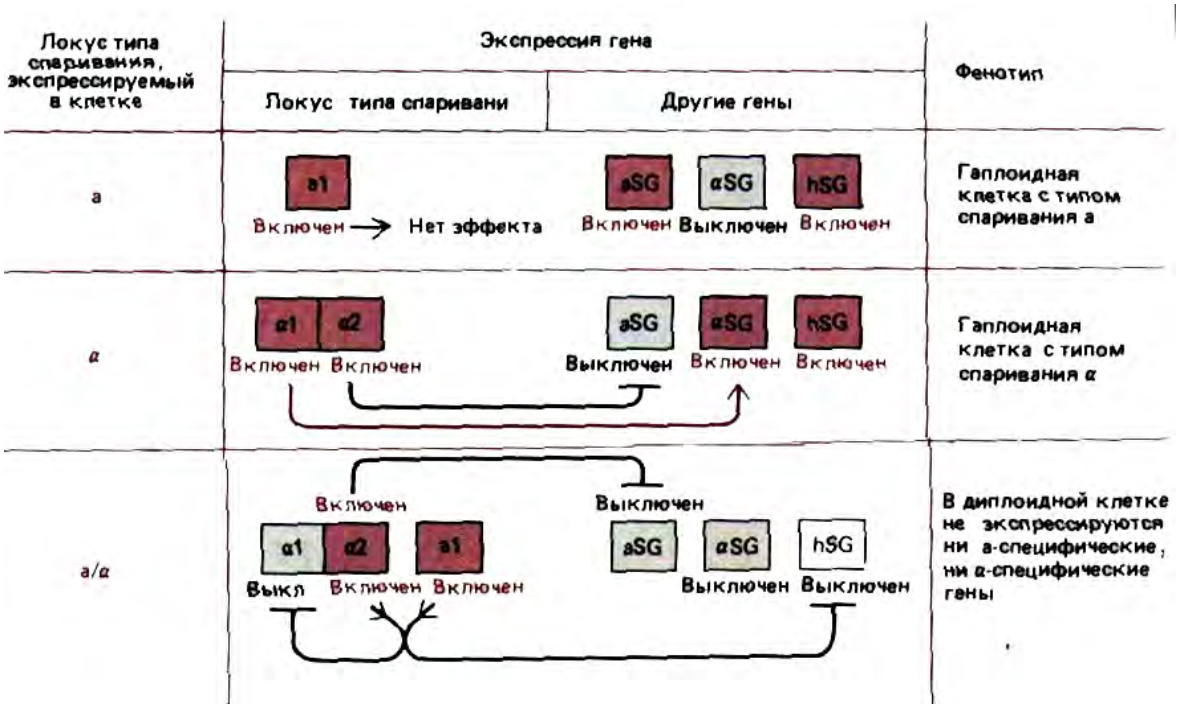


Рис. 10-29. Тип клеток у дрожжей определяется дрожжевыми белками-регуляторами, кодируемыми локусом MAT. В гаплоидных клетках типа а, в гаплоидных клетках типа α и в диплоидных клетках (типа а/α) транскрибируются различные наборы генов. Гаплоидные клетки экспрессируют либо набор генов αSG (α-специфические гены), либо набор aSG (а-специфические гены) плюс набор hSG (гаплоид-специфические гены). В диплоидных клетках ни один из этих генов не экспрессируется. Белки α_1, α_2 и a_1, детерминируемые локусом MAT, связываются (поодиночке или в сочетаниях) с определенными последовательностями ДНК в элементах, расположенных перед промотором, и, таким образом, действуют как главные белки-регуляторы. Следует отметить, что белок A_1 является белком-активатором, тогда как белок α_2-это белок-репрессор. Сам по себе белок a_1 не оказывает никакого действия (а следовательно, клетка, не содержащая локус типа спаривания, принадлежит к типу а). Однако при одновременном синтезе белков a_1 и α_2 они образуют комплекс, включающий иной набор генов, чем белок α_2, действующий сам по себе. Таким образом, простая система из трех белков служит хорошим примером принципа комбинаторного контроля генов, представленного на рис. 10-7.

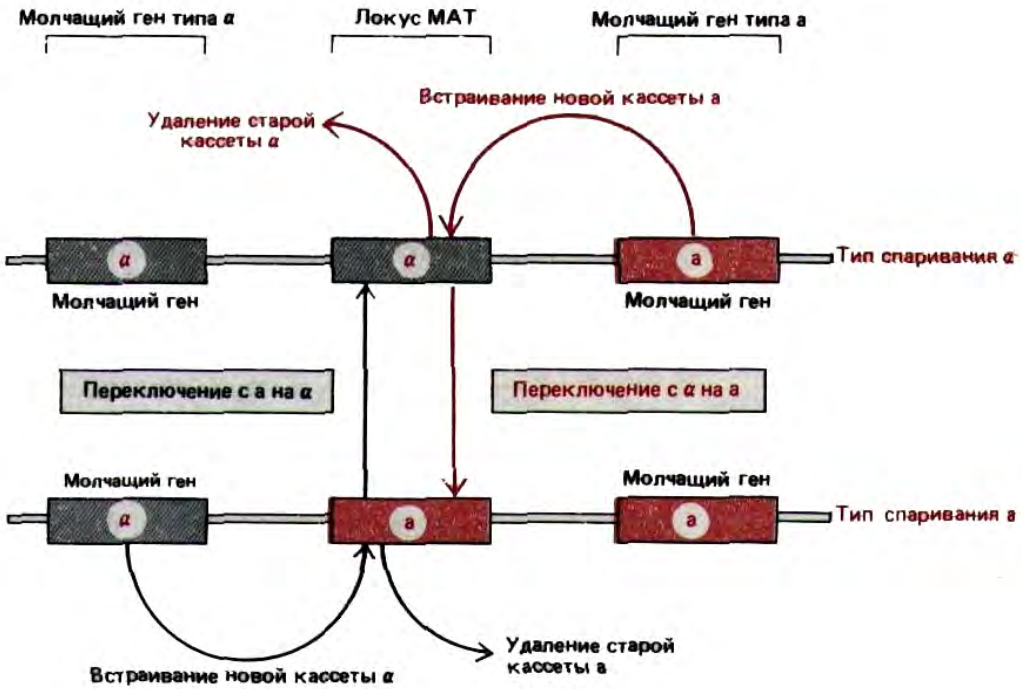


Рис. 10-30. Кассетная модель переключения типа спаривания у дрожжей. Кассетное переключение происходит в ходе процесса конверсии гена, запускаемого, когда нуклеаза HO делает двухцепочечный разрез в определенной последовательности ДНК локуса MAT. ДНК вблизи разреза затем удаляется и заменяется копией молчащей кассеты, определяющей противоположный тип спаривания.

клетки α-типа превращаются в клетки α-типа, ген a в локусе MAT вырезается и замещается вновь синтезированным геном α, скопированным с молчащей копии, расположенной в другом месте генома. Поскольку в данном случае из активного «места» удаляется один ген, а на его место встает другой, этот механизм называют кассетным. Изменение может быть обратимым, поскольку при удалении гена a из локуса MAT в геноме остается его молчащая копия. Копии молчащих генов a и α действуют как кассеты, «вставленные» в локус MAT, который можно сравнить с «проигрывателем» (рис. 10-30).

10.3.3. Способность переключать тип спаривания наследуется асимметрично [22, 23]

Переключение типа спаривания инициируется сайт-специфической эндонуклеазой (HO-эидонуклеазой), являющейся продуктом гена HO, Этот фермент делает двухцепочечный разрез в ДНК локуса MAT, в результате эта область вырезается и затем ресинтезируется, при этом матрицей служит молчащий ген противоположного типа спаривания (рис. 10-30). Транскрипция гена HO, определяющего, когда и где происходит переключение, строго контролируется. С помощью генетического анализа было показано, что контроль обеспечивают по меньшей мере шесть регуляторных генов (от SWI 1 до SWI 6). В связи с тем, что при почковании дрожжевые клетки делятся асимметрично, одна из двух образовавшихся клеток больше («материнская»), чем другая («дочерняя»). Большинство материнских клеток в ходе дальнейшего роста переключает тип спаривания, а вновь образовавшиеся дочерние клетки (возникающие из почки) не синтезируют продукт гена HO и не способны переключаться до тех пор, пока при делении они не станут материнскими клетками (рис. 10-31). Асимметрия переключения оказалось связанной с асимметричным наследованием белка SWI 5, который присоединяется к ДНК перед геном HO и необходим для его транскрипции. Полагают, что белок SWI5 (либо его активная форма) наследуется лишь материнской клеткой. Остается непонятным, почему этого белка нет в почке, но характер его наследования может служить моделью асимметричной сегрегации некоторых признаков, наблюдаемой у высших эукариот.

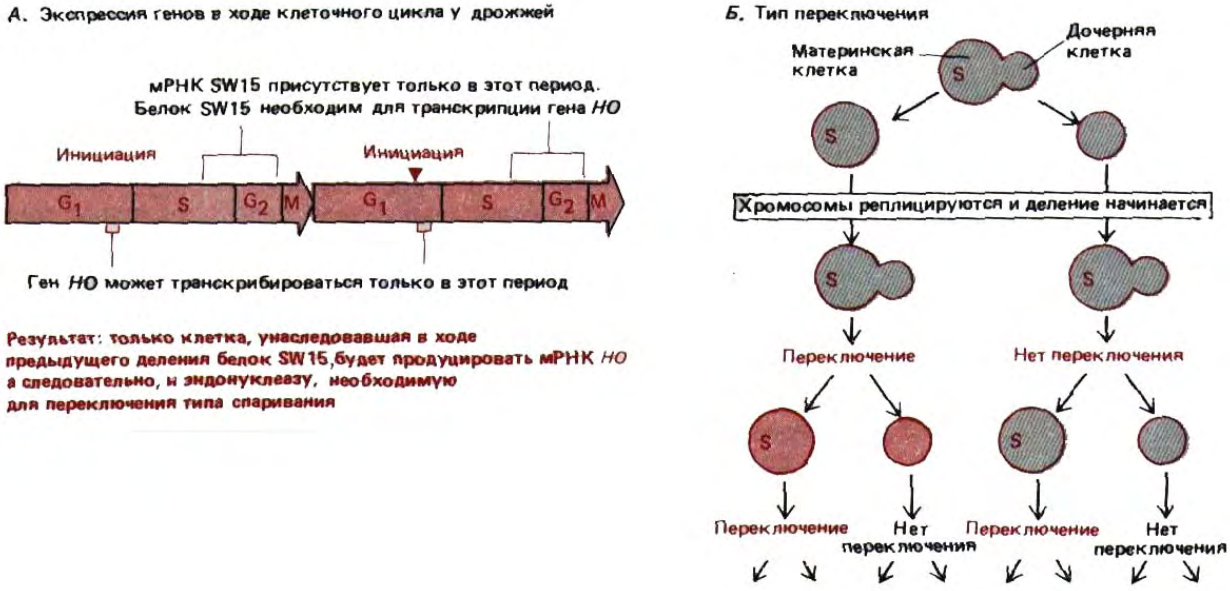


Рис. 10-31. Переключение типа спаривания в гаплоидных клетках S. cerevisiae. А. Экспрессия гена в ходе клеточного цикла дрожжей. В соответствии с приведенной схемой тип спаривания может переключаться лишь в клетках, унаследовавших сайт-специфический ДНК-связывающий белок SW15, необходимый для транскрипции гена HO. Более того, переключение может происходить только в фазе G_1 это единственный отрезок времени в ходе клеточного цикла, когда может синтезироваться эвдонуклеаза HO (после окончания синтеза этот белок быстро исчезает, вероятно, в результате интенсивного протеолиза). Так как после каждого переключения происходит репликация ДНК, делящаяся клетка всегда образует две клетки одного и того же типа спаривания. Б. Схема переключения. Деление клеток осуществляется почкованием. После каждого деления можно различить большую «материнскую» и маленькую «дочернюю» клетки. Оказалось, что вновь образованные дочерние клетки не способны переключать свой тип спаривания (обозначенный на этом рисунке разными цветами) до того, как они пройдут через митоз в качестве материнских клеток и вступят в следующую фазу G_1. По-видимому, подобная асимметрия отражает асимметричное наследование белка SW15 (обозначенного здесь как S).

10.3.4. Сайленсер, вероятно, «закрывает» участок хроматина у дрожжей [23, 24]

Если бы кодирующие последовательности двух молчащих генов, которые определяют тип спаривания, были лишены промоторов, механизм их активации при перемещении в локус MAT, вероятно, был бы аналогичен фазовой вариации. Однако определение первичной структуры ДНК показало, что молчащие гены обладают всеми регуляторными сайтами, необходимыми для транскрипции. Эти гены сохраняются в молчащем состоянии благодаря расположенной за ними на некотором расстоянии последовательности ДНК, которая каким-то образом блокирует их экспрессию. Механизм действия таких сайленсеров неизвестен, тем не менее удалось идентифицировать некоторые белки, опосредующие их функции. Это оказалось возможным вследствие того, что у мутантов, дефектных по одному из четырех генов SIR (silent information regulator), экспрессия молчащих кассет все же происходит. Для действия белков SIR необходима сайленсерная последовательность ДНК, причем репрессируются все гены, расположенные на расстоянии нескольких тысяч нуклеотидных пар от сайленсера. Тот же механизм в норме препятствует вырезанию эндонуклеазой HO ДНК в области молчащих генов типов спаривания, в результате перенос осуществляется из молчащего локуса в локус MAT, но никогда в обратном направлении.

Тот факт, что белки SIR подавляют и транскрипцию, и действие HO-эндонуклеазы, свидетельствует о том, что эти белки могут вызывать изменения в структуре хроматина дрожжей, способствуя «закрытию» целых областей хроматина, лежащих по соседству; в результате эти области становятся недоступными для самых разных ферментов. Два других наблюдения указывают на то, что в механизме действия сайленсеров есть нечто необычное. Для проявления репрессии необходима репликация ДНК, а последовательность, необходимая для инициации репликации (ARS), является существенной составной частью области сайленсера. Подробное изучение этого нового механизма контроля генетической активности может в какой-то мере прояснить влияние структуры хроматина на активность генов в клетках высших эукариот.

10.3.5. Два белка бактериофага, подавляющие синтез друг друга, могут участвовать в стабильном переключении на молекулярном уровне [25]

До сих пор обсуждались некоторые изменения типов клеток, происходящие по типу переключения, т. е. в результате перестройки ДНК. Тот факт, что генетическая информация, содержащаяся в единственном ядре соматической клетки, может дать начало целому растению или позвоночному животному, свидетельствует о том, что вряд ли основным механизмом дифференцировки клеток высших эукариот являются необратимые изменения в последовательности ДНК (хотя именно такие изменения лежат в основе дифференцировки лимфоцитов). Возможно, некоторые наследуемые изменения в экспрессии генов, наблюдаемые у высших организмов, обусловлены механизмом переключения, аналогичным тому, который описан у Salmonella и дрожжей, однако в настоящее время нет данных, подтверждающих эту гипотезу.

Ниже будет показано, что за наследуемый тип регуляции генетической активности могут отвечать несколько механизмов. Наиболее известный среди них - механизм переключения, присущий бактериофагу лямбда. От него зависит, будут ли фаговые частицы размножаться в цитоплазме E. coli (что приведет к гибели клетки) или же геном фага встроится в ДНК хозяйской клетки и будет автоматически реплицироваться вместе с ней. В переключении участвует белок, кодируемый геномом бактериофага. В его состав входит около 50 генов. Эти гены в двух стабильных состояниях транскрибируются совсем по-разному. Так, например, вирус, который собирается включиться, должен синтезировать белок интегразу, необходимый для встраивания ДНК бактериофага в хромосому бактерии, и, кроме того, должен подавить образование вирусных белков, ответственных за размножение вируса (для клетки-хозяина эти белки летальны). После того как установился один или другой тип транскрипции, он уже стабильно поддерживается. В результате включенный в хромосому профаг может не проявляться в геноме £ coli на протяжении тысяч клеточных поколений.

Не останавливаясь здесь на тонкостях этой сложной системы регуляции, опишем некоторые ее общие свойства. Центром всей системы являются два фаговых белка: белок-репрессор (белок cI) и cro-белок. Каждый из них блокирует синтез другого белка, связываясь с оператором его гена. Присутствие того или другого белка, в свою очередь, включает ряд иных генов, что в конечном итоге приводит к установлению одного из двух стабильных состояний. В состоянии 1 (лизогенное состояние) доминирует лямбда-репрессор, и именно он, а не cro-белок синтезируется. В состоянии 2 (литическое состояние) доминирует и синтезируется cro-белок, а не лямбда-репрессор (рис. 10-32). В состоянии 1 большая часть ДНК стабильно включенного в геном клетки-хозяина бактериофага (профага) не транскрибируется. В состоянии 2 фаговая ДНК интенсивно транскрибируется, реплицируется, упаковывается в новые частицы, которые при лизисе клетки выходят наружу.

Характер событий, которые разворачиваются в бактериальной клетке после заражения фагом лямбда, неслучаен. Если клетки хозяйского штамма растут хорошо, бактериофаг скорее всего пойдет по пути лизогенизации, что позволит его ДНК быстро размножатья вместе с хромосомой хозяина. Если клетка, несущая профаг, оказывается по каким-либо причинам ослабленной, фаг переходит из состояния 1 в состояние 2, чтобы размножиться в цитоплазме клетки и быстро выйти из нее. Информацию о статусе клетки-хозяина «поставляют» фагу другие белки, влияющие на переключение белка, репрессора и cro-белка.

На примере бактериофага лямбда можно убедиться в том, что

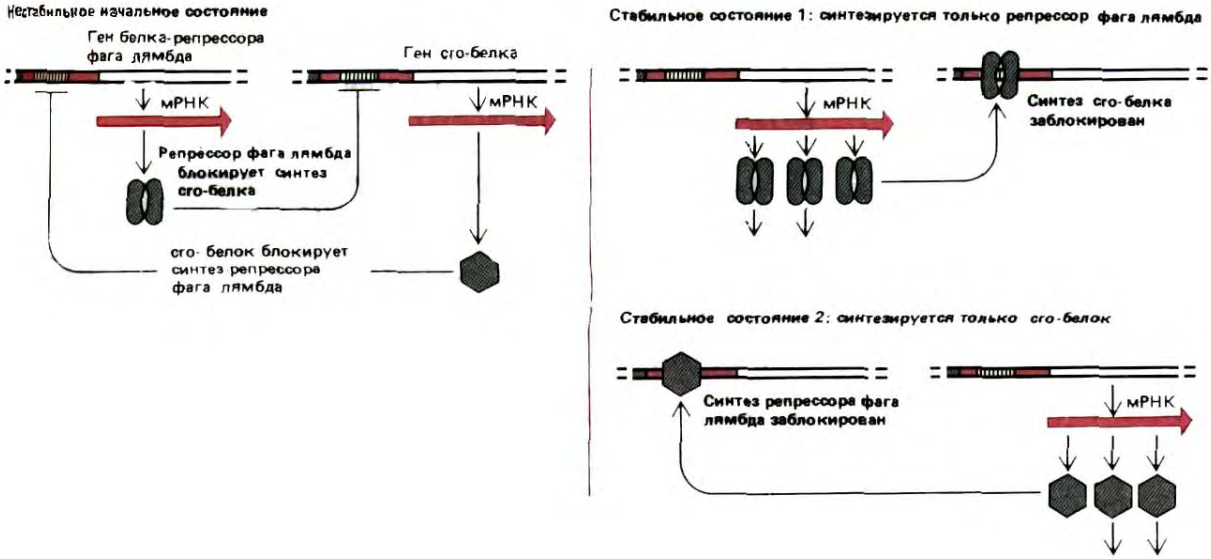


Рис. 10-32. Регуляторная система, определяющая поведение бактериофага лямбда в хозяйских клетках E. coli. В стабильном состоянии 1 (лизогенное состояние) синтезируются большие количества белка-репрессора фага лямбда. Этот регуляторный белок выключает синтез ряда белков бактериофага, включая cro-белок. В результате фаговая ДНК встраивается в хромосому E. coli и автоматически дуплицируется вместе с ней по мере роста бактерии. В стабильном состоянии 2 (литическое состояние) синтезируются большие количества cro-белка. Этот регуляторный белок выключает синтез белка-репрессора фага лямбда. В результате образуется много фаговых белков, вирусная ДНК свободно реплицируется в клетках E. coli, формируются новые частицы бактериофага, что приводит к гибели клетки. Кооперативное и конкурентное взаимодействие между репрессором лямбда и cro-белком способствует переключению по типу «все или ничего» между этими двумя состояниями.

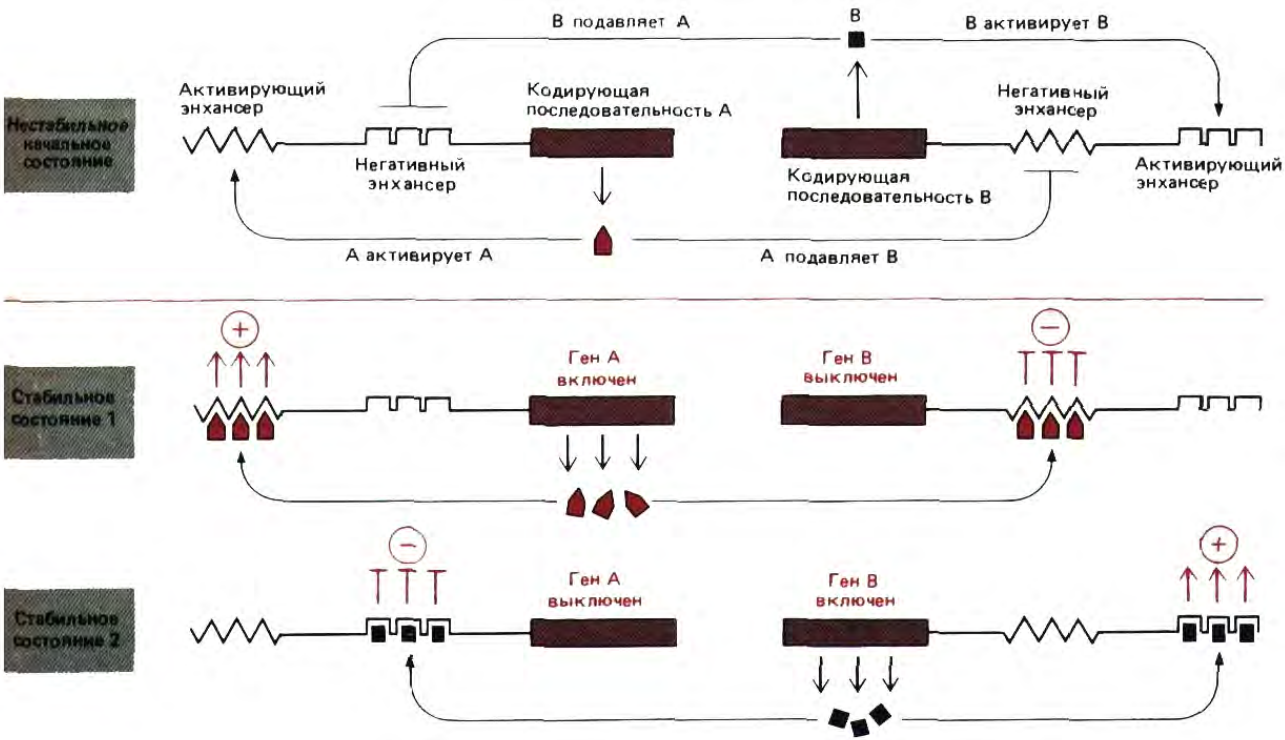


Рис. 10-33. Два главных белка-регулятора способствуют молекулярному переключению у эукариот. Следует отметить, что один и тот же белок может оказывать либо активирующее, либо репрессирующее действие на транскрипцию в зависимости от того, с какой последовательностью ДНК он связывается. Примеры такого типа действия, как полагают, встречаются среди ДНК-связывающих белков, контролирующих направление путей развития на ранних стадиях зародыша у дрозофилы.

относительно сложная модель поведения может определяться немногими белками-регуляторами, которые взаимно контролируют синтез и активность друг друга. Если вспомнить, какое количество белков содержится в эукариотической клетке, возможности, открывающиеся для регуляции активности генов, могут ошеломить.

10.3.6. Регуляторные белки у эукариот тоже могут детерминировать альтернативные стабильные состояния

Генетический анализ развития дрозофилы свидетельствует о том, что на строение белка у этой мухи влияет более 30 белков (см. разд. 16.5). Многие из этих белков являются главными белками-регуляторами, которые связываются с энхансерами и контролируют транскрипцию самых разных генов. Некоторые главные регуляторные белки стимулируют свою собственную транскрипцию, подавляя в то же время транскрипцию аналогичных главных генов, которые экспрессируются в других частях зародыша. Главенствующая роль энхансеров в контроле транскрипции эукариотических генов позволяет многим позитивным и негативным сигналам на расстоянии влиять на один и тот же ген. Это привело к развитию обширной сети реагирующих друг с другом белков-регуляторов (см. рис. 10-73). Однако для иллюстрации общих принципов, лежащих в основе клеточной памяти такого типа, можно ограничиться простой двухгенной системой, аналогичной системе переключения у фага лямбда (рис. 10-33).

О сложности регуляторной сети у высших эукариот можно судить, изучая последовательность ДНК регуляторной области гена, кодирующего главный белок-регулятор, который контролирует развитие многих основных частей тела у дрозофилы. Сравнивая очень длинные регуляторные области этого гена у двух не близкородственных видов дрозофилы, удалось выявить 20 коротких эволюционно консервативных последовательностей, расположенных определенным образом. Полагают, что каждая из них играет важную роль в связывании регуляторных белков (рис. 10-34).

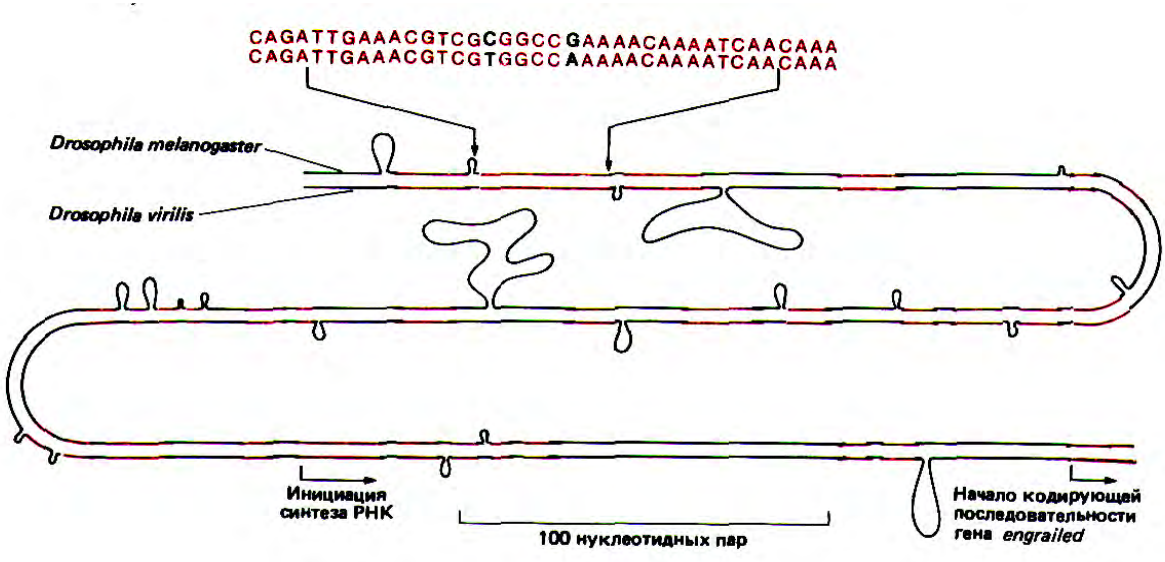


Рис. 10-34. Сравнение части регуляторной области перед геном engrailed у двух типов дрозофилы. Представлены соответствующие последовательности у Drosophila melanogaster и Drosophila virilis, причем области, где гомология достигает 90%, выделены цветом. Порядок нуклеотидов указан в верхней части рисунка. Петли соответствуют тем местам, где произошли вставки или делеции нуклеотидов в процессе дивергенции этих видов от общего предка около 60 млн. лет назад. (С любезного разрешения Judith A. Kassis и Patrick H. O'Farrell.)

10-19

10.3.7. Кооперативно связывающиеся кластеры белков-регуляторов могут передаваться непосредственно от родителей к потомкам [26]

Существует несколько объяснений устойчиво наследуемой картины экспрессии генов. Одно из них основано на том, что с определенным участком хроматина кооперативно связывается множество копий регуляторного белка. Если этот белковый кластер остается соединенным с ДНК во время репликации, то часть его получает «в наследство» каждая из дочерних молекул ДНК. Поскольку связывание данного белка с ДНК носит кооперативный характер, унаследованная часть белкового кластера будет инициировать присоединение дополнительных белковых субъединиц, что в результате обеспечит реконструкцию всего кластера. Таким образом, данный функциональный статус гена наследуется прямо и непосредственно с помощью прочно связанных с ДНК хромосомных белков (рис. 10-35). В принципе подобные непосредственно наследуемые белковые кластеры могут поддерживать индивидуальные гены в постоянно включенном или постоянно выключенном состоянии.

В настоящее время еще нет убедительных доказательств в пользу описанного здесь механизма генетической регуляции, однако имеются некоторые примеры, свидетельствующие о том, что этот механизм может иметь большое значение.

10.3.8. В клетках высших эукариот гетерохроматин содержит особым образом конденсированные области ДНК [27]

Регуляторные белки, связывающиеся с определенными последовательностями ДНК в эукариотических клетках, должны взаимодействовать не просто с молекулой ДНК, как у бактерий, а с ДНК, которая на всем своем протяжении связана с нуклеосомами. Необходимость транскрибировать ДНК в составе хроматина несомненно усложняет контроль транскрипции, однако о том, как действуют соответствующие механизмы, известно очень мало. С уверенностью можно утверждать лишь то, что у эукариот изменения в упаковке ДНК влияют на экспрессию генов. Как отмечалось выше, сайленсер, регулирующий транскрипцию у дрожжей, каким-то образом «закрывает» участки хроматина, расположенные с ним по соседству, и делает их недоступными для транскрипции и для воздействия эндонуклеазы (см. разд. 10.3.4). Однако задолго до открытия этого явления изучение клеток высших эукариот продемонстрировало существование гораздо более сильно закрытого хроматина; при этом в его структуре наблюдались видимые изменения.

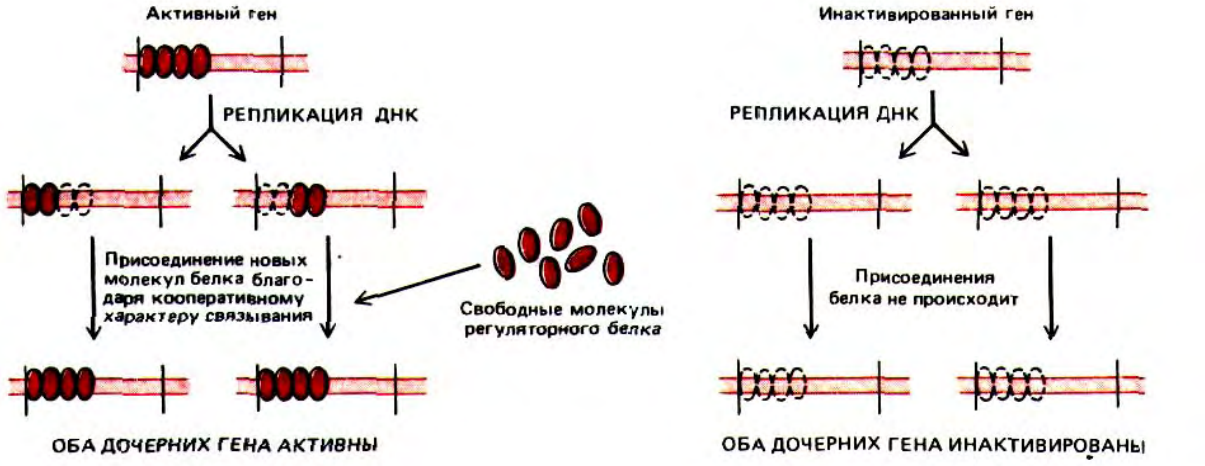


Рис. 10-35. Механизм, объясняющий прямое наследование состояния экспрессии гена в ходе репликации ДНК. Согласно этой гипотетической модели, части кооперативно связанного хластера белков-регуляторов непосредственно переносятся от родительской спирали ДНК к обеим дочерним молекулам. Унаследованный белковый кластер способствует тому, что каждая из дочерних спиралей ДНК связывает дополнительные копии тех же регуляторных белков. Поскольку связывание является кооперативным (см. рис. 9-15), ДНК, синтезировавшаяся на такой же родительской спирали, но без присоединенных регуляторных белков, не будет их связывать. Если присоединенный белок-регулятор выключает транскрипцию гена, то инактивированное состояние гена будет непосредственно наследоваться, как это происходит в случае инактивации Х-хромосомы. Если связанный белок-регулятор включает транскрипцию гена, будет наследоваться активное состояние гена.

Изучение хромосом под световым микроскопом, проводившееся в 30-е годы, показало, что некоторые их участки не способны деконденсироваться в интерфазе и, по-видимому, сохраняют свое высоко конденсированное состояние, характерное для метафазных хромосом (см. I разд. 9.2.2). Эти области были названы гетерохроматином в отличие от остального хроматина в интерфазном ядре, который носит название эухроматина. Некоторые участки хромосом конденсируются в гетерохроматин во всех клетках организма. В митотических хромосоми человека такой конститутивный гетерохроматин локализуется вокруг центромер и при специальном окрашивании легко выявляется в виде темноокрашенных зон (рис. 10-36). У некоторых других млекопитающих конститутивный гетерохроматин обнаруживается и в определенных зонах в плечах хромосом. В интерфазе участки конститутивного гетерохроматина могут агрегировать, образуя хромоцентры (см. рис. 9,43). У млекопитающих число и расположение таких хромоцентров зависит от типа клетки и стадии развития. Большинство областей конститутивного гетерохроматина содержит относительно простые тандемно-повторяющиеся последовательности, называемые сателлитной ДНК. Эти многократно повторяющиеся участки не транскрибируются, и их функция, равно как и функция формируемых ими в интерфазе конденсированных структур, остается неясной.

Некоторые области ДНК в интерфазе конденсируются и формируют гетерохроматин лишь в определенных клетках. Полагают, что эти области также не транскрибируются, однако они не состоят из простых последовательностей. Общее количество такого факультативного гетерохроматина заметно варьирует в различных клетках: в эмбриональных клетках его совсем немного, тогда как высокоспециализированные клетки отличаются высоким его содержанием. Можно предположить, что по мере развития клетки все больше и больше генов становятся неактивными вследствие того, что их ДНК приобретает конденсированную конформацию, которая не позволяет генам взаимодействовать с белками-активаторами. Большая часть данных о факультативном гетерохроматине получена при изучении инактивации одной из двух Х-хромосом в клетках самок млекопитающих.

10.3.9. Инактивация Х-хромосомы наследственно предопределена [28]

Все клетки женских особей млекопитающих имеют две Х-хромосомы, а клетки мужских организмов - одну Х- и одну Y-хромосому. Предполагают, что двойная доза продуктов генов, входящих в состав Х-хромосомы, летальна для организма; возможно, именно поэтому в женских клетках возник специальный механизм, ответственный за то, что одна из двух Х-хромосом постоянно находится в инактивированном состоянии. У мышей такая инактивация происходит между третьим и шестым днем эмбрионального развития: в каждой клетке женской особи с равной вероятностью одна или другая Х-хромосома конденсируется и образует гетерохроматин. Такие конденсированные хромосомы можно увидеть в световой микроскоп: в интерфазе они представляют собой четко оформленные структурные образования, называемые тельцами Барра, которые локализованы в окрестностях ядерной мембраны. Они реплицируются в поздней S-фазе; большая часть составляющей их ДНК не транскрибируется ни в одной из дочерних клеток. Поскольку инактивированная Х-хромосома устойчиво наследуется, каждый женский организм имеет мозаичное строение в том смысле, что он образован клональными группами клеток: примерно в половине групп активна Х-хромосома, унаследованная по материнской линии ($X_м$), а в другой

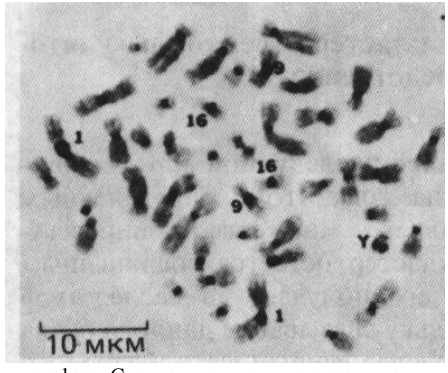


Рис. 10-36. Хромосомы человека в метафазе. Специальная техника окрашивания позволяет выявить области конститутивного гетерохроматина (темные участки). Некоторые хромосомы помечены цифрами и буквой. (С любезного разрешения James German.)

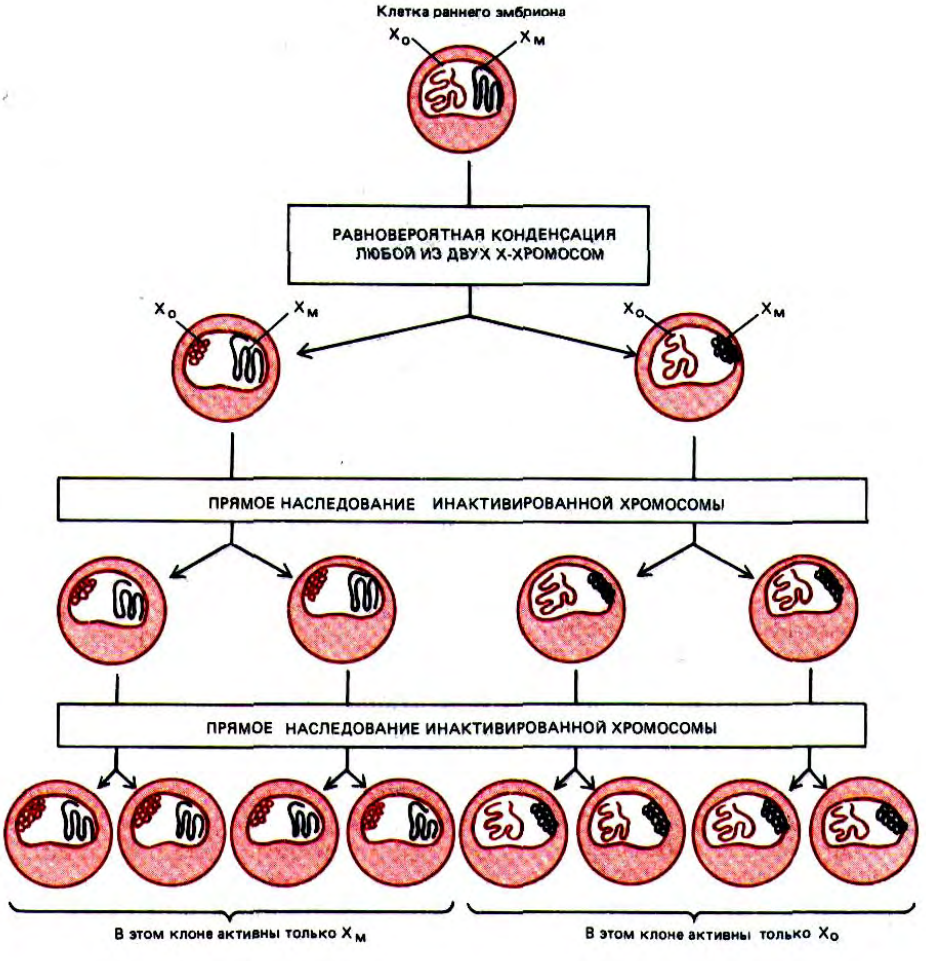


Рис. 10-37. Схема, иллюстрирующая клональное наследование конденсированной неактивной Х-хромосомы, которое имеет место у самок млекопитающих.

половине - Х-хромосома, унаследованная от отца (X_0). Иными словами, клетки, в которых экспрессируется $X_м$ или, наоборот, X_0, расположены во взрослом организме небольшими кластерами, что отражает стремление сестринских клеток оставаться в тесном контакте друг с другом в процессе эмбрионального развития и роста организма, в то время как на ранних стадиях развития происходит некое перемешивание (рис. 10-37).

Процесс конденсации, в ходе которого образуется гетерохроматин Х-хромосомы, имеет тенденцию распространятся вдоль хромосомы.

Это было продемонстрировано в экспериментах с мутантными особями, в клетках которых одну из Х-хромосом присоединили к концу аутосомы (неполовой, соматической хромосомы). В таких мутантных клетках участки аутосом, граничащие с инактивированной Х-хромосомой, часто конденсировались в гетерохроматин, что сопровождалось наследуемой инактивацией содержащихся в них генов. Полученные данные позволяют предполагать, что инактивация Х-хромосом - это кооперативный процесс, который можно рассматривать как «кристаллизацию», распространяющуюся из центра кристаллизации, расположенного на Х-хромосоме. После завершения конденсации хроматина такая конденсация наследуется в ходе всех последующих репликаций ДНК благодаря механизму, аналогичному тому, который представлен на рис. 10-35. Конденсированная хромосома может вновь стать активной при формировании половых клеток. Таким образом, в ДНК, входящей в состав этой хромосомы, не происходит никаких изменений.

10.3.10. Гены дрозофилы могут выключаться благодаря наследуемым свойствам структуры хроматина [29]

Феномен, аналогичный инактивации Х-хромосомы у самок млекопитающих, имеет место и у дрозофилы. Для его изучения весьма эффективными оказались генетические методы. У мух, несущих хромосомные перестройки, в результате которых середина гетерохроматиновой области переносится в эухроматин, эухроматиновые гены, оказавшиеся поблизости от гетерохроматина, инактивируются. Ситуация аналогична присоединению аутосомы к неактивной Х-хромосоме у млекопитающих; инактивация в обоих случаях происходит одинаково: зона инактивации распространяется от точки разрыва хромосомы и захватывает один или несколько генов. Скорость «эффекта распространения» в разных клетках различна, но зона инактивации, возникшая в эмбриональной клетке, стабильно наследуется всеми последующими поколениями клеток (рис. 10-38).

Изучение описанного эффекта у дрозофилы показало, что скорость распространения зоны инактивации меньше у мух, геном которых содержит дополнительный конститутивный гетерохроматин. Возможно, это связано с тем, что в клетках таких мух мало белков, необходимых для образования гетерохроматина. Аналогичным действием обладают и многие генные мутации. Поскольку соответствующие гены клонированы и секвенированы, можно надеяться, что в скором будущем белки, участвующие в образовании гетерохроматина у дрозофилы, тоже будут известны.

Независимо от того, каковы молекулярные механизмы упаковки определенных областей генома эукариот в гетерохроматин, сам феномен гетерохроматизации следует отнести к таким регуляторным процессам, которые отличают клетки эукариот от клеток бактерий. Особенность такой уникальной формы регуляции состоит в том, что в данном случае память о функциональном статусе гена хранится в виде наследуемой структуры хроматина и не обусловлена существованием стабильной обратной связи саморегулирующихся белков-регуляторов, которые в ядре могут менять свою локализацию. Неизвестно, действуют ли механизмы такого типа лишь в случае инактивации больших областей хромосомы или же они могут работать и на уровне одного или нескольких генов. Данные, приведенные ниже, позволяют предположить, что экспрессия отдельных генов часто регулируется близлежащей контролирующей последовательностью и не зависит полностью от общего хромосомного окружения.

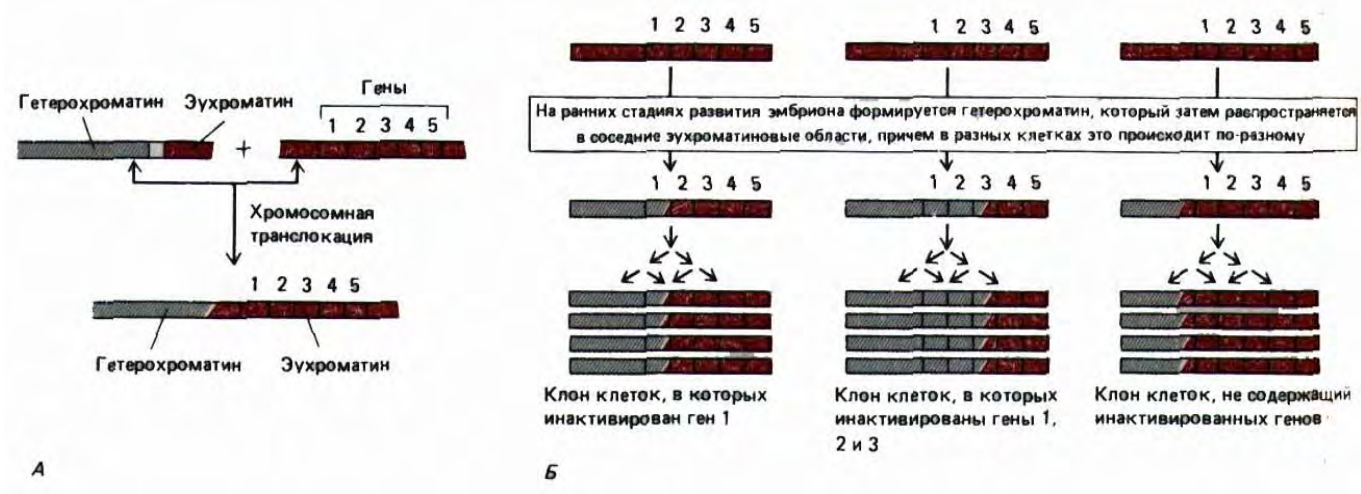


Рис. 10-38. Эффект положения мозаичного типа у дрозофилы. Распространению гетерохроматина (обозначен серым цветом) в соседние эухроматиновые области обычно препятствуют специальные пограничные последовательности неизвестной породы. Однако у мух, несущих в хромосомах определенные транслокации, эти пограничные последовательности отсутствуют. А. На ранних стадиях развития таких мух гетерохроматин начинает распространяться в соседнюю область хромосомы, продвигаясь в разных клетках на разные расстояния. Б. Такое распространение вскоре останавливается, однако достигнутый уровень распространения гетерохроматина наследуется; в результате получаются большие клоны клеток-потомков, у которых одни и те же гены сконденсированы в гетерохроматин и, следовательно, инактивированы (отсюда и «мозаичный» вид у некоторых из этих мух). Это явление имеет много общего с инактивацией Х-хромосомы у млекопитающих.

10.3.11. Для оптимальной экспрессии гена часто бывает необходимо его определенное положение в хромосоме [30]

Гены, перенесенные в другие участки хромосомы, транскрибируются в зависимости от типа клетки. Следовательно, они должны нести с собой информацию, необходимую для их селективной экспрессии в соответствующих клетках. В качестве примера можно привести ген дрозофилы *Sgs-3,* которому для правильной транскрипции в слюнных железах необходимо 600 нуклеотидных пар, расположенных перед ним; установлено, что его транскрипция осуществляется с нормальной скоростью почти в любом сайте (но не в гетерохроматине) политенной хромосомы. Подобным образом трансгенные млекопитающие, содержащие фрагмент тканеспецифического гена, экспрессируют этот ген в соответствующих клетках, но только в том случае, если фрагмент достаточно длинен и несет большую часть последовательности энхансера.

Большинство привнесенных генов в клетках трансгенных животных для правильной экспрессии требуют гораздо больше фланкирующей последовательности, чем ген Sgs-3. Более того, у разных трансгенных особей наблюдаются разные уровни активности этих генов. Так как подобные вариации зависят от того, где трансген встроился в хромосому животного-хозяина, их называют *эффектом положения в хромосоме.* Некоторые результаты, полученные при встраивании гена альфа-фетопротеина мыши в случайные области ее генома, представлены в табл. 10-2. В данном примере ген активен только в тех тканях, где он экспрессируется и в норме, однако уровень его транскрипции обычно в пять-десять раз ниже, чем он должен быть в тех тканях, где его активность высока. И наоборот, уровень транскрипции может быть аномально высок в тканях, где обычно уровень экспрессии этого гена низок.

Если ген β-глобина человека (для которого характерен сильный эффект положения при экспрессии в эритроцитах трансгенных мышей) соединить с фрагментом ДНК, который обычно расположен на расстоянии 50000 нуклеотидных пар от его промотора, эффект положения исчезает и полностью восстанавливается транскрипционная активность.

Таблица 10-2, При экспрессии генов, перенесенных в геном мыши, обычно проявляется эффект положения. У независимо полученных трансгенных особей уровень активности генов различается

	Процент от тотальной мРНК в «летках				
	желточного мешка	**печени**	**кишечник**	**мозга**	**Копийность гена на клетку**
Эндогенный ген	*20*	*5*	*0,1*	*0*	*2*
Трансгенная особь 1	3,4	1	0,1	0	4
Трансгенная особь 2	4,8	30	1,3	0	4
Трансгенная особь 3	4,4	13	4,7	0	4
Трансгенная особь 4	0,4	0,4	0	0	12

В состав фрагмента ДНК, который был инъецирован в оплодотворенную яйцеклетку мыши, помимо гена альфа-протеина «ходила последовательность размером 14000 нуклеотидных нар. Эта последовательность содержала три энхансера, влияющих на экспрессию гена альфа-фетопротеина.

Сравнение уровней синтеза мРНК инъецированного Ієна и мРНК, образующейся в норме эндогенным геном в указанных тканях зародыша, проводили методом гибридизации. (По R. E. Hammer et al., Science 235:53-58, 1987.)

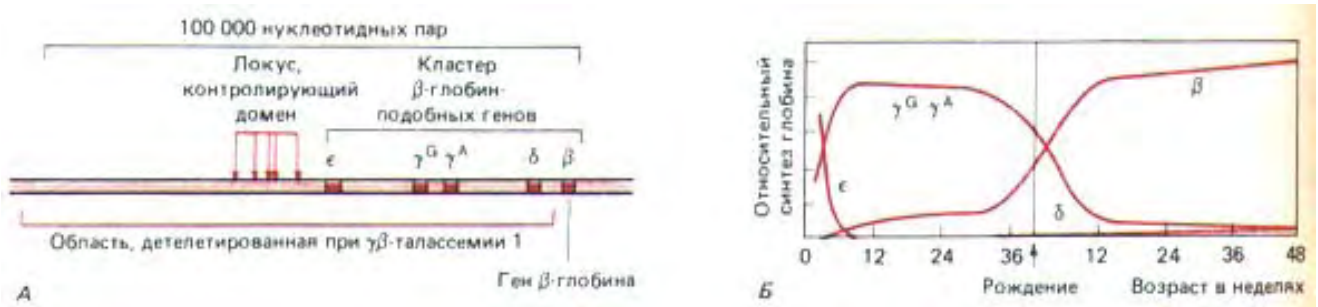


Рис. 10-39. Кластер β-подобных глобиновых генов у человека. *А.* Организация этих генов. Представлен большой участок хромосомы, содержащей 100000 нуклеотидных пар. Он содержит кластер сверхчувствительных к нуклеазе сайтов, составляющих «доменкон-тролирующий участок». Этот контролирующий локус и все, за исключением одного, глобиновые гены в случае γ- β -талассемии несут делецию. *Б.* Изменения при экспрессии β -подобных глобиновых генов на разных стадиях развития человека. Каждая из глобиновых цепей, контролируемых этими генами, для образования гемоглобина эритроцитов соединяется с α-глобиновой цепью, У пациентов с талас-семией уровень синтеза β -глобина в значительной степени снижен (не показано). (А-по F. Grosveld, G. B. van Assendelft, D. R. Greaves and G. Kollias, Cell 51: 975-985, 1987.)

Этот фрагмент, содержащий шесть сверхчувствительных к нуклеазе сайтов (см. разд. 9,1.19), оказывает воздействие на весь кластер глобиновых генов; его называют *участком, контролирующим домен.* Главный вывод, который следует из результатов изучения эффекта положения, состоит в том, что многие гены позвоночных для достижения нужного уровня экспрессии нуждаются в определенных последовательностях, расположенных на некотором расстоянии от них. Далее мы обсудим, какова роль этих последовательностей.

10.3.12. Для активации эукариотических генов может быть необходима локальная деконденсация хроматина [31]

У людей с определенной формой талассемии (наследственная форма анемии) перед геном β-глобина имеются большие делении ДНК. Делетированная область (~ 100 000 нуклеотидных пар) содержит несколько β-глобин-подобных генов, а также участок, контролирующий домен, который был идентифицирован в экспериментах с трансгеннымя мышами (рис. 10-39,*А).* Хотя сам ген β-глобина и не поврежден, уровень его транскрипции значительно снижен. При обработке нуклеазой этот ген, в отличие от нормального гена β -глобина, демонстрирует такую же *низкую* скорость *реакции,* что и основная фракция хроматина и, следовательно, не имеет структуры активного хроматина. Его нормальный гомолог в том же эритроците не содержит делеции, и к моменту начала транскрипции первого из этой группы гена (ген ε-глобина) весь кластер β-глобин-подобных генов (90000 нуклеотидных пар), по-видимому, деконденсируется, превращаясь в активный хроматин (рис. 10-39,£).

Подобные результаты свидетельствуют в пользу двухступенчатой схемы индукции транскрипции генов высших эукариот. На стадии 1 весь хроматин в области, содержащей десятки тысяч нуклеотидных пар, превращается в относительно деконденсированную «активную» форму (рис. 10-40). Эта стадия может запускаться определенным типом белка-регулятора, который вызывает структурное изменение в близлежащем хроматине. Такое изменение распространяется от домен-контролирующего участка через всю петлю этого домена хроматина. На стадии 2 белки-регуляторы, которые действуют на энхансеры и лежащие перед промотором элементы, регулируют транскрипцию определенных генов, локализованных внутри области экспонированного активного хроматина. Благодаря такому местному контролю сперва в желточном мешке зародыша экспрессируется ген ε-глобина человека, затем в печени эмбриона экспрессируются два гена γ-глобина и, наконец, ко времени рождения включаются гены β-глобина (рис. 10-39,Б).

10.3.13. Напряжение, возникающее при суперспирализации ДНК, позволяет осуществлять воздействие на расстоянии [32]

Неизвестно, как в хромосоме осуществляется контроль на большом расстоянии, В настоящее время описано несколько способов передачи

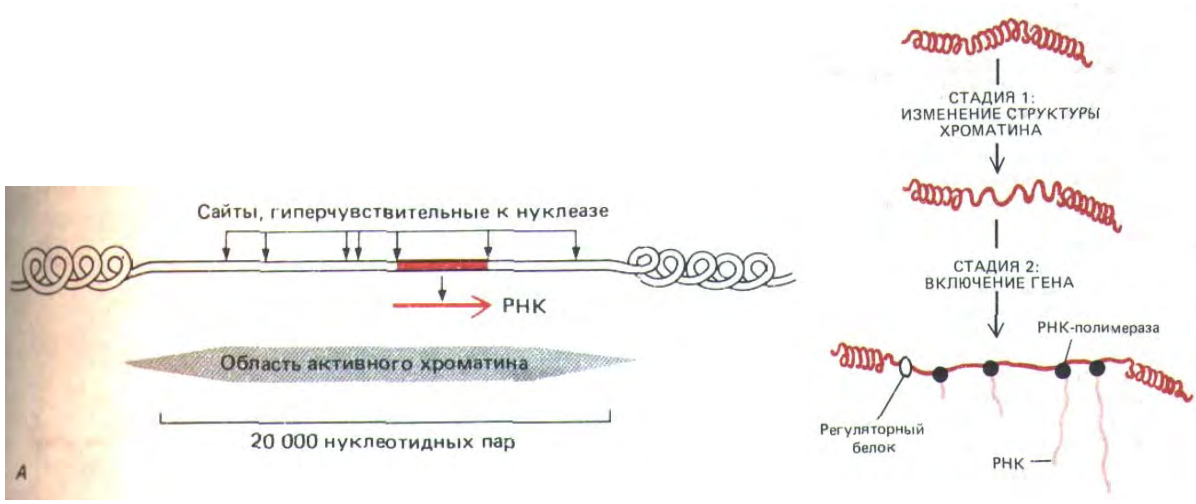


Рис. 10-40. Изменения хроматина в активных генах. *А.* Структура хроматина гена лизоцима в яйцеводе курицы, где этот ген активен. Как показано, область деконденсированного активного хроматина (определяемая по чувствительности к ДНКазе) содержит 24 000 нуклеотидных пар. Она включает семь гиперчувствительных к нуклеазе сайтов и представляет собой специфическую последовательность ДНК, где, как полагают, нуклеосома заменена другими ДНК-связывающими белками. *Б.* Две стадии активации эукариотических генов. На стадии 1 структура небольшой области хроматина модифицирована таким образом, чтобы в ходе подготовки к транскрипции она могла деконденсироваться. На стадии 2 белки-регуляторы связываются с определенными сайтами на изменившемся хроматине, чтобы индуцировать синтез РНК. Транскрипция у прокариот, по-видимому, начинается со стадии 2 процесса контроля эукарнотических генов. *(А* A.E. Sipple et al. In: Structure and Function of Eucaryotic Chromosomes [W. Hennig ed.]. Berlin: Springer Verlag, 1987.)

сигнала из одного участка молекулы ДНК в другой, удаленный от него на расстояние многих тысяч нуклеотидов. В одном случае в закрытой петле двойной спирали ДНК происходят топологические изменения, которые приводят к образованию суперскрученной ДНК. Суперспирализация ДНК лучше всего изучена на примере небольших кольцевых молекул, таких, как плазмиды и хромосомы некоторых вирусов (см. рис. 5-71). Однако такие же события могут произойти и с любым другим участком ДНК, ограниченным двумя концами, которые не могут свободно вращаться (например, с петлей хроматина, прочно связанной у основания).

Простой метод визуализации топологических напряжений, приводящих к суперспирализации ДНК, изображен на рис. 10-41. В двойной спирали ДНК с двумя фиксированными концами для компенсации каждых 10 открытых (не скрученных) нуклеотидных пар образуется один супервиток ДНК. Образование супервитка восстанавливает нормальный поворот спирали в остальных областях, где основания остаются спаренными; в ином случае (для схемы, приведенной на рис. 10-41,*Б)* потребовалось бы увеличить число пар, приходящихся на один виток, с 10 до 11. Спираль ДНК сопротивляется подобным деформациям, предпочитая ослаблять напряжение, изгибаясь в суперспирализованные петли.

У бактерий, таких, например, как E. coli, обнаружен особый фермент, называемый **ДНК-гиразой,** который, используя энергию гидролиза АТР, непрерывно образует в ДНК супервитки и тем самым поддерживает в петельных доменах постоянные механические напряжения. Это так называемые отрицательные супервитки: они закручены в противоположную сторону по сравнению с положительными супервитками, обра-

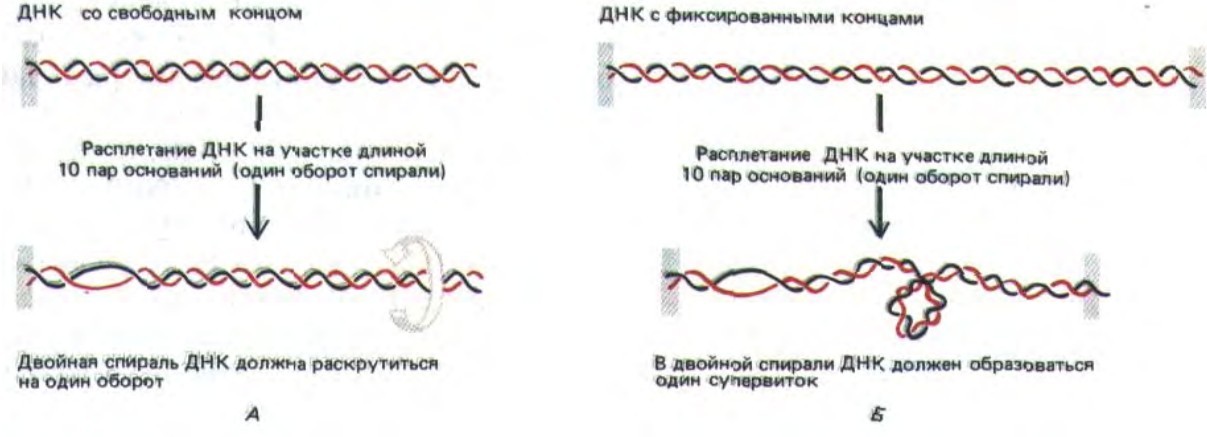


Рис. 10-41. Напряжение, возникающее при сверхспирализации ДНК, приводит к суперскручиванию молекулы. *А.* У молекулы ДНК с одним свободным концом (либо разрывом в одной из цепей, который служит шарниром) двойная цепь раскручивается на один виток на каждые 10 неспаренных нуклеотидных пар. *Б.* Если вращению что-либо препятствует, сверхвитки вводятся в ДНК путем раскручивания спирали в другом месте. В результате на каждые 10 неспаренных нуклеотидных пар возникает один сверхвиток. На этом рисунке изображена положительная сверхспираль (см. рис. 10-42).

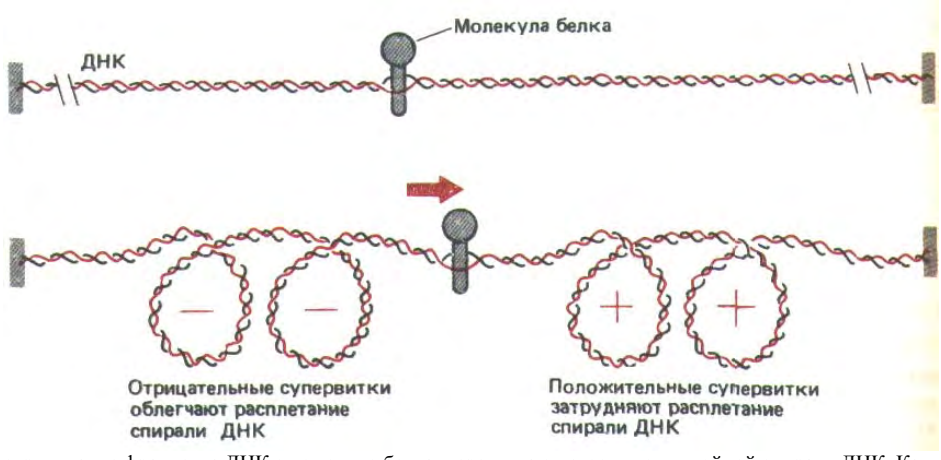


Рис. 10-42. Суперскручивание фрагмента ДНК с помощью белка, передвигающегося вдоль двойной спирали ДНК. Как и на рис. 10-41, *Б,* два конца ДНК зафиксированы, кроме того, принимается, что молекула белка закреплена относительно этих концов или же, что силы трения при движении затрудняют свободное вращение этого белка. Таким образом, при движении возникает избыток витков спирали, которые накапливаются в ДНК перед белком, а за ним образуется нехватка витков. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что продвижение молекул РНК-полимеразы вдоль цепи ДНК сопровождается такими же сжатиями. Напряжение, возникающее в результате положительного суперскручивания впереди молекулы, приводит к тому, что этот участок ДНК труднее открыть, однако имеющееся напряжение должно облегчать сбрасывание ДНК с нуклеосом, что необходимо для работы полнмеразы при транскрипции хроматина (см. рис. 9-32).

зующимися при открытии фрагмента спирали. В связи с тем, что напряжение, вызываемое суперспирализацией, при этом снижается, расплетание двойной спирали ДНК у *E. coli* энергетически более выгодно, чем расплетание ДНК, которая не подверглась суперспирализации.

В эукариотических клетках ДНК-гираза не обнаружена, а эукариотические ДНК топоизомеразы типов I и II снимают напряжение, вызванное суперспирализацией, а не усиливают его (см. разд. 5.3.10). Вот почему большая часть ДНК в эукариотических клетках не напряжена, Тем не менее при инициации транскрипции ДНК происходит раскручивание спирали (см. рис. 9-65). Более того, продвижение молекулы РНК-полимеразы (а также других белков) вдоль ДНК приводит к появлению в ее молекуле положительного напряжения перед ферментом и отрицательного за ним (рис. 10-42). Вследствие подобного топологического изменения, событие, происшедшее в единственном сайте ДНК, может привести к возникновению сил, действующих по всей петле хроматина. Остается неясным, приводит ли подобное воздействие к запуску дальнейших событий, что было бы необходимо, если бы топологические изменения действительно имели отношение к контролю экспрессии у эукариотических генов.

10.3.14. Механизм образования активного хроматина остается неясным

Согласно модели активации генов, приведенной на рис. 10-40, некоторые из регуляторных белков у высших эукариот имеют функции, отличающие их от бактериальных аналогов. Вместо того, чтобы способствовать «посадке» РНК-полимеразы (или факторов транскрипции) на близлежащий промотор (см. рис. 10-27), некоторые сайт-специфические ДНК-связывающие белки могут участвовать в деконденсации хроматина в определенном участке хромосомы, могут удалить нуклеосому с соседнего энхансера или промотора и обеспечить таким образом доступ белков-регуляторов обычного типа. Однако полной уверенности в том, что в« эти события имеют место в действительности, нет. Вполне вероятно, что наблюдаемые отличия в структуре хроматина активных генов являются закономерным следствием сборки факторов транскрипции и/или РНК-полимеразы на последовательности промотора, а не условием, необходимым для инициации транскрипции.

Идентификация определенных последовательностей ДНК, действующих как домен-контролирующий участок гена β-глобина человека, позволила бы выделить белки, связывающиеся с этими последовательностями, и клонировать их гены (см. разд. 9.1.8). В настоящее время остается лишь строить предположения о том, как такие области функционируют. Возможно, их последовательности представляют собой очень

сильные энхансеры (см. разд. 10.2.11.). Три другие гипотезы представлены на рис. 10-43.

Принципиальное различие схем, приведенных на рис. 10-43, говорит о том, как мы еще далеки от понимания процесса перехода хроматина из неактивного в активное состояние. Неизвестно, сколько существует форм хроматина *и какие* именно его структурные особенности приводят к тому, что некоторые области более конденсированы, чем другие. Исходя просто из функции хроматина, невозможно объяснить, почему аминокислотные последовательности гистонов (в особенности H3 и H4) оказываются такими консервативными. Недавно выявлены некоторые химические свойства, присущие только активному хроматину (см. разд. 9.2.10), а для отделения нуклеосом (и связанных с ними последовательностей ДНК) активного хроматина от остальных нуклеосом стали использовать моноклональные антитела. Применяя эти методы при работе с хроматином, выделенными из трансгенных животных, в принципе возможно отличить регуляторные области, ответственные за активацию хроматина, от других участков, что несомненно должно способствовать пониманию того, как контролируются эукариотические гены.

10.3.15. В ходе эволюции многоклеточных организмов возникают новые уровни генного контроля [33]

Дрожжевые клетки служат удобной моделью для изучения эукариотических клеток. В самом деле, высокая степень функционального родства между белками дрожжей и человека не перестает удивлять исследователей. Тем не менее, не все аспекты контроля генной экспрессии можно

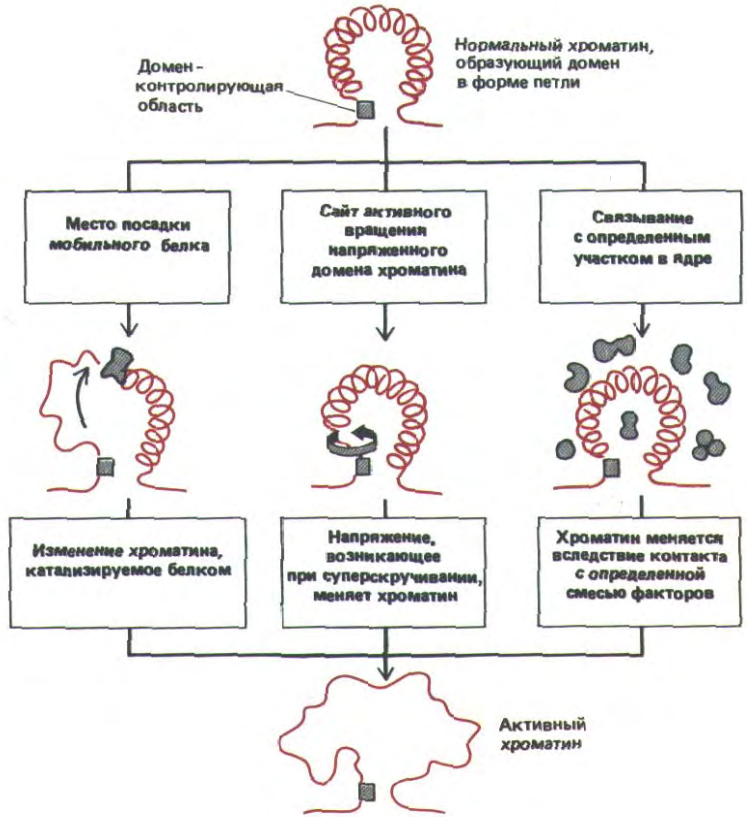


Рис. 10-43. Три гипотезы, предложенные для объяснения большого радиуса действия домен-контролирующего участка на генетическую активность. Обычно считается, что петля хроматина представляет собой целый домен хромосомы, который имеет форму петли и содержит ДНК размером 100000 и более нуклеотидных пар. На самом деле неизвестно, чем объясняется такая дальность действия, возможно, здесь функционируют и другие механизмы. Доказательства того, что хроматин проходит стадию деконденсации вне зависимости от транскрипции ДНК, получены при наблюдении дисков политенных хромосом дрозофилы содержащих ген Sgs-3. Некоторые мутанты, не способные образовывать в этом участке РНК, тем не менее в ходе развития личинок образуют пуф (см. рис. 9-48).



Рис. 10-44. *А.* Образование 5-метил-цитозина происходит при метилировании цитоэина в молекуле цепи ДНК. У позвоночных этот процесе ограничен цитозиновыми остатками (С), находящимися в составе последовательности CG, *К.* Синтетический нуклеотид, содержащий основание 5-азацитозин (5-aza-C), не может метилироваться. Более того, если небольшие количества 5-aza-C включаются в ДНК, они подавляют метилирование нормальных цитозинов.

изучать на дрожжах. По-видимому, в дрожжевой клетке не содержится гистон Н1 и почти весь хроматин находится в активном состоянии. Не выявляются в них и контролирующие участки ДНК, которые способны воздействовать на гены на большом расстоянии. Не используется в дрожжевой клетке и альтернативный сплайсинг РНК, о котором речь пойдет ниже.

Беспозвоночные, такие, как дрозофила, имеют геномы большего размера нежели у дрожжей, содержат гистон Н1, гетерохроматин и по крайней мере некоторые типы активного хроматина (см. рис. 9-54). У беспозвоночных есть также и альтернативный сплайсинг РНК. Однако один уровень контроля генной экспрессии, присущий позвоночным, у беспозвоночных, по-видимому, отсутствует: у них нет общей системы подавления активности на основе метилирования ДНК.

10-20

10.3.16. При делении клеток позвоночных тип метилирования ДНК передается по наследству [34]

Основания в молекуле ДНК в некоторых случаях подвергаются модификации. Например, мы уже говорили о том, что метилирование А в последовательности GATC приводит к ошибкам копирования в ходе репликации у бактерий (см. разд. 5.3.8.); напротив, метилирование А или С в определенном сайте защищает бактерию от воздействия ее собственных рестриктаз (см. разд. 4.6.2). В ДНК позвоночных содержится 5-метнлцнтозин (5-метнл-С), который, по всей вероятности, не оказывает влияния на спаривание оснований (рис. 10-44,Л). Метилирование ограничено основанием С в последовательности CG. В связи с тем, что эта последовательность спарена точно с такой же последовательностью (но в обратной ориентации) на другой цепи ДНК, передача по наследству существующего типа метилирования ДНК обеспечивается простым механизмом копирования. Фермент, называемый *поддерживающей метилазой,* действует лишь на те последовательности CG, которые спарены с уже метилированными последовательностями CG. В результате существовавший ранее тип метилирования автоматически наследуется в ходе репликации ДНК (рис. 10-45).

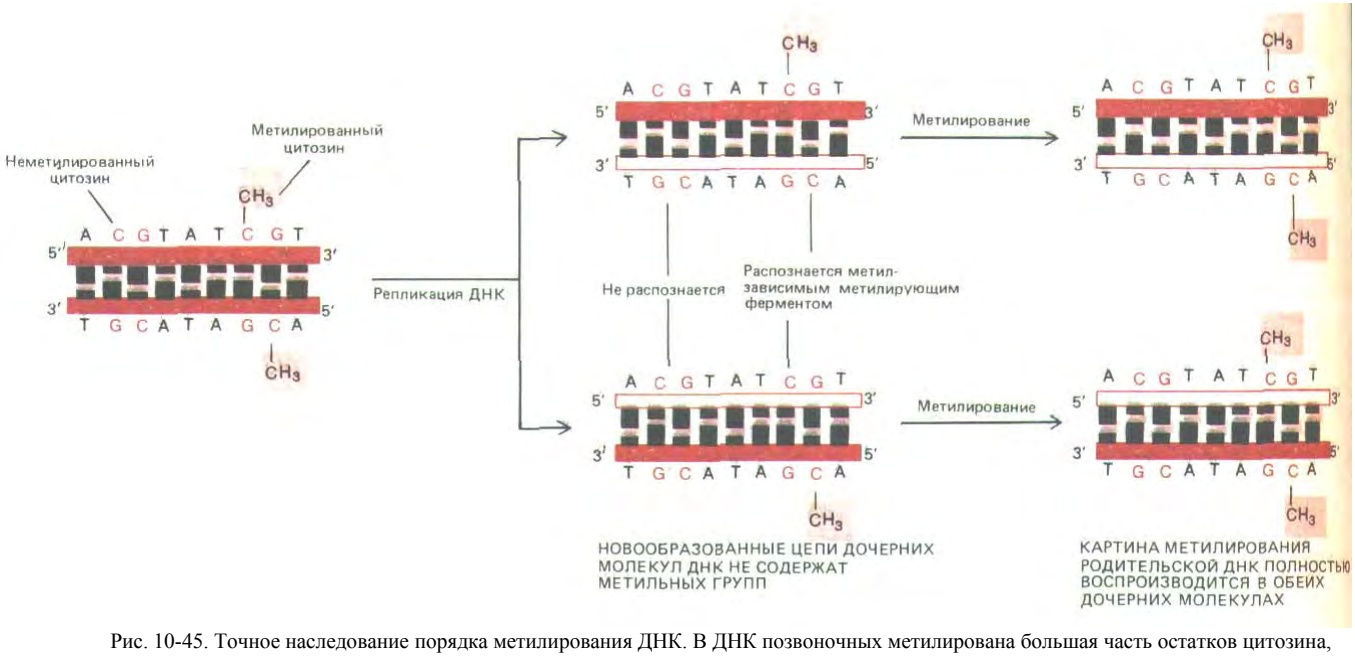


Рис. 10-45. Точное наследование порядка метилирования ДНК. В ДНК позвоночных метилирована большая часть остатков цитозина, входящих в состав последовательности CG (см. рис. 10-44). После того как разметка ДНК метильными группами проведена, каждый сайт метилирования наследуется дочерними молекулами ДНК. Это означает, что изменение в метилированой разметке ДНК сохраняется и наследуется в клетку.

Некоторые рестриктазы разрезают ДНК в области, содержащей динуклеотид CG, и для их действия необходимо, чтобы эта последовательность не была метилирована. Например, HpaII разрезает последовательность CCGG, но не способна это сделать, если средний С метилирован. *Таким образом, чувствительность ДНК к рестриктазе HpaII* может служить тестом на метилирование определенных сайтов. Фермент HpaII-метилаза в обычных условиях защищает любую бактерию от своей собственной рестриктазы HpaII. Следовательно, эту метилазу можно использовать для введения оснований 5-метил-С в определенные последовательности CG (а именно в CCGG) в составе клонированной молекулы ДНК (при клонировании ДНК в *E.coli* метилирование по CG-сайтам утрачивается). С помощью этой методики удалось показать, что каждая отдельная метилированная последовательность CG обычно сохраняется в ходе многих клеточных делений в культуре клеток позвоночных, а неметилированные последовательности CG так и остаются неметилированными.

Автоматическое наследование 5-метил-С ставит проблему «курицы и яйца»: на какой стадии происходит первое метилирование у позвоночных? Установлено, что при введении неметилированной ДНК в оплодотворенную яйцеклетку мыши почти все CG-сайты этой ДНК метилируются (хотя существует одно важное исключение, описанное ниже). Таким образом, большая часть генома млекопитающих может оказаться сильно метилированной. Поскольку известно, что в норме поддерживающая метилаза не способна метилировать ДНК, лишенную метальных групп, остается предположить, что в яйцеклетке должен присутствовать другой фермент: *учреждающая* метилаза. Вероятно, выполнив свою функцию, она исчезает, а за сохранение метилированных нуклеотидов в ДНК клеток развивающихся тканей отвечает уже другая, поддерживающая метилаза.

10-5
10-20

10.3.17. Метилирование ДНК у позвоночных способствует тому, что клетка придерживается выбранного пути развития [35]

Какова роль метилирования CG? Эксперименты, проведенные с использованием рестриктазы HpaII, свидетельствуют о том, что ДНК неактивных генов метилирована сильнее, нежели ДНК активных генов. Более того, оказалось, что неактивный ген, ДНК которого метилирована, после активации теряет большую часть своих метальных групп. Убедительное доказательство того, что именно метилирование влияет на экспрессию генов, получено в опытах с 5-азацитозином (5-aza-C, см. рис. 10-44,6), который на короткий период добавляли к культивируемым клеткам. 5-aza-C, аналог основания, не способный метилироваться, включается в состав ДНК и действует в качестве ингибитора поддерживающей метилазы, снижая таким образом общий уровень метилирования ДНК. В клетках, обработанных 5-aza-C, определенные ранее неактивные гены активировались и одновременно получали неметилированные остатки С. После разовой активации активное состояние этих генов поддерживалось и в отсутствие 5-aza-C во многих последующих поколениях клеток. Этот факт указывает на то, что изначальное метилирование генов способствовало их пребыванию в неактивном состоянии.

На основании результатов, полученных в опытах с 5-азацитозином, было выдвинуто предположение, что метилирование ДНК может играть главную роль в возникновении различных типов клеток. Это означало бы, что специализация клеток у позвоночных и беспозвоночных осу-

ществляется разными путями. Последующее изучение показало, однако, что роль метилирования ДНК в дифференцировке клеток, по-видимому, не столь существенна и носит скорее вспомогательный характер. Важные переключения в ходе развития осуществляются регуляторными белками, способными влиять на активность генов вне зависимости от их метилирования. Например, Х-хромосома самок сперва конденсируется и инактивируется, и лишь затем некоторые из ее генов метилируются сильнее. И наоборот, определенные гены, активные в печени, в ходе развития включаются тогда, когда они еще полностью метилированы, и лишь позднее уровень их метилирования начинает снижаться.

Значение метилирования ДНК для экспрессии генов в значительной степени прояснилось в результате опытов по трансфекции. Например, тканеспецифичный ген, кодирующий актин мышц, выделяли как в полностью метилированной, так и в полностью неметилированной формах. При введении двух модификаций этого гена в культуру мышечных клеток оба варианта транскрибировались одинаково эффективно. Если же этот ген вводили в фибробласты, где он в норме не экспрессируется, неметилированный вариант транскрибировался на низком уровне, который тем не менее был выше, чем у введенного метилированного гена или у эндогенного гена, присутствующего в фибробласте и также метилированного. На основании этих опытов можно сделать вывод, что у позвоночных метилирование ДНК используется для закрепления пути развития, выбранного иными способами.

В отдельных случаях можно с достаточной точностью определить, могут ли последовательности ДНК, транскрибируемые с высокой эффективностью в клетках одного типа, транскрибироваться в клетках позвоночных другого типа. Подобные эксперименты показали, что уровни транскрипции в двух типах клеток позвоночных иногда различаются более чем в 10^6 раз. Неэкспрессируемые гены позвоночных гораздо менее «расплывчаты» в отношении транскрипции, чем неэкс-прессируемые гены бактерий, у которых наибольшие известные различия в скорости транскрипции экспрессируемых и неэкспрессируемых генов не превышают 1000-кратный уровень. Способствуя дальнейшему снижению транскрипции генов, включенных иным способом, метилирование ДНК, по-видимому, вносит свой вклад в это различие.

10.3.18. CG-богатые островки позволяют выявить у млекопитающих около 30000 генов «домашнего хозяйства» [36]

В ходе эволюции метилированные остатки в геноме имеют тенденцию к исчезновению, что объясняется специфическими особенностями механизма репарации. Дело в том, что случайное дезаминирование неметилированного цитозина приводит к возникновению урацила, который в норме не входит в состав ДНК и потому легко распознается ферментом репарации, вырезается и затем заменяется на цитозин. Последствиі случайного дезаминирования остатка 5-метилцитозина не могут быть устранены подобным образом, так как при дезаминировании 5-метил-С образуется тимин, который неотличим от других, немутантных остатков тимина, входящих в состав ДНК. Следовательно, в ходе эволюцш метилированные остатки цитозина в геноме имеют тенденцию превращаться в тимин.

После того, как около 400 млн. лет назад произошла дивергенциі позвоночных и беспозвоночных, подобным образом утерялось более трех из каждых четырех CG, что привело к значительному уменьшению содержания этого динуклеотида в геноме позвоночных. Оставшиеся

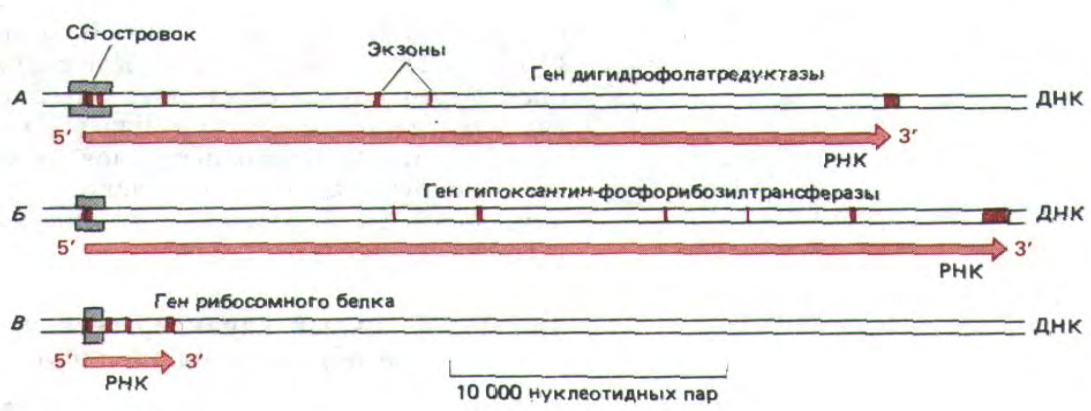


Рис. 10-46. CG-островки в трех генах «домашнего хозяйства» млекопитающих. Прямоугольниками отмечен размер каждого островка, которые, как показано, окружают промоторы каждого гена. Следует отметить, что у большинства генов млекопитающих экзоны *(выделены цветом)* короче, нежели интроны. (По A. P. Bird, Trends Genet. 3: 342-347, 1987.)

последовательности CG очень неравномерно распределены по геному: существуют отдельные области длиной 1000-2000 нуклеотидов (CG-островки), в которых содержание CG в 10-20 раз выше, чем в среднем по геному. Подобные островки окружают промоторы так называемых генов **«домашнего хозяйства»**, т.е. тех генов, которые кодируют белки, необходимые для жизнедеятельности клетки и, следовательно, экспрессируемые в клетках любого типа (рис. 10-46). Эти гены можно противопоставить **тканеспецифичным генам,** кодирующим белки, присущие лишь строго определенным типам клеток.

Распределение CG-островков можно легко объяснить как побочный эффект развития системы метилирования CG, предназначенный для снижения экспрессии неактивных генов у позвоночных (рис. 10-47). В половых клетках все тканеспецифичные гены (за исключением тех, которые присущи яйцеклетке и спермию) неактивны и метилированы. За долгую эволюцию их метилированные CG были утеряны при случайном дезаминировании. Однако CG-последовательности в промоторных областях генов, активных в половых клетках (включая все гены «домашнего хозяйства»), оставались деметилированными и при спонтанном дезаминировании всегда репарировались. Полагают, что эти гены узнаются сайт-специфическими ДНК-связывающими белками, которые присутствуют в половых клетках и удаляют любые метильные группы в области промоторов генов «домашнего хозяйства». Эксперименты с клонированными генами показывают, что лишь CG, входящие в состав CG-островков, остаются неметилированными, если в яйцеклетку мыши инъецировать совершенно неметилированную ДНК.

Известно, что геном млекопитающих (размером около 3 x 10^9 нуклеотидных пар) содержит около 30 000 CG-островков, каждый из которых имеет в длину около 1000 нуклеотидных пар. Большинство островков совпадает с 5'-концом транскрипционной единицы и таким образом,

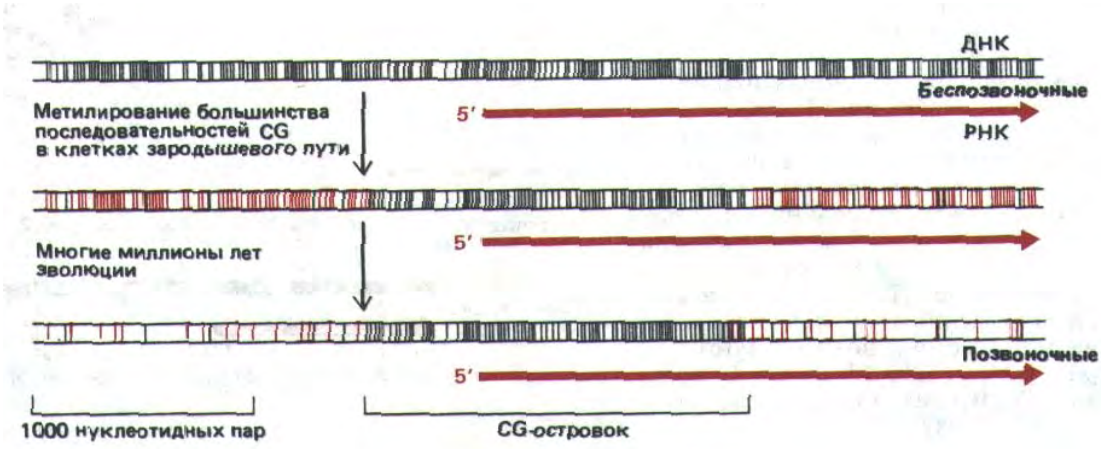


Рис. 10-47. Схема, иллюстрирующая заметную нехватку последовательностей CG и наличие CG-островков. Черными линиями отмечено расположение неметилированных динуклеотидов CG в последовательности ДНК, а красными линиями обозначены метилированные CG-динуклеотиды. Метилированные гены беспозвоночных неизвестны.

по-видимому, с 5'-концом гена. В связи с тем, что ДНК, окружающую CG-островки, можно выделить и клонировать отдельно, относительно просто решается задача идентификации и характеристики жизненно важных генов (генов «домашнего хозяйства»). Вероятно, несколько десятков тысяч остальных генов являются тканеспецифичными и не экспрессируются в половых клетках. Так как большая часть их последовательностей CG утеряна, эти тканеспецифичные гены гораздо труднее выявить в геноме.

10.3.19. Сложный характер регуляции генов необходим для образования многоклеточного организма [37]

Клетки эмбриона имеют много общего с компьютером, поскольку постоянно получают информацию о своем расположении в данный момент и объединяют эту информацию с поступившей ранее для того, чтобы на каждой стадии развития действовать соответствующим образом. Изучение дрозофилы генетическими методами показало, что в образовании и поддержании основного плана строения тела участвует относительно небольшое число (порядка 100) генов, кодирующих главные регуляторные белки, взаимодействующие между собой. В любом многоклеточном организме подавляющее большинство генов (и жизненно важных, и тканеспецифичных), вероятно, регулируются посредством сложных контролирующих цепочек, исходящих от генов главных регуляторных белков. Если в регуляции генов эукариот центральную роль играют механизмы, сильно отличающиеся от бактериальных (например, механизмы, зависящие от прямого наследования структуры хроматина), можно ожидать, что именно эти механизмы контролируют некоторые гены главных белков-регуляторов.

В настоящее время ничего неизвестно о том, как осуществляется контроль за действием генов главных белков-регуляторов у позвоночных, однако начали появляться первые данные о том, как эти гены контролируются у дрозофилы. Например, гомеотические гены, определяющие разное развитие отдельных сегментов тела мухи, находятся в двух сложных локусах *Antennapedia* и *Bithorax*. Комплекс биторакса, ответственный за дифференцировку двух грудных сегментов и восьми сегментов брюшка, содержит три транскрипционные единицы, называемые Ubx, abd-A и abd-B. Каждая транскрипционная единица, по-видимому, кодирует семейство белков-регуляторов, образующихся в результате альтернативного сплайсинга РНК. Полагают, что кодирующие

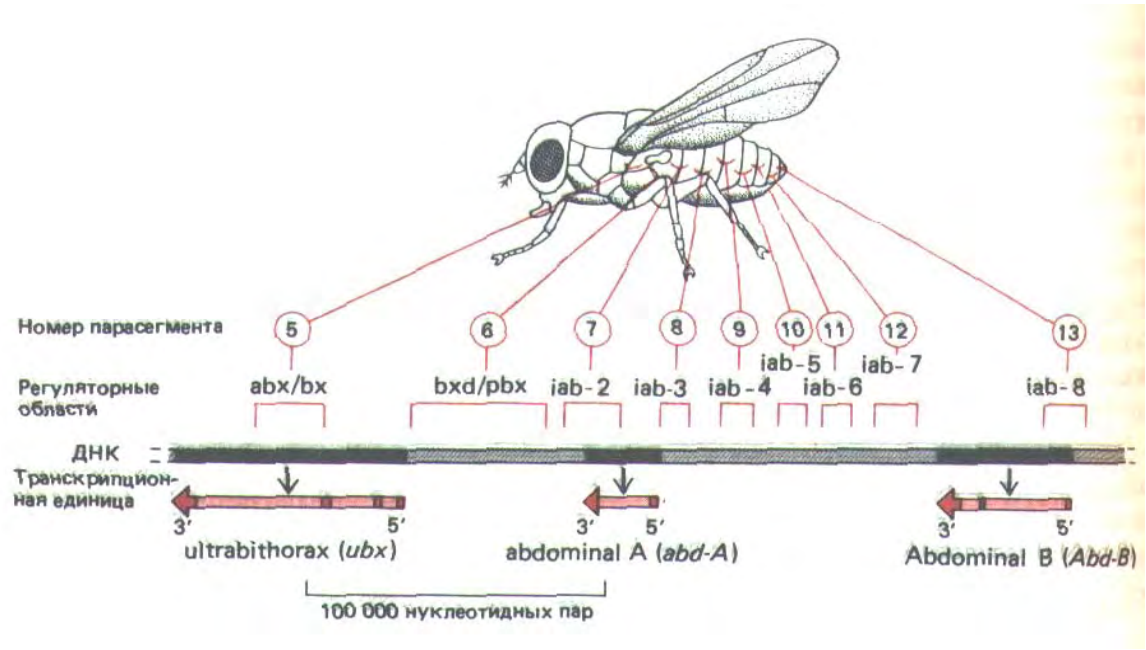


Рис. 10-48. Организация биторального комплекса у дрозофилы. В этой важной области хромосомы размером 300 000 нуклеотидных пар содержатся три гена - *Ubx, abd-A* и *Abd-B.* которые кодируют главные регуляторные белки, контролирующие развитие груди и брюшка. Гомеотические мутации помогли выявить еще девять групп регуляторных последовательностей ДНК. Каждая из этих групп необходима для развития указанных парасегментов, а также других парасегментов, расположенных ближе к концу тела. Считается, что эти регуляторные последовательности ДНК действуют как энхансеры, контролируя экспрессию одного из близлежащих генов, а порядок их расположения на молекуле ДНК соответствует расположению тех сегментов тела, на которые они воздействуют (см. рис. 10-49). (По M. Peifer, F. Karch and W. Bender, Genes Devel. 1: 891-898, 1987.)

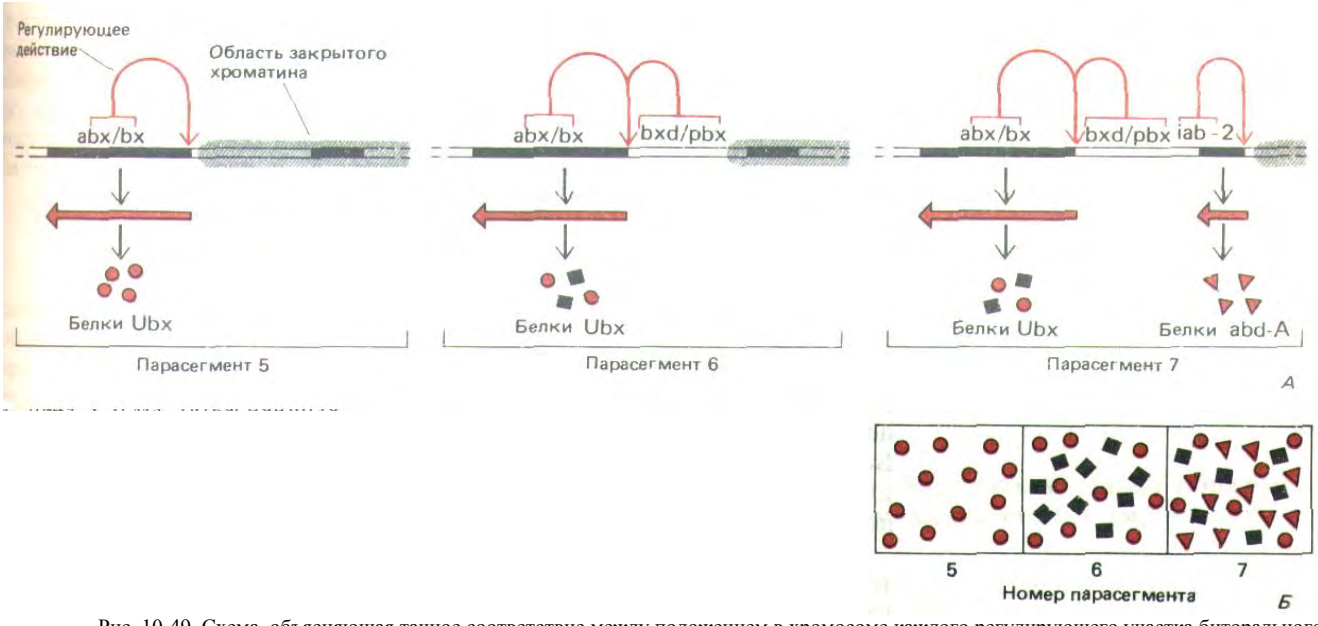


Рис. 10-49. Схема, объясняющая тачное соответствие между положением в хромосоме каждого регулирующего участка биторального гомплекса и расположением на теле мухи тех парасегментов, на которые оказывают влияние мутации в этой области. *А.* Контроль на уровне изменения структуры хроматина. Предполагается, что хроматин деконденсируется или же постепенно активируется во все более отдаленных парасегментах, таким образом, в парасегменте 5 открыта только регуляторная область *вbx/bx,* тогда как все остальные регуляторные участки экспонированы в самых удаленных парасегментах. находящихся под контролем того комплекса (парасегмент 13, см. рис. 10-48). На данном рисунке изображены лишь три парасегмента. Ген *Ubx* может образовывать несколько различных транскриптов (обозначенных здесь квадратиками и кружочками), отбор которых контролируется регуляторными областями. Таким образом, биторальный комплекс образует в каждом из парасегментов свою смесь белков-регуляторов *(Б).*

области этого комплекса содержат менее 20 000 нуклеотидных пар, тогда как регуляторные последовательности насчитывают приблизительно 300000 нуклеотидных пар. По-видимому, регуляторные области состоят из набора энхансеров, расположение которых по длине хромосомы соответствует расположению сегментов тела, подвергающихся действию этих энхансеров (рис. 10-48). Эти факты в совокупности с данными о строении тела мутантных мух, у которых один из энхансеров транслоцирован из одной части комплекса биторакса в другую, позволяют выдвинуть предположение о регуляции генов внутри комплекса биторакса на основе изменений в структуре хроматина. Согласно этому предположению, в клетках, образующих комплекс биторакса и расположенных все ближе к концу тела, последовательно открываются лежащие один за другим домены хроматина. Это дает возможность энхансерам, локализованным в данных доменах, активироваться в строгой очередности (рис. 10-49). Весьма вероятно, что механизмы, контролирующие гены белков-регуляторов, не менее сложны.

Заключение

В организме животных и растений функционируют механизмы, ответственные за то, что в разных клетках транскрибируются разные гены. Так как многие специализированные клетки обладают способностью поддерживать свои уникальные свойства при выращивании их в культуре, механизмы регуляции генов должны быть стабильными и наследуемыми. Прокариоты и дрожжи представляют собой весьма удобную модельную систему, с помощью которой можно изучать механизмы регуляции генов. Некоторые из этих механизмов могут также принимать участие в возникновении специализированных типов клеток у высших эукариот. Один из них - конкурентное взаимодействие между двумя или более главными белками-регуляторами, каждый из которых, подавляя образование другого, стимулирует свой собственный синтез.

Изучение экспрессии генов, сконструированных методами генной инженерии, а также фрагментов, встроившихся в случайные сайты генома трансгенных животных,, показало, что большая часть генов высших эукариот контролируется смесью диффундирующих белков-регуляторов, уникальных для каждого типа клеток. Кроме того, на экспрессию генов у высших эукариот может влиять переход хроматина

в более или менее конденсированное состояние; у позвоночных транскрипцию неактивных генов подавляет метилирование. Однако для большинства *генов эти дополнительные уровни контроля могут либо определяться, либо преодолеваться диффундирующими белками-регуляторами. До сих пор неизвестно, каким образом контролируются гены, кодирующие главные белки-регуляторы, которые, собственно, и детерминируют у позвоночных тип клетки.*

10.4. Посттранскрипционный контроль

Хотя контроль активности большинства генов осуществляется главным образом на уровне инициации транскрипции, тем не менее и позже, в ходе передачи информации от РНК к белку, такой контроль происходит на самых разных этапах. Более того, вполне вероятно, что для некоторых генов каждая стадия их экспрессии находится под контролем. Большая часть сведений о посттранскрипционной регуляции получена лишь недавно, и механизм контроля на этом уровне изучен далеко не "Годностью.

В настоящем разделе речь идет о регуляции экспрессии гена после того, как РНК-полимераза связалась с его промотором и начала синтез РНК. Обсуждение ведется в той же последовательности, в какой регуляторные механизмы могут воздействовать на молекулу РНК после начала транскрипции.

10.4.1. Аттенуацня транскрипции приводит к преждевременной терминации синтеза некоторых молекул РНК [38]

Феномен аттенуацни транскрипции изучали преимущественно на бактериях, где с помощью этого механизма регулируется экспрессия многих генов. Для осуществления регуляции такого типа в начале РНК-цепи должна присутствовать определенная последовательность нуклеотидов, которая позволяла бы молекуле РНК находиться в одной из двух возможных конформаций. Более стабильную конформацию имеет петля РНК, которая служит сигналом терминации для бактериальной РНК-полимеразы; в результате синтез РНК преждевременно останавливается (см. рис. 5-6). Однако, если с определенной последовательностью расту-

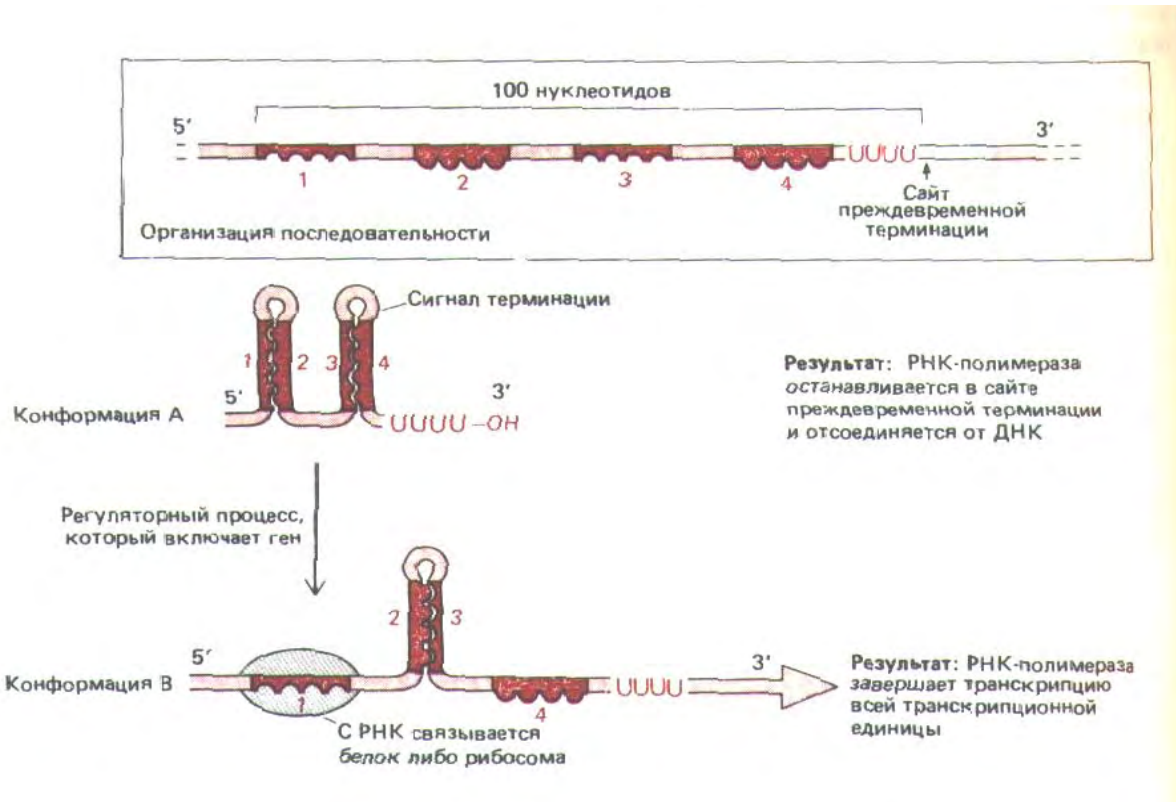


Рис. 10-50. Регуляция экспрессии генов с помощью аттенуации транскрипции у прокариот. По мере роста РНК-транскрипта за счет добавлення нукдеотидов к 3'-концу, РНК-транскрипт приобретает одну из двух указанных информации. Наиболее стабильной является конформация А, которая содержит две шпильки с двойной спиралью, возникшие при спаривании комплементарных оснований. В связи с тем, что за спиралью шпильки, образовавшейся при спаривании сайтов 3 и 4, следует серия U-нуклеотидов, шпилька служит сигналом терминации для бактериальной РНК-полимеразы. Конформация *Б* образуется, если с сайтом 1 на транскрипте РНК связывается регуляторный белок или рибосома, в результате свободный сайт 2 спаривается с сайтом 3, при этом сигнал терминации пропадает и образуется длинный функциональный транскрипт РНК, который и запускает экспрессию гена.

щей молекулы РНК связывается регуляторная молекула, цепь РНК приобретает такую конформацию, при которой сигнала терминации не образуется, а получается длинная функциональная молекула РНК (рис. 10-50), У бактерий таким регуляторним компонентом обычно служит рибосома, которая в процессе трансляции «садится» на растушую цепь РНК.

У эукариот аттенуация транскрипции участвует в регуляции небольшого числа генов. Так как в клеточном ядре функционально активные рибосомы отсутствуют, возможно, что с определенными последовательностями РНК связываются регуляторные молекулы, однако механизм аттенуации в клетках эукариот не изучен.

10-23

10.4.2. Сплайсинг РНК может регулироваться таким образом, что один и тот же ген направляет синтез различных форм белка [39]

Первоначально сплайсинг РНК был открыт у вируса. Оказалось, что из одного первичного транскрипта у него образуется несколько молекул мРНК, и, следовательно, синтезируется несколько разных белков (см. разд. 9.4.12). Многие гены высших эукариот образуют различные белки именно с помощью **альтернативного сплайсинга РНК.** Если в нескольких участках транскрнпта существуют различные точки сплайсинга, то один и тот же ген может служить матрицей для десятков различных белков. Обычно, однако, возможности сплайсинга ограничены и с каждого транскрипта транслируется лишь несколько белков.

В некоторых случаях альтернативный сплайсинг имеет место вследствие «двусмысленности интрона»: стандартный механизм удаления интронов не может четко различить две или более альтернативные пары 5'- и 3'-сайтов сплайсирования, и, таким образом, в разных ситуациях случайно реализуются разные варианты. Подобная *конститутивная* форма альтернативного сплайсинга, по-видимому, ответственна за образование различных аномальных мРНК мутантного гена (3-глобина у некоторых лиц, страдающих β-талассемией (см. рис. 9-86). Для других генов такая двусмысленность характерна и в норме, при этом во всех тканях, где ген экспрессируется, образуются кодируемые им разные версии одного и того же белка.

Во многих случаях регулируется именно альтернативный сплайсинг РНК, а не конститутивный. Отбор сайтов сплайсинга определяется клеткой. Следовательно, в разных клетках в соответствии с потребностями организма с одного и того же первичного транскрипта РНК могут транслироваться различные белки (или наборы белков). Таким образом, многие белки образуются в тканеспецифичных формах. Среди них компоненты 1) внеклеточного матрикса (фибронектин), 2) клеточного скелета (тропомиозин), 3) плазматической мембраны, 4) ядра (см, табл. 10-1) и 5) внутриклеточных путей клеточной сигнализации (С-киназа и тирозин-протеинкиназа, кодируемые протоонкогеном src; рис. 10-51).

Как правило, замены экзонов, происходящие при альтернативном сплайсинге РНК, не приводят к появлению совершенно разных белков. Вместо этого образуется серия белков, функции которых аналогичны. Их называют **изоформамн.** Изоформы белка модифицированы таким образом, чтобы они годились для конкретной ткани. Изменения в них могут определять, с какими другими белками будет взаимодействовать данная молекула, причем каталитические или структурные домены

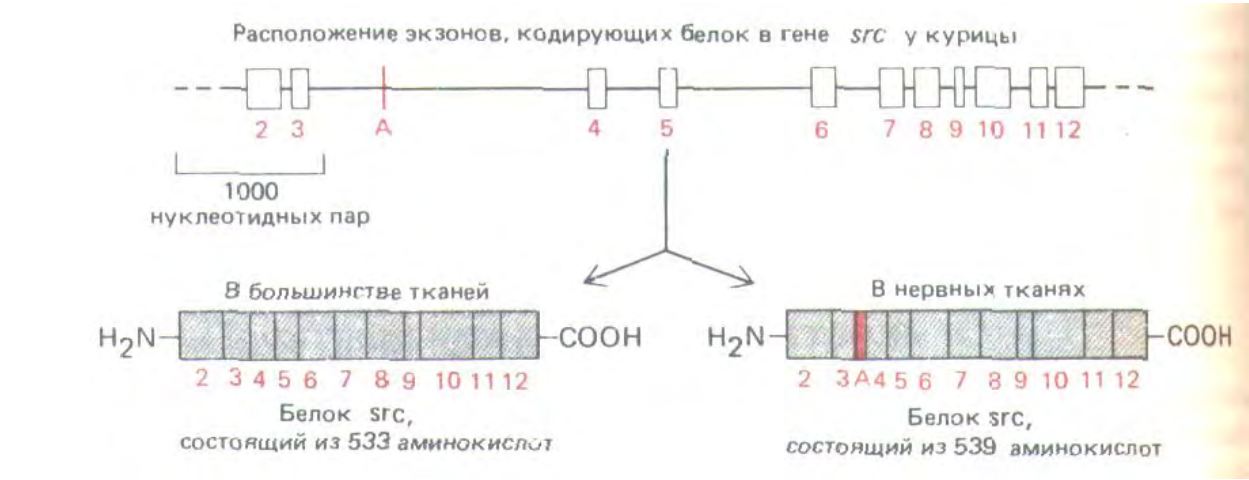


Рис. 10-51. При регуляторном альтернативном сплайсинге РНК с гена src считываются две несколько отличающиеся формы тирозин-протеинкиназы. Экзон А включается в последовательность лишь в нервных тканях. Поскольку такая тканеспецифичность в сплайсинге сохранилась в ходе эволюции (характерна и для птиц, и для млекопитающих), можно предположить, что наблюдаемая разница в белках, кодируемых геном *src,* весьма важна для биологической активности этого регуляторного белка. На рисунке указаны только экзоны, кодирующие белок (экзон 1 формирует 5'-лидерную последовательность мРНК). (По J. B. Levy et al., Mol. Cell Biol. 7: 4142-4145, 1987.)

остаются прежними. Например, одна и та же транскрипционная единица в клетках щитовидной железы дает начало кальцитонину, а в клетках нервной ткани - далекому от него по свойствам пептидному гормон (CGRP - calcitonin-gene-related peptide).

10.4.3. Альтернативный сплайсинг РНК может использоваться для включения и выключения генов [40]

Некоторые гены постоянно транскрибируются во всех клетках, однако из-за существования конститутивного сплайсинга образуемая мРНК кодирует нефункционирующий белок, и ген экспрессируется лишь в тех клетках, где происходит специализированная реакция сплайсинга.

Такой тип генной регуляции особенно хорошо охарактеризовав у дрозофилы. Так, например, свойство Р-элемента (см. разд. 5.6.10) перемещаться лишь в половых клетках, связано с его неспособностью образовывать активную транспозазу в соматических клетках. Это явление в свою очередь обусловлено присутствием в мРНК транспозазы

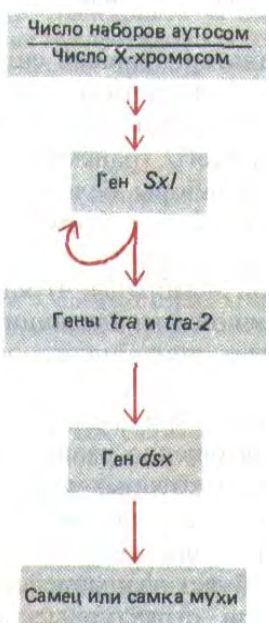


Рис. 10-52. Каскадные изменения в экспрессии генов, определяющих пол у дрозофилы, зависят от альтернативного сплайсинга РНК. Если отношение числа наборов аутосом к числу Х-хромосом равно единице (в норме это два набора аутосом и две Х-хромосомы), особь развивается в самку; мухи, у которых это отношение равно двум (в норме два набора аутосом и одна Х-хромосома), развиваются как самцы. Это соотношение определяется уже на ранних стадиях развития и затем сохраняется в каждой клетке, Функция генов, представленных на рисунке, как раз и состоит в передаче информации об этом соотношении другим генам, определяющим фенотип, характерный для того или иного пола. Такие гены функционируют как два альтернативных набора, определяющие свойства, характерные для самки и для самца. Ген dsx (doubl esex - двупол ость) получил свое название благодаря тому, что у мутантов, не экспрессирующих этот ген, работают оба набора, специфичные для самок и для самцов.

На рисунке представлена цепь событий, которые происходят при развитии самок. Стрелки указывают действие каждого гена, участвующего в этом процессе. У самцов гены *Sxl, tra* и *tra2* транскрибируются, но образуют только нефункциональную мРНК, а транскрипт гена *dsx* сплайсируется, причем в итоге образуется белок, который включает гены, детерминирующие женский путь развития. У самок транскрипт *Sxl* сплайсируется совершенно по-другому, в результате образуется белок, контролирующий сплайсинг, который, с одной стороны, поддерживает свой собственный синтез, а с другой стороны, включает два гена *tra (указано стрелками).* В свою очередь, продукты генов *tra,* действуя кооперативно, меняют схему сплайсинга РНК у транскрипта гена *dsx.* Получившаяся мРНК гена *dsx* образует измененную форму белка *dsx,* которая выключает гены, определяющие мужской путь развития.

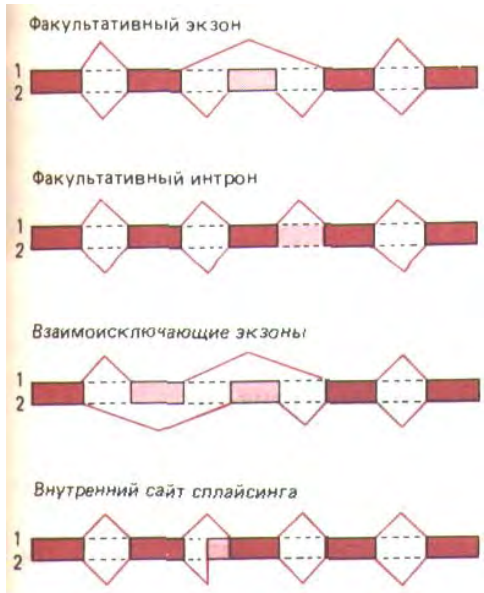


Рис. 10-53. Четыре пути альтернативного сплайсинга РНК, которые имели место в эксперименте. В каждом случае одна транскрибированная РНК может сплайсироваться двумя альтернативными способами с образованием двух разных мРНК (1 и 2), Более темным цветом обозначены последовательности РНК, присутствующие в обоих типах мРНК. Прямоугольники, окрашенные светлее, соответствуют последовательностям, имеющимся лишь в мРНК одного типа. Соседние прямоугольники соединены цветными линиями, указывающими на последовательности нитронов. По-видимому, не существует какого-либо простого механизма или единого правила, которые могли бы объяснить, почему происходит тот или иной выбор. (По A. Andre-adis, M. E. Gallego, B. Nadal-Ginard, Annu. Rev. Cell Biol. 3: 207-242, 1987.)

интрона, который, по-видимому, удаляется лишь в половых клетках. С помощью генетического анализа выявлен другой пример. Пол мух определяется каскадной активацией генов, каждый из которых ответствен за синтез белка, детерминирующего правильный сплайсинг РНК следующего в этом ряду гена (рис. 10-52). Области ДНК, кодирующие некоторые белки, которые детерминируют пол мухи, клонированы и секвенированы, что в значительной мере облегчило изучение механизмов, регулирующих выбор сайта сплайсинга.

10-23

10.4.4. Механизмы, ответственные за выбор сайта для регулируемого сплайсинга РНК, неизвестны

Полагают, что регулируемые изменения в выборе сайтов сплайсинга РНК осуществляются путем связывания ткане- и геноспецифичных белков или молекул РНК с растущим РНК-транскриптом. Так как выбор сайтов сплайсинга происходит и при конститутивном, и при регулируемом варианте по одним и тем же стандартным консенсусным последовательностям, связывание с определенным компонентом должно менять конформацию транскрипта РНК, с тем чтобы закрыть или открыть сайты сплайсинга, ранее существовавшие в молекуле. Вероятно, тут задействованы сложные механизмы, так как простое предположение о том, что при связывании белка сайт сплайсинга закрывается, не объясняет в достаточной мере, почему наблюдается такое разнообразие продуктов сплайсинга (рис. 10-53). Для изучения молекулярных механизмов регулируемого сплайсинга необходимо реконструировать его в бесклеточной системе, что позволило бы выделить все необходимые компоненты и проанализировать действие каждого из них на сплайсосому.

10.4.5. Изменение сайта, в котором происходит расщепление транскрипта РНК и его полиаденилирование, может менять карбоксильный конец белка [41]

У эукариот 3'-конец молекулы мРНК определяется не терминацией синтеза РНК РНК-полимеразой, а в ходе реакции расщепления РНК, которая катализируется дополнительными факторами при элонгации транскрипта (см. разд. 9.4.5). Место такого расщепления может варьировать, при этом изменяется карбоксильный конец получающейся молекулы белка, который кодируется 3'-концом мРНК. У прокариот образование более длинного транскрипта РНК приводит лишь к появлению дополнительных аминокислот в белковой цепи. Однако у эукариот при сплайсинге образование более длинного транскрипта может привести к тому, что исходный карбоксильный конец белка будет полностью удален и замещен новым.

С изменением такого типа связано переключение синтеза антител при созревании В-лимфоцитов с мембраносвяз энных на секретирующие формы. В незрелых В-клетках образующиеся антитела связаны с плазматической мембраной, где они служат рецепторами антигенов. Стимуляция антигенами одновременно запускает деление этих клеток и начало секреции ими антител. Секретируемая форма антител отличается от мембраносвязанной только в терминальной части карбоксильного конца: мембраносвязанная форма содержит здесь длинную цепь из гидрофобных аминокислот, пересекающую липидный бислой, а секретируемая форма несет гораздо более короткий фрагмент водорастворимых аминокислот. Таким образом, для переключения с синтеза мембраносвязанных на секретируемые антитела необходима иная нуклеотидная последовательность на 3'-конце мРНК.

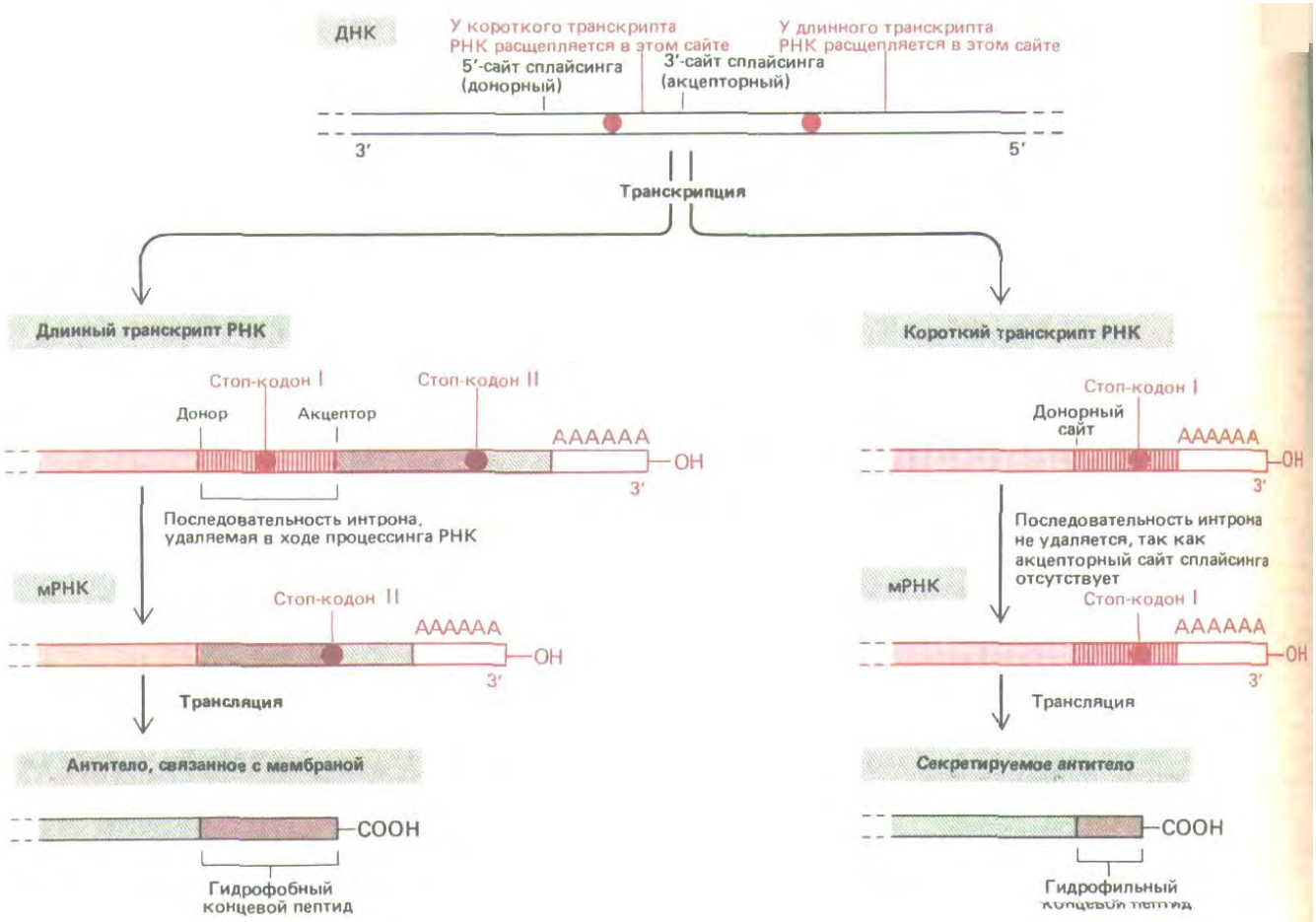


Рис. 10-54. Выбор сайта расщепления РНК и полиаденилирования весьма важен при образовании антител. В нестимулированных В-клетках *(слева)* образуются длинные транскрипты РНК, и при сплайсинге удаляется последовательность интрона вблизи 3'-конца этой молекулы. В результате образуется мРНК, которая кодирует молекулу антитела, связывающуюся с мембраной. Напротив, после стимуляции антигеном *(справа)* первичный транскрипт РНК разрезается перед акцепторным сайтом сплайсинга последнего экзона. В результате некоторые последовательности интрона, удалявшиеся из длинного транскрипта, остаются в качестве кодирующих последовательностей в коротком транскрипте. Это те последовательности, которые кодируют гидрофильную карбоксиконцевую часть секретируемой молекулы антитела.

Мембраносвязанная форма белка образуется при транскрипции всех кодирующих последовательностей ДНК с образованием длинного транскрипта. Нуклеотиды, кодирующие длинный гидрофобный карбоксильный конец мембраносвязанного белка, локализованы в последнем экзоне (рис. 10-54, *слева)*. Интрон, предшествующий этому экзону, содержит нуклеотиды, кодирующие водорастворимый хвост секретируемой молекулы; при сплайсинге мРНК они удаляются. Секретируемая форма молекулы образуется с более короткого первичного транскрипта, который заканчивается перед началом следующего экзона. Следовательно, в этом транскрипте перед нуклеотидами, кодирующими водорастворимый хвост, отсутствует акцепторный сайт сплайсинга, который мог бы взаимодействовать с имеющимся донорным сайтом. В результате эти нуклеотиды остаются в образующейся молекуле мРНК (рис. 10-54, *справа)*.

Неизвестно, однако, как контролируется реакция расщепления, определяющая переключение длины транскриптов РНК.

10.4.6. Открытие альтернативного сплайсинга требует пересмотра понятия «ген» [42]

С тех пор, как стало известно, что эукариотические гены содержат интроны, а их кодирующие последовательности можно состыковать по-разному, вновь встал вопрос о том, что следует понимать под словом «ген». Первое определение гена на молекулярном уровне было предложено в начале 40-х гг. на основании изучения биохимической генетики гриба

нейроспора. До этого времени геном считали область генома, которая в мейозе обособляется как отдельная единица и ответственна за проявление определенного фенотипического признака, например, белых и красных глаз у дрозофилы или гладких и морщинистых семян у гороха. После работ на нейроспоре стало ясно, что ген, как правило, соответствует области генома, направляющей синтез единственного фермента. На основании этого возникло предположение, что один ген кодирует одну полипептидную цепь. Эта гипотеза оказалась весьма плодотворной. При изучении механизмов экспрессии в 60-х гг. ген стали определять как фрагмент ДНК, который транскрибируется с образованием РНК, кодирующей одну полипептидную цепь (или одну структурную РНК, как например, молекулы тРНК или рРНК). Обнаруженный в конце 70-х гг. феномен прерывистости генов эукариот не противоречил принятым представлениям. Однако теперь нам стало ясно, что в клетках высших эукариот многие последовательности ДНК могут кодировать два и более различных белка благодаря альтернативному сплайсингу. Что же тогда следует считать геном?

В тех относительно редких случаях, когда два сильно различающихся эукариотических белка образуются из одной транскрипционной единицы, говорят, что эти белки кодируются различными генами, которые на хромосоме перекрываются. Однако определение видоизмененных белков, образующихся в результате альтернативного сплайсинга РНК, как продуктов перекрывающихся генов, может показаться излишне усложненным. Проще изменить исходную формулировку и считать геном любую последовательность ДНК, которая транскрибируется как отдельная единица и кодирует набор близкородственных полипептидных цепей (изоформы белков).

10.4.7. Экспорт РНК из ядра может регулироваться [43]

Первичный транскрипт РНК в среднем в 10 раз длиннее, чем зрелая молекула РНК, образующаяся при сплайсинге. Но по некоторым данным пределы клеточного ядра покидает только одна двадцатая часть всей гяРНК (см. разд. 9.4.8). Таким образом, значительная часть первичных транскриптов (вероятно, половина) полностью разрушается в ядре, никогда не образуя молекулу мРНК, предназначенную для переноса. Распаду подвергаются и те молекулы РНК, последовательности которых не могут превратиться в мРНК, и такие молекулы, которые способны соответствующим образом процессироваться лишь в клетках другого типа.

Перенос РНК через ядерные поры представляет собой активный процесс (см. разд. 8.3.3). Если этот процесс зависит от специфического узнавания транспортируемых молекул РНК (либо связавшихся с РНК молекул белка или РНК) белком-рецептором, входящим в состав комплекса ядерной поры, то РНК, не имеющие такого опознавательного знака, будут избирательно задерживаться в ядре. С другой стороны, для переноса РНК могут и не потребоваться опознавательные сигналы, в этом случае автоматически переносится вся РНК, за исключением той, которая избирательно задерживается. Третья возможность заключается в том, что используется и селективный перенос, и селективное задержание. Поскольку любая РНК задерживается в ядре до тех пор, пока с ней связаны компоненты сплайсосомы, селективное задержание может обусловливаться механизмом, препятствующим завершению сплайсинга определенной молекулы РНК. В настоящее время ни одна из этих гипотез не получила четкого экспериментального подтверждения, более того, представляется маловероятным, чтобы транспорт РНК из ядра

играл существенную роль в регуляции экспрессии большинства генов у эукариот.

В связи с тем, что вирус использует для своего размножения клеточный аппарат, изучение цикла развития вируса часто помогает понять механизмы клеточных процессов. Например, геном аденовируса представляет собой двухцепочечную молекулу ДНК, которая реплицируется и транскрибируется в ядре клетки-хозяина. На поздних стадиях инфекции транспорт хозяйской РНК из ядра останавливается, в результате большая часть РНК, попадающей в цитоплазму, оказывается принадлежащей аденовирусу. Генетический анализ показал, что для такого изменения в избирательности переноса РНК из ядра необходимы два образующихся на ранних стадиях инфекции аденовирусных белка. Таким образом, взаимодействие аденовируса с клеткой-хозяином может служить перспективной модельной системой для изучения контроля за транспортом РНК.

10-24 10.4.8. Белки, связывающиеся с 5'-лидерной областью мРНК, участвуют в негативном контроле трансляции [44]

Не все молекулы РНК, достигающие цитоплазмы, транслируются в белок. Трансляция некоторых из них блокируется особыми белками-репрессорами (рис. 10-55), которые связываются вблизи 5'-конца, там, где должна происходить инициация трансляции. Такой тип регуляции был впервые обнаружен у бактерий, где избыток рибосомных белков может подавлять трансляцию своих собственных мРНК.

В клетках эукариот особенно хорошо изучен тип негативного контроля трансляции, который дает возможность быстро привести в соответствие синтез внутриклеточного белка ферритина с количеством имеющихся в клеточном содержимом атомов железа. Показано, что после добавления железа мРНК ферритина в цитоплазме перемещается из неактивного рибонуклеопротеинового комплекса в трансляционноактивный полирибосомный комплекс. С помощью генной инженерии установлено, что регуляция, направляемая железом, связана с последовательностью размером 30 нуклеотидов, которая расположена на 5'-лидерном конце молекулы мРНК ферритина. Этот элемент, контролирующий ответ на железо, складывается в структуру, состоящую из стебля с петлей (см. рис. 10-60, *Б);* элемент связывается с регуляторным белком в том случае, если этот белок не соединен с железом. При связывании регуляторного белка с элементом, контролирующим ответ на железо, трансляция любой последовательности РНК, расположенной за этим сайтом, подавляется (рис. 10-55). Добавление железа приводит к диссоциации комплекса РНК—белок, что вызывает увеличение скорости трансляции мРНК в 100 раз.

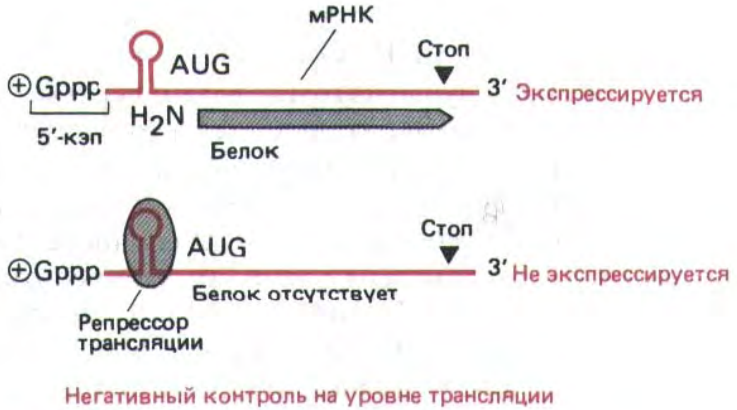


Рис. 10-55. Негативный контроль трансляции с участием сайт-специфического ДНК-связывающего белка (репрессор трансляции). Связывание этого белка с молекулой мРНК приводит к снижению уровня ее трансляции. Известно несколько примеров контроля на уровне трансляции такого типа. В данном случае представлен механизм повышения синтеза ферритина при увеличении концентрации свободного железа в клетке (см. также рис. 10-60).

10.4.9. Присутствие энхансера трансляции в некоторых вирусных мРНК свидетельствует о существовании механизма позитивного контроля трансляции [45]

В принципе, **позитивный контроль трансляции** может осуществляться засчет расположенной на мРНК специальной области «трансляционного энхансера», который способен выборочно привлекать рибосомы. Показано, что определенные РНК-вирусы *(пикорнавирусы)* содержат такую область. Ее присутствие приводит к тому, что трансляция начинается с внутренних сайтов AUG, которые в других случаях в эукариотической клетке не используются для инициации синтеза белка (рис. 10-56).

Позитивный контроль трансляции обнаружен также и в дрожжевых клетках. Генетическими методами были выявлены специфические белки, необходимые для активации трансляции мРНК дрожжевого гена *GCN4*. В отсутствие этих белков мРНК не транслируется. мРНК гена *GCN4* напоминает слабо транслируемые мРНК высших эукариот. Полагают, что трансляция таких мРНК контролируется аналогичным образом. (К этому классу относится около 5% всех охарактеризованных до сих пор мРНК). У таких РНК 5'-лидерная последовательность необычно длинна и содержит серию триплетов AUG, препятствующих трансляции основной кодирующей последовательности, расположенной за сайтом инициации синтеза коротких пептидов. Стоп-кодон, локализованный перед основной кодирующей последовательностью, препятствует сквозному считыванию. Сходным образом, у пикорнавирусов трансляция основной

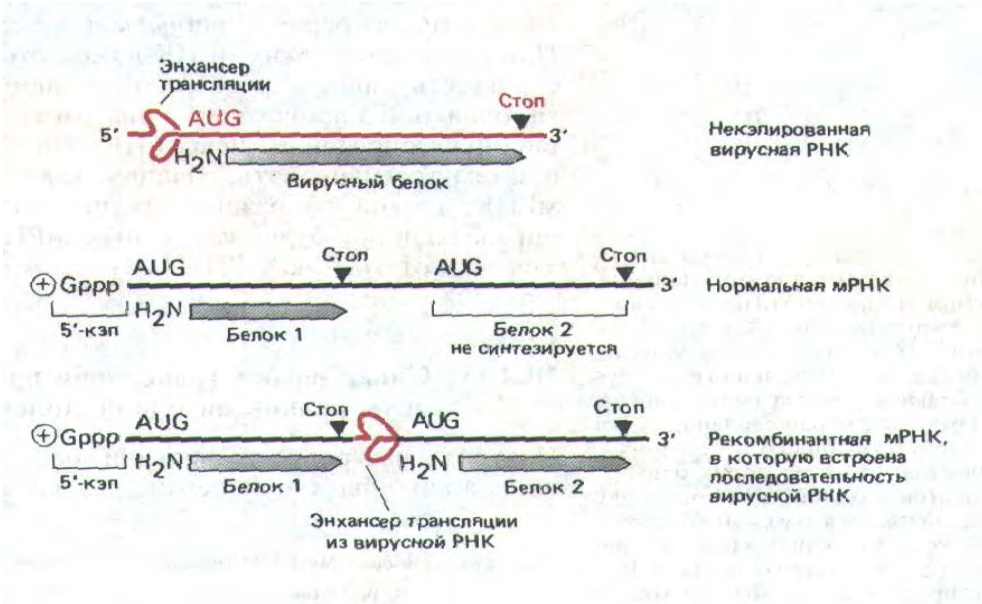


Рис. 10-56. Схема эксперимента, который демонстрирует существование последовательности РНК в геномах некоторых РНК-содержащих вирусов, выступающей в роли трансляционного энхансера. Геном пикорнавирусов (к которым относится и вирус полиомиелита) представляет собой плюс-нить РНК, т.е. может служить непосредственно мРНК для синтеза вирусоспецифических белков. У этих вирусов нет нэпа на 5'-конце РНК, который необходим для инициации белкового синтеза на большинстве молекул мРНК. Измеряя уровень белкового синтеза, катализируемого различными рекомбинантными РНК, в молекуле вирусной РНК можно идентифицировать последовательности трансляционных энхансеров длиной несколько сот нуклеотидных пар. Как показано на схеме, перемещая эту последовательность в середину цепи мРНК, можно вставить рибосому начинать трансляцию с соседнего внутреннего кодона AUG; таким образом, можно обойти правила, которые в норме заставляют начинать белковый синтез только с первого кодона AUG.

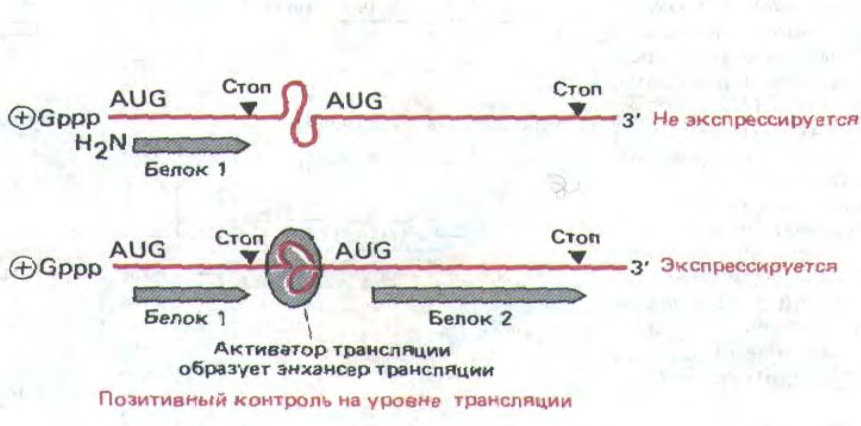


Рис. 10-57. Модель позитивного контроля трансляции, согласно которой для интенсивной трансляции мРНК необходимо связывание белка (активатора трансляции). Хотя известно, что трансляция специфических мРНК находится под позитивным контролем, его механизм до конца неясен. Установлено, что позитивный контроль имеет отношение к синтезу коротких пептидов, трансляция которых инициируется перед первым AUG. Это дает право считать, что в данном случае действует механизм, аналогичный тому, который описан у пикорнавирусов (рис. 10-56).

кодирующей последовательности такой мРНК может зависеть от связывания молекул-активаторов трансляции с последовательностями энхансеров трансляции, расположенных вблизи соответствующих кодо-нов AUG, что приводит к повторной инициации трансляции (рис. 10-57). Однако каков механизм подобной активации трансляции, до сих пор неизвестно.

10-25

10.4.10. Многие мРНК-объект контроля на уровне трансляции [46]

Насколько контроль на уровне трансляции распространен у высших эукариот? Согласно некоторым оценкам, таким способом регулируется экспрессия одного гена из десяти. Контроль на уровне трансляции дает возможность клетке быстро и обратимо менять концентрацию белка, не подавляя синтез кодирующей его мРНК (см. разд. 12.4.7). По-видимому, экспрессия некоторых протоонкогенов регулируется именно так.

Особенно важную роль контроль на уровне трансляции играет в оплодотворенных яйцеклетках, где необходимо переключить синтез с белков, присущих ооциту в состоянии покоя, на белки, участвующие в быстром делении клеток. В таких яйцеклетках имеется большой запас мРНК, образовавшейся в ходе созревания ооцита. Многие из этих материнских мРНК до оплодотворения яйцеклетки не транслируются. Изучение яйцеклеток двустворчатых моллюсков показало, что до и после оплодотворения с рибосомами ассоциированы различные мРНК. При трансляции таких мРНК в бесклеточной системе образуются белки, соответствующие определенной стадии созревания яйцеклетки моллюска, однако это происходит лишь тогда, когда сохраняется мРНК в виде рибонуклеопротеина. Если РНК очистить от связанных *с* ней белков и затем транслировать, разница между белками, синтезированными на мРНК, взятой на разных стадиях, исчезает. Следовательно, фактор, определяющий, будет ли данная мРНК транскрибироваться, должен зависеть от того, как РНК связывается с регуляторними молекулами.

5-8

10.4.11. Сдвиг рамки трансляции приводит к образованию двух белков на одной молекуле мРНК [47]

Контроль на уровне трансляции, описанный выше, влияет на скорость инициации новых полипептидных цепей на молекуле мРНК. Обычно

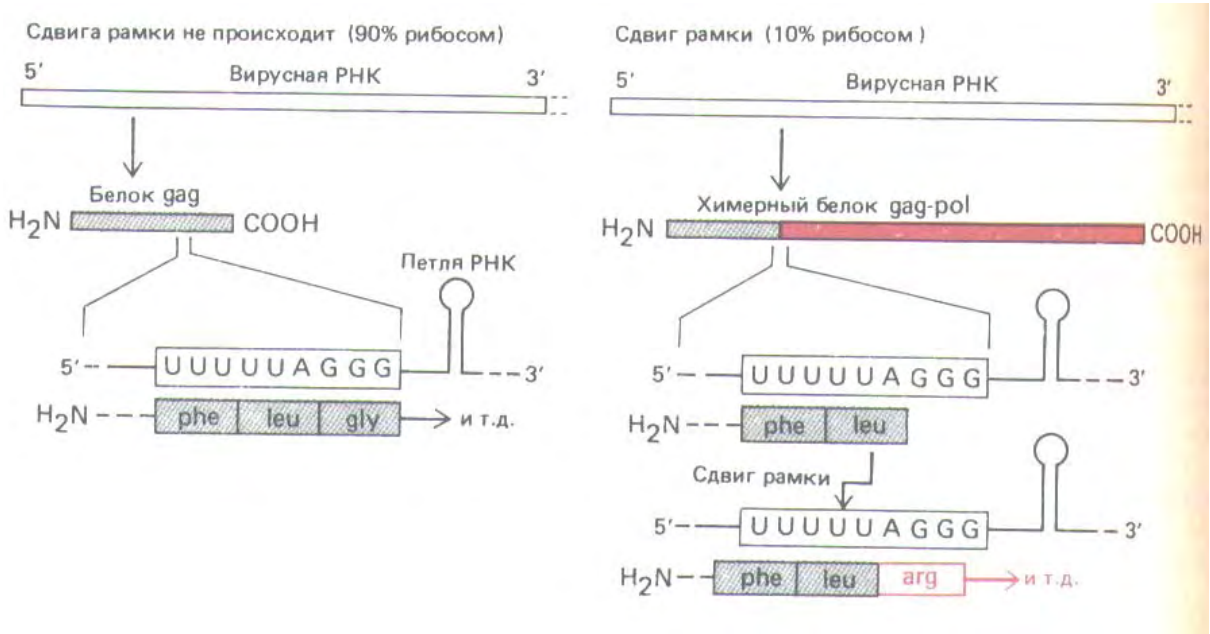


Рис. 10-58. Сдвиг рамки при трансляции необходим для образования обратной транскриптазы ретровируса. Вирусные обратная транскриптаза и интеграза образуются при расщеплении большого химерного белка gag-pol, а белки капсида в результате расщепления белка gag, присутствующего в больших количествах. Синтез обоих белков начинается в одной точке, но у gag он заканчивается на стоп-кодоне в той же рамке считывания, а при сдвиге рамки в направлении — 1 синтезируется химерный белок. Сдвиг рамки обусловлен локальными особенностями в структуре РНК (к ним относится и показанная на рисунке петля РНК), которые приводят к тому, что $тРНК^{Leu}$, присоединенная к карбоксильному концу растущей полипептидной цепи, время от времени соскальзывает на один нуклеотид назад в рибосоме и спаривается с кодоном UUU вместо UUA, который определял ее включение. Представлена последовательность вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1). (По T. Jacks et al., Nature 331: 280-283, 1988.)

завершение синтеза белка происходит автоматически. Однако в отдельных случаях образующийся белок может изменяться в ходе процесса, называемого **сдвигом рамки трансляции** (считывания).

Сдвиг рамки трансляции широко распространен у ретровирусов, что позволяет получать с одной мРНК различные количества двух или более белков. У этих вирусов обычно образуется большой полипротеин, который разрезается вирусной протеазой с образованием нескольких капсидных белков (gag-белки), обратной транскриптазы вируса и интегразы (pol-белки). Во многих случаях гены *gag* и *pol* находятся в разных рамках считывания, и, таким образом, сдвиг рамки необходим для образования pol-белков, присутствующих в гораздо меньших количествах. Сдвиг рамки происходит по определенному кодону в мРНК, и для его осуществления необходимо присутствие специфических последовательностей, которые могут находиться и перед этим сайтом, и за ним (рис. 10-58).

10-26
10-27

10.4.12. Экспрессия генов может контролироваться изменением стабильности мРНК [48]

Большая часть мРНК в клетках бактерий весьма нестабильна и имеет время полужизни около 3 минут. Так как мРНК у бактерий быстро синтезируется и также быстро разрушается, бактерия в ответ на изменения окружающей среды может соответствующим образом регулировать экспрессию своих генов.

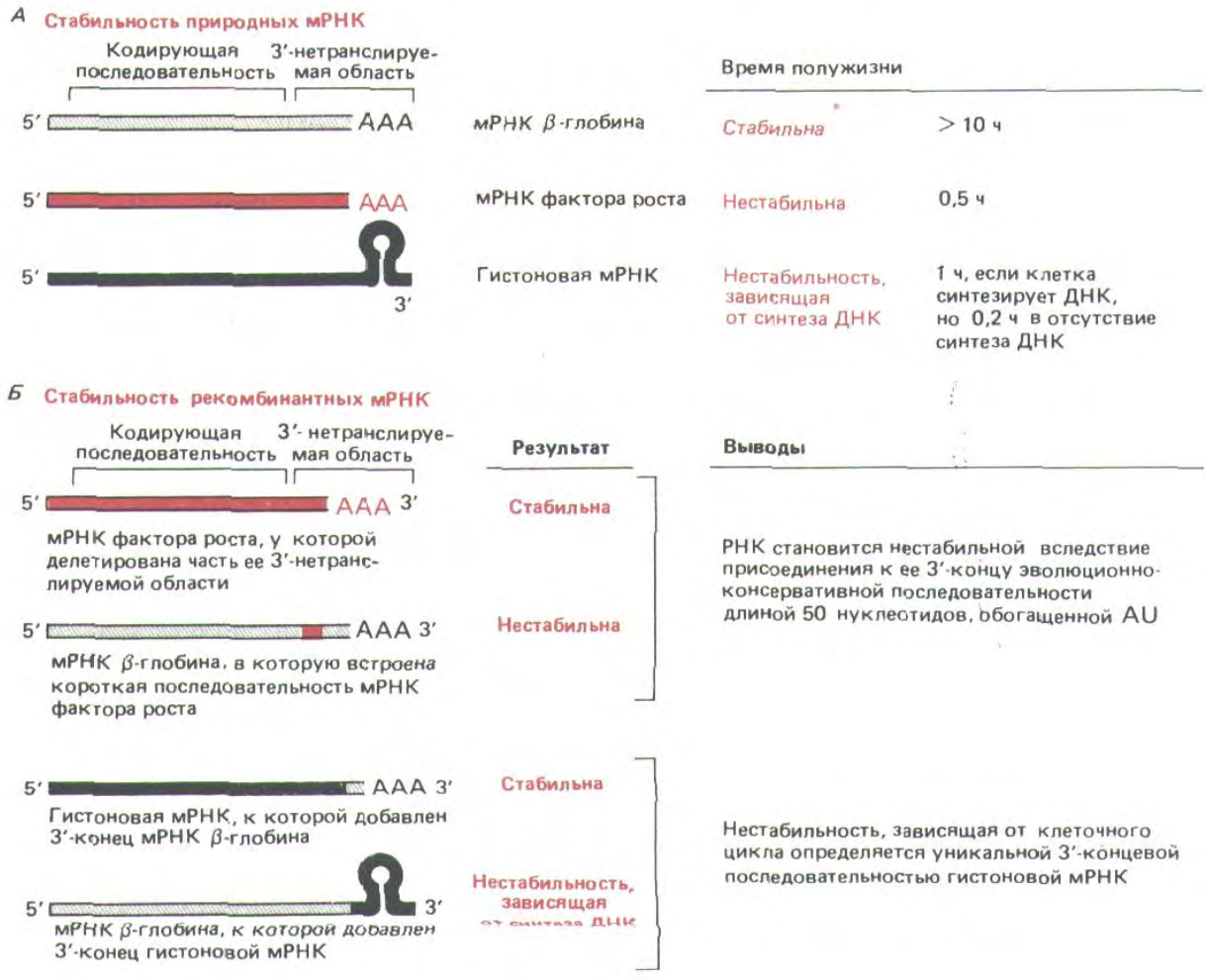


Рис. 10-59. Особые сигнальные последовательности, ответственные за нестабильность (быструю деградацию) некоторых мРНК. *А.* Три мРНК, время полужизни которых сильно различается. Непрерывный распад молекул мРНК, кодирующих различные факторы роста, обусловливает быстрое изменение их концентрации в ответ на внеклеточные сигналы. Гистоны необходимы, главным образом, для формирования хроматина, образующегося в ходе синтеза ДНК. Значительные изменения в стабильности их мРНК ограничивают время синтеза пистонов S-фазой клеточного цикла. *Б.* За необычно быстрый распад мРНК ответственны особые последовательности на 3'-нетранслируемом конце молекулы. Представленные результаты получены в экспериментах, когда указанные измененные последовательности РНК синтезировались в клетках с генов, модифицированных методами генной инженерии.

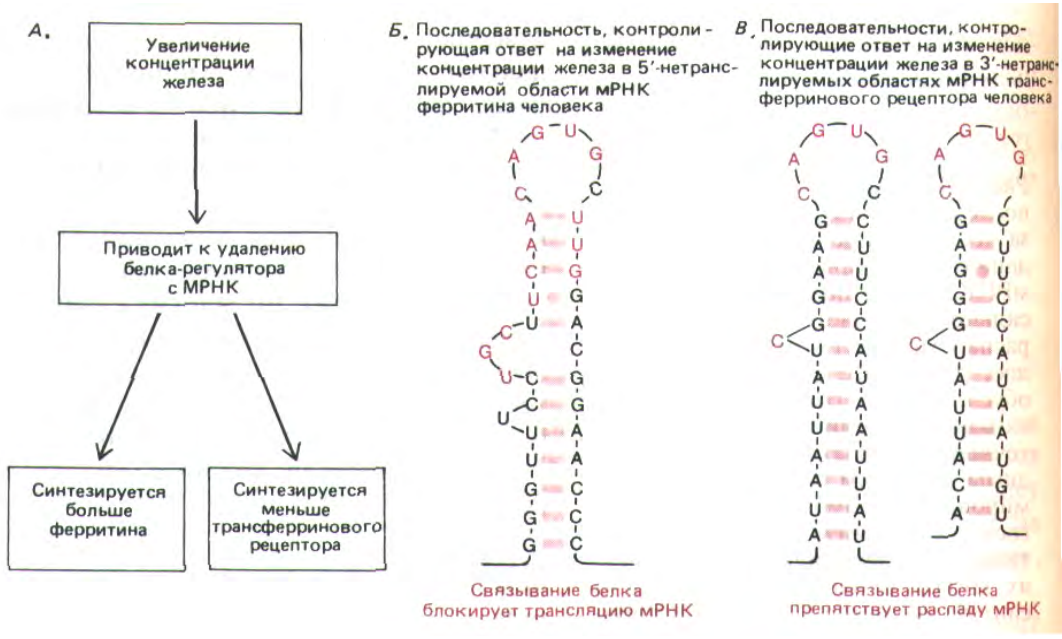


Рис. 10-60. В ответ на увеличение концентрации железа клетка повышает уровень синтеза ферритина (чтобы связать избыток железа) и снижает уровень синтеза рецепторов трансферрина (чтобы в клетку попадало меньше железа). Полагают, что оба типа ответов обусловлены одним и тем же регуляторным белком. Этот белок узнает общие свойства мРНК, кодирующих ферритин и рецептор трансферрина. *А.* Регуляторний белок отделяется от мРНК. *Б.* Элемент, контролирующий ответ на железо, расположенный в 5'-нетранслируемой области мРНК ферритина. Нуклеотиды, выделенные цветом, идентичны в мРНК ферритина млекопитающих, птиц и земноводных. Если поместить эту последовательность в 5'-нетранслируемую область других мРНК, то их трансляция также будет контролироваться уровнем содержания железа в среде. *В.* Две из пяти одинаковых последовательностей, от которых зависит ответ на изменение концентрации железа в среде, расположенные в 3'-нетранслируемой области мРНК, кодирующей рецептор трансферрина. Железо-зависимый контроль стабильности мРНК требует присутствия многих сайтов связывания регуляторных белков. Считается, что нуклеотиды, выделенные цветом, а также спиральный стебель шпильки, последовательность которого не так важна, играют решающую роль в узнавании белка. Поскольку контроль синтеза рецептора трансферрина и ферритина осуществляется разными механизмами, их уровни отвечают на изменения концентрации железа противоположным образом, несмотря на то, что в регуляции принимает участие один и тот же белок. (По M. W. Hentze et al., Science 238: 1570-1573, 1987; J. L. Casey et al., Science 240: 924-928, 1988.)

В эукариотических клетках мРНК более стабильна. Наприме мРНК, кодирующая 3-глобин, имеет время полужизни более 10 ч, есть и такие мРНК, время полужизни которых составляет всего 30 минут! или еще меньше. Нестабильные мРНК часто кодируют белки-регуляторы, концентрация которых в клетке быстро меняется (например, факторы роста и продукты протоонкогенов fos и *myc).* Нетранслируемая 3'-область многих таких нестабильных мРНК содержит длинные последовательности, обогащенные A и U, которые, по-видимому, и ответственны за их нестабильность (рис. 10-59).

Стабильность мРНК может меняться в ответ на внеклеточные сигналы. Так, например, стероидные гормоны действуют на клетку, не только усиливая транскрипцию отдельных генов (см. разд. 12.2.1), но и повышая стабильность некоторых мРНК, считываемых с этих генов. И наоборот, добавление к клеткам железа уменьшает стабильность мРНК, кодирующей трансферриновый рецептор, что приводит к образованию меньшего количества белка, связывающего железо. Интересно, что в дестабилизации мРНК трансферринового рецептора, по-видимому, участвует тот же чувствительный к железу белок, связывающийся с РНК, который контролирует трансляцию мРНК ферритина. В данном примере с трансферриновым рецептором белок соединяется с противоположным концом мРНК (нетранслируемый 3'-конец), что обусловливает усиление, а не ослабление синтеза белка (рис. 10-60).

10.4.13. Для избирательной деградации мРНК необходим постоянный синтез белка [49]

Контроль стабильности мРНК в клетках эукариот лучше всего изучен для мРНК, кодирующих гистоны. Время полужизни этих мРНК во время S-фазы клеточного цикла (когда требуются новые гистоны) составляет около 1 ч, но при остановке синтеза ДНК сокращается до нескольких минут. Если в ходе S-фазы синтез ДНК подавить антибиотиками, гистоновая мРНК становится нестабильной; возможно, накопление свободных гистонов в отсутствие новой ДНК, с которой они могли бы связаться, специфически повышает скорость распада гистоновой мРНК.

Регуляция стабильности гистоновой мРНК зависит от короткой структуры, состоящей из петли и двухцепочечного участка на 3'-конце; она заменяет роїуА-последовательность, присутствующую на 3'-конце

других мРНК. Такой 3'-конец образуется после того, как гистоновая мРНК синтезируется РНК-полимеразой II, в ходе специальной реакции расщепления, для которой необходимо спаривание с основаниями небольшой РНК, входящей в состав рибонуклеопротеиновой частицы (U7-мя РНК). Если методами генной инженерии соединить этот 3'-конец с другими мРНК, они также становятся нестабильными при остановке синтеза ДНК (см. рис. 10-59). Таким образом, как и в случае мРНК других типов, скорость распада жестко контролируется сигналами, расположенными вблизи 3'-конца, с которого, как полагают, и начинается деградация мРНК.

Если в середину кодирующей последовательности гистоновой мРНК поместить стоп-кодон, такая мРНК теряет способность быстро деградировать. Исходя из этого, было высказано предположение, что нуклеаза, ответственная за деградацию мРНК, соединена с рибосомой, и перед тем, как она начинает реакцию, большая часть гистоновой мРНК должна транслироваться. Это предположение могло бы объяснить, почему значительная часть нестабильных мРНК селективно стабилизируется при обработке клеток ингибитором белкового синтеза циклогексимидом. Тем не менее остается неясным, почему система деградации мРНК должна быть связана таким образом с рибосомой.

10.4.14. Некоторые мРНК расположены в определенных областях цитоплазмы [50]

Метод гибридизации in situ позволяет локализовать в клетке специфические молекулы мРНК (см. разд. 4.6.11). В гл. 16 будет идти речь о том, что некоторые мРНК, участвующие в формировании частей тела на ранних стадиях развития, сконцентрированы в определенных участках цитоплазмы ооцита (см. рис. 16-22, 16-60). Хотя остается неизвестным, с чем они при этом связаны, в ряде случаев подобное распределение по областям зависит от длинного нетранслируемого 3'-конца мРНК.

Легче всего определить локализацию молекул мРНК в больших по размеру ооцитах, однако примеры специфической локализации мРНК известны и для соматических клеток. Вероятно, в будущем с помощью методов генной инженерии станет возможным менять расположение конкретных молекул мРНК в цитоплазме с тем, чтобы выявить эффект такого перемещения на функцию этих мРНК.

10-28

10.4.15. Редактирование мРНК изменяет смысл информационной РНК [51]

Открытие все новых молекулярных механизмов, используемых клеткой, заставляет биологов постоянно удивляться. Например, совсем недавно было обнаружено, что все мРНК у трипаносомы содержат общую кэпированную последовательность на 5'-конце, которая транскрибируется отдельно и затем добавляется к 5'-концам транскриптов гяРНК при сплайсинге двух ранее не связанных между собой молекул. Подобный транссплайсинг имеет место у нематод, когда к ряду мРНК добавляется лидерная 5'-последовательность. Обнаружен он и у растений при комбинировании отдельных транскриптов РНК, из которых образуется кодирующая последовательность некоторых белков в хлоропластах. Разрезание и воссоединение транскриптов может оказаться кратчайшим путем к появлению новых белков, а те немногие известные сегодня случаи такого соединения экзонов могут быть остатками процессов, некогда имевших гораздо более широкое распространение.

Другой любопытный феномен, в значительной мере изменяющий транскрипты РНК, был обнаружен в митохондриях трипаносом. Он заключается в редактировании РНК: в определенные области транскрипта добавляется или удаляется один (или более) нуклеотид U, что приводит к изменению исходной рамки считывания и меняет смысл информации. Однако неизвестно, как контролируется редактирование, в результате которого образуется последовательность, кодирующая необходимый белок.

Редактирование РНК, хотя и в более ограниченных пределах, встречается у млекопитающих, где с помощью этого механизма ген аполипопротеина В образует два типа транскриптов: в одном из транскритов цитозин, кодируемый ДНК, заменяется на урацил, в результате чего появляется стоп-кодон и синтезируется короткий тканеспецифичный вариант этого большого белка. Хотя до сих пор приведенный пример редактирования РНК остается единственным, представляется маловероятным, что этот феномен у млекопитающих ограничивается только одним геном.

10.4.16. Реакции, катализируемые РНК, вероятно, | имеют весьма древнее происхождение [52]

Все обсуждаемые в данном разделе механизмы контроля на посттранскрипционном уровне зависят от специфического узнавания определенной молекулы РНК; именно таким путем отбираются молекулы для специальных превращений, например, сплайсинга или деградация. Узнавание возможно благодаря существованию большого числа сайт-специфических РНК-связывающих молекул, большая часть которых еще не охарактеризована. Сайты РНК, с которыми ассоциируют эти молекулы, обычно содержат группу открытых нуклеотидов в одноцепочечном участке (см. рис. 10-60). Следовательно, подобное сайт-специфическое связывание отличается от связывания с ДНК, где нуклеотидная последовательность обычно распознается по спаренным основаниям в двойной спирали. Более того, все известные молекулы, связывающиеся с определенными последовательностями ДНК, представляют собой белки; между тем к объединению со специфическими последовательностями РНК способны и белки, и молекулы РНК, принцип узнаваний у которых частично основан на комплементарном спаривании оснований РНК-РНК. Таким образом, пытаясь разобраться в посттранскрипционных процессах, мы вступили в мир РНК. Реакции, катализируемые молекулами РНК, гораздо труднее поддаются изучению, чем реакции, катализируемые белками. Большие молекулы РНК при выделении, из-за присутствия следовых количеств рибонуклеаз, легко распадаются, и их трудно очистить до гомогенного состояния, сохранив при этом, активность. Однако в настоящее врем» методы генной инженерии с использованием очищенных РНК-полимераз позволяют получать in vitro большое количество чистых РНК с любой последовательностью (рис. 9-81). Благодаря этому появилась возможность подробно изучить химию катализируемых РНК реакций самосплайсинга (см. разд. 3.2.11) и определить минимальные размеры последовательностей, необходимых для саморасщепления РНК вироида растений (рис. 10-61). Другой реакцией, в которой РНК играет роль катализатора как у прокариот, так и у эукариот, является расщепление предшественников тРНК комплексом белок—РНК, известным под названием *РНКаза Р*. РНК, входящая в состав мяРНП-частиц сплайсосом, вероятно, может также формировать и разрушать ковалентные связи (хотя это еще и не доказано). Полагают, что активный центр ферментативного комплекса пелтидилтрансферазы, участвующего в полимериза-

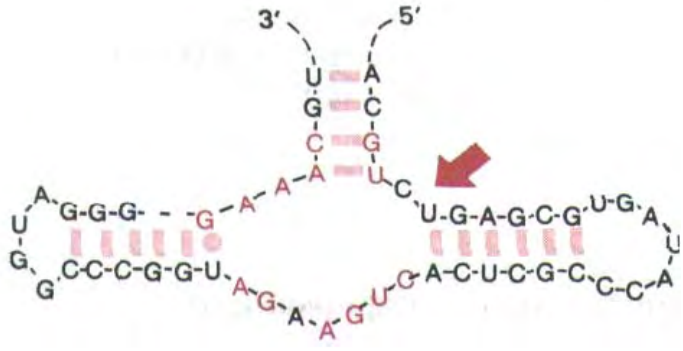


Рис. 10-61. Структура активного центра РНК вироида растений. Эта короткая молекула РНК сама расщепляет себя в участке, указанном стрелкой. Нуклеотиды, выделенные цветом, идентичны у семи саморасщепляющихся РНК, шесть из которых обнаружены в растениях и одна у животных. Реакции саморасщепления превращают тандемно повторенные последовательности одноцепочечной РНК (промежуточный продукт вироид-подобной РНК) в однокопийную линейную молекулу РНК, которая затем замыкается в кольцо. (По A. C. Forster et al., Nature 334: 265-267, 1988.)

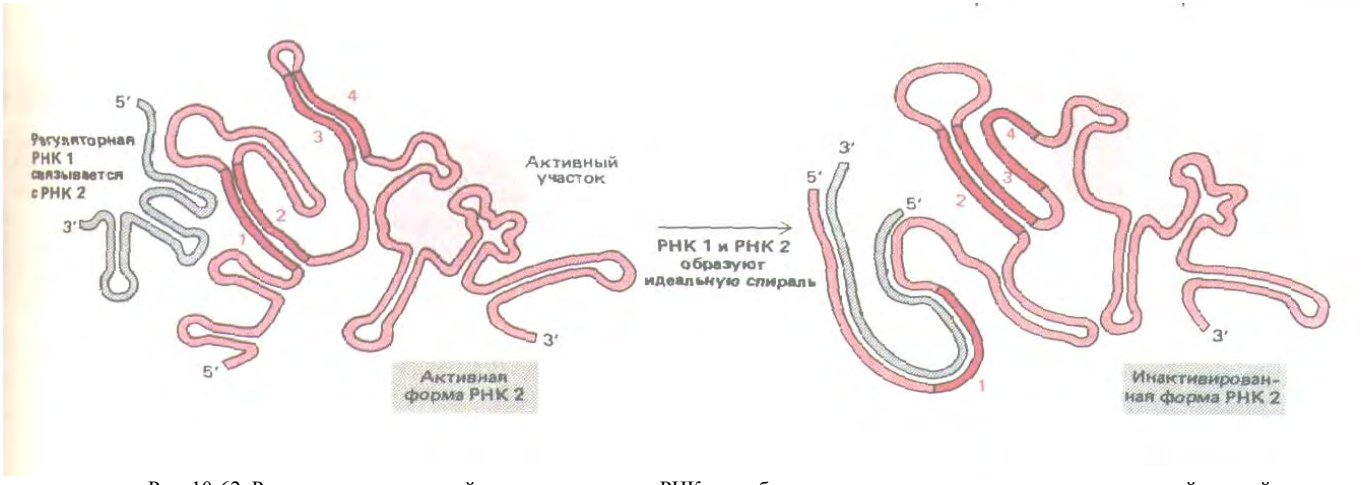


Рис. 10-62. Регуляторное взаимодействие двух молекул РНК способствует поддержанию постоянного числа копий в семействе бактериальных ДНК-содержащих плазмид ColEl. РНК (длиной около 100 нуклеотидов) представляет собой регуляторную молекулу, которая подавляет активность РНК 2 (длиной около 500 нуклеотидов), участвующей в инициации репликации плазмидной ДНК. РНК 1 комплементарна последовательности на 5'-конце РНК 2 и ее концентрация возрастает пропорционально числу молекул плазмидной ДНК в клетке. У РНК 2 последовательность 2 комплементарна как последовательности 1, так и последовательности 3 (ср. рис. 10-50) и способна замещаться при связывании РНК 1; в результате меняется конформация последовательности 4, инактивирующая РНК 2. (По H. Masukata and J.Tomizawa, Cell 44: 125-136, 1986.)

ции аминокислот рибосомой, расположен на рРНК (см. разд. 5.1.8).

Молекулы РНК обладают также и регуляторной функцией. Антисмысловая РНК в клетках, измененных экспериментальным путем, делает эти клетки не способными экспрессировать определенный ген (механизм, аналогичный тому, который в норме регулирует экспрессию некоторых генов бактерий). Этот механизм на самом деле может иметь гораздо более широкое распространение. Особенно хорошо изученным примером такого рода служит контроль с обратной связью за началом репликации ДНК большого семейства бактериальных плазмид. Контролирующая система ограничивает копийность плазмид, и таким образом не дает плазмидам убить хозяйскую клетку (рис. 10-62).

Изучение реакций, катализируемых РНК, представляет особый интерес для понимания хода эволюции. Как уже обсуждалось в гл. 1, первые клетки, по-видимому, не содержали ДНК, и в них было очень мало, а может быть и вообще не было белков. Многие из реакций, катализируемых РНК в современных клетках, могут представлять собой молекулярные ископаемые, т.е. происходить от той сложной сети реакций, направляемых РНК, которые предположительно преобладали в метаболизме клетки 3,5 млрд лет назад. Разобравшись в них, биологи, возможно, смогут проследить пути возникновения первой живой клетки.

Заключение

При осуществлении контроля экспрессии генов клетки воздействуют на многие стадии перехода РНК→белок. Полагают, что большинство генов регулируется на нескольких уровнях, хотя преобладающим считают контроль на уровне инициации транскрипции. Тем не менее, некоторые гены транскрибируются с постоянной скоростью, а их включение и выключение происходит только за счет воздействия на РНК. К таким посттранскрипционным регуляторним процессам относят: 1) аттенуа-цию транскрипции путем преждевременной терминации, 2) альтернативный выбор сайта сплайсинга, 3) контроль за образованием 3'-конца путем расщепления и добавления polyA, 4) контроль инициации трансляции и 5) регулируемую деградацию мРНК. Для большинства из этих контролирующих процессов необходимо узнавание последовательностей или структур в молекуле РНК. Такое узнавание может осуществляться либо белком-регулятором, либо регуляторной молекулой РНК.

10.5. Организация и эволюция ядерного генома [53]

В геномах ныне живущих организмов записана значительная часть их эволюционной истории. Некоторые ее страницы могут быть расшифрованы при изучении последовательности ДНК этих организмов. Методы секвенирования ДНК, широко распространенные в настоящее время, дают возможность анализировать большое количество молекул ДНК и судить о том, как за десятки миллионов лет возникли гены, кодирующие определенные белки. Изучение случайных изменений, происходящих в хромосомах сейчас, проливает дополнительный свет на механизмы, ответственные за эволюционные изменения в прошлом. В данном разделе представлены некоторые молекулярно-генетические подходы, направленные на изучение организации и эволюции ядерного генома высших эукариот.

10-32
10-34

10.5.1. Точковые мутации обусловливают небольшие изменения генома, а его перестройка или увеличение осуществляются в ходе генетической рекомбинации [54]

Последовательность нуклеотидов в ДНК должна точно реплицироваться и сохраняться. В гл. 5 обсуждались сложные механизмы, позволяющие ДНК наследоваться с необычайной точностью: за каждые 200000 лет случайно меняется лишь одна нуклеотидная пара из тысячи (см. разд. 5.2). И даже при такой скорости мутирования в популяции, состоящей из 10000 особей, каждая возможная нуклеотидная замена будет «испробована» около пятидесяти раз за миллион лет. Если какой-либо вариант последовательности обладает преимуществом, он быстро размножится благодаря естественному отбору. Следовательно, можно ожидать, что у любого вида функция большинства генов будет оптимизирована в отношении вариаций, возникающих вследствие точковых мутаций.

Точковые мутации служат для тонкой «подстройки» генома, но долговременный эволюционный процесс должен быть связан с более радикальными генетическими изменениями. Эту функцию выполняет генетическая рекомбинация; с ее помощью геном может увеличиваться или уменьшаться (при дупликации или делеции), а его части могут перемещаться из одной области в другую, образуя новые комбинации. Составляющие части генов (их экзоны и регуляторные элементы) могут перемешиваться, давая начало новым белкам, обладающим совершенно новыми функциями. Кроме того, если какой-либо ген представлен в геноме двумя копиями, одна из них может подвергнуться мутации, что приведет к дивергенции копий и их специализации для едва различающихся функций. Таким путем геном как целое постепенно усложняется и совершенствуется. Например, у млекопитающих почти каждый ген существует в нескольких вариантах: разные гены актина - для различных типов сократительных клеток, разные гены родопсина - для восприятия различных цветов, разные гены коллагена - для различных типов соединительных тканей и так далее. Экспрессия каждого гена регулируется строго и специфически. Изучение последовательностей ДНК показывает, что многие гены, даже значительно отличающиеся друг от друга, могут иметь родственные модульные области. Так например, определенная часть генов родопсина имеет общего предшественника с рядом генов, кодирующих некоторые гормоны и рецепторы (см. разд. 12.3.13); эта общая последовательность, вероятно, присутствует и в других белках (см. разд. 3.3.8).

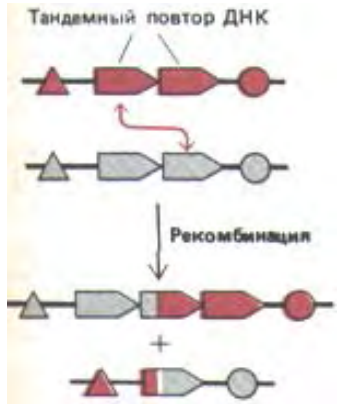


Рис. 10-63. Семейство тандемно повторенных генов теряет и восстанавливает свои копии вследствие кроссинговера между сестринскими хромосомами, несущими эти гены. Это происходит довольно часто, так как длинные участки гомологичных последовательностей ДНК являются хорошим субстратом для общей генетической рекомбинации.

Основой для возникновения подобных семейств генов и генных сегментов служит генетическая рекомбинация. Выше обсуждались молекулярные механизмы общей и сайт-специфической рекомбинации. В данном разделе будут рассмотрены некоторые результаты воздействия рекомбинации на геном.

10-33
10-34
10-35

10,5.2. Тандемно повторяющиеся последовательности ДНК стремятся остаться неизмененными [55]

Дупликации генов обычно объясняют редкими событиями, которые катализируются некоторыми рекомбинационными ферментами. Однако у высших эукариот имеется эффективная ферментативная система, которая соединяет концы разорванной молекулы ДНК. Таким образом, дупликации (а также инверсии, делеции и транслокации сегментов ДНК) могут возникать у этих организмов вследствие ошибочного воссоединения фрагментов хромосомы, которая по каким-то причинам оказалась разорванной. Если дуплицированные последовательности соединяются «голова к хвосту», то говорят о *тандемных повторах.* Появление одного тандемного повтора легко может привести к возникновению их длинной серии в результате неравного кроссинговера между двумя сестринскими хромосомами, поскольку длинные участки спаривающихся последовательностей представляют собой идеальный субстрат для обычной рекомбинации (рис. 10-63). Дупликация ДНК и следующий за ней неравный кроссинговер лежат в основе *амплификации ДНК,* процесса, который, как выяснилось, способствует возникновению раковых клеток (см. рис. 21-26). В ходе неравного кроссинговера число тандемно повторяющихся генов может как увеличиваться, так и уменьшаться (см. рис, 10-63). Большое количество повторяющихся генов будет поддерживаться естественным отбором лишь в том случае, если существование дополнительных копий окажется выгодным для организма. Как отмечалось выше, у позвоночных тандемный повтор кодирует большой предшественник рибосомной РНК, что необходимо для обеспечения потребности растущих клеток в новых рибосомах (см. разд. 9.4.16). Кластеры тандемно повторяющихся генов кодируют у позвоночных и другие структурные РНК, включая 5S-рРНК, U1- и U2-мяРНК. Тандемные повторы характерны и для гистоновых генов, на которых синтезируется большое количество белка, требующегося в каждой S-фазе.

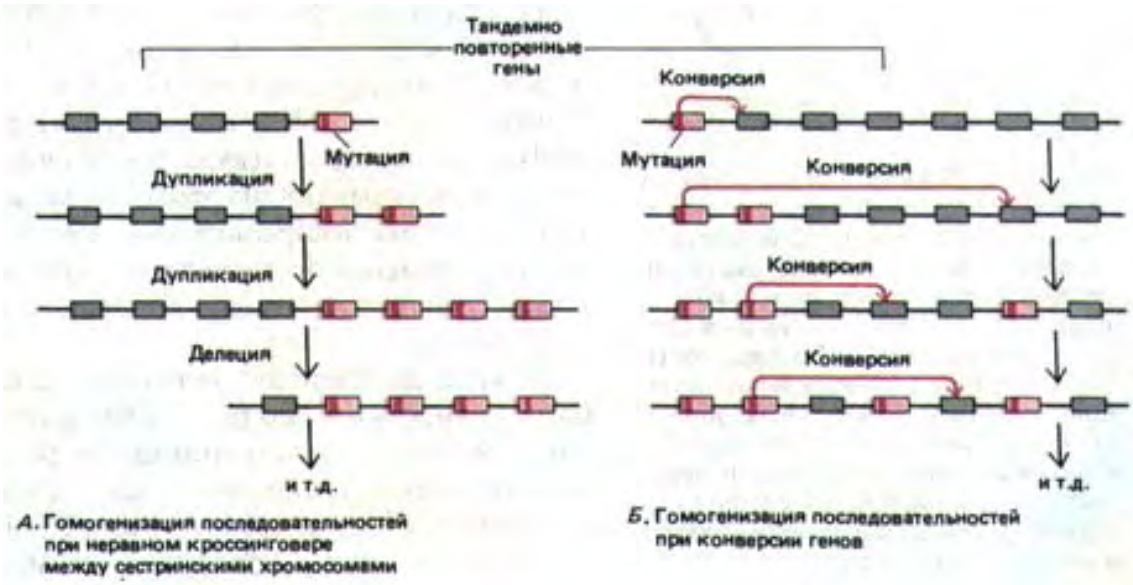


Рис. 10-64. Два типа событий, позволяющих сохранить последовательности ДНК в тандемном расположении и очень похожими друг на друга. *А.* Постоянное увеличение и уменьшение числа копий гена в тандеме при неравном кроссинговере (см. рис. 10-63) приводит к гомогенизации всех последовательностей генов, входящих в состав кластера. *Б.* При конверсии генов одна копия действует как матрица, которая передает либо все. либо часть последовательностей своей ДНК другой копии гена. У высших эукариот эти процессы, по-видимому, присущи генам, расположенным рядом друг с другом на хромосоме. У низших эукариот, например у грибов, конверсия генов у которых изучена гораздо лучше, этот процесс, как оказалось, не лимитирован лишь соседними генами.

Можно ожидать, что в ходе эволюции последовательности тандемно расположенных генов, а также нетранскрибируемой ДНК спенсеров, расположенных между ними, дивергируют за счет случайных мутаций. изменяющих одну или несколько копий гена. Однако на самом деле последовательности тандемно повторенных генов и их спейсерная ДНК обычно почти идентичны. Полагают, что к этому причастны два механизма: во-первых, неравный кроссинговер, приводящий к последовательному расширению и сокращению областей, содержащих тандемно повторяющиеся последовательности (анализ компьютерной модели такого кроссинговера показывает, что при этом последовательности имеют тенденцию оставаться прежними, рис. 10-64, *А);* во-вторых, конверсия генов (показано, что она может обусловливать гомогенизацию родственных последовательностей ДНК, рис. 10-64, *Б).*

10.5.3. На примере семейства глобиновых генов можно проследить, как случайные дупликации ДНК способствуют эволюции организмов [56]

Дупликации ДНК имеют очень большое значение для эволюции новых белков. Чтобы убедиться в этом, обратимся к семейству глобиновых генов, поскольку его история изучена особенно хорошо. Явные гомологии в аминокислотной последовательности и в структуре современных глобиновых генов указывают на их происхождение от общего предка, несмотря на то, что некоторые члены этого семейства теперь расположены в геноме млекопитающих в совершенно разных местах.

Анализируя формы гемоглобина в организмах, стоящих на разных ступенях филогенетической лестницы, можно восстановить некоторые события, приведшие к возникновению разнообразных типов этого белка. Появление гемоглобиноподобных молекул в ходе эволюции, по-видимому, способствовало увеличению размеров многоклеточных животных. Крупным животным для поддержания должного уровня кислорода в тканях уже недостаточно простой диффузии. В результате, гемоглобиновые молекулы обнаруживаются у всех позвоночных и многих беспозвоночных. Самая примитивная молекула, переносящая кислород, представляет собой глобиновую полипептидную цепь размером около 150 аминокислот. Она обнаруживается у многих морских червей, насекомых и примитивных рыб. Молекула гемоглобина у высших позвоночных устроена более сложно: в ее состав входит два типа глобиновых цепей. По-видимому, около 500 млн лет назад в ходе эволюции высших рыб произошла серия мутаций и дупликации соответствующего гена. В результате этих событий вначале образовалось два слегка отличающихся друг от друга гена, кодирующих цепи α- и β-глобинов в геноме каждой особи. У современных высших позвоночных каждая молекула гемоглобина представляет собой комплекс, состоящий из двух α- и двух β-цепей. (рис. 10-65). Такая структура функционирует гораздо более эффективно, чем молекула гемоглобина, содержащая одну цепь. Четыре кислород-связывающих сайта в молекуле $\alpha_2\beta_2$ взаимодействуют друг с другом. Это взаимодействие приводит к кооперативному аллостерическому изменению в молекуле при связывании и освобождении кислорода, позволяющему доставлять в ткани гораздо большие порции кислорода.

В ходе дальнейшей эволюции млекопитающих мутации и дупликации, по-видимому, подвергся ген β-цепи, вследствие чего возник второй тип гемоглобина, синтезируемый только в эмбрионе. Образовавшаяся молекула гемоглобина обладает повышенным сродством к кислороду по сравнению с гемоглобином взрослой особи, и, таким образом, способствует переносу кислорода от матери к плоду. Ген, кодирующий

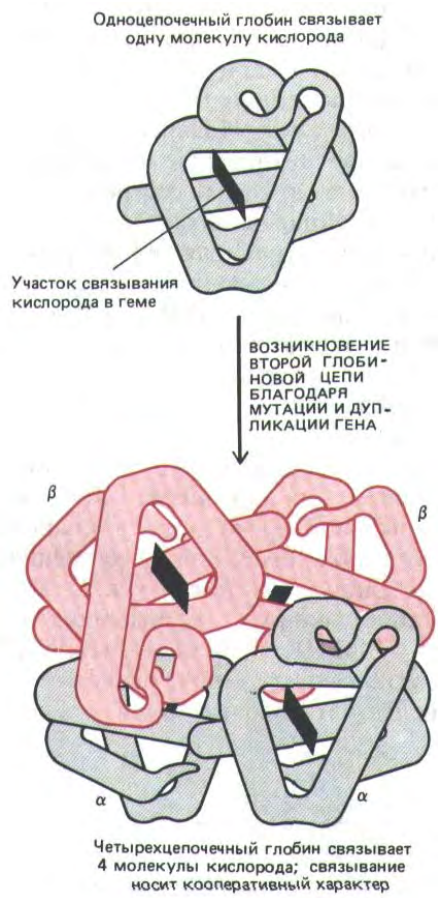


Рис. 10-65. Пространственная структура одноцепочечного и четырехцепочечного глобинов. Изображенный здесь четырехцепочечный гемоглобин представляет собой комплекс, состоящий из двух α- и двух β-глобиновых цепей. Глобин, состоящий из одной цепи, у некоторых примитивных позвоночных образует димер, который диссоциирует при связывании кислорода и представляет собой промежуточную ступень в эволюции глобина, содержащего четыре цепи.

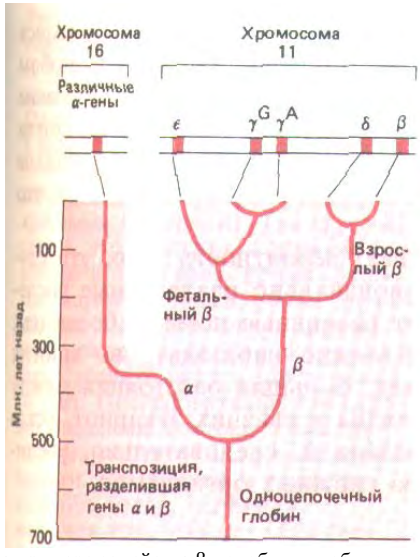


Рис. 10-66. Схема эволюции цепей глобина на примере семейства β-подобиых глобиновых генов (см. рис. 10-39). Относительно недавно возникшие дупликации гена γ -цепи, привели к образованию γ^G- и γ^A-цепей, которые являются (3-подобными и обладают идентичными функциями.

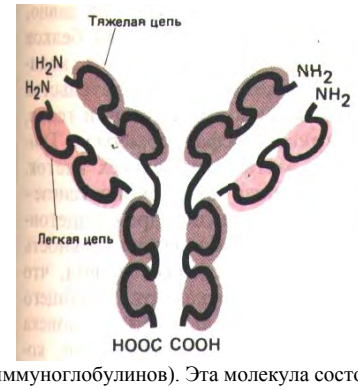


Рис. 10-67. Структура молекулы антитела (иммуноглобулинов). Эта молекула состоит из двух идентичных тяжелых цепей и двух идентичных легких цепей *(выделены цветом).* Каждая тяжелая цепь содержит четыре сходных ковалентно связанных домена. Каждая легкая цепь имеет в своем составе два таких домена. Каждый домен кодируется отдельным экзоном; вероятно, все экзоны возникли в результате дупликации одного исходного экзона.

новую, похожую на β-цепь, молекулу гемоглобина, вновь подвергся последовательным мутациям и дупликациям, в ходе которых возникли два новых гена ε и γ. Цепь ε синтезируется на более ранних стадиях развития (с образованием $\alpha_2\varepsilon_2$), чем γ-цепь эмбриона, образующая форму $\alpha_2\gamma_2$ (см. рис. 10-39, *Б).* Дупликация гена β-цепи взрослых, происшедшая еще позже в ходе эволюции приматов, привела к образованию гена δ-глобина и соответственно *минорной формы* глобина ($\alpha_2\delta_2$), обнаруживаемой только у взрослых приматов (рис. 10-66). Каждый из этих дуплицировавшихся генов впоследствии был модифицирован за счет точковых мутаций, воздействующих на свойства конечной молекулы гемоглобина, а также в результате изменений в регуляторных областях, определяющих выбор времени и уровень экспрессии данного гена (см. рис. 10-73).

Конечный результат процесса дупликации генов, приведшего к дивергенции глобиновых цепей, хорошо виден при рассмотрении генов, возникших из исходного β-гена и расположенных в виде серии гомологичных последовательностей ДНК внутри сегмента ДНК размером 50000 нуклеотидных пар (см. рис. 10-39, А). У человека кластер α-глобиновых генов находится на другой хромосоме. На основании того, что у птиц и млекопитающих кластеры α- и β-глобиновых генов обнаруживаются в разных хромосомах, а у лягушки *Xenopus* они лежат рядом, считается, что два гена разъединились в результате транслокации примерно 300 млн лет назад (рис. 10-66). Подобные транслокации, вероятно, способствуют стабилизации дуплицированных генов, обладающих различными функциями, поскольку предохраняют их от гомогенизации, которой часто подвергаются близлежащие гены со сходной последовательностью (см. рис. 10-64).

Существует несколько дуплицированных последовательностей глобиновой ДНК, входящей в состав кластеров α- и β-глобиновых генов, которые не являются активными. Это пример псевдогенов, которые имеют высокую степень гомологии с активными генами, но неактивны вследствие мутаций, препятствующих их экспрессии. Существование подобных псевдогенов не должно вызывать удивления, ведь не все дупликации ДНК могут приводить к возникновению новых активных генов, между тем неактивные последовательности не удаляются из генома немедленно.

Сравнивая последовательности ДНК многих семейств генов у животных, стоящих на разных ступенях филогенеза, можно проследить значительную часть истории нашей эволюции (см. рис. 4-62).

10.5.4. Гены, кодирующие новые белки, могут образовываться при рекомбинации экзонов [54]

Роль дупликации ДНК в эволюции не ограничивается их участием в образовании больших генных семейств. Дупликации могут иметь значение и для возникновения новых одиночных генов. Белки, кодируемые такими генами, можно узнать по присутствию в них повторяющихся сходных белковых доменов, которые последовательно ковалентно связаны друг с другом. Например, иммуноглобулины (рис. 10-67), альбумины, а также большинство фибриллярных белков (таких, как спектрины и коллагены) кодируются генами, возникшими в результате многократных дупликации исходной последовательности ДНК.

У генов, возникших таким путем, каждый экзон часто кодирует отдельную субъединицу или домен в белке (см. разд. 3.3.4). Организация кодирующих последовательностей ДНК в виде серии таких экзонов, разделенных длинными нитронами, в значительной мере упростила эволюцию новых белков. Например, дупликации, необходимые для

образования отдельного гена, кодирующего белок с повторяющимися доменами, могут возникать при разрыве и воссоединении ДНК в любом месте длинных нитронов, окружающих экзон. Без нитронов в исходном гене было бы лишь несколько сайтов, рекомбинация по которым могла бы привести к дупликации домена. Увеличивая число возможных сайтов для дупликации, интроны значительно повышают вероятность того, что дупликация окажется полезной.

Наличие нитронов намного увеличивает вероятность того, что случайная рекомбинация соединит две первоначально разделенные последовательности ДНК, которые кодируют различные домены белка (см, рис. 10-71). Результаты таких событий можно наблюдать во многих современных белках (см. рис. 3-38). Итак, большие расстояния между экзонами, кодирующими отдельные домены у высших эукариот, ускоряют процесс возникновения новых белков и, следовательно, увеличивают эффективность эволюции весьма сложных организмов.

10.5.5. Вероятно, большинство белков кодируются генами, состоящими из многих небольших экзонов [57]

Открытие в 1977 г. прерывистости генов эукариот оказалось совершенно неожиданным. Все исследованные до этого гены были бактериального происхождения и не содержали нитронов. У бактерий, как известно, отсутствуют ядро и внутренние мембраны, их геном меньше, чем геном эукариот, и традиционно считалось, что бактерия напоминает ту древнюю простую клетку, из которой произошла клетка эукариотическая. Неудивительно поэтому, что многие биологи вначале воспринимали интроны как причудливую позднейшую эволюционную добавку. Однако в настоящее время все больше утверждается точка зрения, согласно которой прерывистые гены имеют весьма древнее происхождение, а бактерии потеряли свои интроны лишь после того, как возникла большая часть их белков.

Мысль о том, что интроны появились в ходе эволюции очень давно соответствует современному представлению о происхождении белков методом проб и ошибок при рекомбинации отдельных экзонов, кодирующих различающиеся белковые домены. Более того, доказательства древнего происхождения нитронов были получены при изучении генов, кодирующих распространенный фермент триозофосфатизомеразу. Триозофосфатизомераза играет важную роль в метаболизме всех клеток, катализируя центральное событие при гликолизе и глюконеогенезе-взаимопревращение глицералальдегида-3-фосфата и дигидроксиацетон-фосфата (см. рис. 2-38). Сравнивая аминокислотную последовательность этого фермента у различных организмов, можно сделать вывод, что фермент возник еще до дивергенции прокариот и эукариот от общего предка, поскольку 46% аминокислотной последовательности у человека и бактерии идентичны. У позвоночных (курицы и человека) ген, кодирующий этот фермент, содержит шесть нитронов, причем пять из них присутствуют точно в том же месте у кукурузы. Из этого следует, что эти пять нитронов существовали в гене до того, как растения и животные дивергировали в ходе эволюции эукариот, что, как установлено, произошло 10^9 лет назад (рис. 10-68).

Мелкие одноклеточные организмы находятся под сильным давлением отбора, что заставило их воспроизводиться путем деления клеток с максимальной скоростью, какую только позволяет содержание питательных веществ в окружающей среде. В связи с этим, они вынуждены свести к минимуму содержание ненужной ДНК, которую надо синтезировать в каждом цикле клеточного деления. Для организмов большего размера, живущих благодаря хищничеству, и в целом для многокле-

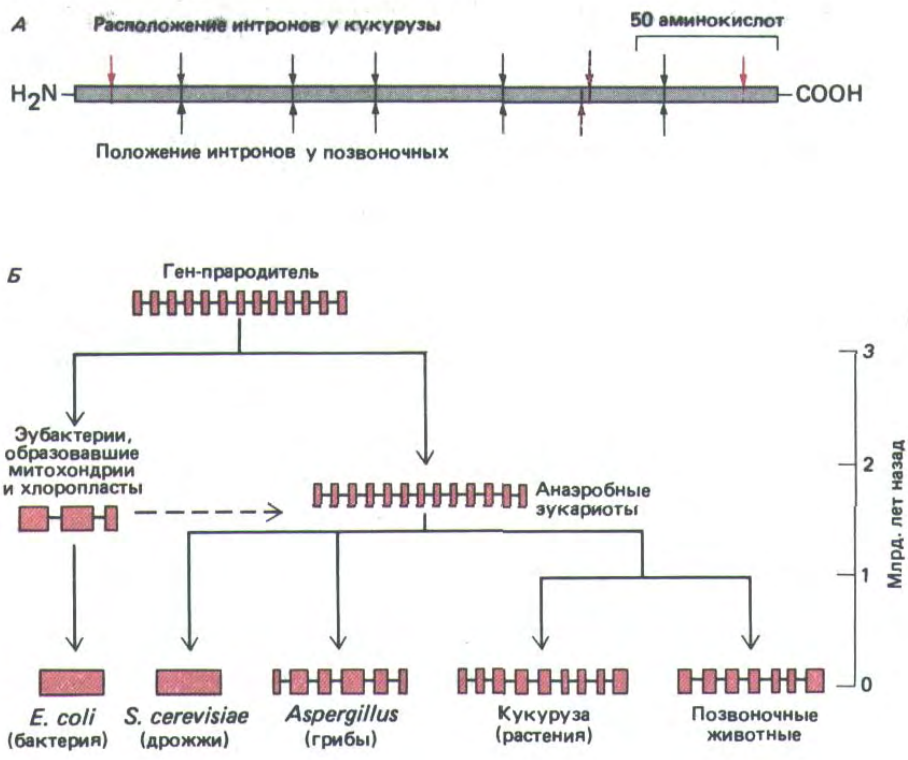


Рис. 10-68. Эволюция прерывистых генов с древнейших времен. А. Структура гена триозофосфатизомеразы у растений и животных. Одинаковые положения нитронов у кукурузы (зерна) и позвоночных отмечены черными стрелками, а отличающиеся положения выделены красными стрелками. Так как считается, что растения и животные возникли от общего предка около миллиарда лет назад, общие интроны должны иметь очень древнее происхождение. *Б,* Гипотетическая схема возникновения определенного гена. Последовательности экзонов выделены цветом, а последовательности интрона обозначены черным. Приведенный здесь ген кодирует белок, необходимый для всех клеток. Подобно триозофосфатизомеразе, этот белок, по-видимому, сформировал свою окончательную трехмерную структуру перед тем, как от общего предка отделились бактерии, архебактерии и эукариоты. Этот общий предок обозначен на рисунке как «ген-прародитель». Пунктиром указано примерное время прохождения эндосимбиотических процессов, которые привели к возникновению митохондрий и хлоропластов. *(А-по* W. Gilbert, M. Marchionni and G.Mc. Knight, Cell 46: 151-154, 1987.)

точных организмов, у которых скорости деления клеток определяются другими причинами, такое сильное давление отбора, ведущее к удалению избыточной ДНК из генома, отсутствует. Скорее всего именно эти обстоятельства объясняют, почему бактерии должны были потерять свои интроны, тогда как эукариоты их сохранили. Подобное объяснение соответствует также другим данным, полученным при изучении триозофосфатизомеразы: в то время как многоклеточный гриб *Aspergillus* содержит пять нитронов в гене, кодирующем этот фермент, его одноклеточный родич, дрожжи *Saccharomyces,* не содержит их вообще.

Каков же механизм потери нитронов? Возможно, интроны терялись при постепенных случайных делециях коротких сегментов ДНК, но более вероятно, что эукариотические клетки (а возможно, также и предки бактерий) имеют механизм точной и селективной делеции всего интрона из своих геномов. Например, в клетках большинства позвоночных содержится лишь один ген инсулина с двумя нитронами, но у крыс по-соседству имеется еще один инсулиновый ген, в составе которого всего один интрон. Очевидно, второй ген возник относительно недавно в результате дупликации и затем потерял один из своих нитронов. Так как при потере интрона необходимо точное воссоединение кодирующих последовательностей ДНК, считается, что второй ген возник в результате редкого события - включения в геном ДНК-копии мРНК соответствующего гена, откуда интроны были точно удалены. Подобные копии, не содержащие нитронов, могут появляться благодаря активности обратных транскриптаз. Считают, что ферменты рекомбинации дают возможность таким копиям спариться с исходной последовательностью, которая затем «корректируется» по матрице, лишенной нитронов, в ходе событий, напоминающих конверсию гена.

Обратные транскриптазы синтезируются в клетках транспозируемыми элементами (см. табл. 10-3) и всеми ретровирусами. Образование ДНК-копий частей генома при обратной транскрипции, по-видимому, тоже внесло свой вклад в эволюцию геномов высших организмов.

10.5.6. Основная фракция ДНК высших эукариот состоит из повторяющихся некодирующих последовательностей нуклеотидов [58]

Геномы эукариот содержат не только интроны, но также и большое число копий ДНК, которая не кодирует белок и представляется ненужной. Присутствие таких повторяющихся последовательностей ДНК у высших эукариот впервые было обнаружено методом гибридизации, позволяющим оценить число копий гена (см. разд. 4.6.7). При использовании этого метода геном механически нарезается на короткие двухцепочечные фрагменты длиной около 1000 нуклеотидных пар; затем фрагменты подвергают денатурации и получают одноцепочечную ДНК. Скорость, с которой одноцепочечные ДНК гибридизуются в смеси, зависит от комплементарности фрагментов. Для большей части фрагментов реакция протекает очень медленно. Например, гаплоидный геном клетки млекопитающего представлен примерно 6 млн различных фрагментов ДНК длиной 1000 нуклеотидов, и любой фрагмент, последовательность которого содержится лишь в одной копии, должен случайно столкнуться с 6 млн некомплементарных цепей, чтобы наш гомолога.

Анализ гибридизации ДНК из клеток человека показал, что примерно 70% одноцепочечных фрагментов гибридизуется очень медленно, т. е. так, как и следует ожидать в случае большого набора уникальных (неповторяющихся) последовательностей (полная гибридизация приходит в течение нескольких дней). Однако остальные 30% цепей ДНК гибридизуется гораздо быстрее. Эти цепи содержат последовательности, которые многократно повторены в геноме, и, следовательно, могут относительно быстро найти своего партнера. Большая часть такой ДНК не кодирует белки, приблизительно одну ее треть составляют тандемно повторяющиеся сателлитные последовательности, остальные две трети приходятся на рассеянную по геному повторяющуюся ДНК. Эти диспергированные повторы, по-видимому, произошли из транспозируемых элементов, размножившихся в нашем геноме и достигших исключительно высокой степени копийности.

10.5.7. Функция сателлитной ДНК неизвестна [59]

Большая часть быстро гибридизующихся цепей ДНК обычно состоит из очень длинных тандемных повторов одной короткой последовательности нуклеотидов (рис. 10-69). Повторяющаяся единица в подобной последовательности может быть представлена даже одним или двумя нуклеотидами, однако большинство повторов длиннее; у млекопитающих они обычно составлены из вариантов одной короткой последовательности, организованной в повтор размером в несколько сот нуклеотидов. Такие тандемные повторы простой последовательности называются сателлитной ДНК, поскольку первая обнаруженная ДНК такого типа имела необычный нуклеотидный состав, что давало возможность отделить ее от тотальной клеточной ДНК в виде минорного компонента (или «сателлита»). Обычно последовательности сателлитной ДНК не транскрибируются и чаще всего локализованы в гетерохроматине центромерных областей хромосом (см. разд. 10.3.8). У некоторых млекопитающих на долю сателлитной ДНК приходится 10% и более от всей

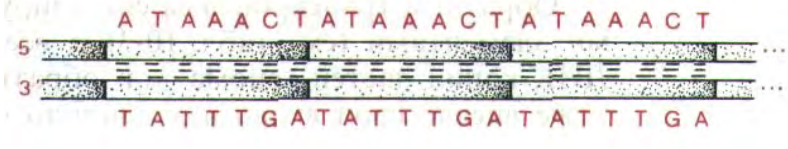


Рис. 10-69. Одна из последовательностей сателлитной ДНК, образованная серией повторяющихся блоков из семи нуклеотидов. Данная последовательность обнаружена в геноме дрозофилы.

ДНК (сателлитные последовательности могут даже занимать целое плечо хромосомы).

Последовательности сателлитной ДНК способны быстро меняться; более того, в ходе эволюции произошел их сдвиг по хромосоме. Например, при сравнении двух гомологичных хромосом у любого человека некоторые последовательности сателлитной ДНК обнаруживаются у них в разных местах. Обычно у двух близкородственных видов последовательности сателлитной ДНК значительно отличаются, между тем последовательности ДНК в других областях генома характеризуются высокой консервативностью. До сих пор неизвестно, какие функции имеют последовательности сателлитной ДНК: все попытки доказать ее участие в спаривании хромосом или организации ядра заканчивались неудачей. Было выдвинуто предположение, что это «эгоистичная ДНК», которая «заботится» лишь о сохранении своих последовательностей в составе генома, но никак не способствует выживанию содержащих её клеток. Другие последовательности, которые обычно рассматривают как эгоистичную ДНК, - это транспозирующиеся элементы или транспозоны.

10-36

10.5.8. Эволюция геномов ускоряется транспозирующимися элементами по крайней мере трех типов [60]

Геномы обычно содержат много разнообразных **транспозирующихся элементов, или транспозонов.** Впервые эти элементы были обнаружены в геноме кукурузы; некоторые из них удалось охарактеризовать и даже определить их первичную структуру. Лучше всего изучены транспозоны у дрозофилы, где известно более 30 их типов. Длина этих транспозонов колеблется от 2000 до 10000 нуклеотидных пар; большинство из них присутствует в геноме в количестве 5-10 копий на диплоидную клетку. В настоящее время различают три больших класса транспозонов на основании особенностей организации их последовательностей (табл. 10-3). Некоторые элементы перемещаются в геноме в виде ДНК, но есть и такие, у которых этот процесс включает образование промежуточного продукта (в его роли выступает РНК). В любом случае транспозоны способны размножаться, вырезаться из каких-то сайтов и внедряться в другие; их поведение можно охарактеризовать как паразитическое.

Таблица 10-3. Три основных семейства транспозонов

Структура	Гены, входящие в состав полного элемента	Способ перемещения в геноме	Примеры
1  **Короткие инвертированные**	Кодируют транспозазу	Перемещаются в виде фрагмента ДНК или при вырезании, или при репликации	Р-элемент (дрозофила) Ac-Ds (кукуруза) tn 3, IS1 *(E.coli)* 3 (львиный зев) Tarn
2  **Прямые длинные концевые повторы (LTR)**	Кодируют обратную транскриптазу, напоминают ретровирус	Перемешаются путем образования промежуточной формы РНК, синтезируемой с промотора, локализованного в LTR	Copia ту THE-1 bsl
3  **Poly A на 3'-конце каждого РНК-транскрипта; 5'-конец часто "обрезан"**	Кодируют обратную транскриптазу	Перемещаются путем образования промежуточной формы РНК, синтезируемой с соседнего промотора	Р-элемент (дрозофила) L1 (человек) (кукуруза) cin 4

Длина этих элементов варьирует от 2000 до 12 000 нуклеотидных пар. В состав каждого семейства входит много различных элементов, в таблице приведены лишь немногие из них.

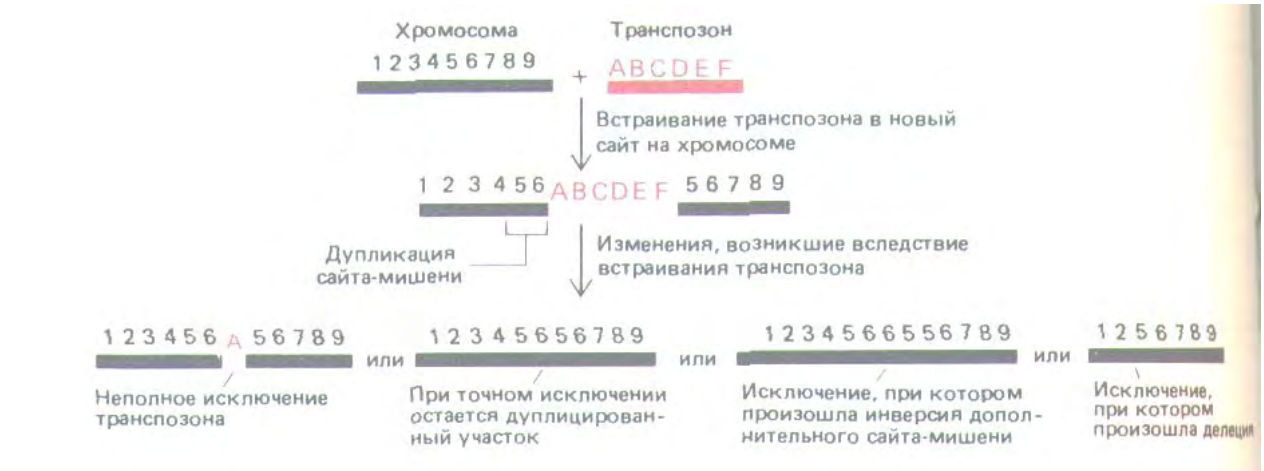


Рис. 10-70: Некоторые изменения в последовательностях ДНК хромосомы, возникающие вследствие перемещения транспозонов. При встраивании транспозона всегда образуется короткая дупликация хромосомной последовательности из 3-12 нуклеотидных пар. Ферменты сайт-специфической рекомбинации, кодируемые этим элементом, участвуют и в последующем исключении транспозона. При таком исключении последовательность хромосомной ДНК часто не восстанавливается, как это показано на четырех примерах.

На долю транспоэонов приходится по крайней мере 10% геномнов ДНК высших эукариот. Большинство этих элементов перемещается лишь изредка, но поскольку их количество в клетке велико, транспозиция оказывает значительное влияние на разнообразие видов. Например, больше половины спонтанных мутаций, изученных у дрозофилы, вызвана встраиванием транспозона внутрь мутировавшего гена или вблизи него.

Мутации могут возникать либо когда элемент встраивается в ген, либо когда он начинает перемещаться в какое-либо другое место. Все известные транспозоны приводят к появлению коротких дупликаций в сайте-мишени, что связано с механизмом их встраивания (см. рис. 5-67, *Б*). При вырезании транспозона из хромосомы обычно он оставляет на месте своего пребывания одну из копий, составляющих дупликацию (рис. 10-70). Таким образом, перемещение транспозона сопровождается вставками и делециями в нуклеотидной последовательности.

Транспозоны вносят свой вклад в вариабельность генома и иными средствами. Если два транспозона, которые узнаются одним и тем же сайт-специфическим ферментом рекомбинации *(транспозазон),* встраиваются в соседние сайты хромосомы, ДНК между ними может стать субстратом для транспозиции, осуществляемой с помощью транспозазы. Так как это весьма эффективный путь перемещения экзонов, справедливо утверждение, что транспозоны могут способствовать образованию новых генов (рис. 10-71).

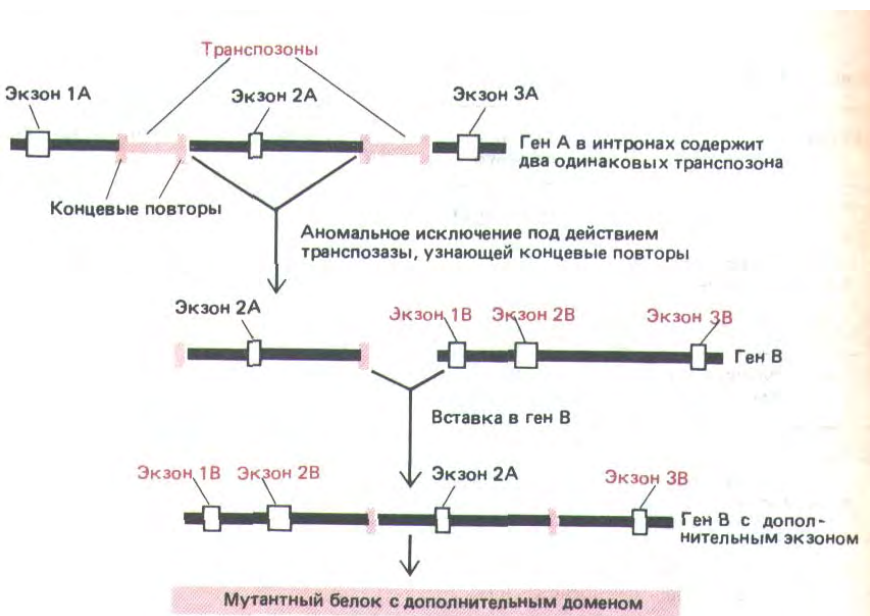


Рис. 10-71. Перемещение экзона, которое может происходить в результате встраивания транспозонов. Когда два транспозона, принадлежащие к одному и тому же типу *(выделены цветом),* оказываются по соседству друг с другом на хромосоме, то в транспозиции могут оказаться задействованными концы двух разных элементов (вместо двух концов одного и того же элемента); в результате хромосомная ДНК, заключенная между ними, переместится в новую область хромосомы. Так как по сравнению с экзонами интроны очень велики (см. рис. 9-7), изображенное на схеме встраивание нового экзона в ранее существовавший интрон - не такое уж невероятное событие.

10-36

10.5.9. Транспозоны могут влиять на регуляцию генов [61]

Перестройки последовательностей ДНК, вызываемые транспозонами, часто изменяют экспрессию близлежащих генов, что может привести к различным нарушениям в развитии животных или растений, например их пигментации (рис. 10-72). Большая часть таких изменений в регуляции генов, как правило, оказывается вредной для организма, но некоторые - могут оказаться и полезными.

Свойства мутаций, вызываемых транспозонами, необычны и позволяют отличить их от мутаций, возникших вследствие ошибок в репликации или репарации ДНК. Одно важное отличие состоит в том, что при перемещении транспозона вблизи гена часто оказываются новые последовательности, которые действуют как участки узнавания для сайт-специфических ДНК-связывающих белков, включая транспозазу

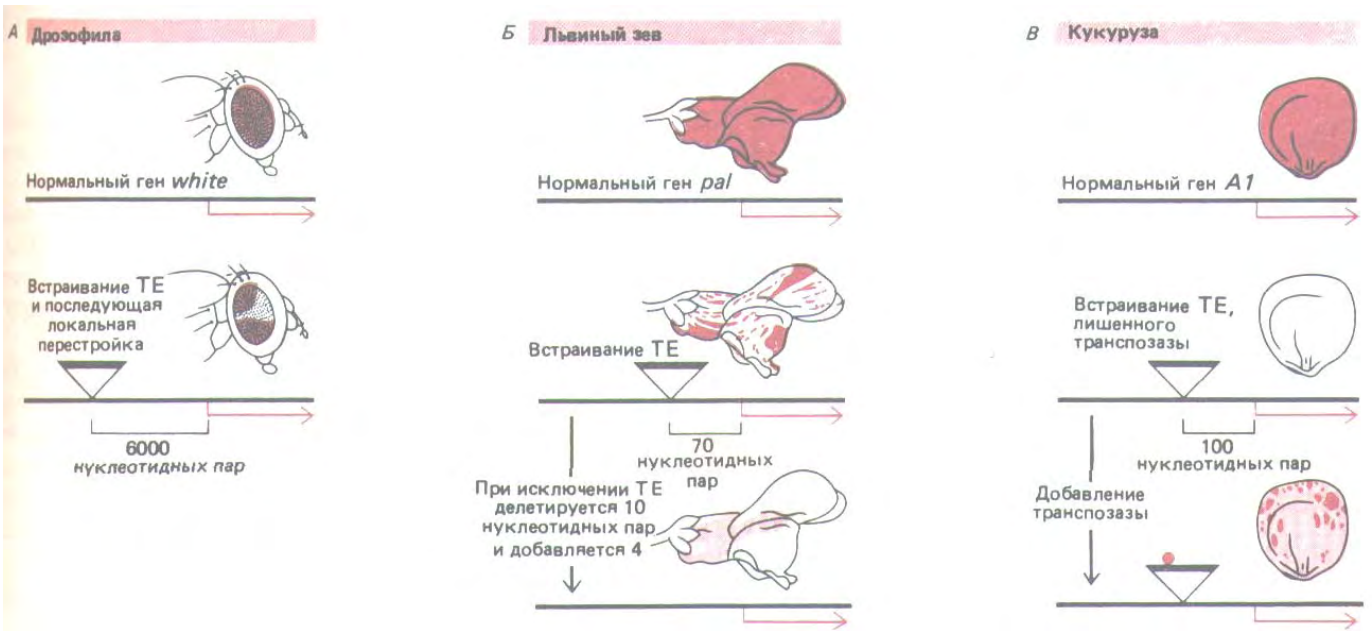


Рис. 10-72. Транспозоны могут обусловливать значительные изменения в регуляции генов. Для каждого из трех организмов приведен пример наследуемых изменений в распределении пигмента, вызванных встраиванием транспозонов (ТЕ) в регуляторные области генов. Аналогичные процессы могут приводить к морфологическим изменениям в организме, воздействуя на рост и дифференцировку клеток. *А.* Встраивание в регуляторные элементы, расположенные перед промотором гена *white y* дрозофилы, приводит к тому, что красный пигмент проявляется лишь в дорсальной и вентральной области глаза. *Б.* Встраивание перед промотором гена, определяющего образование пигмента у львиного зева, приводит к появлению *цветов, у которых пегмент отсутствует везде, за исключением тех групп клеток, в которых этот элемент был удален при транспози*ции. Последующее исключение транспозона из генома всего растения обусловливает появление на ограниченном участке цветка бледной окраски. *В.* Пример регулируемого изменения окраски зерна кукурузы, вызываемого транспозоном. В данном случае транспозон действует как регуляторный белок, отчасти восстанавливающий окраску во всех клетках зерна, которое в ином случае осталось бы неокрашенным. Кроме того, транспозаза катализирует случайное исключение элемента, в результате чего образуются отдельные интенсивно окрашенные пятна. *(А* -по G.M. Rubm et aL, Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 50: 329-335 1985; Б-по E S Coen, R. Carpenter and C. Martin, Cell 47: 285-296,1986; В-по **Zs.** Schwarz-Sommer et at, EMBO J. 6: 287-294, 1987.)

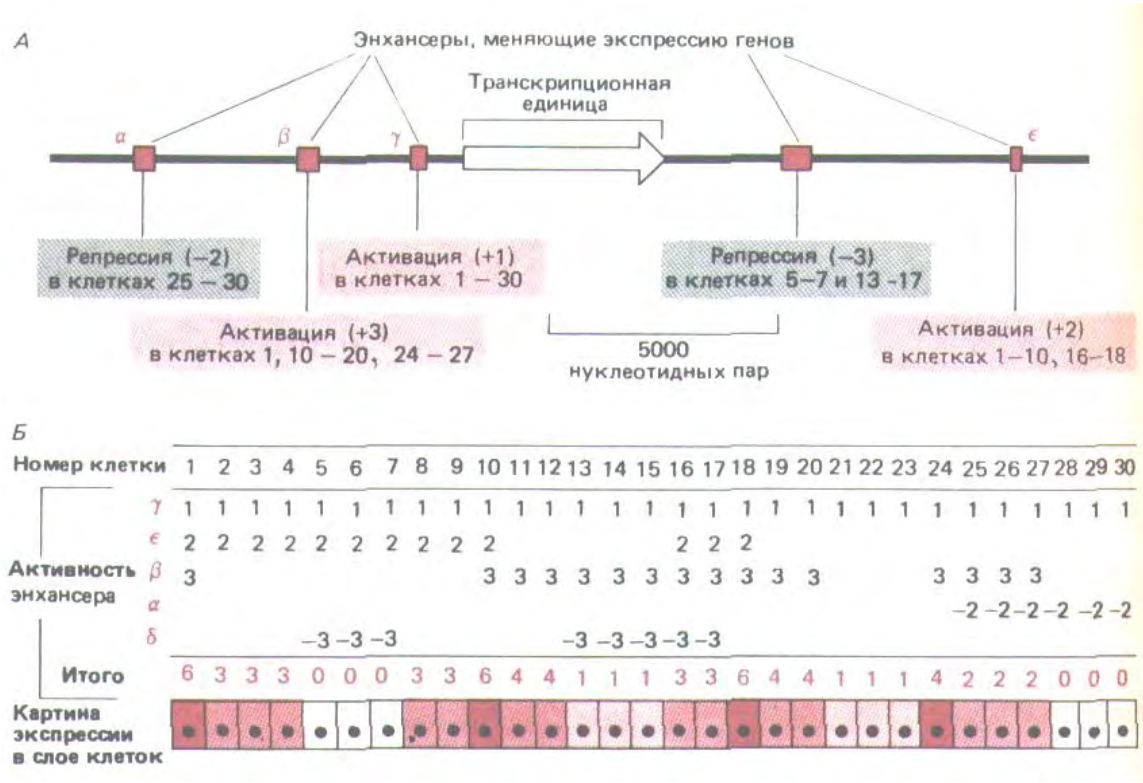


Рис. 10-73. Совместное действие отдельных энхансерных модулей приводит к характерному для каждой клетки порядку экспрессии генов. В связи с тем, что смесь регуляторных белков, связывающихся с каждым энхансером, варьирует от клетки к клетке, действие энхансера в различных клетках различно. Эта схема составлена по результатам, полученным на дрозофиле, где можно проанализировать много энхансеров, по-отдельности выявляя их действие в трансгенных мухах. Для простоты стимулирующее (+) и ингибирующее (—) действие каждого энхансера (α, β, γ, δ, или ε) оценивают числами от + 3 до —3 и считают, что эти числа можно складывать и вычислять суммарную активность энхансеров, определяющих уровень экспрессии генов.

и белки, регулирующие транскрипцию ДНК, входящей в состав транс-позона. Таким образом, эти последовательности могут действовать как энхансеры и усиливать транскрипцию генов, расположенных от них на расстоянии тысяч нуклеотидных пар. Пример такого типа воздействия на экспрессию гена пигмента у кукурузы приведен на рис. 10-72. Аналогичный эффект может вносить свой вклад в возникновение раковых клеток: перенос регуляторных последовательностей в области, соседствующие с протоонкогеном, способен превратить его в онкоген.

Геномы высших эукариот, где длинные последовательности некодирующей ДНК перемежаются относительно короткими кодирующими участками, представляют собой «благодатную почву» для интеграции и исключения мобильных элементов. В связи с тем, что на транскрипцию генов влияют и удаленные от них на десятки тысяч нуклеотидных пар участки, можно ожидать, что многие возникшие при транспозиции изменения генома окажут влияние и на экспрессию генов. И напротив, по-видимому, лишь немногие перестройки приведут к разрушению коротких экзонов, содержащих кодирующие последовательности.

Может ли большой избыток некодирующей ДНК высших эукариот поддерживаться в ходе эволюции благодаря той регуляторной пластичности, которую она сообщает организму, содержащему много разнообразных транспозонов? То, что известно о регуляторных системах, контролирующих гены высших эукариот, находится в соответствии с этой возможностью. Энхансеры подобно экзонам, по-видимому, действуют как отдельные модули, и активность генов зависит от суммарного влияния на промотор набора энхансеров (рис. 10-73). Транспозоны, перемещая энхансеры по геному, могут способствовать оптимизации регуляции генов в целях выживания организма в ряду поколений.

10-36

10.5.10. Транспозиционные взрывы приводят к существенным изменениям в геномах и повышают биологическое разнообразие [62]

Другой уникальной особенностью, отличающей транспозоны от обычных мутагенов, является их способность долгое время находиться в состоянии покоя в хромосоме. Время от времени у части популяции бурно активируются движения транспозонов и, соответственно, их мутагенная

активность. При таких катастрофических изменениях в геномах, называемых **транспозиционными взрывами,** происходит почти одновременное перемещение транспозонов нескольких типов. Впервые транспозиционные взрывы были обнаружены в развивающихся растениях кукурузы. Подобное явление наблюдается и при скрещивании определенных линий мух-феномен, известный под названием *«гибридный дисгенез».* Если такие взрывы происходят в клетках зародышевой линии, то они вызывают множественные изменения в геноме потомства отдельной мухи или растения.

Меняя свойства организма, транспозиционные взрывы повышают вероятность того, что два новых признака, каждый из которых сам по себе не обладает селективными преимуществами, окажутся выгодными, проявляясь вместе у единственной особи в популяции. Есть данные о том, что у определенных растений транспозиционные взрывы могут активироваться сильными стрессами, вызванными внешними условиями. Это приводит к появлению разнообразных, случайным образом модифицированных потомков, часть из которых может оказаться лучше приспособленной к выживанию в новых условиях. Возможно, что, по крайней мере у этих растений, существует механизм активации транспозонов, которые работают как мутагены и вызывают появление большого числа вариантных организмов в тот момент, когда такое разнообразие необходимо как никогда. Таким образом, транспозоны нельзя представлять себе только как паразитов; в некоторых случаях они способны действовать как полезные симбионты, способствуя выживанию тех видов, в геноме которых они содержатся.

10-37

10.5.11. Около 10% генома человека занимают два семейства транспозонов, которые, по-видимому, размножились лишь недавно [63]

ДНК приматов необычна по крайней мере в одном отношении: она содержит громадное количество копий двух последовательностей, про которые можно сказать, что ими прямо-таки «кишат» наши хромосомы. Оба типа этих последовательностей перемещаются в геноме в ходе РНК-опосредованного процесса, требующего обратную транскриптазу. Одна из этих последовательностей-L1-напоминает F-элемент у дрозофилы и cin4-элемент у кукурузы. Полагают, что она кодирует обратную транскриптазу (см. табл. 10-3). Транспозоны обычно возникают при участии систем контроля с обратной связью, которая жестко регулирует их число в каждой клетке (и таким образом спасает клетку от возможного бедствия); тем не менее, у человека L1-элементы составляют около 4% от всей массы генома.

Еще более необычная **Alu-последовательность** очень коротка (около 300 нуклеотидных пар) и перемещается, встраивая копию на месте сайта-мишени. Она образовалась в результате делеции гена 7SL-РНК хозяйской клетки. Этот ген кодирует РНК-компонент сигнал-узнающей частицы (SRP-signal-recognition particle), которая принимает участие в синтезе белка. Таким образом, неясно, следует ли рассматривать Alu-последовательность как транспозон или правильнее считать ее подвижным псевдогеном. Число копий Alu-последовательности в гаплоидном геноме человека составляет примерно 500000 (около 5% ДНК), таким образом, в среднем эта последовательность встречается один раз на каждые 5000 нуклеотидных пар ДНК. ДНК Alu транскрибируется с промотора 7SL-РНК, который узнается РНК-полимеразой III и находится внутри транскрипта. Следовательно, эта последовательность несет информацию, необходимую для своей собственной транскрипции.

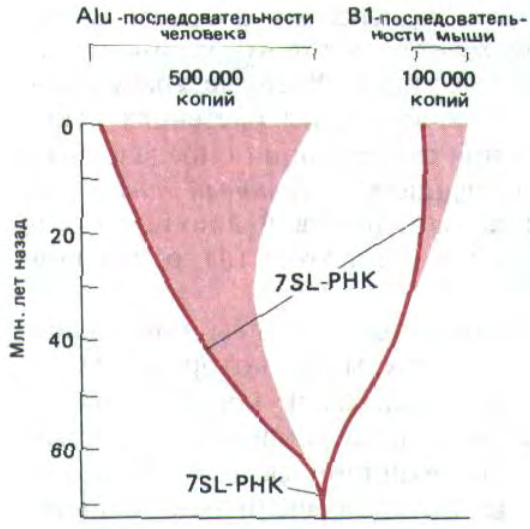


Рис. 10-74. Схема возможной эволюции повторяющихся Alu-подобных последовательностей, содержащихся в геномах мыши и человека. Полагают, что обе эти транспозирующиеся последовательности ДНК возникли из жизненно важного гена 7SL-РНК. Однако, принимая во внимание специфическое распределение и гомологию последовательностей этих высокоповторяющичся элементов, следует признать, что увеличение их копийности происходило независимо друг от друга.

туда, куда она перемещается. Однако для перемещения Alu-последовательности необходима обратная транскрштаза.

Сравнение последовательности и расположения L1- и Alu-подобных элементов у различных млекопитающих позволяет сделать вывод, что эти элементы размножились и достигли высокой копийности относительно недавно (рис. 10-74). Трудно представить себе, что эти последовательности, рассеянные по всему геному, не оказывают заметного воздействия на близлежащие гены.

Заключение

Функциональные последовательности ДНК в геномах высших эукариот, по-видимому, собраны из небольших генетических модулей по крайней мере двух типов. Блоки кодирующих последовательностей образуют множество комбинаций для синтеза белков; регулирующие последовательности рассеяны среди длинных некодирующих участков и контролируют экспрессию генов. Как кодирующие последовательности (экзоны), так и регуляторные последовательности (энхансеры) по размеру обычно не превышают нескольких сот нуклеотидных пар. В геномах происходят разнообразные генетические рекомбинации, обусловливающие возникновение дупликацип и перенос последовательностей ДНК. В некоторых случаях дуплцируются целые гены, которые могут затем приобретать новые функции. В результате рекомбинации иногда возникают новые белки, при этом происходит перетасовка экзонов или изменение экспрессии генов за счет перекомбинации энхансеров. Перестановка последовательностей имеет огромное значение для эволюции организмов, у эутриот она в значительной мере упрощена благодаря прерывистой структуре генов эукариот. Важно также, что гены эукариот подвержены многочисленным активирующим и подавляющим влияниям, которые оказывают на них разные комбинации удаленных от них энхансеров.

В геномах присутствуют различные типы транспозонов. Все вместе они составляют более 10% генома (и у дрозофилы, и у позвоночных). Время от времени в клетках зародышевой линии происходят «транспозиционные взрывы», приводящие ко многим наследуемым изменениям в экспрессии генов у одной и той же особи. Полагают, что транспозоны играют особую роль в эволюции, влияя на разнообразие организмов.

Литература

Общая

Lewin B. Genes, 3rd ed. New York, Wiley, 1987.

ScHteif R, Genetics and Molecular Biology. Reading M.A., Addison-Wesley, 1986.

Stem G. S. Molecular Genetics: An Introductory Narrative. San Francisco. Freeman, 1971.

Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J. W., Steitz J.A., Weiner A.M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1987.

Цитированная

1. *Gurdon J. B.* The developemental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. J. Embryol. Exp. Morphol., 10, 622-640, 1962.
   Steward F. C., Mapes M. O., Mears K. Growth and organized developement of cultured cells. Am. J. Bot, 45, 705-713, 1958.
2. *Garrels J, I.* Changes in protein synthesis during myogenesis in a clonal cell line. Dev. Biol., 73, 134-152, 1979.
3. *Darned J. K, Jr.* Variety in the level of gene control in eucaryotic cells. Nature, 297, 365-371, 1982.
   Derman E. et al. Transcriptional control in the production of liver-specific mRNAs. Cell, 23, 731-739, 1981.
4. *Gierer A.* Molecular models and combinatorial principles in cell differentiation and morphogenesis. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bio)., 38, 951-961, 1974.
   Scott M. P., O'Fanell P. H. Spatial programming of gene expression in early *Drosophila* embryogenesis. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 49-80, 1986.

5. *Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J.A.* Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science, 236, 1237-1244, 1987.
Yamamoto K. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. Annu. Rev. Genet; 19, 209-252, 1985.
6. *Gehring W.J., Hiromi Y.* Homeotic genes and homeobox. Annu. Rev. Genet; 20, 147-173, 1986.
7. *BlauH.M. et al.* Plasticity of the differentiated state. Science, 230, 758-766, 1985.
Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibrpblasts to myoblasts. Cell, 51, 987-1000, 1987.
8. *Miller J. H., Reznikoff W.S., eds.* The Operon. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory, 1978.
Neidhardt F. C. et al., eds. Escherichia coli and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology, Vol. 2, pp. 1439-1526. Washington DC. American Society for Microbiology, 1987. (Paradigms of operon regulation in bacteria.)
Ptashne M. A. Genetic Switch. Palo Alto, CA. Blackwell, 1986.
9. *Gilbert W., Muller-Hill B.* The *lac* operator in DNA. Proc. Natl. Acad, Sci. USA, 58, 2415-2421, 1967.
Gottesman S. Bacterial regulation: global regulatory networks. Annu. Rev. Genet., 18, 415-441, 1984.
Jacob F., Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol; 3, 318-356, 1961.
Reznikoff W. S., Siegele D. A., Cowing D. W., Gross C. A. The regulation of transcription initiation in bacteria. Annu. Rev. Genet., 19, 355-388, 1985.
10. *de Combrugghe B., Busby S., Buc H.* Cyclic AMP receptor protein: role in transcription activation. Science, 224, 831-838, 1984.
Hochschild A., Irwin M., Ptashne M. Represser structure and the mechanism of positive control. Cell, 32, 319-325, 1983.
Raibaud O., Schwartz M. Positive control of transcription initiation in bacteria. Annu. Rev. Genet., 18, 173-206, 1984.
11. *Keener J., Wong P., Popham D., Wallis J., Kustu S.* A sigma factor and auxiliary protiens required for nitrogen-regulated transcription in enteric bacteria. In: RNA Polymerase and the Regulation of Transcription. (W. S. Reznikoff et al, eds.), pp. 159-175. New York, Elsevier, 1987.
Ninfa A.J., Reitzer L.J., Magasanik B. Initiation of transcription at the bacterial y/иAp2 promoter by purified *E. coli* components is facilitated by enhancers. Cell, 50, 1039-1046, 1987.
12. *Dunn T. M., Hahn S., Ogden S., Schlief R. F.* An operator at -280 base pairs that is required for the repression of araBAD operon promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5017-5020, 1984.
Griffith J., Hochschild A., Ptashne M. DNA loops induced by cooperative binding of lambda represser. Nature, 322, 750-752, 1986.
Mossing M. C., Record M. T. Upstream operators enhance repression of the *lac* promoter. Science, 233, 889-892, 1986.
13. *Helmann J.D., Chamberlin M.J.* Structure and function of bacterial sigma factors. Annu. Rev. Biochem; 57, 839-872, 1988.
14. *Davidson B.L., Egly J.M., Mulvihill E. R., Chambon P.* Formation of stable preinitiation complexes between eucaryotic class B transcription factors and promoter sequences. Nature, 301, 680-686, 1983.
Sawadogo M., Roeder R. G. Interaction of a gene-specific transcription factor with the adenovirus major late promoter upstream of the TATA box region. Cell, 43, 165-175, 1985.
Workman J. L., Roeder R. G. Binding of transcription factor TFIID to the major late promoter during in vitro nucleosome assembly potentiates subsequent initiation by RNA plymerase II. Cell, 51, 613-622, 1987. 15 *Atchison M L.* Enhancers: mechanisms of action and cell specificity. Annu. Rev. Cell Biol: 4, 127-153, 1988.
Maniatis T., Goodbourn S., Fischer J. Regulation of inducible and tissue-specific gene expression. Science, 236, 1237-1245, 1987.
McKnight S.L., Kingsbury R. Transcriptional control signals of a eucaryotic protein-coding gene. Science, 217, 316-324, 1982.
Serfling E., Jasin M., Schaffner W. Enhancers and eukaryotic gene transcription. Trends Genet., 1, 224-230, 1985.
16. *Emerson B. M., Nickol J. M., Jackson P. D., Felsenfeld G.* Analysis of the tissue-specific enhancer at the 3' end of the chicken adult β-globin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4786-4790, 1987.
Evans T., Reitman M., Felsenfeld G. An erythrocyte-specific DNA-binding factor recognizes a regulatory sequence common to all chicken globin genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5976-5980, 1988.
Jones N. C., Rigby P. W. J., Ziff E. B. Trews-acting protein factors and the regulation

of eukaryotic transcription: lessons from studies on DNA tumor viruses. Cenes Dev., *2,* 267-281, 1988.
Nomiyama H., Fromental C., Xiao J. H., Chambon P. Cell-specific activity of the constituent elements of Simian virus 40 enhancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,84 7881-7885, 1987.
17. *Brent R., Ptashne M.* A eukaryotic transcriptional activator bearing the DNA specificity of a prokaryotic represser. Cell, 43, 729-736, 1985.
Evans R. M. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science, 240 889-895, 1988.
Kumar V. et al. Functional domains of the human estrogen receptor. Cell, 51 941-951, 1987.
Godowski P.J., Picard D., Yamamoto K. Signal transduction and transcriptionil regulation by glucocorticoid receptor - lexA fusion proteins. Science, 241, 812-816, 1988.
18. *Sen R., Baltimore D.* Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer bindingprotein NF-kappa B by a posttranslational mechanism. Cell, 47, 921-928, 1986
Yamamoto K. K., Gonzalez G.A., Biggs W.H., MontminyM.R. Phosphorylationinduced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. Nature, 334. 494-498, 1988.
Zimarino V., Wu C. Induction of sequence-specific binding of *Drosophila* heat shock activator protein without pritein synthesis. Nature, 327, 727-730, 1987.
19. *Metzger D., White J. H., Chambon P.* The human estrogen receptor functions in yeast. Nature, 334, 31-36, 1988.
Ptashne M. Gene regulation by proteins acting nearby and at a distance. Nature, 322, 697-701, 1986. *Struhl K.* Promoters, activator proteins, and the mechanism of transcriptional initiation in yeast. Cell, 49, 295-297, 1987.
20. *Borst P., Greaves D. R.* Programmed gene rearrangements altering gene expression. Science, 235, 658-667, 1987.
Mever T. F. Molecular basis of surface antigen variation in *Neisseria.* Trends Genet, 3, 319-324, 1987.
Simon M., Zieg J., Silverman M., Mandel G., Doolittle R. Phase variation: evolution of a controlling element. Science, 209, 1370-1374, 1980.
21. *Cross F., Hartwell L.H., Jackson C., Konopka J.B.* Conjugation in *Saccharomyas cerevisiae.* Annu. Rev. Cell Biol; 4, 429-457, 1988.
Herskowitz I. Master regulatory loci in yeast and lambda. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 50, 565-574, 1985.
Kushner P. J., Blair L. C., Herskowitz I. Control of yeast cell types by mobile genes: a test. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5264-5268, 1979.
22. *Kostriken R., Strathern J. N.. Klar A., Hicks J. B., Heffern F.* A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae.* Cell, 35, 167-174, 1983.
23. *Nasmyth K., Shore D.* Transcriptional regulation in the yeast life cycle. Science, 237, 1162-1170, 1987.
24. *Brand A. H., Breeden L., Abraham J., Sternglanz R., Nasmyth K.* Characterization of the "silencer" in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of a transcriptional enhancer. Cell, 41, 41-48, 1985.
25. *Friedman D. I. et al.* Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lambda. Microbiol. Rev., 48, 299-325, 1984.
Ptashne M. et al. How the lambda represser and ero work. Cell, 19, 1-11, 1980.
26. *Brown D. D.* The role of stable complexes that repress and activate eukaryotic genes. Cell, 37, 359-365, 1984.
Weintraub H. Assembly and propagation of repressed and derepressed chromosomal states. Cell, 42, 705-711, 1985.
27. *Brown S.W.* Heterochromatin. Science, 151, 417-425, 1966.
Hsu T. C., Cooper J. E. K., Mace M. L., Brinkley B. R. Arrangement of centromeres in mouse cells. Chromosoma, 34, 73-87, 1971.
28. *Gartler S. M., Riggs A. D.* Mammalian X-chromosome inactivation. Annu. Rev. Genet, 17, 155-190, 1983.
Lock L. F., Takagi N., Martin G. R. Methylation of the *Hprt* gene on the inactive X occurs after chromosome inactivation. Cell, 48, 39-46, 1987.
Lyon M. F. X-chromosome inactivation and developmental patterns in mammals. Biol. Rev., 47, 1-35, 1972.
29. *Baker W.K.* Position-effect variegation. Adv. Genet, 14, 133-169, 1968.
Spofford J. B. Position-effect variegation in *Drosophila.* In: The Genetics and Biology of *Drosophila* (M. Ashburner, E. Novitski, eds.), Vol. 1C, pp. 955-1018. New York, Academic Press, 1976.
30. *Goldberg D. A., Posakony J. W., Maniatis T.* Correct developmental expression of a cloned alcohol dehydrogenase gene transduced into the *Drosophila* germ line. Cell, 34, 59-73, 1983. *Grosveld F., van Assendelft G. B., Greaves D. R., Kollias G.* Position independent,

high-level expression of the human β-globin gene in transgenic mice. Cell, 51, 975-985, 1987.
Meyerowitz E. M., *Raghavan K. V., Mothers P. H., Roark M.* How *Drosophila* larvae make glue: control of Sc/S-3 gene expression. Trends Genet., 3, 288-293, 1987.
Palmiter R. D., Brinster R. L. Germ-line transformation of mice. Annu. Rev. Genet., 20, 465-499, 1986.
31. *Ephrussi A., Church G.M., Tonegawa S., Gilbert W.* B lineage-specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. Science, 227, 134-140, 1985.
Garel A., Zolan M., Axel R. Genes transcribed at diverse rates have a similar conformation in chromatin. Proc. Mail. Acad. Sci. USA, 74, 4867-4871, 1977.
Karlsson S., Nienhuis A. W. Developmental regulation of human globin genes. Annu. Rev. Biochem., 54, 1071-1108, 1985.
Weintraub H., Groudine M. Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation. Science, 193, 848-856, 1976.
32. *Brill S.J., Sternglanz R.* Transcription-dependent DNA supercoiling in yeast DNA topoisomerase mutants. Cell, 54, 403-411, 1988.
Wang J.C. Superhelical DNA. Trends Biochem. Sci; 5, 219-221, 1980. *Wanq J. C., Giaever G. N.* Action at a distance along a DNA. Science, 240, 300-304, 1988.
33. *Guarente L.* Regulatory proteins in yeast. Annu. Rev. Genet., 21, 425-452, 1987.
34. *Razin A., Cedar H., Riggs A.D., eds.* DNA Methylation: Biochemistry and Biological Significance. New York, Springer-Verlag, 1984.
35. *Cedar H.* DNA methylation and gene activity. Cell, 53, 3-4, 1988.
Ivarie R, D., Schacter B. S., O'Farrell P. H. The level of expression of the rat growth hormone gene in liver tumor cells is at least eight orders of magnitude less than that in anterior pituitary cells. Moï. Cell. Biol., 3, 1460-1467, 1983.
Yisraeli J. et al. Muscle-specific activation of a methylated chimeric actin gene. Cell, 46, 409-416, 1986.
36. *Bird A. P.* CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus. Trends Genet, 3, 342-347, 1987.
37. *Duncan L* The bithorax complex. Annu. Rev. Genet; 21, 285-319, 1987.
Peifer M., Karchi F., *Bender W.* The bithorax complex: control of segmental identity. Genes Dev; 1, 891 -898, 1987
38. *Landrick R., Yanofsky C.* Transcription attenuation. In; *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium:* Cellular and Molecular Biology (F.C. Neihardt et al, eds.), Vol. 2, pp. 1276 1301, Washington DC, American Society for Microbiology, 1987.
Plan T. Transcription termination and the regulation of gene expression. Annu. Rev. Biochem., 55, 339-372, 1986.
Yanofsky C. Operon-specific control by transcription attenuation. Trends Genet., 3, 356-360, 1987.
39. *Andreadis A., Gallego M.E., Nadal-Ginard B.* Generation of protein isoform diversity by alternative splicing: mechanistic and biological implications. Annu. Rev. Cell Biol; 3, 207-242, 1987.
Leff S., Rosenfeld M., Evans R. Complex transcriptional units: diversity in gene expression by alternative RNA processing. Annu. Rev. Biochem; 55, 1091-1117, 1986.
Schwarz T. L., Tempel B. L., Papazian D. M., Jan Y. N., Jan L. Y. Multiple potassium-channel components are produced by alternative splicing at the *Shaker* locus in *Drosophila.* Nature, 331, 137-142, 1988.
40. *Baker B. S., Belote J. M.* Sex determination and dosage compensation in *Drosophila melanogaster.* Annu. Rev. Genet., 17, 345-393, 1983.
Bingham P. M., Chou T., Mims L, Zachar Z. On/off regulation of gene expression at the level of splicing. Trends Genet. 4, 134-138, 1988.
Boggs R. T., Gregor P., Idriss S., Belote J. M., McKeown M. Regulation of sexual differentiation in *Drosophila melanogaster* via alternative splicing of RNA from the transformer gene. Cell, 50, 739-747, 1987.
Laski F. A., Rio D. C., RubinG.M. Tissue specificity of *Drosophila* P element transposition is regulated at the level of RNA splicing. Cell, 44, 7-19, 1986.
41. *Early P. et al.* Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways. Cell, 20, 313-319, 1980.
Peterson M. L., Perry R. P. Regulated production of μ_m and μ_s mRNA requires linkage of the poly(A) addition sites and is dependent on the length of the μ_m - μ_s intron. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8883-8887, 1986.
42. *Beadle G.* Genes and the chemistry of the organism. Am. Sci., 34, 31-53, 1946.
43. *Newport J.W., Forbes D.J.* The nucleus: structure, function, and dynamics. Annu. Rev. Biochem., 56, 535-565, 1987.
Schneider R.J., Shenk T. Impact of virus infection on host cell protein synthesis. Annu. Rev. Biochem; 56, 317-332, 1987.
44. *Aziz N.; Munro H. N.* Intron regulates ferritin mRNA translation through a seg-

ment of its 5' untranslated region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 8478-8482, 1987.
Gold L. Posttanscriptional regulatory mechanisms in *Escherichia coli.* Annu. Rev. Biochem., 57, 199-234, 1988.
Nomura M., Course R., Baughman G. Regulation of the synthesis of ribosomes and ribosomal components. Annu. Rev. Biochem; 53, 75-117, 1984.
Walden W. E. et al. Translational repression in eucaryotes: partial purification and characterization of a represser of ferritin in RNA translation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 9503-9507, 1988.
45. *Hunt T.* False starts in translational control of gene expression. Nature, 316, 580-581, 1985.
Kozak M. Bifunctional messenger RNAs in eucaryotes. Cell, 47, 481-483, 1986.
Pelletier J., Sonenberg N. Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature, 334, 320-325, 1988.
46. *Ilan J., ed.* Translational Regulation of Gene Expression. New York, Plenum Press, 1987.
Rosenthal E. T., Hunt T., Ruderman J. V. Selective translation of mRNA controls the pattern of protein synthesis during early development of the surf clam, *Spisula solidissima.* Cell, 20, 487-494, 1980.
Walden W.E., Thach R.E. Translalional control of gene expression in a normal fibroblast: characterization of a subclass of mRNAs with unusual kinetic properties. Biochemistry, 25, 2033-2041, 1986.
47. *Craigen W. J., Caskey C. T.* Translational frameshifting: where will it stop? Cell, 50, 1-2, 1987.
48. *Casey J. L. et al.* Iron-responsive elements: regulatory RNA sequences that control mRNA levels and translation. Science, 240, 924-928, 1988.
Raghow R. Regulation of messenger RNA turnover in eukaryotes. Trends Biochem. Sci., 12, 358-360, 1987.
Shaw G., Kamen R.A. conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediaters selective mRNA degradation. Cell, 46, 659-667, 1986.
49. *Graves R.A., Pandey N.B., Chodchoy N., MarzluffW.F.* Translation is required for regulation of histone mRNA degradation. Cell, 48, 615-626, 1987.
MarzluffW.F., Pandey N. B. Multiple regulatory steps control histone mRNA concentrations. Trends Biochem. Sci., 13, 49-52, 1988.
Mowry K. L., Steits J. A. Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone premessenger RNAs. Science, 238, 1682-1687, 1987.
50. *Driever W., Nusslein-Volhard C.A.* gradient of bicoid protein in *Drosophila* embryos. Cell, 54, 83-93, 1988.
Lawrence J. B., Singer R. H. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal protiens. Cell, 45, 407-415, 1986.
Weeks D.L., Me/ton D.A. A maternal mRNA localized to the vegetal hemisphere in *Xenopus eggs* codes for a growth factor related to TGF-beta. Cell, 51, 861-867, 1987.
51. *Borst P.* Discontinous transcription and antigenic variation in trypanosomes. Annu. Rev. Biochem., 55, 701-732, 1986.
Eisen H. RNA editing: who's on first? Cell, 53, 331-332, 1988.
Powell L. M. et al. A novel form of tissue-specific RNA processing produces apolipoprotein-B48 in intestine. Cell, 50, 831-840, 1987. *Sharp P. A.* Trans splicing: variation on a familiar theme. Cell, 50, 147-148, 1987.
52. *McClain W. H., Guerrier-Takada C., Altman S.* Model substrates for an RNA enzyme. Science, 238, 527-530, 1987.
Pines O., Inouye M. Antisense RNA regulation in prokaryotes. Trends Genet; *2,* 284-287, 1986.
Tomizawa J. Control of ColEI plasmid replication: binding of RNA I to RNA II and inhibition of primer formation. Cell, 47, 89-97, 1986. *Wu H. N.,*
Uhlenbeck O. C. Role of a bulged A residue in a specific RNA-protein interaction. Biochemistry, 26, 8221-8227, 1987.
53. *Clarke B.C., Robertson A., Jeffreys A.J., eds.* The Evolution of DNA Sequences. London. The Royal Society, 1986.
Nei M., Koehn R. K., eds. Evolution of Genes and Proteins. Sunderland MA, Sinauer, 1983.
54. *Doolittle R.F.,* Proteins. Sci. Am; 253 (4), 88-99, 1985.
Holland S. K., Blake C. C. Proteins, exons, and molecular evolution. Biosystems, 20, 181-206, 1987.
Maeda N.. Smithies O. The evolution of multigene families: human haptoglobin gene. Annu. Rev. Genet., 20, 81-108, 1986.
55. *Kourilsky P.* Molecular mechanisms for gene conversion in higher cells. Trends Genet., 2, 60-63, 1986.

Roth D. B., Porter T. N.. "Wilson J. H. Mechanisms of uonbomologous recombination in cells. Moï. Cell. Biol; 5, 2599-2607, 1985.
Smith G. P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossovers. Science, 191, 528-535, 1976.
Stark G.R., Wahl G.M. Gene amplification. Annu. Rev. Biochem., 53, 447-491, 1984.
56. *Dickerson R. E., Geis I.* Hemoglobin: Structure, Function, Evolution and Pathology. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1983.
Efstratiadis A. et al. The structure and evolution of the human p-globin gene family. Cell, 21, 653-668, 1980.
Vollrath D., Nathans J., Davis R. W. Tandem array of human visual pigment genes at Xq28. Science, 240, 1669-1672, 1988.
57. *Doolittle W.F.* RNA mediated gene conversion? Trends Genet., 1, 64-65, 1985.
Gilbert W., Marchionni M., McKnight G. On the antiquity of introns. Cell, 46, 151-153, 1986.
Sharp P. On the origin of RNA splicing and introns. Cell, 42, 397-400, 1985.
58. *Britten R.J., Kohne D.E.* Repeated sequences in DNA. Science, 161, 529-540, 1968.
Jelineh W. R., Schmid C. W. Repetitive sequences in eukaryotic DNA and their expression. Annu. Rev. Biochem; 51, 813-844, 1982.
59. *Craig-Holmes A. P., Shaw M. W.* Polymorphism of human constitutive heterochromatin. Science, 174, 702-704, 1971.
Hsu T. C. Human and Mammalian Cytogenetics: A Historical Perspective. New York, Springer-Verlag, 1979.
John B., Miklos G.L.G. Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. Int. Rev. Cytol; 58, 1-114, 1979.
Orgel L. E., Crick F. H. C. Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature, 284, 604-607, 1980.
60. *Berg D. E., Howe M. M., eds.* Mobile DNA. Washington DC, American Society for Microbiology, 1989. *Daring H.-P.,*
Starlinger P. Molecular genetics of transposable elements in plants. Annu. Rev. Genet., 20, 175-200, 1986.
Finnegan D.J. Transposable elements in eukaryotes. Int. Rev. Cytol., 93, 281-326, 1985.
McClintock B. Controlling elements and the gene. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 21, 197-216, 1956.
61. *Coen E.S., Carpenter, R.* Transposable elements in *Antirrhinum majus:* generators of genetic diversity. Trends Genet; 2, 292-296, 1986.
Georgiev G. P. Mobile genetic elements in animal cells and their biological significance. Eur. J. Biochem., 145, 203-220, 1984.
O'Kane C.J., Gehring W. Detection in situ of genomic regulatory elements in *Drosophila,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9123-9127, 1987.
Hiromi Y., Gehring W.J. Regulation and function of the *Drosophila* segmentation gene/MS/I/ *tarazu.* Cell, 50, 963-974, 1987.
62. *Gerasimova T.1., Mizrokhi L.J., Georgiev G.P.* Transposition bursts in genetically unstable *Drosophila.* Nature, 309, 714-716, 1984.
McClintock B. The significance of responses of the genome to challenge. Science, 226, 792-801, 1984.
Walbot V., Cullis C.A. Rapid genomic change in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., 36, 367-396, 1985.
63. *Deininger P. L., Daniels G. R.* The recent evolution of mammalian repetitive DNA elements. Trands Genet; 2, 76-80, 1986.
Ruffner D. E., Sprung C. N.. Minghetti P. P., Gibbs P. E., Dugiaczyk A. Invasion of the human albumin-a-fetoprotein gene family by Alu, Kpn, and two novel repetitive DNA elements. Moï. Biol. Evol; 4, 1-9, 1987.
Weiner A. M., Deininger P. L., Efstratiadis A. Nonviral retroposons: genes, pseudo-genes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. Annu. Rev. Biochem; 55, 631-661, 1986.

11 Цитоскелет

Способность эукариотических клеток сохранять определенную форму, а также осуществлять направленные и координированные движения обусловлена наличием у них **цитоскелета** - сложной сети белковых нитей, пронизывающих цитоплазмv. Цитоскелет с равным правом можно назвать и «цитомускулатурой» - ведь именно он прямо ответствен за такие виды движения, как ползание клеток по субстрату, сокращение мышечных волокон и многообразные формообразовательные процессы у развивающихся зародышей позвоночных. Кроме того, он обеспечивает активное перемещение клеточных органелл в цитоплазме. Поскольку у бактерий цитоскелета, по-видимому, нет, можно думать, что он играл важнейшую роль в эволюции эукариотических клеток.

Разнообразные функции цитоскелета зависят от трех главных типов белковых нитей - *актиновых филаментов, микротрубочек* и *промежуточных филаментов.* Нити этих трех типов построены из разных структур в зависимости от того, с какими дополнительными белками они ассоциированы. Некоторые из этих белков соединяют филаменты друг с другом или с иными компонентами клетки, например с плазматической мембраной. Другие определяют время и место сборки актиновых филаментов и микротрубочек, регулируя скорость и степень их полимеризации. И наконец, есть белки, благодаря взаимодействию которых с филаментами, осуществляется движение; наиболее изученные примеры - сокращение мышц, зависящее от актиновых филаментов, и биение ресничек, зависящее от микротрубочек.

Мы начнем эту главу с рассмотрения структур, построенных из актиновых филаментов, - от специализированных *миофибрилл* мышечного волокна до вездесущего богатого актином *кортекса* под плазматической мембраной всякой животной клетки. Затем мы перейдем к микротрубочкам, сначала к тем, которые собраны в пучки и ответственны за биение ресничек, а потом к микротрубочкам, пронизывающим всю цитоплазму, контролирующим движение органелл и определяющим полярность клеток. Затем, после обсуждения обширного семейства промежуточных филаментов, придающих клетке прочность на растяжение и формирующих ядерную ламину, мы в заключение рассмотрим функционирование цитоскелета как единой сети, определяющей и координирующей двигательные процессы и форму отдельных клеток и целых тканей.

11.1. Мышечное сокращение

Многие белки, входящие в состав свойственного всем клеткам актинового цитоскелета, впервые были открыты в мышцах, и из всех типов движения, наблюдаемых у животных, мышечное сокращение для нас наиболее знакомо и лучше всего изучено. Бег, ходьба, плавание, полет - все эти виды локомоции у позвоночных основаны на способности *скелетных мышц* быстро сокращаться, приводя в движение соединенные

с ними кости скелета; а такие виды непроизвольных движений, как работа сердца и перистальтика кишечника, обусловлены сокращением *сердечной* и *гладких* мышц соответственно.

Мышечное сокращение-результат работы весьма сложного и мощного белкового аппарата, который в зачаточной форме присутствует почти во всех эукариотических клетках. В процессе эволюции мышечных клеток элементы цитоскелета подверглись сильной гипертрофии и специализации, что сделало сократительный механизм мышц чрезвычайно стабильным и эффективным. В поперечнополосатой мускулатуре, к которой относятся скелетные и сердечная мышцы, а также сходные ткани беспозвоночных (например, летательные мышцы насекомых), структурная организация сократительного аппарата достигает такой степени, что можно непосредственно наблюдать его работу, и при этом сразу выявляется ряд важных свойств составляющих его молекул.

11.1.1. Сократительными элементами клеток скелетной мышцы служат миофибриллы

Длинные, тонкие *мышечные волокна,* из которых построена скелетная мышца, - это гигантские клетки, образующиеся в ходе онтогенеза при слиянии множества отдельных клеток (разд. 17,6.1). Они получаются многоядерными, причем ядра располагаются прямо под плазматической мембраной. Основная же часть цитоплазмы (около двух третей сухого веса) состоит из *миофибрилл* - цилиндрических элементов толщиной 1 -2 мкм, которые часто тянутся от одного конца клетки до другого (рис. 11-1). На изолированных миофибриллах отчетливо видны поперечные полоски, от которых и зависит характерная поперечная исчерченность клеток скелетных мышц. Если к изолированным миофибриллам добавить АТР и Ca^{2+}, они тотчас же сократятся - значит, именно они служат генераторами силы при сокращении мышечных клеток. Каждая миофибрилла представляет собой цепь миниатюрных сократимых единиц, состоящих из регулярным образом расположенных систем толстых и тонких нитей (филаментов).

11.1.2. Миофибриллы построены из повторяющихся ансамблей толстых и тонких филаментов

Регулярно повторяющиеся единицы, образующие миофибриллы и придающие им характерную *исчерчекностъ, - саркомеры* - имеют длину около 2,5 мкм. При большом увеличении в миофибрилле можно видеть широкие темные и светлые полосы, а посередине каждой светлой полосы-плотную линию, которая отделяет один саркомер от другого и называется Z-*линией* (на срезе) или *Z-диском* (рис. 11-2).

Молекулярная основа поперечной исчерченности (послужившая ключом к пониманию функционального значения этой особенности) была выявлена в 1953 г. в одной из первых работ по электронной микроскопии биологического материала. Оказалось, что в состав каждого саркомера входят два набора параллельных, частично перекрывающихся филаментов: *толстых,* которые образуют темную полосу и тянутся от одного ее края до другого, и *тонких,* лежащих в области светлой полосы и частично проникающих в соседние темные полосы (рис. 11-2, *В).* Когда рассматривали поперечный срез миофибриллы в области, где толстые и тонкие филаменты перекрываются, можно было видеть, что толстые филаменты организованы в виде правильной гексагональной решетки, причем каждый толстый филамент окружен тонкими, тоже расположенными регулярно (рис. 11-3).

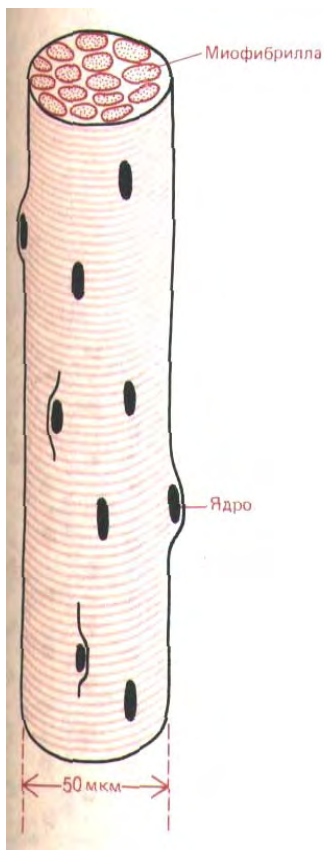


Рис. 11-1. Схематическое изображение небольшого отрезка клетки скелетной мышцы (называемой также мышечным волокном). У взрослого человека эти гигантские многоядерные клетки обычно имеют толщину около 50 мкм, а в длину могут достигать 500 000 мкм (50 мм).

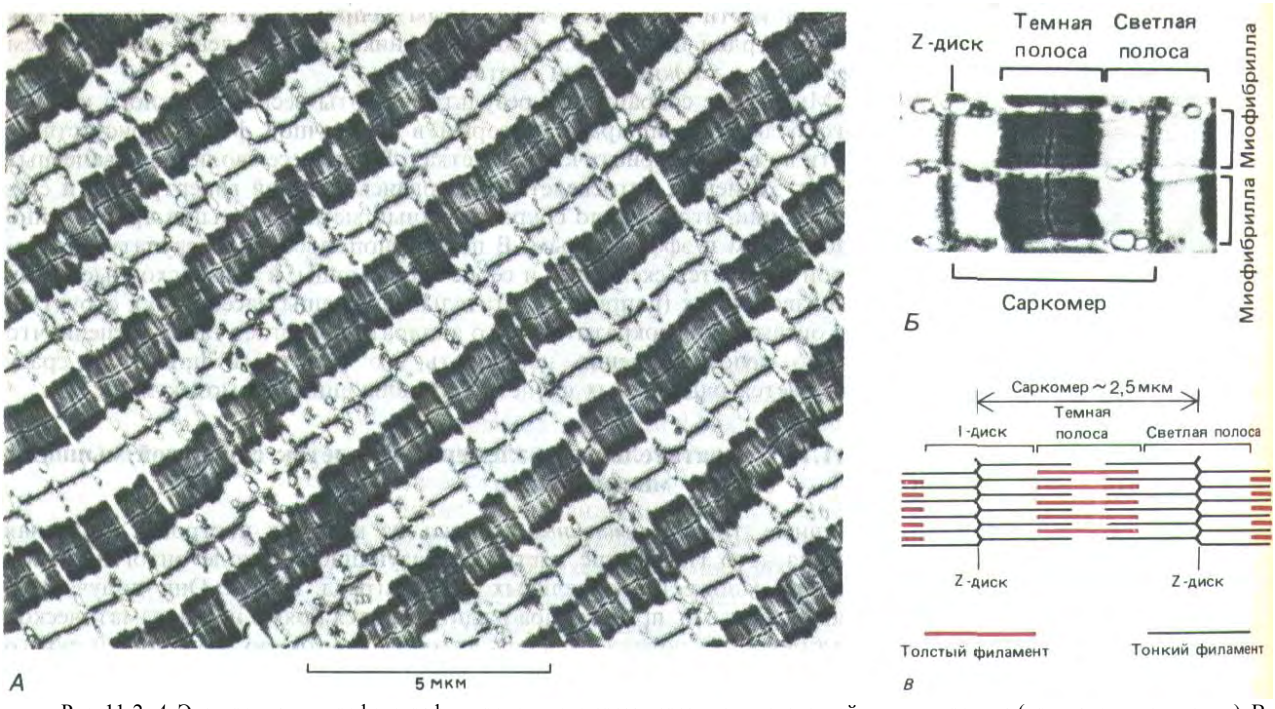


Рис. 11-2. *А.* Электронная микрофотография продольного среза через клетку скелетной мышцы кролика (при малом увеличении). Видна регулярная поперечная исчерченность. Клетка содержит множество параллельных миофибрилл (см. рис. 11-1). *Б.* Небольшой участок того же фото: показаны отрезки двух смежных миофибрилл и детали саркомера. *В.* Схема строения отдельного саркомера, объясняющая происхождение темных и светлых полос, которые видны на электронной микрофотографии. Темные полосы иногда называют полосами А, так как они выглядят анизотропными в поляризованном свете (т. е. их показатель преломления меняется с изменением плоскости поляризации). Светлые полосы относительно изотропны в поляризованном свете, и их иногда называют *полосами I. (А* и *Б* с любезного разрешения Roger Craig.)

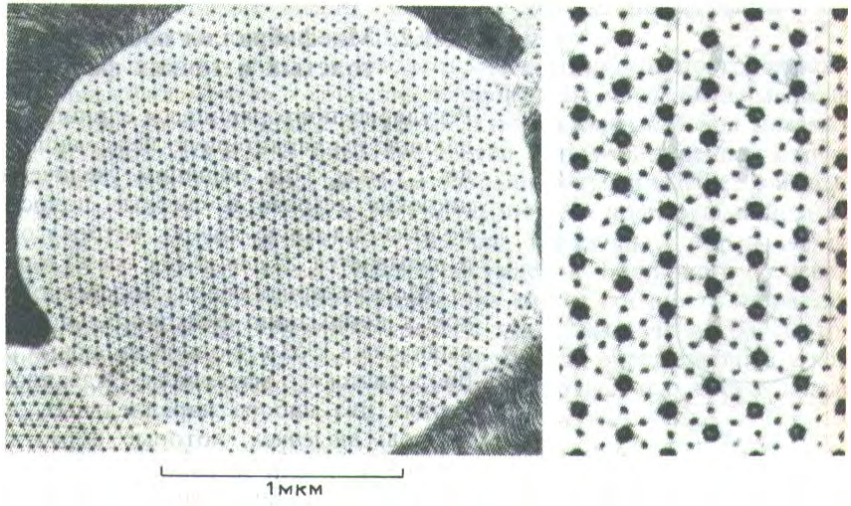


Рис. 11-3. Электронные микрофотографии поперечного среза летательной мышцы насекомого. Видна кристаллоподобная упаковка толстых и тонких филаментов. У насекомых в отличие от позвоночных толстые филаменты имеют продольную центральную полость, что можно видеть при более сильном увеличении *(справа)*. Сама геометрия гексагональной решетки в мышцах позвоночных тоже несколько иная. (J. Auber, J. de Microsc., 8: 197-232, 1969.)

11-3

11.1.3. Сокращение - результат скольжения тонких и толстых филаментов друг относительно друга [2]

Если через живую мышечную клетку пропустить пучок монохроматического света, возникнет интерференционная картина, позволяющая с большой точностью регистрировать изменения в длине саркомеров. Такие измерения показали, что при сокращении мышцы пропорционально укорачивается и каждый саркомер; если миофибрилла, состоящая из 20000 саркомеров, укорачивается с 5 см до 4 см (т.е. на 20%), длина каждого саркомера соответственно уменьшится с 2,5 до 2 мкм.

При укорочении саркомера сжимаются только светлые полосы - темная полоса своих размеров не меняет. Это можно легко объяснить, предположив, что сокращение вызывается скольжением тонких филаментов относительно толстых без изменения длины тех и других (рис. 11-4). Эта *«модель скользящих нитей»,* впервые предложенная в 1954 г., сыграла решающую роль в понимании механизма мышечного сокращения. Она, в частности, привлекла внимание к молекулярным взаимодействиям, лежащим в основе взаимного скольжения соприкасающихся толстых и тонких филаментов.

Модель скользящих нитей базируется на нескольких группах экспериментальных данных. Электронномикроскопические исследования показали, что длина как толстых, так и тонких филаментов при укорочении мышцы не изменяется. Судя по данным рентгеноструктурного анализа, характер упаковки субъединиц, образующих филаменты, тоже остается неизменным. По мере укорочения мышцы развиваемое механическое усилие растет пропорционально степени перекрывания толстых и тонких филаментов; этого и следует ожидать, если усиление - результат взаимодействия нитей во всей области их соприкосновения.

Ультраструктурную основу этого взаимодействия удается выявить с помощью электронной микроскопии высокого разрешения. Оказалось, что от толстых филаментов отходят многочисленные боковые отростки, или *поперечные мостики,* соприкасающиеся с тонкими нитями, которые лежат на расстоянии около 13 нм от толстых (рис. 11-5). При сокращении мышцы толстые и тонкие филаменты подтягивают друг друга с помощью этих мостиков, работающих циклично, как миниатюрные весла.

Взаимодействующие белки тонких и толстых филаментов были идентифицированы как *актин* и *миозин* соответственно. Актин, которого в цитоскелете больше, чем какого-либо другого белка, часто образует вместе с миозином структуры, способные к сокращению. Хотя эти белки

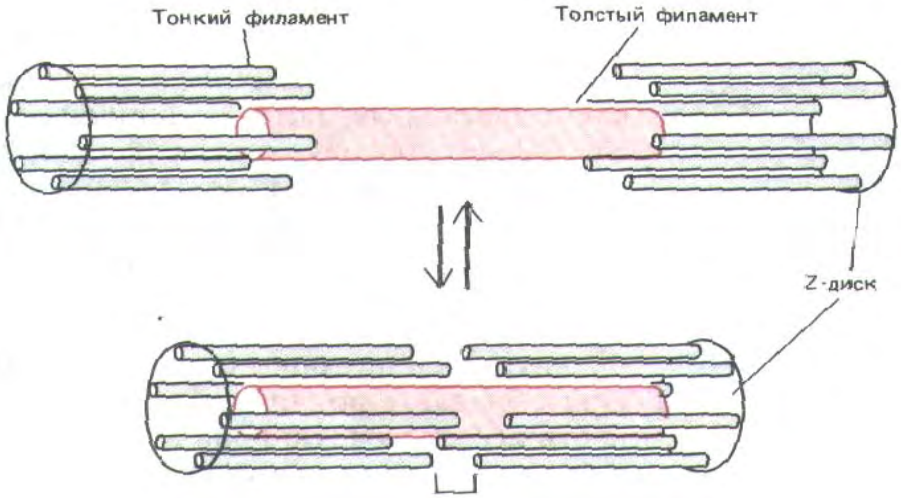


Рис. 11-4. Схема, иллюстрирующая процесе мышечного сокращения по принципу скользящих нитей; толстые и тонкие филаменты скользят друг по другу, не изменяя собственной длины.

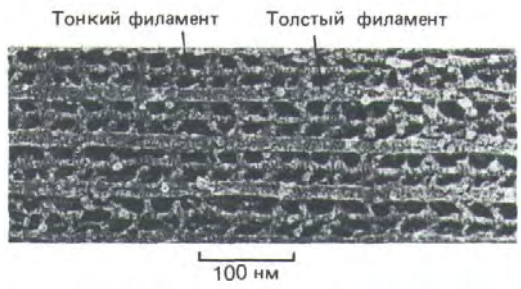


Рис. 11-5. Продольный срез летательной мышцы насекомого (электронная микрофотография; препарат получен методом быстрого замораживания, скалывания и глубокого травления). Обратите внимание на почти кристаллическую укладку толстых миозиновых и тонких актиновых филаментов. Поперечные мостики, соединяющие нити двух типов, - головки миозина. (С любезного разрешения John Heuser и Roger Cooke.)

имеются почти во всех эукариотических клетках, большая часть наших знаний об их свойствах первоначально была получена в биохимических экспериментах с актином и миозином, выделенными из мышцы.

11.1.4, Тонкие филаменты состоят в основном из актина [2]

Актин имеется у всех эукариот, включая одноклеточных (например, у дрожжей). Гены актина эволюционно крайне консервативны, так что актины весьма далеких друг от друга организмов в опытах in vitro функционально взаимозаменяемы. Главные свойства актина, выделенного, например, из скелетных мышц позвоночных, являются общими| для актинов из любых других источников.

Обычно актин выделяют, обрабатывая порошок высушенной мышечной ткани сильно разбавленным солевым раствором, который вызывает диссоциацию актиновых филаментов на их глобулярные субъединицы. Каждая субъединица представляет собой одну полипептидную цепь длиной в 375 аминокислотных остатков, с которой нековалентно связана одна молекула ATP. Такой актин называют глобулярным, или *G-актином.* При полимеризации актина связанный ATP гидролизуется, отщепляя концевой фосфат, а актин образует филаменты, называемые фибриллярным актином *(F-актином).* Полимеризацию можно вызвать, просто повысив концентрацию соли до уровня, близкого к физиологическому; при этом раствор актина, лишь ненамного более вязкий, чем вода, быстро «густеет» по мере образования филаментов.

Хотя в процессе полимеризации и происходит гидролиз связанного ATP, сама полимеризация энергии не требует; она идет, даже если. с актином связан ADP или негидролизуемый аналог ATP. Однако гидролиз ATP оказывает существенное влияние на динамическое поведение актиновых филаментов; это мы увидим позже, когда будем рассматривать те виды клеточной активности, которые (в отличие от мышечного сокращения) зависят от контролируемой полимеризации и деполимеризации актина.

На электронных микрофотографиях **актиновые филаменты** выглядят как однородные нити толщиной около 8 нм (рис. 11-6). Эти нити составляют основу тонких филаментов скелетных мышц, что подтверждается данными электронной микроскопии, рентгеноструктурного анализа и окраски антителами к актину. Однако актин - не единственный компонент тонких филаментов, о чем будет сказано позже (разд. 11.1.12).

Актиновые филаменты представляют собой плотную спираль, собранную из однотипно ориентированных мономеров актина (рис. 11-7). Они обладают полярностью, т. е. два их конца различны. Эта полярность играет важную роль в осуществлении подвижности клеток и легче всего обнаруживается в ориентированных комплексах, которые каждый

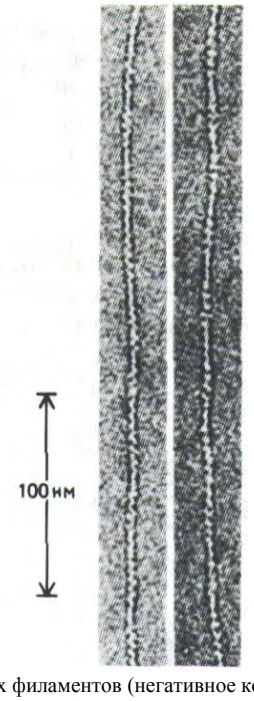


Рис. 11-6. Электронные микрофотографии актиновых филаментов (негативное контрастирование). {С любезного разрешения Roger Craig.)

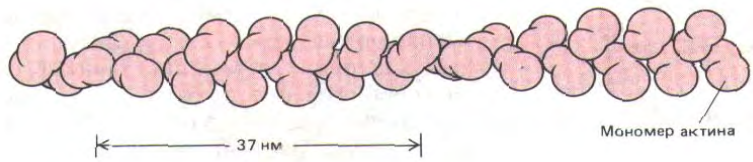


Рис 11-7. Организация глобулярных молекул актина в актиновом филаменте. Молекулы упакованы в плотную спираль; на один оборот приходится приблизительно два мономера актина. Хотя такое устройство создает видимость спирали из двух цепочек актина, обвивающих друг друга с шагом 37 нм, эта видимость ошибочна, так гипотетическая "одиночная" актиновая цепь сама по себе существовать не может.

актиновый мономер образует с миозином. Но прежде чем обсуждать это ключевое взаимодействие, мы должны рассмотреть некоторые особенности молекул миозина.

11.1.5. Толстые филаменты состоят из миозина [2]

Миозин есть почти во всех клетках позвоночных и всегда находится в сократительных пучках, образуемых в цитоплазме актиновыми филаментами. Миозин - эволюционно гораздо менее консервативный белок, чем актин, и известно несколько его форм. При полимеризации in vitro миозин скелетных мышц, например, образует значительно более крупные филаменты, чем миозины немышечных клеток.

Миозин экстрагируют из скелетных мышц концентрированными солевыми растворами, под действием которых толстые филаменты деполимеризуются до составляющих их молекул миозина (рис. 11-8). Каждая молекула состоит из шести полипептидных цепей - двух одинаковых *тяжелых цепей* и двух пар *легких цепей* (рис. 11-9).

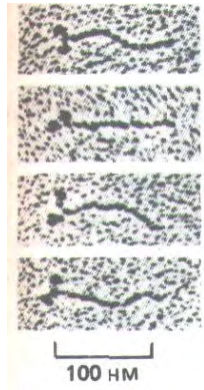
Протеолитический фермент папаин расщепляет молекулу миозина на длинный α-спиральный участок, называемый *миозиновым стержнем* (или *миозиновым хвостом),* и две раздельные глобулярные *миозиновые головки,* называемые также *субфрагментами-1* или *S1-фрагментами* (рис. 11-10). Эти две части молекулы выполняют разные функции - хвост ответствен за самопроизвольную сборку толстых филаментов, а с помощью головок осуществляется движение этих филаментов относительно прилегающих актиновых нитей. Вначале мы опишем строение и самосборку хвостов, а затем рассмотрим, каким образом головки создают мышечное усилие.

11-4

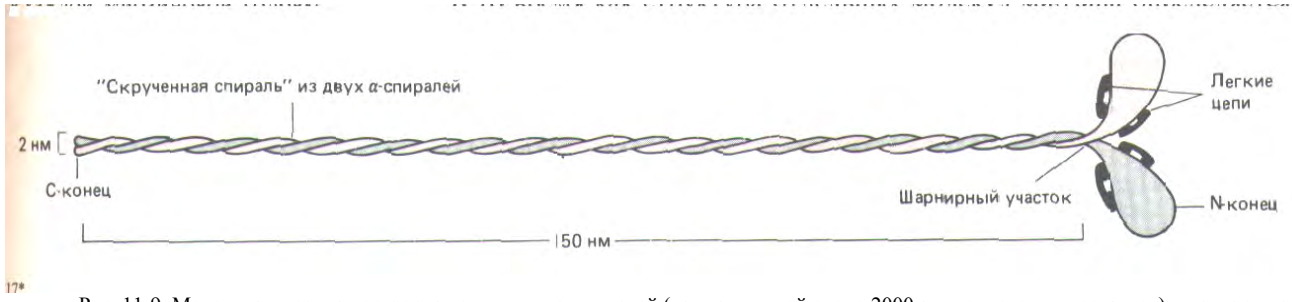
11.1.6. Миозиновые хвосты самоорганизуются в биполярные толстые филаменты [3]

Подобно многим другим цитоскелетным белкам, хвосты миозина - это длинные стержневидные образования. Жесткость таких белков определяется наличием общего структурного элемента, в котором две α-спирали благодаря особому расположению гидрофобных аминокислотных остатков обвиваются друг около друга, образуя «скрученную спираль» (рис. 11-11). В миозине и во многих других белках цитоскелета эти две спирали направлены параллельно (ориентация N- и С-концов у них совпадает) и объединены в нить толщиной около 2 нм.

В то время как структура отдельных молекул миозина определяется



Рнс. 11-8. Электронные микрофотографии молекул миозина (напыление платиной). Обратите внимание, что каждая молекула состоит из двух глобулярных головок, прикрепленных к фибриллярному хвосту (С любезного разрешения David Shotton.)



Рнс. 11-9. Молекула миозина построена из двух тяжелых цепей (каждая длиной около 2000 аминокислотных остатков) и четырех легких цепей. Легкие цепи представлены молекулами двух типов (в одних около 190 аминокислотных остатков, в других около 170)-по одной молекуле каждого типа в каждой миозиновой головке.

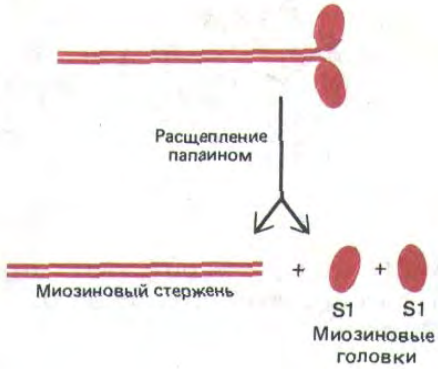


Рис. 11-10. При ограниченном расщеплении папаином молекула миозина распадается на стержень и две головки.

гидрофобными взаимодействиями между двумя α-спиральными тяжелыми цепями (рис. 11 -11, Л), структура толстых филаментов, образуемых миозином в мышце, зависит от ионных взаимодействий между хвостами. Именно поэтому растворы соли высокой концентрации, разрушающие ионные взаимодействия, но не влияющие на гидрофобные, экстрагируют из мышцы отдельные молекулы миозина. При снижении ионной силы раствора до физиологического уровня эти молекулы ассоциируют, образуя крупные филаменты, которые могут быть очень сходны с нормальными толстыми филаментами мышц. В мышечных клетках эти взаимодействия стабилизируются различными сопутствующими белками, и получающиеся в результате толстые филаменты образованы сотнями миозиновых хвостов, упакованных в плотные упорядоченные пучки, из которых торчат миозиновые головки расположенные «лесенкой» (рис. 11-12). Такая структура оказывается биполярной, с «голой» (без миозиновых головок) центральной областью, где соединяются противоположно направленные пучки миозиновых хвостов. Глобулярные головки миозина взаимодействуют с актином, образуя поперечные мостики между толстыми и тонкими филаментами.

11-5

11.1.7. Источником энергии для мышечного сокращения служит гидролиз ATP [4]

Скелетная мышца превращает химическую энергию в механическую работу с весьма высокой эффективностью - в виде тепла теряется всего лишь 30-50% (для сравнения: тепловые потери при работе автомобильного двигателя составляют обычно 80-90% всей энергии, выделяющейся при сжигании бензина).

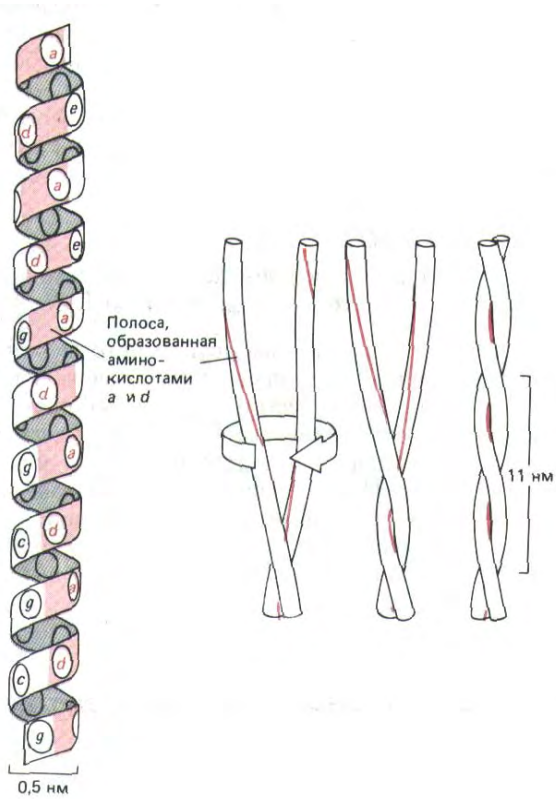


Рис. 11-11. Топология «скрученной спирали». Слева одиночная α-спираль представлена в виде цилиндра, где боковые цепи аминокислот обозначены семичленной последовательностью букв *abcdefg* (снизу вверх). Аминокислоты *a* и *d* в этой последовательности оказываются на поверхности цилиндра рядом, образуя «полосу» (выделена цветом), которая медленно оборачивается вокруг α -спирали. Белки, образующие скрученную спираль, как правило, имеют в положениях *a* и *d* гидрофобные аминокислоты. Поэтому, как показано справа, две α -спирали обвивают друг друга таким образом, что гидрофобные боковые цепи одной α -спирали попадают в пространство между гидрофобными боковыми цепями другой, тогда как более гидрофильные боковые цепи обращены к окружающей водной среде.

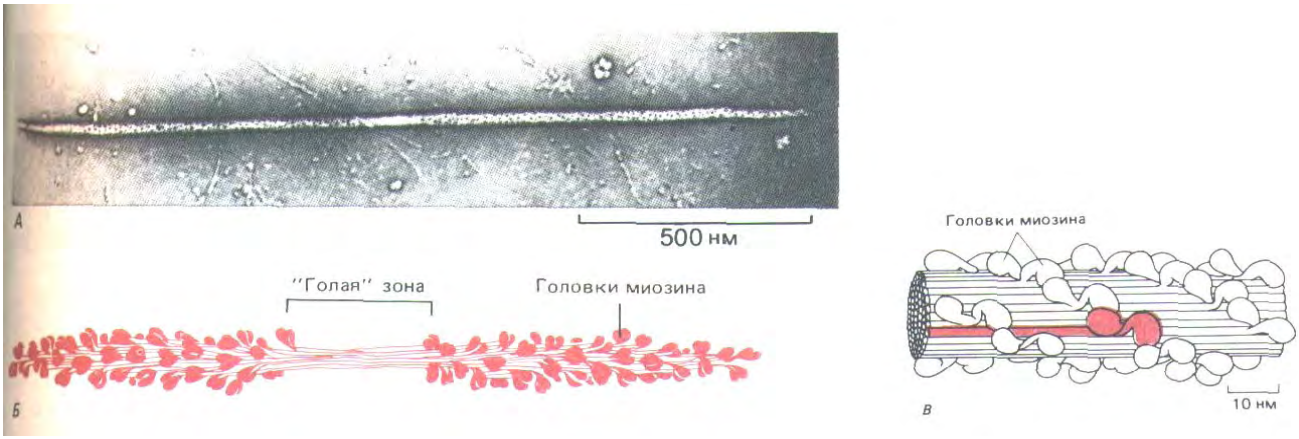


Рис. 11-12. Толстый миозиновый филамент. *А.* Электронная микрофотография толстого филамента из мышцы морского гребешка. Видна центральная «голая» зона. *Б.* Схема строения (без соблюдения масштаба). Молекулы миозина связаны хвостовыми участками в пучок, на поверхности которого выступают головки. «Голая» зона в центре содержит только хвосты миозина. В. Небольшой отрезок толстого филамента: реконструкция по электронным микрофотографиям. Одна из молекул миозина выделена цветом. *(А-с* любезного разрешения R. Craig; B-no R. A. Crowther, R. Pardon, R. Craig, J. Mol, Biol. 184: 429-439, 1985.)

Необходимую для мышечного сокращения энергию поставляет гидролиз ATP, однако содержание ATP в покоящейся и в активно работающей мышце различается мало, так как в мышечных клетках работает чрезвычайно эффективная система регенерации ATP. Фермент *фосфокреатинкиназа* катализирует реакцию между креатинфосфатом и ADP, в результате которой образуются ATP и креатин. (Креатин-фосфат-вещество с еще большей энергией, чем ATP; рис. 11-13). После кратковременной вспышки мышечной активности падает внутриклеточный уровень именно креатинфосфата, хотя сам сократительный механизм использует ATP. Таким образом, креатинфосфат играет роль аккумулятора - он запасает энергию, «заряжаясь» за счет новых молекул ATP (синтезируемых при клеточных процессах окисления), когда мышца находится в покое.

11.1.8. Миозин действует как актин-зависимая АТРаза [5]

Происходящий при мышечном сокращении гидролиз ATP - прямое следствие взаимодействия между актином и миозином. Миозин и сам по себе действует как АТРаза, но в очищенном виде он работает сравнительно медленно. Для завершения полного цикла гидролиза одной молекулы ATP каждой молекуле миозина требуется примерно полминуты. При этом скорость-лимитирующей стадией оказывается не связывание ATP с миозином и не гидролиз концевой фосфатной связи (оба процесса протекают быстро), а освобождение продуктов гидролиза-ADP и неорганического фосфата - из комплекса с миозином. Оставаясь нековалентно связанными с его молекулой, они препятствуют присоединению и последующему гидролизу новых молекул ATP.

В присутствии актиновых филаментов АТРазная активность миозина резко возрастает. Каждая молекула миозина начинает гидролизовать от 5 до 10 молекул ATP в секунду, что сравнимо со скоростью гидролиза в сокращающейся мышце. Активация АТРазы миозина актиновыми филаментами отражает физическую ассоциацию этих белков, которая служит основой мышечного сокращения. Связывание миозина с актиновым филаментом ведет к быстрому отделению ADP и P_i от молекулы миозина, в результате чего последняя может связывать новые молекулы ATP и возобновлять цикл.

11.1.9. С актиновыми филаментами взаимодействуют головки миозина [6]

Как связывание с актиновыми филаментами, так и гидролиз ATP осуществляют глобулярные миозиновые головки. Изолированные го-

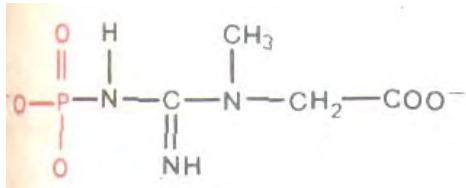


Рис. 11-13. Структура креатинфосфата. Это вещество играет роль «запасного аккумулятора» высоко-їнергетических фосфатных групп в мышцах и других тканях позвоночных. Фосфатная группа (выделена цветом) с помощью фермента креатинкиназы переносится на ADP с образованием ATP, когда в последнем возникает нужда.

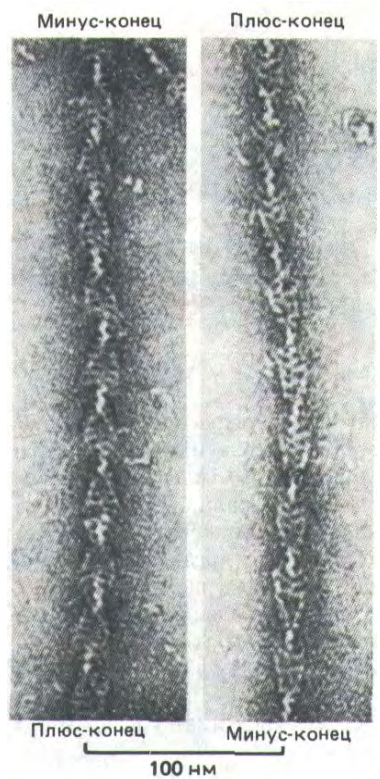


Рис. 11-14. Электронная микрофотография актиновых филаментов с присоединенными к ним изолированными головками миозина. Спиральное расположение связанных головок, повернутых в одном направлении, создает картину цепочки из наконечников стрел, выявляющую полярность актинового филамента. Конец, к которому обращены острия, называют *минус-концом, а* другой конец - *плюс-концом,* так как полимеризация актина на этих концах идет с различной скоростью (см. рис. 11-40). {С любезного разрешения R. Craig.)

ловки, которые можно получить путем отщепления «хвостов» папаином (см. рис. 11-10), сохраняют и АТРазную активность, и актин-связывающие свойства интактных молекул миозина, поэтому их можно использовать для изучения взаимодействий между актином и миозином.

Каждая молекула актина в составе актинового филамента способна связать одну миозиновую головку. Образующиеся при этом комплексы выдают структурную полярность актиновых филаментов; в электронном микроскопе негативно контрастированные препараты таких филаментов имеют весьма характерный вид: каждая миозиновая головка образует боковой выступ, и все множество этих выступов создает впечатление, что на филамент нанизаны наконечники стрел (рис. 11-14) Поскольку миозиновые головки присоединяются к каждой субъединице актина в одинаковой ориентации, такая картина означает, что все актиновые молекулы тоже ориентированы вдоль оси филамента в одном направлении. Таким образом, два конца актинового филамента структурно различаются. Их назвали соответственно минус-концом (или *заостренным концом,* т. е. тем, к которому направлены острия стрел) и плюс-концом (или *оперенным концом,* к которому обращены хвосты стрел). Термины «плюс» и «минус» связаны с тем фактом, что разные концы актинового филамента in vitro растут с различной скоростью (разд. 11.20.9).

Из рисунка 11-12 видно, что миозиновые головки, расположенные по разные стороны от центральной «голой» области толстого филамента, смотрят в противоположных направлениях. Так как головки должны взаимодействовать с тонкими филаментами в зоне перекрывания, сами тонкие филаменты с одной и с другой стороны саркомера должны иметь противоположную полярность. Это действительно удалось продемонстрировать, присоединяя миозиновые головки к актиновым филаментам, отходящим в обе стороны от изолированных Z-дисков: все миозиновые «стрелы» были направлены прочь от Z-диска. Таким образом, плюс-концы каждого актинового филамента закреплены в Z-диске, а минус-концы направлены в сторону толстых филаментов (рис. 11-15).

11.1.10. Миозиновые головки «шагают» по актиновому филаменту в направлении плюс-конца [7]

Мышца сокращается в результате взаимодействия головок миозина с прилегающими к ним актиновыми филаментами. В ходе этого взаимодействия миозиновые головки гидролизуют АТР. Гидролиз АТР и последующая диссоциация прочно связанных продуктов гидролиза (ADP и P_i) вызывают упорядоченную серию аллостерических изменений в конформации миозина. В итоге часть освобождающейся энергии превращается в двигательную работу. Общие принципы, лежащие в основе сопряжения гидролиза АТР с направленным перемещением белковых молекул, обсуждаются в разд. 3.4.11.

Анализ кинетики гидролиза АТР в процессе мышечного сокращения, данные электронной микроскопии и результаты рентгеноструктурного анализа указывают на вероятную последовательность событий, представленную на рис. 11-16. Свободная головка миозина связывает АТР (состояние 1) и гидролизует его. Этот процесс обратим, так как энергия гидролиза АТР первоначально запасается в напряженной конформации белка (когда ADP и PJ остаются связанными с ним - состояние 2). Переходя поочередно в то или другое из этих состояний, миозиновая головка в результате случайных движений может приблизиться к соседней субъединице актина и слабо связаться с ней; это приводит к освобождению P_I, что в свою очередь ведет к прочному связыванию головки с актиновым филаментом (состояние 3). В этом состоянии головка

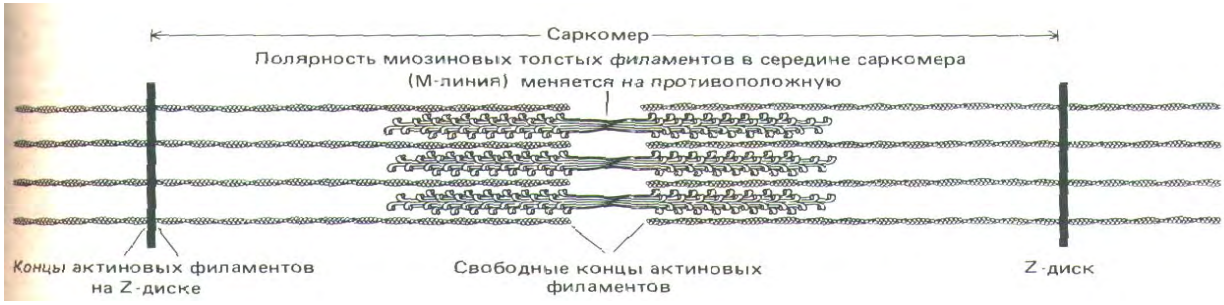


Рис. 11-15. Тонкие и толстые филаменты в саркомере перекрываются, причем их полярность симметрична относительно средней линии саркомера.

претерпевает конформационное изменение, которое и производит элементарный силовой акт, участвующий в подтягивании всего толстого филамента. В конце этого «рабочего хода» (состояние 4) происходит отделение ADP от головки, а затем присоединение к ней новой молекулы ATP, отделяющее головку от актинового филамента и возвращающее ее в состояние 1. Далее гидролиз связанного ATP подготавливает миозиновую головку к следующему циклу.

Поскольку каждый оборот цикла приводит к гидролизу и освобождению одной молекулы ATP, вся эта серия конформационных изменений связана с большим положительным изменением свободной энергии системы, что делает весь процесс однонаправленным (см. разд. 3.4.11). Поэтому каждая отдельная головка миозина «шагает» по актиновому филаменту в одном направлении - всегда в сторону плюс-концов (см. рис. 11-15). При циклических изменениях своей конформации головка тянет актиновый филамент, заставляя его скользить относительно миозинового; в те моменты, когда головка не контактирует с актином, она

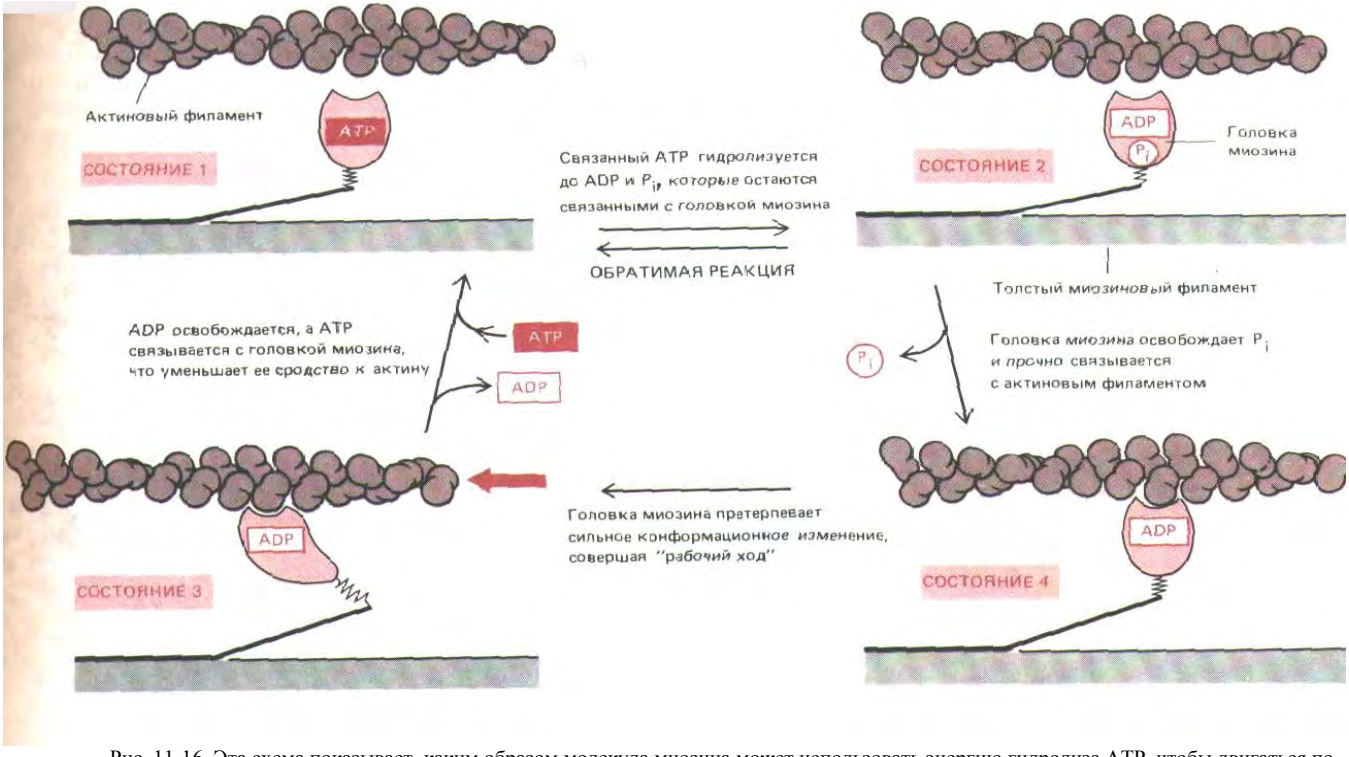


Рис. 11-16. Эта схема показывает, какнм образом молекула миозина может использовать энергию гидролиза ATP, чтобы двигаться по актвому филаменту от его минус-конца к плюс-концу. При переходе из состояния 2 в состояние 3 присоединение миозиновой голов-в к актину приводит к тому, что она теряет связанный с ней фосфат и более прочно прикрепляется актиновому филаменту. Вслед за этим форма головки претерпевает пока еще не очень понятные изменения, которые сопровождаются высвобождением ADP и заставляют миозиновую головку «подтянуться» относительно актинового филамента (рабочий ход). Каждая из пары головок на молекуле миозина работает независимо от другой.

смещается за счет работы других миозиновых головок того же филамента. На «моментальном снимке» всего миозинового филамента в сокращающейся мышце было бы видно, что часть его головок находится в контакте с актиновыми филаментами, а часть остается свободной (для этого весьма существенна эластичность, «пружинистость» молекулы миозина). На каждом толстом филаменте сидит около 500 миозиновых головок, и каждая головка при быстром сокращении мышцы проходит примерно 5 рабочих циклов за секунду; в результат скорость скольжения тонких филаментов относительно толстых достигает 15 мкм/с.

11.1.11. Мышечное сокращение инициируется внезапным повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле [8]

Только что описанный молекулярный механизм создания силы включается лишь тогда, когда мышца получает сигнал от своего мотонейрона. Нервный импульс вызывает на плазматической мембране мышечной клетки потенциал действия, и в результате электрическое возбуждение быстро распространяется по серии мембранных впячиваний, называемых *поперечными трубочками (Т-трубочками),* которые отходят внутрь от плазматической мембраны, вступая в контакт с каждой миофибриллой. Отсюда сигнал каким-то образом передается саркоплазматическому ретикулуму - своеобразной оболочке из сообщающихся уплощенных пузырьков, которая окружает каждую миофибриллу подобно сетчатому чулку (рис. 11-17).

Щель между Т-трубочкой и саркоплазматическим ретикулумом имеет ширину всего лишь 10-20 нм, но как через нее передается сигнал, остается неясным. Электрическое возбуждение Т-трубочек приводит (неизвестным пока способом) к открытию в мембране саркоплазматического ретикулума кальциевых каналов (рис. 11-17), и ионы Ca^{2+}, которых в ретикулуме очень много, выходят в цитозоль. Именно этот внезапный подъем концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле вызывает сокращение миофибрилл. Так как время прохождения сигнала от плазматической мембраны через Т-трубочки и саркоплазматический ретикулум до каждого из саркомеров измеряется миллисекундами, сокращение всех миофибрилл в клетке происходит одновременно. Повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле кратковременно, поскольку ионы Ca^{2+} быстро перекачиваются обратно в саркоплазматичес-

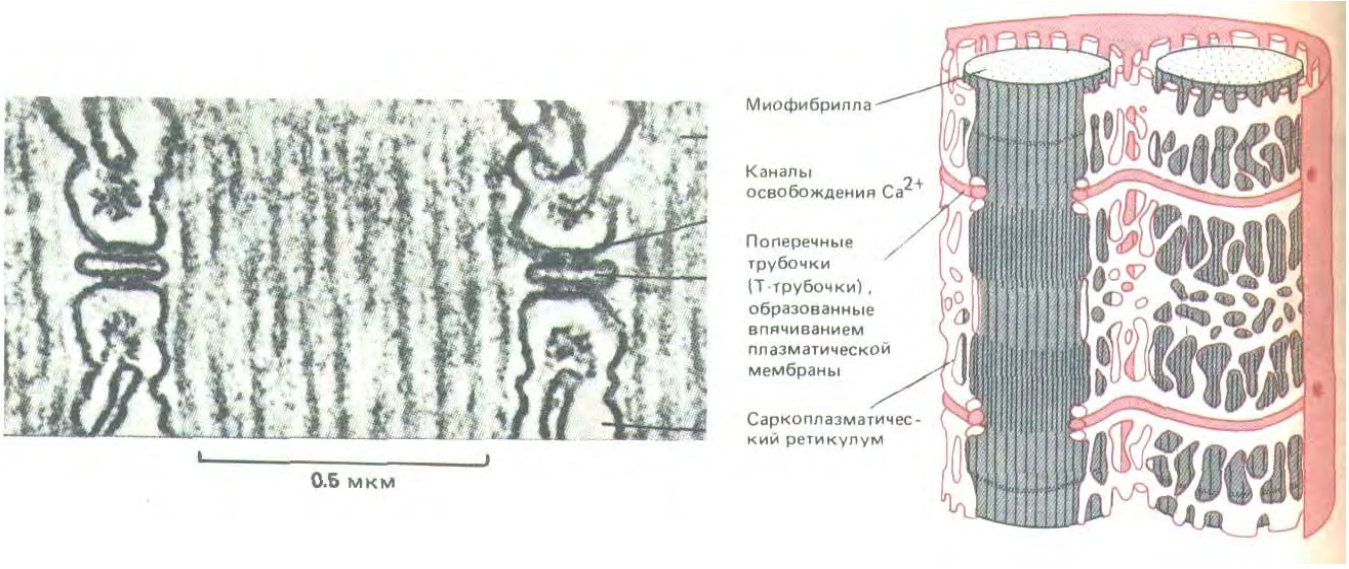


Рис. 11-17. Система мембран, передающая сигнал к сокращению от плазматической мембраны мышечной клетки ко всем ее миофибриллам. На электронной микрофотографии видны две Т-трубочки и большие каналы для выброса Ca^{2+} в мембране саркоплазматического ретикулума, которые выглядят как прямоугольные «ножки», соединенные с мембраной соседней Т-трубочки. (Микрофотографию любезно предоставила Clara Ftanzini-Armstrong.)

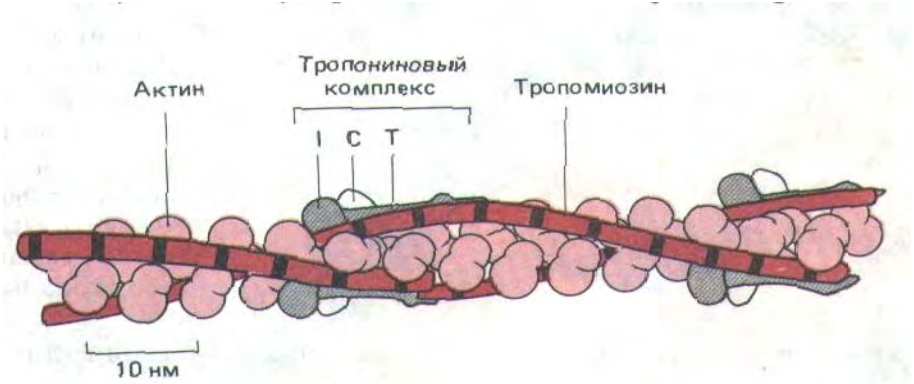


Рис. 11-18. Здесь показано, каким образом на актиноном филаменте расположены тропомиозин и тропонин. Каждая молекула тропомиозина имеет семь регулярно расположенных участков с гомологичной последовательностью; как полагают, каждый такой участок связывается с мономером актина. Обратите внимание, что концы соседних молекул тропомиозина слегка перекрываются, как если бы они полимеризовались вдоль актинового филамента «головой к хвосту». (По G.N. Phillips, J.P. Fillers, C. Cohen, J. Mol. Biol. 192: 111-131, 1986, с изменениями.)

кий ретикулум Ca^{2+}-АТРазой, которой в его мембране очень много (разд. 6.4.7). Обычно возвращение концентрации Ca^{2+} в цитозоле к уровню покоя происходит за 30 мс, что приводит к расслаблению миофибрилл.

11.1.12. Сокращение скелетной мышцы регулируется ионами Ca^{2+} при участии тропонина и тропомиозина [9]

Зависимость сокращения скелетной мышцы позвоночного от ионов Ca^{2+} (и тем самым - от команд, передаваемых нервами) всецело определяется наличием специализированных вспомогательных белков, тесно связанных с актиновыми филаментами. Если миозин смешать в пробирке с очищенными актиновыми филаментами, АТРаза миозина активируется независимо от присутствия Ca^{2+}, тогда как в нормальной миофибрилле, где на актиновых филаментах «сидят» вспомогательные белки, активация миозиновой АТРазы зависит от Ca^{2+}.

Один из этих белков, названный *тропомиозином* (из-за сходства его с миозином на рентгеновских дифрактограммах), - жесткая стержневидная молекула длиной 41 нм. Как и хвост миозина, тропомиозин представляет собой димер, состоящий из двух одинаковых α-спиральных цепей по 284 аминокислоты в каждой. Цепи обвиваются друг около друга (см. разд. 11.1.6). Связываясь с актиновым филаментом по всей его длине, он стабилизирует филамент и придает ему жесткость (рис. 11-18).

Другой важный вспомогательный белок, участвующий в регулировании функции скелетных мышц позвоночных ионами кальция, - это *тропонин.* Он представляет собой комплекс из трех полипептидов-тропонинов Т, I и С (названных так за свои тропомиозин-связывающие, ингибиторные и Ca^{2+}-связывающие свойства соответственно). Тропониновый комплекс имеет удлиненную форму, причем субъединицы С и I образуют глобулярную головку, а тропонин Т-длинный хвост. Хвост *тропонина Т* связывается с тропомиозином и, как полагают, определяет положение всего комплекса на тонком филаменте (рис. 11-18). *Тропонин I* присоединяется к актину, и если его добавить к тропонину Т и тропомиозину, то образуемый ими комплекс будет ингибировать взаимодействие актина с миозином даже в присутствии Ca^{2+}.

Если же, наконец, добавить *тропонин С* и достроить таким образом тропониновый комплекс, его влияние на актин-миозиновые взаимодействия станет чувствительным к Ca^{2+}. Тропонин С способен связывать до четырех ионов Ca^{2+}, и в комплексе с Ca^{2+} он ослабляет ингибирующее действие двух других компонентов тропонина на связывание миозина с актином. Тропонин С-близкий «родственник» *кальмодулина* - белка, который участвует в Ca^{2+}-зависимых ответах всех клеток, в том числе в активации миозина в гладких мышцах (разд. 11.1.15). Поэтому тропонин С можно рассматривать как специализи-

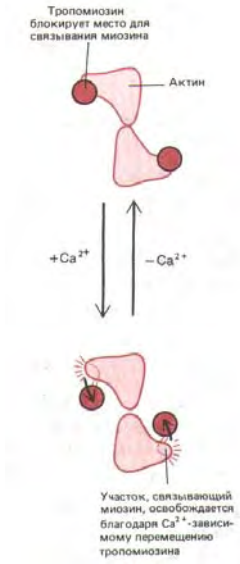


Рис. 11-19. Актиновый филамент в поперечном разрезе (схема): показано, каким образом в отсутствие Ca^{2+} тропомиозин может блокировать взаимодействие миозиновых головок с актином.

рованную форму кальмодулина, приобретшую участки стабильного связывания с тропонином I и тропонином T и обеспечивающую тем самым способность миофибрилл чрезвычайно быстро реагировать на повышение концентрации Ca^{2+}.

На каждые семь мономеров актина в актиновом филаменте приходится только один тропониновый комплекс (рис. 11-18). Судя по данным структурных исследований, в покоящейся мышце связывание тропонина I с актином ведет к перемещению тропомиозина на актиновом филаменте в то самое место, с которым в сокращающейся мышце контактируют миозиновые головки, и в результате взаимодействие актина с миозином подавляется. При повышении уровня Ca^{2+} тропонин C заставляет тропонин I «отцепиться» от актина, таким образом позволяя тропомиозину слегка изменить свое положение, и участок взаимодействия головок актина с миозином освобождается (рис. 11-19}.

11.1.13. Другие вспомогательные белки поддерживают архитектуру миофибрилл и обеспечивают их эластичность [10]

Удивительная сила и быстрота мышечного сокращения обусловлена тем, что в каждой миофибрилле актиновые и миозиновые филаменты находятся на оптимальном расстоянии друг от друга и в правильном расположении. Тонкую организацию миофибрилл обеспечивает группа

Таблица 11-1. Основные белковые компоненты миофибрилл скелетных мышц позвоночных[1)]

Белок	Доля общего белка, %	Мол. масса	Субъединицы, мол. масса	Функция
Миозин	44	510	2 x 223 {тяжелые цепи)	Главный компонент толстых филаментов. Взаимодействует с актиновыми филаментами, создавая механическое усилие за счет гидролиза ATP
Актин	22	42	-	Главный компонент тонких филаментов, по которым скользят толстые филаменты при мышечном сокращении
Тропомиозин	5	64	2 x 32	Стержневидный белок, который связывается с актиновыми филаментами по всей их длине
Тропонин	5	78	30 (Tn = T) 30 (Tn = I) 18 (Tn = C)	Комплекс из трех мышечных белков, расположен через равные интервалы на актиновых филаментах и участвует в регуляции мышечного сокращения ионами Ca^{2+}
Титин	9	~2500	-	Очень большой гибкий белок, образует эластичную цепь, соединяющую толстые филаменты с Z-дисками
Небулин	*3*	600	-	Удлиненный нерастяжимый белок, связанный с Z-диском и ориентированный параллельно актиновым филаментам
α-Актинин	1	190	2 x 95	Актин-связывающий белок, который соединяет актиновые филаменты в области Z-диска.
Миомезин	1	185	-	Миозин-связывающий белок, находящийся в области центральной M-линии толстых филаментов
C-белок	1	140	-	Миозин-связывающий белок; образует полосы по обе стороны от M-линии толстых филаментов.

[1)] Поперечно полосатые миофибриллы позвоночных содержат также не менее 20 других белков, не вошедших в эту таблицу.

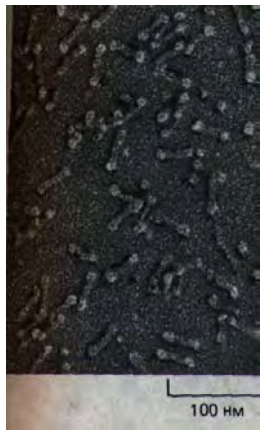


Рис. 11-20. Электронная микрофотография молекул очищенного α-актинина (любезно предоставлена J. Heuser.)

структурных белков, из которых больше дюжины уже идентифицировано (табл. 11-1), Локализация большинства этих белков в саркомере была выяснена иммуноцитохимическими методами (разд. 4.5.3).

Актиновые филаменты «заякорены» своими плюс-концами в Z-диске, где их удерживают в правильно организованной решетке другие белки. Из них лучше всего охарактеризован а-актинин - актин-связывающий белок, имеющийся в большинстве животных клеток. В мышечных клетках он находится в области Z-диска. Очищенный а-актинин - биполярная палочковидная молекула (рис. 11-20), которая может связывать актиновые филаменты в параллельные пучки. Аналогичную функцию в случае миозина может выполнять белок *миомезин,* который сшивает соседние миозиновые филаменты в области М-линии (посередине биполярного толстого филамента), собирая их в гексагональную упаковку. Стабилизирует упаковку миозиновых филаментов еще одна группа миозин-связывающих белков, выявляемых при окраске антителами как серия из 11 регулярно расположенных бледных полосок по обе стороны от М-линии.

В мышечных клетках есть также целая система очень плохо растворимых белковых филаментов, которые можно выделить лишь после полной экстракции миозина и актина из саркомера концентрированным раствором йодистого калия. Одна группа таких филаментов, построенных из очень крупного белка, названного *титином,* тянется параллельно толстым и тонким филаментам и соединяет толстые филаменты с Z-диском. Титиновые филаменты очень эластичны и, по-видимому, действуют как пружины, «центрируя» толстые филаменты между Z-дисками (рис. 11-21). Еще одна группа нерастворимых нитей - это промежуточные филаменты (разд. 11.5), которые расположены между Z-дисками соседних миофибрилл. Предполагается, что они удерживают саркомеры в определенных пространственных отношениях между собой и соединяют миофибриллы с плазматической мембраной мышечной клетки.

11.1.14. У позвоночных есть три основных типа мышц [11]

До сих пор мы рассматривали лишь один из трех главных типов мышц, имеющихся у позвоночных, а именно *скелетные мышцы.* Два других-это *сердечная мышца,* которая за среднее время жизни человека успевает совершить около трех миллиардов циклов сокращения и расслабления, и *гладкая мускулатура,* обеспечивающая более медленное и продолжительное сокращение, характерное для таких органов, как кишечник. Во всех трех типах мышечных клеток, а также в еще одном типе сократи-

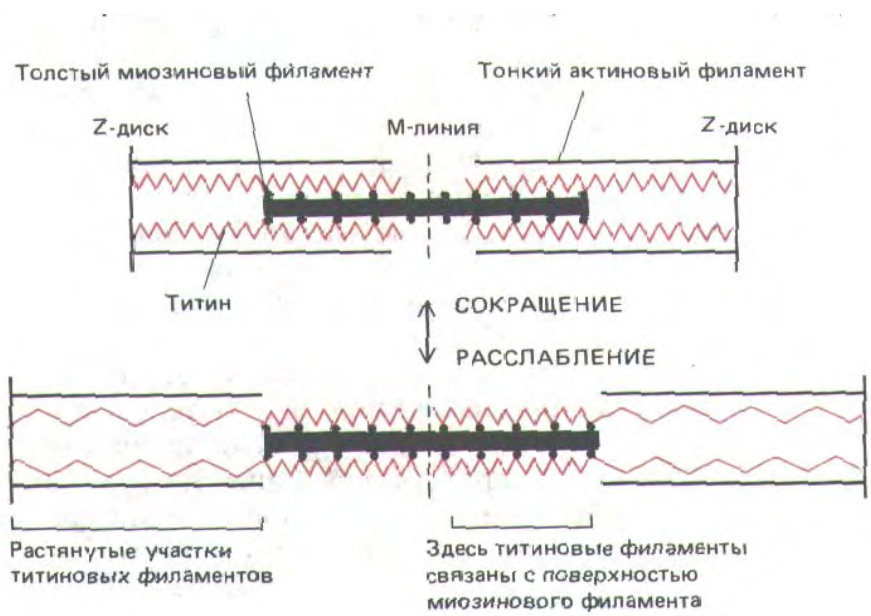


Рис. 11-21. Сеть из нитей титина, которые, как предполагается, соединяют в саркомерах скелетных мышц толстые миозиновые филаменты с Z-дисками. Эластичные титиновые нити, по-видимому, присоединены к толстым филаментам вдоль всей их поверхности, так что свободно изменять длину и обусловливать эластичность саркомера может только отрезок нити между концом толстого филамента и Z-диском. Такая упругая сеть удерживает толстые филаменты точно посередине между Z-дисками и позволяет мышцам растягиваться за пределы области перекрывания толстых и тонких филаментов без разрушения саркомера. Поперечные мостики между толстыми и тонкими филаментами для простоты не показаны. (По K. Wang, J. Wright, J. Cell Biol. 107: 2199-2212, 1988.)

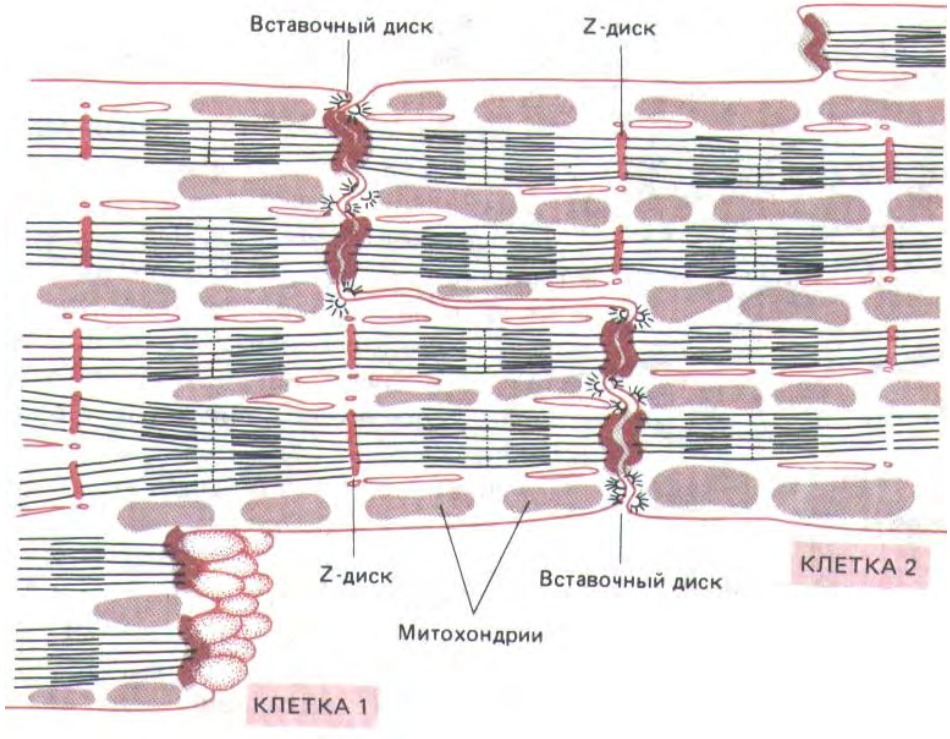


Рис. 11-22. Структура сердечной мышцы. Сердечная мышца состоит из множества отдельных клеток, каждая со своим ядром. Эти клетки соединены между собой с помощью специальных контактов, называемых вставочными дисками. В зоне каждого вставочного диска актиновые филаменты саркомеров соседних клеток входят в плотное вещество, связанное с плазматической мембраной, как если бы это был Z-диск. Таким образом, миофибриллы тянутся в мышце, игнорируя границы клеток.

мых клеток - *миоэпителиальных клетках* (см. разд. 17,6)-работает механизм скользящих нитей.

Подобно скелетным мышцам, сердечная мышца выглядит исчерченной (поперечнополосатой), что отражает весьма сходную организацию актиновых и миозиновых филаментов. Сокращение тоже запускается сходным механизмом: потенциал действия, достигнув Т-трубочек, вызывает выброс из саркоплазматического ретикулума Ca^{2+}, который с помощью тропонин-тропомиозинового комплекса стимулирует сокращение. Однако клетки сердечной мышцы не являются многоядерными и соединены между собой конец в конец специальными *вставочными дисками* (рис. 11-22). Вставочные диски выполняют по крайней мере три функции: 1) они соединяют при помощи десмосом (разд. 14.1.4) каждую клетку со следующей; 2) они связывают тонкие филаменты, входящие в состав миофибрилл соседних клеток (играя роль, аналогичную роли Z-дисков внутри клетки); 3) в них находятся щелевые контакты (разд. 14.1.5), через которые потенциал действия быстро распространяется от клетки к клетке, синхронизируя их сокращение.

Наиболее «примитивная» мышца - в том смысле, что она имеет наибольшее сходство с немышечными клетками - лишена исчерченности, откуда ее название **«гладкая»** мышца. Она образует сократимые структуры желудка, кишки, матки, стенок артерий, железистых протоков и многих других частей тела, где необходимо медленное и продолжительное сокращение. Гладкомышечная ткань состоит из слоев удлиненных веретенообразных клеток, в каждой из которых одно ядро. В клетках есть и толстые, и тонкие филаменты, но они не организованы в столь упорядоченные структуры, как в скелетной мускулатуре и в сердце (в частности, они не образуют отдельных миофибрилл). Филаменты сократительного аппарата гладкомышечных клеток распределены более диффузно, хотя в основном они вытянуты вдоль длинной оси клетки, соприкасаясь под косым углом с плазматической мембраной в дисковидных контактах, соединяющих группы клеток вместе.

Сократительный аппарат гладкой мускулатуры неспособен к такому быстрому сокращению, как миофибриллы поперечнополосатых мышц. Однако он имеет то преимущество, что допускает гораздо большую степень укорочения и может поэтому осуществлять значительные пере-

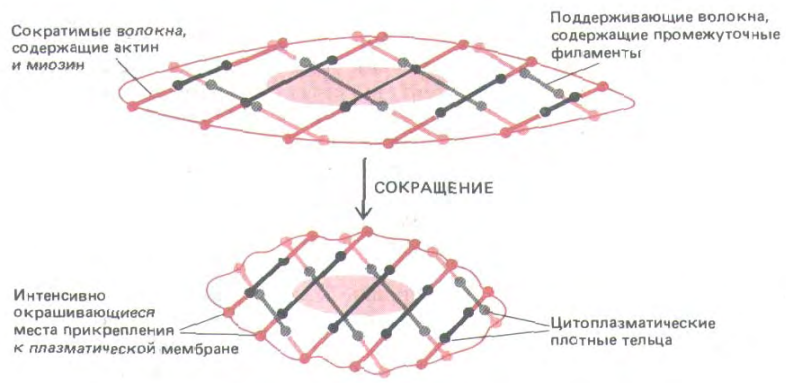


Рис. 11-23, Модель сократительного аппарата гладкомышечной клетки. На этой гипотетической схеме пучки сократительных филаментов, содержащих антин и миозин, присоединены одним концом к плазматической мембране, а другим концом - к несократимым пучкам промежуточных филаментов через цитоплазматические плотные тельца. Сократительные актомиозиновые пучки расположены с наклоном к длинной оси клетки (которая обычно гораздо сильнее вытянута, чем показано на схеме), и их сокращение намного укорачивает клетку. Показана только небольшая часть всех пучков.

мещения, несмотря на отсутствие такой системы рычагов, как кости. Благодаря какой организации актиновых филаментов и миозина это становится возможным, пока не ясно; одна из гипотетических моделей представлена на рис. 11-23.

11.1.15. И в гладкомышечных, и в немышечных клетках миозин активируется фосфорилированием его легких цепей [12]

Высокоспециализированные сократительные механизмы мышечных клеток, которые мы здесь рассмотрели, произошли от более простых силовых механизмов, имеющихся во всех эукариотических клетках. В связи с этим неудивительно то, что миозин немышечных клеток наиболее сходен с миозином гладких мышц - наименее специализированного типа мускулатуры. В клетках этого типа сокращение запускается повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле (так же как и в клетках сердечной и скелетных мышц), однако ионы Ca^{2+} действуют тут не через тропонин-тропомиозиновый комплекс. Инициация сокращения происходит главным образом за счет фосфорилирования одной из двух цепей молекулы миозина, что контролирует взаимодействие миозина с актином.

Две легкие цепи миозина, входящие в состав каждой миозиновой головки (см. рис. 11-9), неодинаковы, и при сокращении гладкомышечных и немышечных клеток фосфорилируется лишь одна из них. Когда она фосфорилирована, головка миозина может взаимодействовать с актиновым филаментом, что приводит к сокращению; при дефосфорилировании этой легкой цепи миозиновая головка стремится отделиться от актина, становясь тем самым неактивной. Это фосфорилирование катализируется специальным ферментом - *киназой легких цепей миозина,* которая становится активной, лишь связываясь с комплексом Ca^{2+}-кальмодулин (разд. 12.4.3). Таким образом, сокращение здесь тоже находится под контролем концентрации Ca^{2+} в цитозоле (рис. 11-24). Фосфорилирование происходит сравнительно медленно, так что максимальное сокращение развивается нередко за время порядка секунды (в поперечнополосатых мышцах - за несколько миллисекунд), но для гладкомышечных и немышечных клеток быстрая активация сокращения и не нужна.

Миозин этих клеток гидролизует АТР примерно в 10 раз медленнее, чем миозин скелетных мышц, что отражается, естественно, на скорости «шагания» его по актиновым филаментам и быстроте сокращения в целом. Однако не следует рассматривать гладкомышечные клетки как

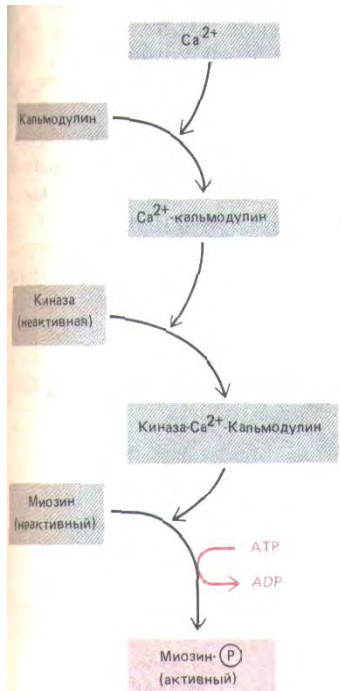


Рис. 11-24. Сокращение гладкой мышцы активируется в присутствии Ca^{2+} с помощью *киназы легких цепей миозина,* фосфорилирующей определенный участок одного из двух типов легких цепей в миозине. Регуляция немышечного миозина осуществляется таким же образом (см. рис. 11-25).

«плохой», медленно работающий вариант клеток скелетных мышц, пригодный на что-то только потому, что к этим клеткам предъявляется меньше требований. Они специально приспособлены для медленного продолжительного сокращения и способны поддерживать напряжение длительное время, гидролизуя при этом в 5-10 раз меньше АТР, чем требовалось бы для выполнения такой же задачи клеткам скелетных мышц. Кроме того, сокращение гладких мышц контролируется большим набором разнообразных сигналов, в том числе импульсами, приходящими от вегетативной нервной системы, и гормонами (например, адреналином). Многие из этих сигналов действуют через киназу легких цепей миозина. Так, во многих клетках адреналин, повышая уровень циклического АМР, вызывает фосфорилирование этой киназы, что резко уменьшает ее сродство к Ca^{2+}-кальмодулиновому комплексу; тем самым адреналин ингибирует фосфорилирование легких цепей миозина, заставляя гладкомышечную клетку расслабляться.

11.1.16. При фосфорилировании легких цепей немышечный миозив способен объединяться в филаменты [13]

Хотя миозин есть практически во всех эукариотических клетках, стабильные толстые филаменты он образует только в сердечной и скелетных мышцах. Молекулы миозина в немышечных клетках собраны в меньшие комплексы в зависимости от обстоятельств; размеры и местоположение этих сократительных систем определяются внутриклеточными сигналами. Важным фактором, регулирующим степень агрегации миозина, служит его фосфорилирование киназой легких цепей, которое влияет не только на АТРазную активность миозина, но также на его форму и способность к самосборке.

Если немышечный миозин дефосфорилировать путем обработки фосфатазой, он становится легко растворимым. Седиментационный анализ показал, что единичные молекулы растворимого миозина имеют компактную конфигурацию, и, судя по данным электронной микроскопии, каждый миозиновый хвост складывается с самим собой, цепляясь за «липкий участок» на головке. В этой свернутой конформации миозиновые молекулы не способны эффективно образовывать филаменты. Когда киназа легких цепей миозина фосфорилирует головки, они теряют «липкость», хвосты освобождаются, распрямляются и могут ассоциировать друг с другом, образуя биполярные миозиновые филаменты (рис. 11-25 и 11-26).

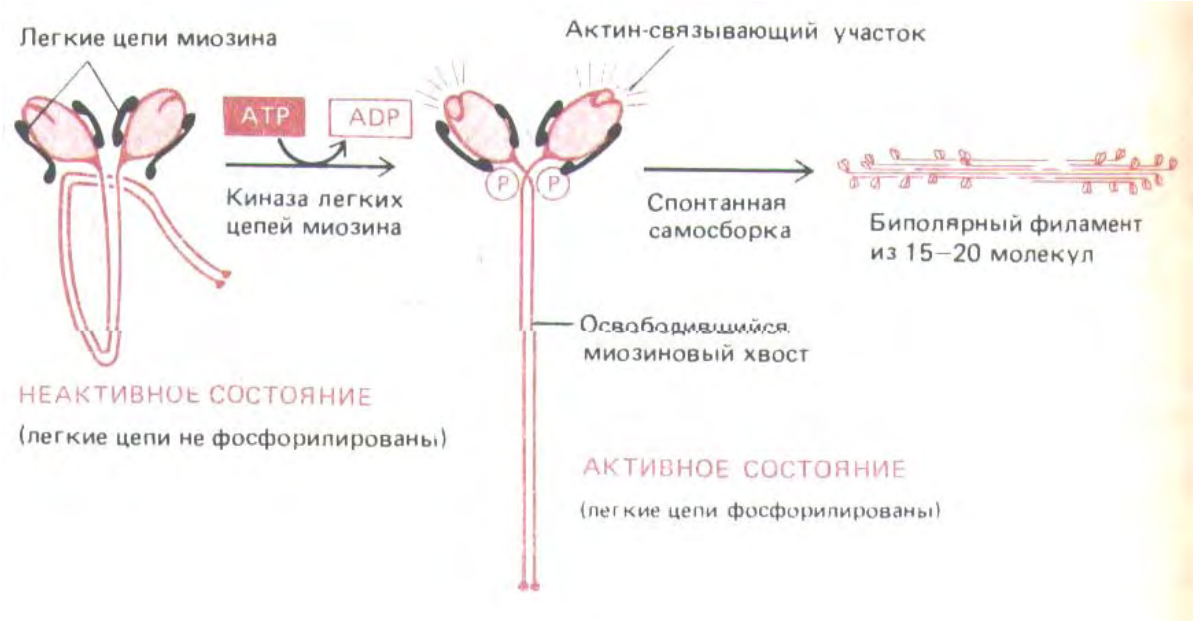


Рис. 11-25. Сборка филаментов немышечного миозина контролируется фосфорилированием его легких цепей. Фосфорилирование вызывает два эффекта: оно изменяет конформацию миозиновой головки таким образом, что на ней обнажается актин-связывающий участок, и высвобождает миозиновый хвост из «липкого кармана» на миозиновой головке, тем самым позволяя молекулам миозина объединяться в короткие биполярные филаменты. Точно так же ведет себя гладкомышечный миозин.

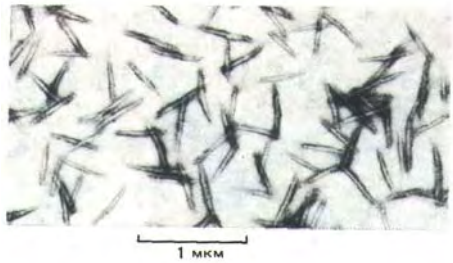


Рис. 11-26. Короткие филаменты немышечного миозина, образовавшиеся в результате фосфорилирования его легких цепей (электронная микрофотография, негативный контраст). (С любезного разрешения John Kendrick-Jones.)



Рис. 11-27. Примеры встречающихся в немышечных клетках сократительных пучков актиновых филаментов, в состав которых входит также миозин.

11.1.17. В немышечных клетках могут временно создаваться сократимые комплексы мышечного типа [14]

Для немышечных клеток контроль над сборкой и разборкой миозиновых комплексов имеет особое значение, так как в них сократительные структуры из актиновых филаментов и миозина нередко образуются лишь для выполнения какой-нибудь специальной функции, после чего снова разбираются. В частности, при делении клетки под ее мембраной появляется так называемое **сократимое кольцо - поясок** из актиновых филаментов и миозина. Именно за счет его сокращения посередине клетки образуется перетяжка, что ведет затем к разъединению двух дочерних клеток (рис. 11-27; см. также разд. 13.5.14). Поскольку сократительное кольцо не является постоянной клеточной структурой, оно должно формироваться в начале деления. Этот процесс можно наблюдать, окрашивая делящиеся клетки флуоресцентными антителами к миозину. Например, в готовых к делению яйцах морского ежа молекулы миозина вначале равномерно распределены под плазматической мембраной, а затем, по мере образования сократительного кольца, мигрируют в экваториальную область; распределение их снова становится дисперсным, когда деление клетки завершилось. Каким образом этот процесс контролируется - неизвестно.

Другой пример временно существующих сократимых структур - это так называемые **стрессовые волокна** (или нити), характерные элементы цитоскелета культивируемых фибробластов (см. рис. 11-27). И по своей структуре, и по функциям они напоминают тонкие миофибриллы (рис. 11-28). Одним концом эти волокна связаны с плазматической мембраной в особых участках, называемых *фокальными контактами* (см. разд. 11.2.8), и похожи по составу и ультраструктуре на участки присоединения к плазматической мембране актиновых филаментов в клетках гладких мышц (см. рис. 11-23). Другим концом они связаны либо с густой сетью промежуточных филаментов, окружающей ядро клетки (см. рис. 9-1), либо с другим фокальным контактом. Стрессовые волокна образуются при механическом растяжении клетки (например, когда она распластывается по субстрату) и исчезают во время митоза, когда клетка округляется и теряет связь с субстратом. Если ликвидировать натяжение, «оторвав» лазерным лучом один конец стрессового волокна от фокального контакта, оторванное волокно тоже быстро исчезнет. Стрессовые волокна фибробластов, находящихся в тканях, судя по всему, способны сокращаться, передавая создаваемое усилие на окружающий коллагеновый матрикс; этот процесс играет большую роль в заживлении ран и в морфогенезе.

Некоторые сократительные структуры на основе актиновых фила-

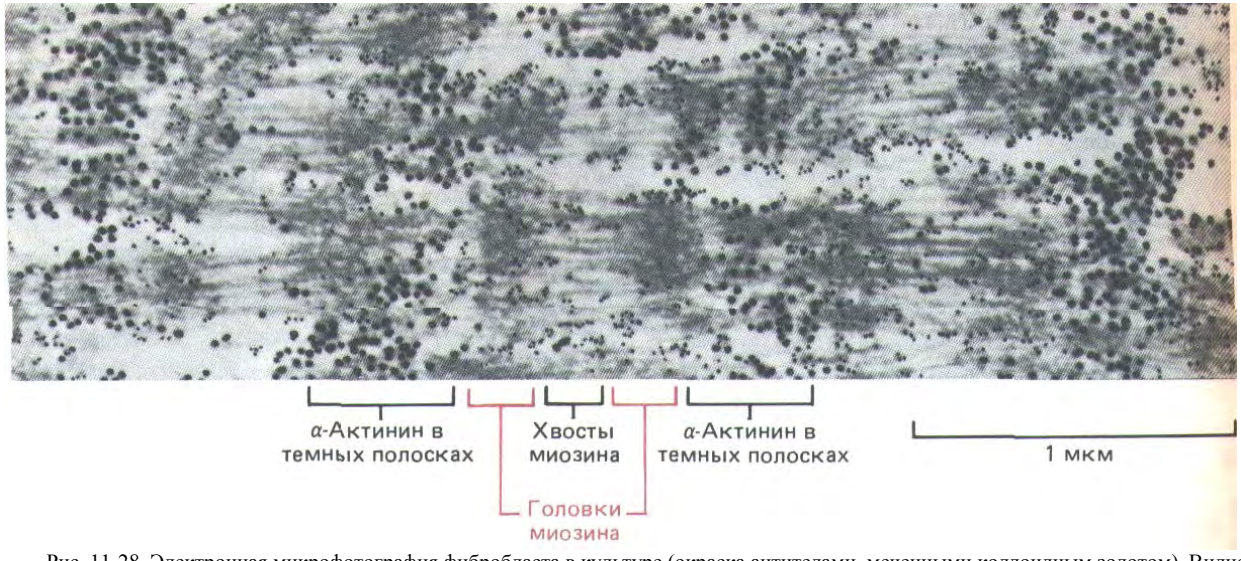


Рис. 11-28. Электронная микрофотография фибробласта в культуре (окраска антителами, меченными коллоидным золотом). Видно, что организация белков в стрессовых волокнах напоминает мышечную. Показано расположение двух типов актин-связывающих белков: α-актинин (крупные частицы золота) ассоциирован с периодически повторяющимися плотными участками в стрессовых волокнах (в поперечнополосатой мышце α -актинин находится в Z-дисках), тогда как головки миозина (мелкие частицы золота) видны по обе стороны от полос с а-актинином. Такая организация имеет некоторое сходство с саркомером (сравните с рис. 11-2) и указывает на то, что молекулы миозина здесь собраны в филаменты. (Фото любезно предоставлено M. de Brabander, J. de Mey, G. Langanger.)

ментов оказываются более долгоживущими. Таковы, например, кольце вые пучки актиновых филаментов в *опоясывающих десмосомах,* расположенных вблизи апикальной поверхности клеток эпителия (разд. 14.1.3). Среди прочих функций, эти пучки, видимо, играют важную роль в изгибании эпителиальных пластов в ходе эмбриогенеза (разд. 11.6.9).

11.1.18. Мышечные белки кодируются генами, составляющими мультигенные семейства [15]

Как мы видели, в мышечных клетках всех трех типов, а также в немышечных клетках сократительный аппарат имеет много общих черт, Различные типы сокращения, свойственные разным клеткам, отчасти определяются тканеспецифичностью экспрессии генов, кодирующих белки этого аппарата. У млекопитающих, например, имеются по меньшей мере шесть генов актина, шесть генов тяжелой цепи миозина, три тропомиозиновых гена и три гена тропонина Т. В некоторых случаях кодируемые разными генами белки несколько различаются по функции в других же случаях функциональных различий пока не обнаружено.

Из шести вариантов актина, экспрессируемых у млекопитающих один содержится только в скелетных мышцах, другой - в сердечной мышце, а еще два - только в гладкомышечных клетках (первый из них - в гладкой мускулатуре сосудов, а второй в мускулатуре других органов); и наконец, два последних варианта, известные как немышечные, или цитоплазматические, актины, являются, по-видимому, универсальными компонентами цитоскелета и в значительных количествах присутствуют в большинстве немышечных клеток. Все эти виды, или изоформы, актина очень сходны по аминокислотным последовательностям; например, мышечные актины отличаются от цитоплазматических менее чем по 7% аминокислот. Если не считать некоторых различий в N-концевой части молекулы, возможно, влияющих на процесс полимеризации актина, не ясно, имеют ли такие различия какое-либо функциональное значение, Экспрессия гена «сердечного» актина в культивируемых фибробластах не изменяет ни форму, ни поведение клеток, и синтезируемый белок легко включается в их нормальные актиновые структуры. Напротив, различия между миозинами влияют и на скорость сокращения, и на его регуляцию, а также на степень ассоциации молекул миозина в клетке.

11.1.19. Разнообразие мышечных белков увеличивается за счет альтернативных способов сплайсинга их мРНК [16]

Все сказанное выше о различных типах мышц дает лишь частичное представление об их реально существующем разнообразии. В скелетных мышцах взрослого человека, например, мы находим смесь мышечных клеток трех типов: *белые* мышечные клетки, приспособленные для быстрого анаэробного сокращения (АТР синтезируется в них в основном за счет гликолиза); *красные* мышечные клетки, специализированные для медленного и более продолжительного сокращения и использующие главным образом аэробный метаболизм (их цвет обусловлен высокой концентрацией запасающего кислород белка - миоглобина); и наконец, мышечные клетки *промежуточного* типа, синтезирующие АТР как аэробным, так и анаэробным путем (разд. 2.3.2). В каждом из этих типов есть еще подтипы, с помощью которых происходит «тонкая настройка» каждой мышцы на выполнение характерных для нее физиологических функций и на соответствующий метаболизм. При этом одни и те же мышцы у взрослого человека и у плода различны.

Белковый состав каждого из этих типов мышц имеет свои особенности. Очень важным источником разнообразия служит тканеспецифическая регуляция сплайсинга пре-мРНК, позволяющая комбинировать различные наборы экзонов, так что продуктами одного гена могут быть несколько слегка различающихся молекул мРНК (разд. 10.4.2). Характер сплайсинга пре-мРНК может изменяться под действием гормональных, нервных и иных факторов, и в результате изменяются аминокислотные последовательности определенных мышечных белков в зависимости от ткани и стадии онтогенеза. Например, ген тропонина Т, который экспрессируется в скелетных мышцах, благодаря альтернативному сплайсингу РНК дает по меньшей мере 10 различных форм белка. Эти варианты, вероятно, по-разному взаимодействуют с тропонином С и тропомиозином, модифицируя таким образом регуляцию мышечного сокращения.

Заключение

Сокращение мышц происходит в результате скольжения актиновых филаментов вдоль миозиновых. Головки молекул миозина, выступающие по бокам миозиновых филаментов, осуществляют АТР-зависимый цикл, в котором присоединяются к соседним актиновым филаментам, изменяют свою конформацию таким образом, что заставляют актиновые и миозиновые филаменты смещаться относительно друг друга, а затем снова отделяются от нитей актина. Эффективной работе этого цикла способствуют специальные вспомогательные белки, которые поддерживают пространственную организацию актиновых и миозиновых филаментов в виде параллельных, частично перекрывающихся пучков с правильной взаимной ориентацией и оптимальным расстоянием между ними. Еще два вспомогательных белка-тропонин и тропомиозин-обеспечивают регуляцию сокращения скелетных и сердечной мышц ионами Ca^{2+}.

Актин и миозин присутствуют также и в гладких мышцах, и в большинстве немышечных клеток. Сокращение в них осуществляется по тому же принципу, что и в сердечной и скелетных мышцах, но элементарные сократимые блоки здесь мельче и не обладают столь высокой степенью упорядоченности; кроме того, их активность и степень ассоциации находятся под контролем Ca^{2+} *-зависимого фосфорилирования одной из легких цепей миозина.*

Сократительный аппарат мышечных и немышечных клеток точно настроен на выполнение специфических функций в зависимости от типа

клеток. Это определяется тканеспецифическоп экспрессией различных генов, кодирующих мышечные белки, и тканеспецифической же регуляцией сплайсинга мРНК, благодаря которой один ген может давать слегка различающиеся варианты белков.

11.2. Актиновые **филаменты и клеточный кортекс [17]**

Во многих эукариотических клетках актин содержится в больших количествах, составляя нередко до 5% и более от общего белка клетки. Хотя он распределен по всей цитоплазме, в большинстве животных клеток существует особенно густая сеть из актиновых филаментов и ассоциированных с ними белков под самой плазматической мембраной. Эта сеть образует **клеточный кортекс,** который придает механическую прочность поверхностному слою клетки и позволяет клетке изменять свою форму и двигаться. Структура кортекса может быть различной у разных клеток и даже в разных участках одной и той же клетки. Иногда это плотная трехмерная сеть из поперечносшитых актиновых филаментов, в которую не могут проникать органеллы и другие крупные частицы из прилежащих слоев цитоплазмы (рис. 11-29); в других случаях кортекс заметно тоньше и больше похож на двумерную структуру. В одни участках животных клеток небольшие пучки актиновых филаментов, отходящие от наружной стороны кортекса, заполняют выступы клеточной поверхности, тогда как в других актиновые филаменты втягивают мембрану внутрь. Плазматическая мембрана настолько тесно связана с кортикальным актиновым слоем, что для некоторых целей лучше считать их единым функциональным образованием.

В большинстве животных клеток примерно половина всех молекул актина находится в неполимеризованной форме - в виде свободных мономеров или небольших комплексов с другими белками. Между этим пулом актина и актиновыми филаментами существует динамическое равновесие, что помогает осуществлять движения клеточной поверхности. В этом разделе мы расскажем о том, как актин-связывающие белки регулируют сборку актиновых филаментов, соединяют их в пучки или сети и определяют их расположение, длину и другие свойства.

11.2.1. Актин-связывающие белки «сшивают» актиновые филаменты в обширные сети [18]

Актиновые филаменты часто связаны между собой в жесткие трехмерные сети с помощью специальных сшивающих белков. Наиболее

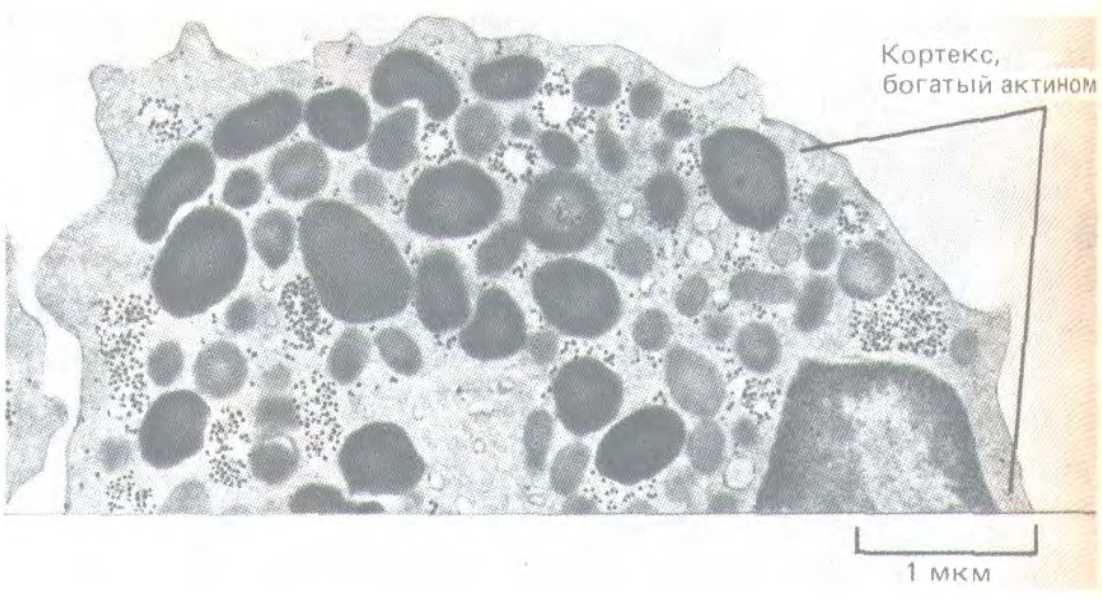


Рис. 11-29. Актиновый кортекс на электронной микрофотографии тонкого среза лейкоцита. Хотя цитоплазму заполняют гранулы различного типа, в тонкий слой под самой плазматической мембраной (кортекс) они не попадают. Кортекс содержит сеть актиновых филаментов и связанных с ними белков, определяющих движения клеточной поверхности. (С любезного разрешения Dorothy Bainton.)

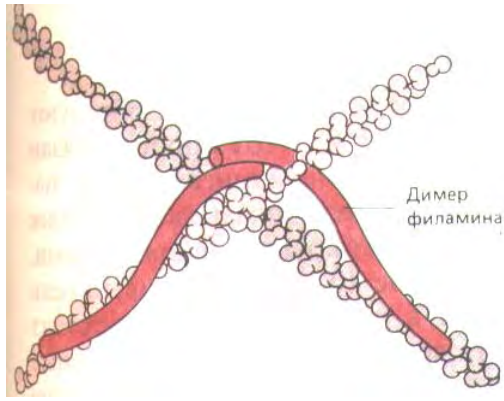


Рис. 11-30. Образуя гибкие сшивки между соседними актиновыми нитями, филамин создает из них трехмерную сеть, обладающую механическими свойствами геля. Каждый димер филамина, если его полностью выпрямить, имеет длину Около 160 нм.

распространенный из них **- филамин;** его длинная гибкая молекула состоит из двух одинаковых полипептидных цепей, соединенных «голова к голове», а участки связывания актиновых филаментов находятся на «хвостовых» концах (рис. 11-30). Во многих клетках белки такого типа составляют почти 1 % всего белка (примерно 1 димер на 50 мономеров актина).

Гели, образуемые in vitro актиновыми филаментами и сшивающими белками, обладают любопытными механическими свойствами: они сохраняют свою форму, если к ним приложить резкое короткое усилие, но легко деформируются под действием более слабой постоянной силы. Предполагаемый молекулярный механизм, лежащий в основе такого поведения, характерного и для кортикальной цитоплазмы, показан на рис. 11-31. По-видимому, именно такие актиновые сети позволяют клетке легко восстанавливать свою фирму за счет упругости после мелких толчков, но в то же время подвергаться значительным деформациям при длительном воздействии слабых сил.

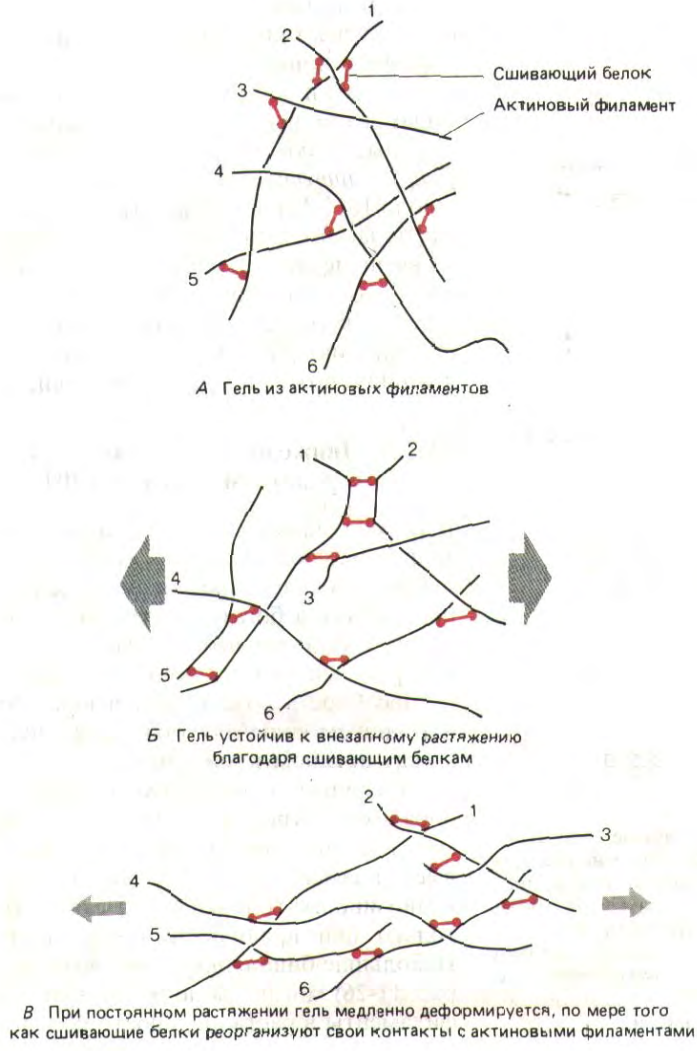


Рис. 11-31. Механические свойства геля из актиновых филаментов, образованного с помощью белков, сшивающих актин. Гель противостоит резким деформациям (Б), так как сшивающие белки не успевают отделиться от актиновых филаментов. Сопротивление медленным деформациям гораздо слабее: сшивающим белкам хватает времени, чтобы диссоциировать и вновь связаться с актиновыми филаментами в других положениях. (По M. Sato, W.H. Schwartz, T.D. Pollard, Nature 325: 828-830, 1987.)

11.2.2. Гельзолин, активированный ионами Ca^{2+}, вызывает фрагментацию актиновых филаментов [19]

Экстракты, полученные из животных клеток многих типов, образуют гель, если к ним добавить АТР и прогреть до 37 °С. Этот процесс связан со взаимодействием актиновых филаментов и сшивающего белка, например филамина, однако поведение такого геля оказывается более сложным, чем у простой смеси филамина с актиновыми филаментами. Так, при увеличении концентрации Ca^{2+} выше 10^{-7} М актиновый гель начинает разжижаться. Под микроскопом в участках, где происходит такой переход геля в золь, можно увидеть весьма энергичные локальные «течения». Очевидно, в экстрактах помимо актиновых филаментов и филамина должны присутствовать еще какие-то компоненты, благодаря которым ионы Ca^{2+} вызывают превращение геля в золь и движение жидкости. Вероятно, именно эти компоненты ответственны за *течение цитоплазмы,* наблюдаемое в некоторых крупных клетках, где оно необходимо для равномерного распределения метаболитов и других веществ. Эти внутриклеточные движения связаны, по-видимому, с быстрыми локальными изменениями в консистенции цитоплазмы - переходами гель/золь.

Из клеточных экстрактов удалось выделить несколько белков, которые разжижают актиновый гель в присутствии Ca^{2+}. Из них лучше всего изучен **гельзолин** - компактный белок с мол. массой около 90 000. Связывая ионы Ca^{2+}, гельзолин активируется, разрывает актиновые филаменты и образует «шапки» на появляющихся при этом плюс-концах филаментов, что ведет к разрушению сети из сшитых актиновых нитей. Сходные белки содержатся в кортексе многих клеток позвоночных. *фрагмонтирующие белки* активируются при таких концентрациях Ca^{2+} (около 10^{-6} М), которые создаются в цитозоле лишь на короткое время; как полагают, они служат посредниками в реакциях клеточного кортекса на внешние сигналы. Например, когда фагоцитирующий лейкоцит вступает в контакт с микроорганизмом, сеть актиновых филаментов в этом участке кортекса распадается, что позволяет поверхностному слою цитоплазмы окружить и поглотить микробную клетку. К механизмам, лежащим в основе таких движений, мы вернемся несколько позже.

11.2.3. Движение цитоплазмы может осуществляться с участием миозина [20]

В искусственных смесях из актиновых филаментов, филамина и гельзолина наблюдаются Ca^{2+}-зависимые переходы геля в золь и обратно, однако к сокращению эти смеси не способны и в них не возникают такие потоки, как в богатых актином гелях, получаемых из клеток. Судя по всему, для этого необходим *миозин:* неочищенные актиновые гели, из которых миозин избирательно экстрагирован, теряют сократимосгь и способность создавать течения. Поэтому можно предполагать, что источником силы для таких движений служит какое-то взаимодействие между актином и миозином.

Поскольку в исходном экстракте актиновые филаменты, видимо, образуют неупорядоченную трехмерную сеть, возникает вопрос: как могут актин и миозин производить согласованные движения? Актиновые филаменты, как мы знаем, обладают отчетливой полярностью, и миозиновые головки могут связываться с ними и скользить вдоль них только при правильной ориентации относительно этой полярности, Небольшие биполярные комплексы молекул немышечного миозина (см. рис. 11-26) могли бы до некоторой степени «упорядочивать» актиновые филаменты в растворе, просто подтягивая одну их группу относительно

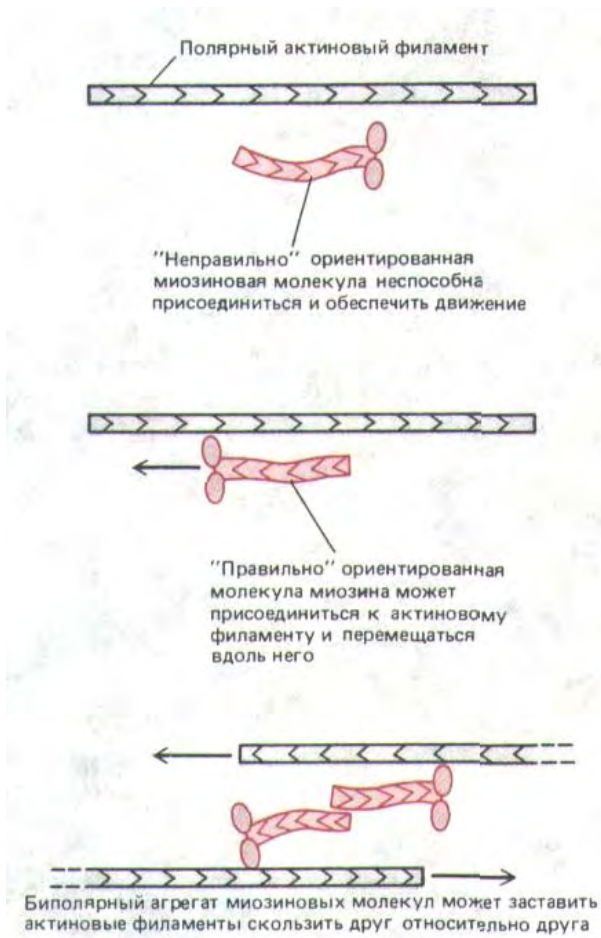


Рис. 11-32. Биполярные агрегаты молекул немышечного миозина (см. рис. 11-26) вызывают скольжение двух актиновых филаментов противоположной полярности (как и в мышце). Этим способом миозин может вызывать сокращение даже в сети из случайно ориентированных актиновых нитей.

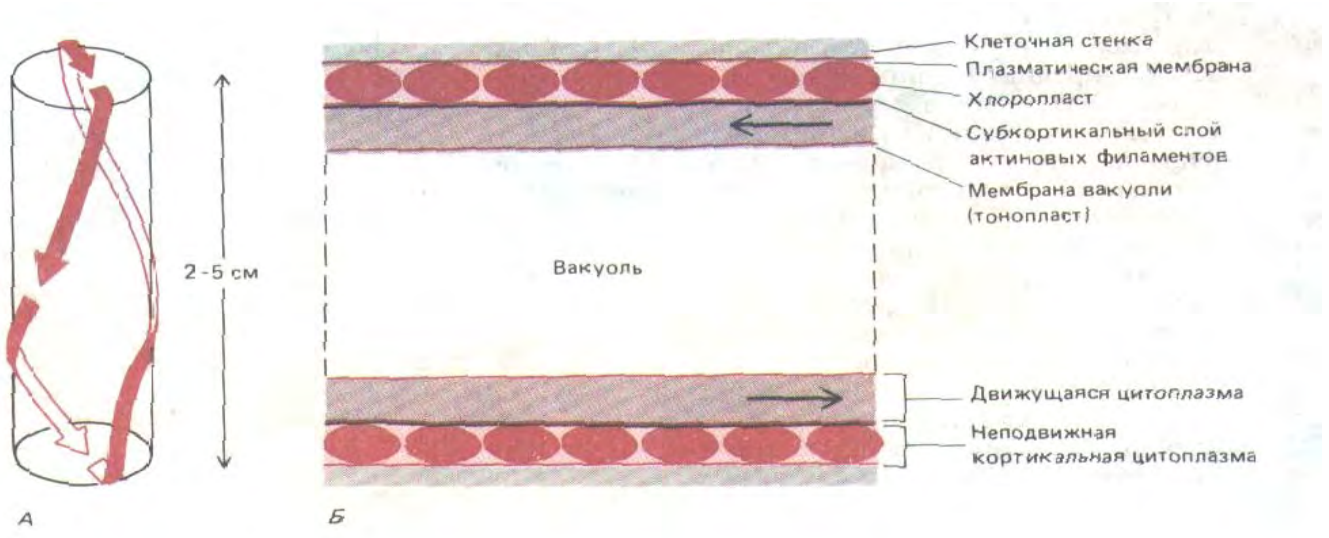
другой, даже если эти миозиновые комплексы и актиновые филаменты вначале не были хорошо ориентированы (рис. 11-32).

11.2.4. Цитоплазм этические потоки в гигантских клетках водорослей создаются при участии актина и миозина [21]

Растительные клетки могут достигать гораздо больших размеров, чем животные клетки, так как они обладают жесткой клеточной стенкой и содержат обширную центральную вакуоль (см. гл. 20, разд. 20.4.9). Диффузия при таких расстояниях недостаточно эффективна, поэтому очень крупным клеткам для перемешивания цитоплазмы нужны мощные цитоплазматические потоки. Гигантские многоядерные клетки зеленых водорослей *Chara* и *Nitella* достигают в длину *2-5* см, и белковой молекуле потребовались бы недели для диффузии от одного конца клетки до другого. Неудивительно, что у таких организмов мы находим самые яркие примеры цитоплазматических потоков. Непрерывный узкий поток цитоплазмы движется вдоль клетки в виде бесконечной спиральной ленты, обходя огромную центральную вакуоль (рис. 11-33, А). Этот поток увлекает с собой внутренние мембранные структуры, митохондрии и ядра со скоростью до 75 мкм/с.

Система, создающая потоки в таких клетках, находится между движущимся слоем цитоплазмы и неподвижным монослоем хлоропластов, лежащих под самой плазматической мембраной (рис. 11-33, Б), На электронных микрофотографиях в этой промежуточной области видны большие пучки актиновых филаментов с одинаковой полярностью. Эта полярность такова, что направленное движение вдоль них молекул миозина (от минус-конца к плюс-концу) совпадает с направлением наблюдаемых потоков цитоплазмы. Более того, можно «вскрыть» гигантскую клетку *Nitella* так, чтобы обнажились актиновые пучки на поверхности слоя хлоропластов; если теперь добавить к препарату шарики латекса, покрытые миозином, то эти шарики в присутствии АТР будут двигаться по актиновой сети, причем движение их окажется очень похожим на перемещение органелл в интактной клетке. Таким образом, весьма вероятно, что цитоплазматические потоки создаются в клетке при участии миозина.

Для такого движения цитоплазмы, как у *Nitella,* биполярные миозиновые филаменты не нужны - ведь здесь происходит не сокращение, а непрерывное однонаправленное перемещение. Помимо немышечного миозина, организованного в филаменты (см. рис. 11-26), многие клетки содержат относительно небольшие молекулы так называемых *мини-миозинов.* Эти молекулы впервые были экстрагированы из крупных амеб



Рис, 11-33. Схема токов цитоплазмы в гигантской клетке водоросли *Nitella. А.* Путь движения цитоплазмы в цилиндрической клетке. Для простоты диаметр клетки относительно ее длины преувеличен. *Б.* Продольный разрез участка такой клетки; показана организация неподвижных и движущихся слоев цитоплазмы. В неподвижном кортикальном слое лежат хлоропласты, которые связаны с подлежащими пучками актиновых филаментов; под этими пучками расположен движущийся слой цитоплазмы, в нем находятся ядра, митохондрии к другие органеллы. На самом деле относительные размеры вакуоли гораздо больше, чем на рисунке.

(Acanthamoeba); они состоят из единственной глобулярной головки с которой гибким хвостом, который, вместо того чтобы образовать спираль с таким же хвостом другой молекулы, связывается с мембранами-непосредственно или через другой белок. Очищенные мини-миозины in vitro присоединяются к мембранным органеллам и могут перемещать их вдоль ориентированных пучков актиновых филаментов, По-видимому, именно так осуществляется активный транспорт многих органелл в клетках.

11.2.5. Организация кортекса определяется взаимодействием актиновых филаментов с плазматической мембраной

До сих пор мы обходили вопрос, который является основным для понимания структуры и функций актинового кортекса: какова природа связи актиновых филаментов с плазматической мембраной? Полагают, что находящиеся в мембране специальные белки служат центрами организации для актиновой сети. Силы, возникающие в кортикальном слое актиновых нитей и ответственные за движения клеточной поверхности, должны передаваться на мембрану именно через эти или другие мембранные белки. О том, каковы эти белки и как они взаимодействуют с актином, мало что известно. Очевидно, однако, что есть по крайней мере три функциональных типа присоединения актина к плазматической мембране: первый главным образом придает мембране прочность и определяет ее форму; второй дает возможность актиновым филаментам втягивать участки мембраны внутрь; и наконец, третий тип-тот, при котором актиновые филаменты вызывают быстрое выпячивание участков мембраны наружу. Рассмотрим по порядку каждый из этих типов.

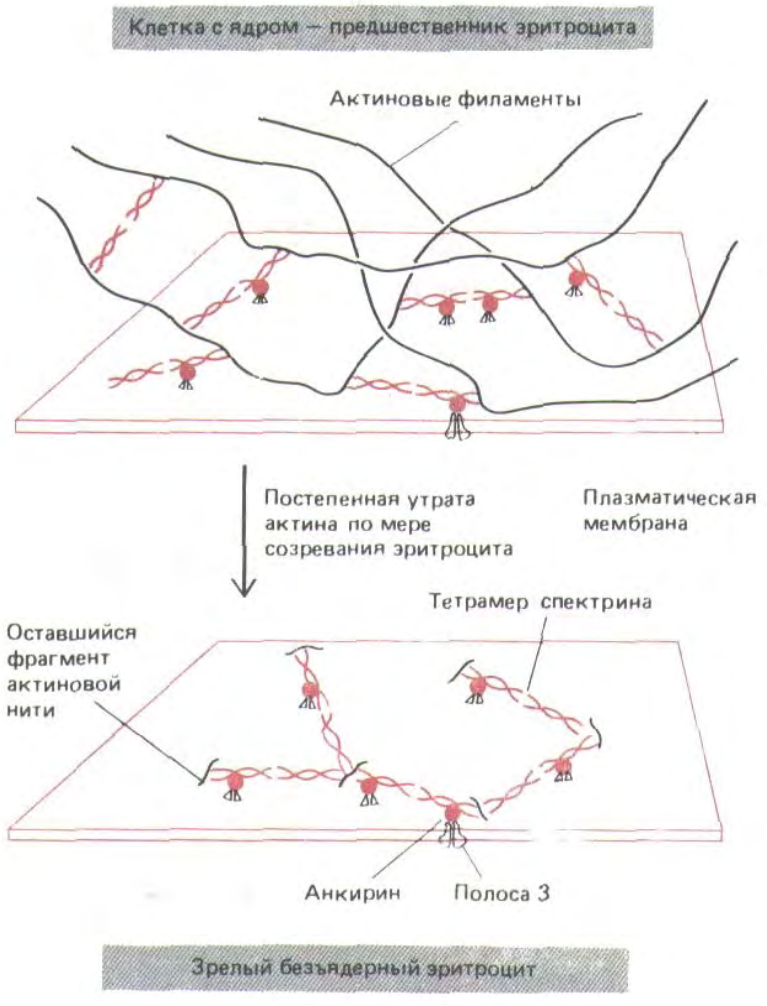


Рис. 11-34. Эта гипотетическая схема показывает, как цитоскелет, подстилающий мембрану эритроцитов у млекопитающих, мог бы получиться из более обычного кортекса с преобладанием актина. Клетка-предшественник с ядром имеет связанный с мембраной кортекс, состоящий из актиновых филаментов, удерживаемых вместе тетрамерами спектрина и другими сшивающими белками. Когда эта клетка созревает и превращается в эритроцит, большая часть ее актина теряется. В результате актиновые филаменты деполимеризуются и сшивающие белки в основном отделяются от них - остается лишь тонкая двумерная сеть из спектрина и коротких «отрезков» актиновых филаментов, связанных с плазматической мембраной.

11.2.6. Цитоскелетные сети, связанные с мембраной, создают для нее механический «каркас» [22]

В гл. 6 (разд. 6.2.4) мы уже говорили о **спектрине** и **анкирине** - белках, которые впервые были открыты в эритроцитах млекопитающих как важнейшие компоненты цитоскелета, связанного с мембраной. В зрелых эритроцитах млекопитающих ядро и внутренние мембраны утрачены, так что из всех мембран остается только плазматическая. Ее поддерживает двумерная сеть из тетрамеров спектрина, концы которых соединены с помощью очень коротких актиновых филаментов; через анкириновые мостики эти тетрамеры связаны с трансмембранным белком полосы 3 (см. рис. 6-26). Белки, очень сходные и со спектрином, и с анкирином, имеются в кортексе многих клеток позвоночных. Было высказано предположение, что необычайно тонкая (всего около 20 нм) цитоскелетная сеть, лежащая под плазматической мембраной зрелого эритроцита, образуется из более толстого кортекса клетки-предшественницы, обладающей ядром, в результате постепенной деполимеризации актиновых филаментов (рис. 11-34). В этом случае пространственную организацию белков кортекса в эритроците можно было бы рассматривать как модель цитоскелетных сетей на актиновой основе, которые служат опорой для плазматической мембраны во всех других животных клетках.

11-10

11.2.7. Микроворсинки - пример того, как пучки поперечносшитых актиновых филаментов могут стабилизировать локальные выпячивания плазматической мембраны [23]

Микроворсинки - это пальцевидные выступы плазматической мембраны на поверхности многих животных клеток. Микроворсинок особенно много у тех эпителиальных клеток, которым для эффективного выполнения их функций необходима большая поверхность. Например, в тонкой кишке человека одна такая клетка несет на своей апикальной поверхности несколько тысяч микроворсинок. Каждая микроворсинка имеет длину около 1 мкм и ширину около 0,08 мкм; в результате всасывающая поверхность клетки оказывается в 20 раз больше, чем если бы она была гладкой. Высокоспециализированная плазматическая мембрана микроворсинок покрыта снаружи плотным слоем из полисаха-ридов и пищеварительных ферментов.

Внутри каждой кишечной микроворсинки находится жесткий пучок из 20-30 параллельных актиновых филаментов, тянущихся от ее верхушки к основанию, где они погружены в клеточный кортекс. Все филаменты в пучке ориентированы плюс-концами наружу (от клетки) и удерживаются вместе на одинаковых расстояниях друг от друга несколькими *актин-связывающими белками,* в частности *фимбрином* и *фасцином* (рис. 11-35). В отличие от филамина и других сшивающих актиновые филаменты белков, молекулы которых гибки и объединяют филаменты в рыхлую сеть, эти актин-связывающие .белки относительно невелики и компактны, причем полипептидная цепь такого белка образует два

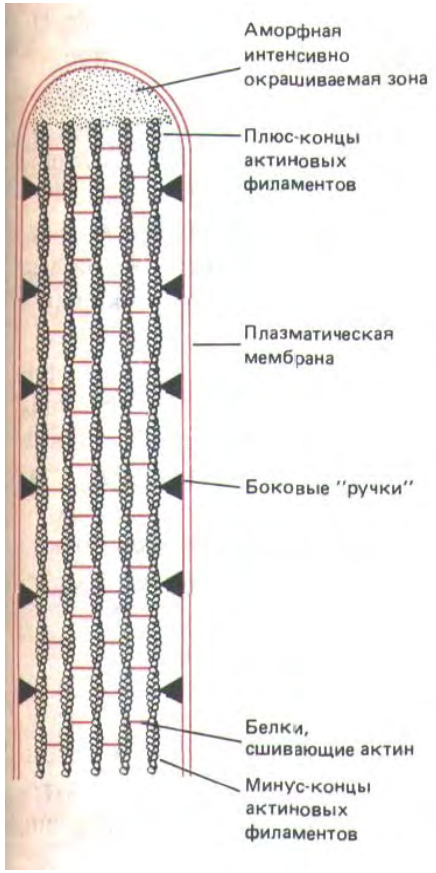


Рис. 11-35. Сердцевину микроворсинки образует пучок параллельных актиновых филаментов, удерживаемый белками, сшивающими актин. Поверхность этого пучка соединена с окружающей его плазматической мембраной боковыми «ручками». Плюс-концы всех актиновых филаментов находятся в кончике микроворсинки, где они погружены в аморфный интенсивно окрашиваемый материал неизвестного состава.

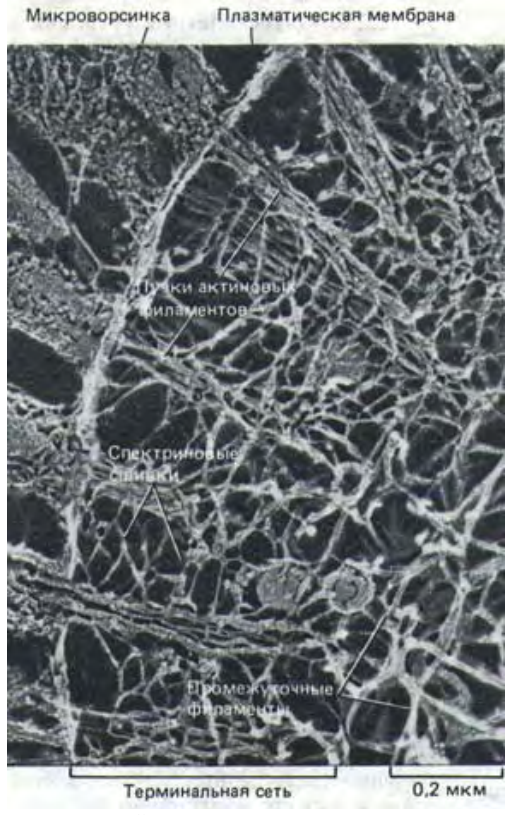


Рис. 11-36. Эпителиальная клетка кишечника, в которой видна терминальная сеть, лежащая под апикальной плазматической мембраной (электронная микрофотография, метод замораживания-травления). Пучки актиновых филаментов, образующих сердцевину микроворсинок, продолжаются в терминальную сеть, где они соединены главным образом спектрином. Под терминальной сетью находится слой промежуточных филаментов. (N. Hirokawa, J. E. Heuser, J. Cell Biol. 91: 399-409, 1981. С разрешения Rockefeller University Press.)

раздельных участка для связывания актина. Поэтому актиновые филаменты оказываются объединенными в плотные пучки, где они прочно удерживаются параллельно друг другу на расстоянии около 10 нм.

Нижний конец актинового пучка микроворсинки заякорен в специализированном кортексе апикальной части клетки. Этот кортекс. называемый *терминальной сетью,* содержит густое сплетение из молекул спектрина, лежащее поверх слоя промежуточных филаментов (рис. И-36); по-видимому, именно терминальная сеть фиксирует актиновые пучки, а тем самым и микроворсинки, под прямым углом к апикальной поверхности клетки.

Каким образом пучок актиновых филаментов микроворсинки присоединен к одевающей его плазматической мембране? Электронная микроскопия выявляет два различных типа такого соединения: по всей длине пучка, подобно ступенькам винтовой лестницы, расположены контактирующие с мембраной боковые отростки, а на верхушке микроворсинки плюс-концы актиновых филаментов соединены с мембраной через «шапочку» из бесструктурного, интенсивно окрашиваемого вещества (см. рис. 11-35).

Если плазматическую мембрану эпителиальной клетки кишечника растворить с помощью неионного детергента, боковые отростки актиновых пучков останутся связанными с обнажившимся цитоскелетом. Однако их можно отделить, добавив к такому препарату АТР, и оказалось, что каждый отросток состоит из молекулы мини-миозина, к которой прочно присоединен кальций-связывающий белок кальмодулин.

Своим АТР-зависимым головным участком мини-миозин связывается с актиновыми филаментами срединного пучка микроворсинки, а коротким хвостовым участком-с плазматической мембраной. Почему для образования такой связи используется «двигательный» белок, неизвестно; но, поскольку молекулы миозина движутся по актиновым филаментам в направлении к плюс-концу, следует ожидать, что в микроворсинке они должны тянуть компоненты мембраны к ее верхушке. Возможно, что такой механизм способствует непрерывному слущиванию плазматической мембраны с конца микроворсинки в просвет кишки, где связанные с мембраной пищеварительные ферменты продолжают свое действие.

О природе аморфной «шапочки» на кончике микроворсинки известно еще меньше. Как мы увидим, есть основания подозревать, что находящиеся в этой области белки контролируют толщину и длину пучка актиновых филаментов, определяя тем самым размеры микроворсинки (разд. 11.6.10). Если это так, то взаимодействие актиновых филаментов с плазматической мембраной микроворсинки на ее верхушке должно быть весьма сложным.

11.2.8. Благодаря фокальным контактам актиновые филаменты могут создавать тянущую силу, приложенную к субстрату [24]

Пучки актиновых филаментов часто присоединяются к плазматической мембране способом, который позволяет им передавать тянущее усилие на субстрат - будь то внеклеточный матрикс или другая клетка. Мы уже упоминали о таких способах прикрепления пучков актиновых филаментов у фибробластов и гладкомышечных клеток (разд. 11.14 и 11.17). В подобном соединении конца пучка с плазматической мембраной

участвуют трансмембранные линкерные гликопротеины. Лучше всего изучены места прикрепления культивируемых фибробластов к внеклеточному матриксу. Когда фибробласты растут в культуральной чашке, большая часть их обращенной к субстрату поверхности отделена от него промежутком более 50 нм. Однако в некоторых местах, называемых **фокальными контактами** или *адгезионными пластинками,* этот промежуток уменьшается до 10-15 нм. В отражательном интерференционном микроскопе, который собирает только свет, отраженный от нижней поверхности клетки, эти места имеют вид темных пятен. Окрасив клетку антителами к актину, можно показать, что именно здесь концы стрессовых волокон прикрепляются к плазматической мембране (рис. 11-37). В фокальном контакте клеточный кортекс соединяется при помощи

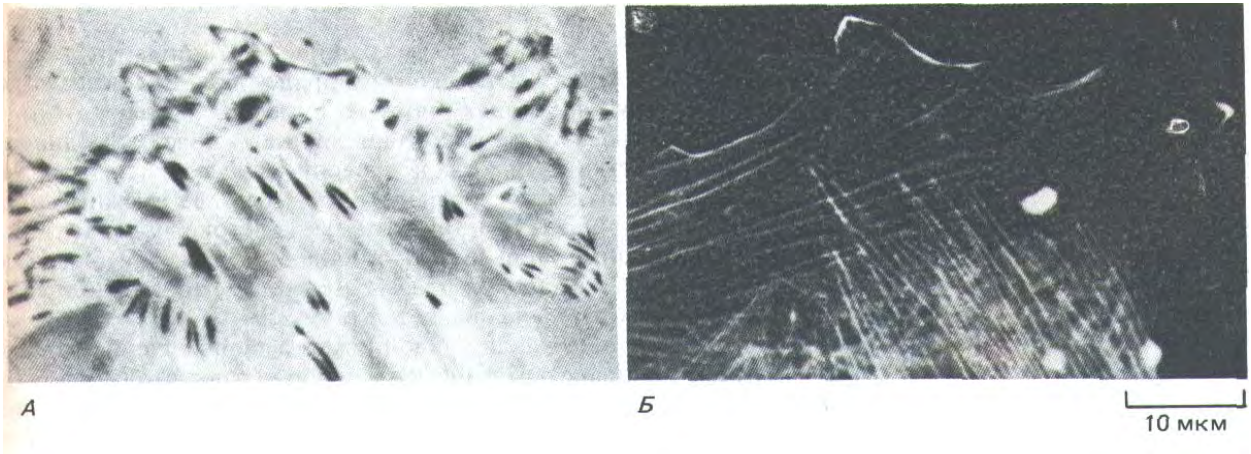


Рис. 11-37. Взаимоотношения междуфокальными контактами и стрессовыми волокнами в фибробласте invitro. Фокальные контакты лучше всего видны в живой клетке при использовании отражательной интерферснционной микроскопии *(А).* Свет при этом отражается от нижней поверхности клетки, прикрепившейся к предметному стеклу, и фокальные контакты имеют вид темных пятнышек. На фото *Б та* же кл**етка** окрашена (после фиксации) антителами к актину; видно, что большая часть пучков ее актиновых филамснтов (или стрессовых волокон) оканчивается в фокальных контактах или в непосредственной близости от них. (С любезного разрешения Grenham Ireland.)

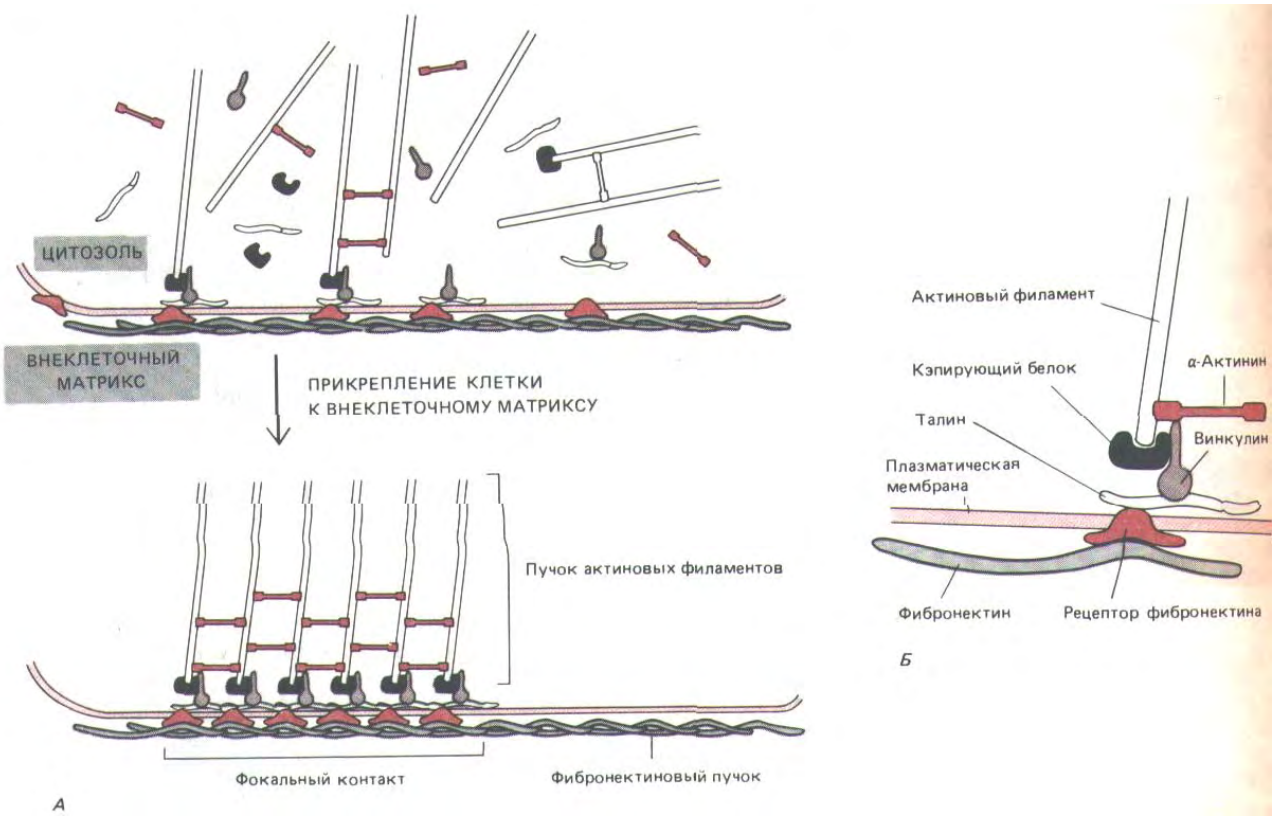


Рис. 11-38. Модель, показывающая, как трансмембранные линкерные гликопротеины плазматической мембраны могут соединять внутриклеточные актиновые филаменты с внеклеточным матриксом в фокальных контактах. Фокальные контакты образуются, когда связывание гликопротеинов матрикса с поверхностью клетки приводит к группировке трансмембранных линкеров в области контакта *(А)*. Справа (Б) показано возможное расположение внутриклеточных прикрепительных белков, осуществляющих связь между трансмембранными гликопротеинами-линкерами (например, рецептором фибронектина) и актиновыми филаментами.

трансмембранных белков-линкеров с компонентами внеклеточного матрикса (в частности, с *фибронектином;* см. разд. 14.2.13), которые адсорбированьт на чашке; Типичным[1] трансмембранным линкером является *рецептор фибронектина-построенный* из двух цепей гликопротеин из группы *интегринов* (разд. 14.2.17). Его наружный домен связывается с фибронектином, а цитоплазматический соединен с актиновыми филаментами в стрессовых волокнах (рис. 11-38, *А)*. Это соединение непрямое, в нем участвуют еще по меньшей мере четыре *прикрепительных* белка, в том числе *талин* и *винкулин* талин связывается как с цито-плазматическим доменом рецептора фибронектина, так и с винкулином. Ни один из этих белков, однако, прямо с актиновыми филаментами не соединен; по-видимому, с ними непосредственно связаны другие белки: белок, кэпирующий актиновые филаменты, который присоединяется к их плюс-концам, и α-актинин, который в мышцах прикреплен к актиновым, филаментам около плюс-конца в области Z-диска (разд. 11.1.13). Возможное расположение всех этих белков в фокальном контакте показано на рис. *11-38,Б.*

С фокальными контактами весьма сходны места прикрепления акти-новых филаментов к плазматической мембране гладкомышечных клеток (разд. 11.1.14). Другая сходная (но уже в меньшей степени) структура-это *опоясывающие десмосомы* (адгезионные пояса), соединяющие эпителиальные клетки в пласты и позволяющие сократимым пучкам актиновых филаментов взаимодействовать через две смежные плазматические мембраны (разд. 14.1.3). В этих межклеточных контактах имеются винкулин и α-актинин, но нет талина, так что способ присоединения актиновых филаментов к плазматической мембране должен быть несколько иным, чем в фокальных контактах.

До сих пор мы обсуждали такие примеры прикрепления актиновых филаментов к мембране, где филаменты либо играют структурную роль (как в микроворсинках), либо способны передавать на мембрану тянущее усилие (как в фокальных контактах). В обоих этих случаях мы

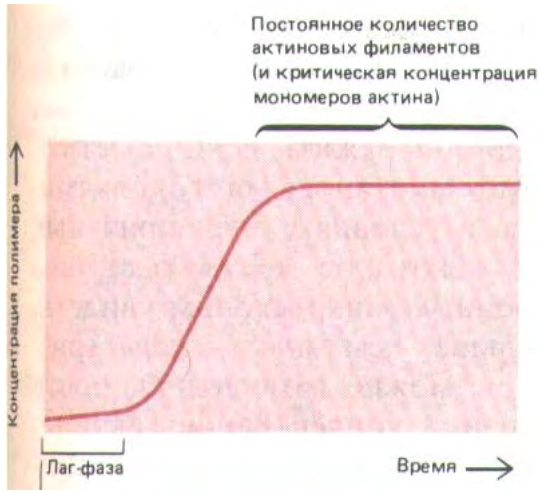


Рис. 11-39. Кинетика полимеризации актина in vitro. Полимеризацию инициируют повышением ионной силы в растворе актина, и она обычно начинается после некоторой вдержки (лаг-фазы).

имеем дело с постоянными структурами - продуктами относительно стабильной ассоциации актиновых филаментов. Быстрые же изменения формы клеточной поверхности (например, при движении клетки) часто зависят от кратковременной регулируемой полимеризации актина. Но прежде чем рассматривать механизм быстрого выпячивания плазматической мембраны в результате полимеризации актина, мы сделаем краткое отступление и выясним, что известно о процессах такой полимеризации in vitro.

11-11

11.2.9. Рост актинового филамента происходит главным образом на плюс-конце [25]

Как уже упоминалось, in vitro молекулы актина могут спонтанно полимеризоваться в присутствии АТР, образуя филаменты. Обычно этот процесс инициируют повышением ионной силы раствора актина, а следить за его протеканием проще всего, измеряя увеличение светорассеяния раствора или флуоресценции ковалентне связанного красителя. Полимеризация актина развивается нелинейно - вначале наблюдается лаг-фаза, отражающая первую стадию, самую медленную и затрудненную, в которой три молекулы актина должны соединиться в определенной геометрической конфигурации (рис. 11-39). Эта стадия называется *нуклеациеп.* Когда нуклеация произошла, дальнейшее присоединение новых молекул актина к концам филамента происходит быстро. Процесс сборки филаментов обратим, и в конце концов концентрация мономеров падает до уровня, при котором скорости ассоциации и диссоциации мономеров становятся равными. Такую концентрацию называют *критической.* Если быстро разбавить раствор актина так, чтобы концентрация мономеров упала ниже критической, актиновые филаменты начнут распадаться, и их деполимеризация будет продолжаться до тех пор, пока не восстановится критическая концентрация мономеров. Как мы увидим, и нуклеация, и полимеризация актина в клетке находятся под контролем различных актин-связывающих белков, которые и определяют таким образом местоположение и длину актиновых филаментов. У полимеризации актина есть еще одна особенность, которая позволяет объяснить направленность роста филаментов при осуществле-

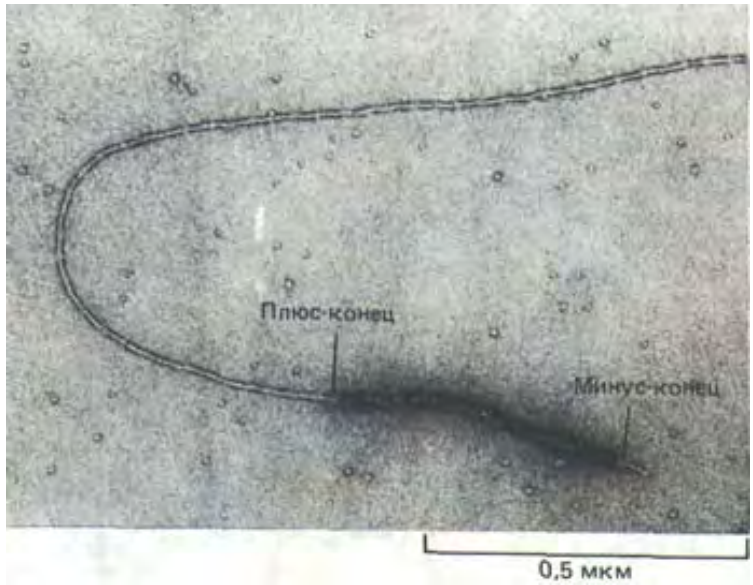


Рис. 11-40. Асимметричный рост актинового филамента. Если в качестве «затравки» для полимеризации актина использовать небольшие фрагменты актиновых нитей, помеченных головками миозина, можно увидеть, что сборка происходит гораздо быстрее на плюс-конце первоначального фрагмента, чем на минус-конце. (С любезного разрешения M.S. Runge, T. D. Pollard.)

нии различных клеточных движений. Как мы уже достаточно хорошо знаем, актиновые филаменты обладают полярностью, и важное следствие этой полярности - различная кинетика полимеризации плюс- и минус-концах. Это различие можно обнаружить, если пометить небольшой участок актинового филамента миозиновыми головками, а затем добавить к ним мономеры актина в условиях, благоприятных для полимеризации. Зафиксировав через некоторое время растущие актиновые филаменты, можно под электронным микроскопом увидеть, что их *плюс-концы* выросли гораздо больше, чем *минус-концы* (рис, 11-40). Проведя серию таких экспериментов, можно измерить скорость роста обоих концов филамента при различных концентрациях актиновых мономеров. В среде, соответствующей по ионному составу внутриклеточным условиям, очищенные актиновые филаменты растут на плюс-концах в 5-Ю раз быстрее, чем на минус-концах. По-видимому, in vivol рост почти всегда происходит на плюс-конце; поэтому, закрепив плюс-конец филамента в определенной ориентации, клетка может предопределить скорость и направление роста филамента.

11-12

11.2.10. В актиновых филаментах происходит «тредмиллинг» составляющих их субъединиц [25]

Эксперименты in vitro (вроде показанного на рис. 11-40) говорят о том, что концентрация актина, при которой рост филаментов прекращается, т. е. критическая концентрация, различна для разных концов филамента. Поэтому при полимеризации актина в пробирке достигается стационарное состояние, в котором присоединение мономеров происходит в основном на плюс-конце, а их отделение - на минус-конце. Скорости этих двух процессов в стационарном состоянии одинаковы, и потому концентрация свободных мономеров остается постоянной. Хотя общая длина полимера при этом не изменяется, отдельные молекулы актина непрерывно перемещаются от одного конца филамента к другому (рис. 11-41). Этот процесс, получивший название **тредмиллинга,** можно сравнить с продвижением людей в очереди.

Для тредмиллинга необходима энергия, иначе на его основе можно

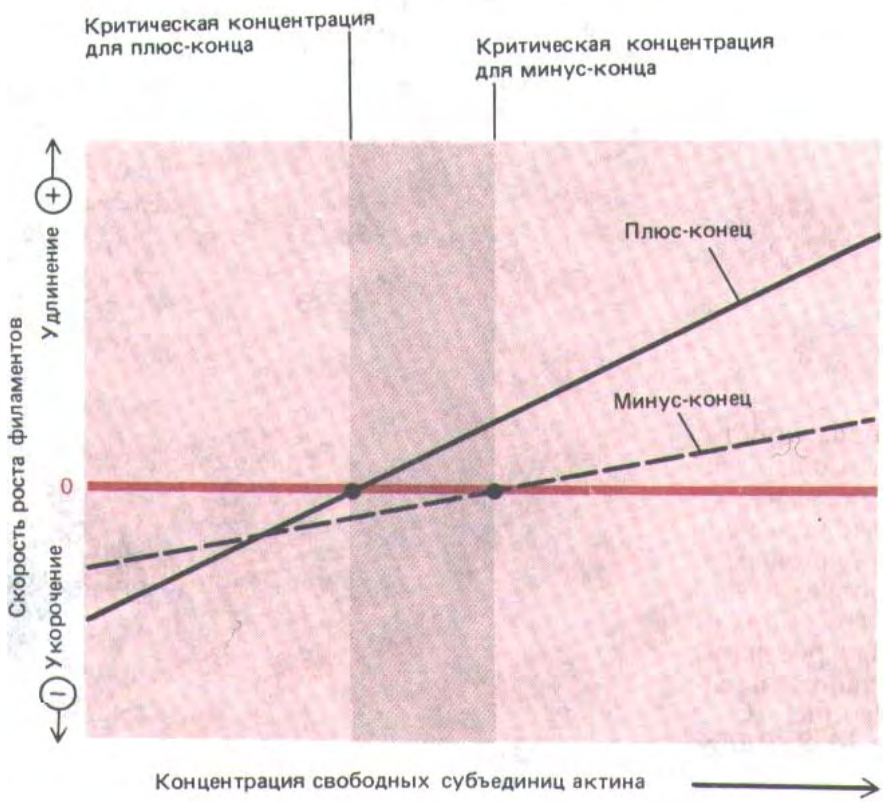


Рис. 11-41. Скорость роста актиновых филаментов на разных концах при различных концентрациях мономеров актина. График показывает, что два конца растут с разными скоростями и критические концентрации для них различны. Поэтому существует некоторый диапазон концентраций свободного актина (темная полоса), при которых плюс-конец актинового филамента полимеризуется, а минус-конец деполимеризуется. Когда in vitro свободный актин находится в равновесии с актиновыми филаментами, в целом роста не происходит, так как скорости отделения молекул от минус-конца и присоединения их к плюс-концу равны. При такой концентрации свободных актиновых субъединиц (промежуточной между критическими концентрациями для двух концов-показано цветной стрелкой) длина филаментов не изменяется, но молекулы актина в них все время движутся от одного конца полимера к другому. Этот процесс называют тредмил-лингом (см. схему 11-1).

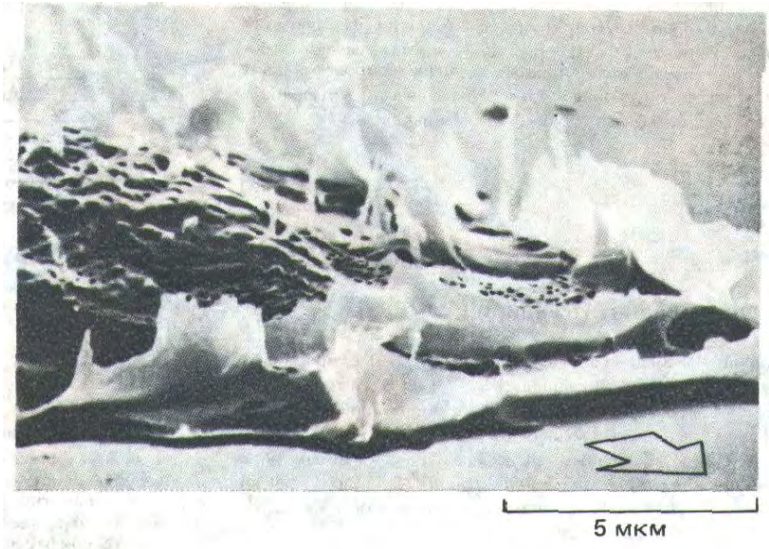


Рис. 11-42. Ламеллоподии и микро-шипы на переднем крае человеческого *фибробласта, передвигающегося* в культуре (микрофотография, ученная с помощью сканирующего электронного микроскопа). Стрелкой указано направление движения. По мере того как **клетка** продвигается вперед, ламеллоподии и микрошипы перемещаются назад' по ее верхней стороне, что создает картину «раффлинга». (С любезного разрешения Julian Heath.)

было бы создать вечный двигатель - машину, способную совершать работу, не расходуя энергии, т. е. нарушая законы термодинамики. В случае тредмиллинга энергию доставляет гидролиз ATP: каждый мономер актина связывает молекулу ATP, которую после своего присоединения к филаменту быстро гидролизует до ADP и фосфата. Каким образом гидролиз ATP делает возможным тредмиллинг, объясняется на схеме 11-1. Вскоре мы увидим (разд. 11.2.11), что тредмиллинг может быть одним из механизмов, с помощью которого актиновые нити и связанные с ними компоненты выполняют в клетке двигательные функции.

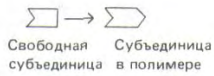
11.2.11. Многие клетки образуют на своей поверхности подвижные структуры, содержащие актин, - микрошипы и ламеллоподии [26]

Динамичные выступы клеточной поверхности с актиновыми филаментами внутри - весьма обычная черта животных клеток, особенно тех, которые в данный момент мигрируют или изменяют свою форму. Культивируемые клетки, например, часто образуют множество тонких жестких выростов толщиной около 0,1 мкм и длиной 5-10 мкм, называемых **микрошипами,** которые содержат рыхлые пучки примерно из 20 актиновых филаментов, ориентированных плюс-концами наружу. Растущий конец аксона нервной клетки-конус роста - выпускает еще более длинные микрошипы - *филоподии,* длина которых может достигать 50 мкм (разд. 19.7.7). Эти выступы клеточной поверхности весьма подвижны, они могут очень быстро появляться и исчезать. Видимо, они действуют подобно щупальцам, которыми клетка исследует окружающее пространство; те микрошипы, которые прочно прикрепляются к какому-то субстрату, направляют движущуюся клетку к этому более адгезивному участку, а те, которым прикрепиться не удалось, перемещаются .по верхней стороне клетки назад и там втягиваются.

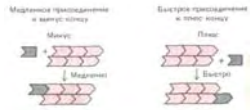
Помимо микрошипов ползущие клетки и конусы роста периодически выбрасывают из своего активно продвигающегося («переднего») края тонкие пластинчатые отростки, получившие название **ламеллоподии.** Как и микрошипы, одни ламеллоподии успешно прикрепляются к субстрату,

СКОРОСТИ РОСТА НА ПЛЮС- И МИНУС-КОНЦАХ РАЗЛИЧНЫ

Сборка (полимеризация) и разборка (деполимеризация) актиновых филаментов осуществляются путем присоединения и отделения мономеров на концах филамента. В процессе сборки фипамент растет на одном из концов быстрее, чем на другом; быстро растущий конец называют *плюс-концом,* а медленно растущий - *минус-концом.* Различие в скоростях роста противоположных концов обусловлено тем, что каждая субъединица, присоединяясь к полимеру, изменяет свою конформацию.



Это конформационное изменение влияет на присоединение субъединицы преимущественно на одном из концов.

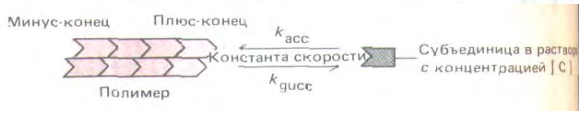


КРИТИЧЕСКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ СУБЪЕДИНИЦ

Число субъединиц, присоединяющихся к полимеру за 1 с, пропорционально концентрации свободных субъединиц ($k_{асс.}$ [C]) ; в то же время субъединицы диссоциируют от концов полимера с постоянной скоростью *($k_{дисс}$*), от [C] не зависящей. По мере роста полимера свободные субъединицы расходуются и [C] снижается до тех пор, пока не достигает постоянной величины — *критической концентрации (C_c*), при которой скорость присоединения субъединиц к полимеру равна скорости их отделения от него. В этом состоянии равновесия

$$k_{асс.}\ C_c = k_{дисс.},\ \text{откуда}$$

$$\text{Критическая концентрация} = C_C = \frac{k_{дисс.}}{k_{асс.}} = \frac{1}{K}$$ (здесь K — константа равновесия для присоединения субъединиц)



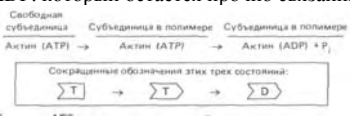
И хотя значения $k_{асс}$ и $k_{дисс}$ для плюс- и минус-концов будут различны, их отношения $k_{дисс}/k_{асс}$ значит и C_c, должны быть одинаковы на обоих концах. Это обусловлено тем, что при отделении субъединицы от любого конца полимера разрушаются совершенно одинаковые связи, а конечные состояния субъединиц после этого тоже идентичны. Таким образом, изменение свободной энергии ДС при отделении субъединицы, определяющее константу равновесия для ассоциации субъединицы С концом (см. табл. 3-3), на обоих концах одно и то же; если плюс-конец растет вчетверо быстрее, чем минус-конец, то и укорачиваться он должен тоже вчетверо быстрее.

Итак, при [C] $<C_0$ оба конца растут;

при [C 1 > C_0 оба конца укорачиваются (см. рис. 11 41)

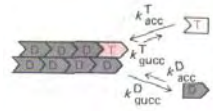
ГИДРОЛИЗ АТР ПРИВОДИТ К ИЗМЕНЕНИЮ КОНСТАНТЫ РАСНОВЕСИЯ НА КАЖДОМ ИЗ КОНЦОВ

Каждая молекула актина несет прочно связанную молекулу АТР. Вскоре после коформационного изменения субъединицы актина при ее присоеди-нии к полимеру этот АТР гидролизуется до ADP. который остается прочно связанным с актином.



Гидролиз АТР уменьшает сродство субъединицы к соседним субъединицами и тем самым увеличивает вероятность ее отделения от любого конца. Обычно присоединяется к филаменту форма T , а покидает его форма D (которая затем в растворе превращается в D , так что процесс отделения субъединицы от полимера не является просто обращением реакции присоединения.

Расмотрим события, происходящие на плюс-конце:



Как и прежде, полимер будет расти, пока [C] не снизится до C_C. Для большей наглядности мы можем Пренебречь величинами $k_{асс}$ и $k_{дисс}$ как малый; рост полимера прекратится при

$$k_{асс.}\ C_C = k_{дисс.},\ \text{т.е.}\ C_0 = k_{дисс.}/k_{асс.} = 1/K$$

Это не истинное равновесие, а стационарное состояние, поскольку гидролизованный АТР должен быть восполнен путем обмена нуклеотидов на свободной субъединице (D → T)

ТРЕДМИЛЛИНГ

Так как $k_{асс}$ и $k_{дисс}$ относятся к различным реакциям, их отношение $k_{дисс}/k_{асс}$ не обязательно будет одинаковым на разных концах полимера. Действительно, оказалось, что гидролиз АТР создает для противоположных концов различные критические концентрации, причем

C_c (для *минус-конца)* > c_c (для *плюс-конца).*

Если оба конца полимера "открыты", полимеризация будет преобладать, пока [C] не достигнет некоторого уровня выше С для плюс-конца и ниже C_c для минус-конца (см. рис. 11-14). В этом стационарном состоянии нз •плюс-конце будет идти сборка субьединиц в полимер, а на минус-конце — разборка полимера, причем скорости этих процессов будут одинаковы, так что длина полимера не будет изменяться, несмотря на перемещение субъединиц в полимере — *тредмиллинг:*



Для сборки филаментов гидролиз АТР не нужен. В подходящих условиях полимеризуются и мономеры актина, несущие негидролизуемый аналог АТР. Однако образующиеся при этом филаменты не способны к тредмиллингу - он возможен лишь благодаря гидролизу АТР, который сопутствует полимеризации.

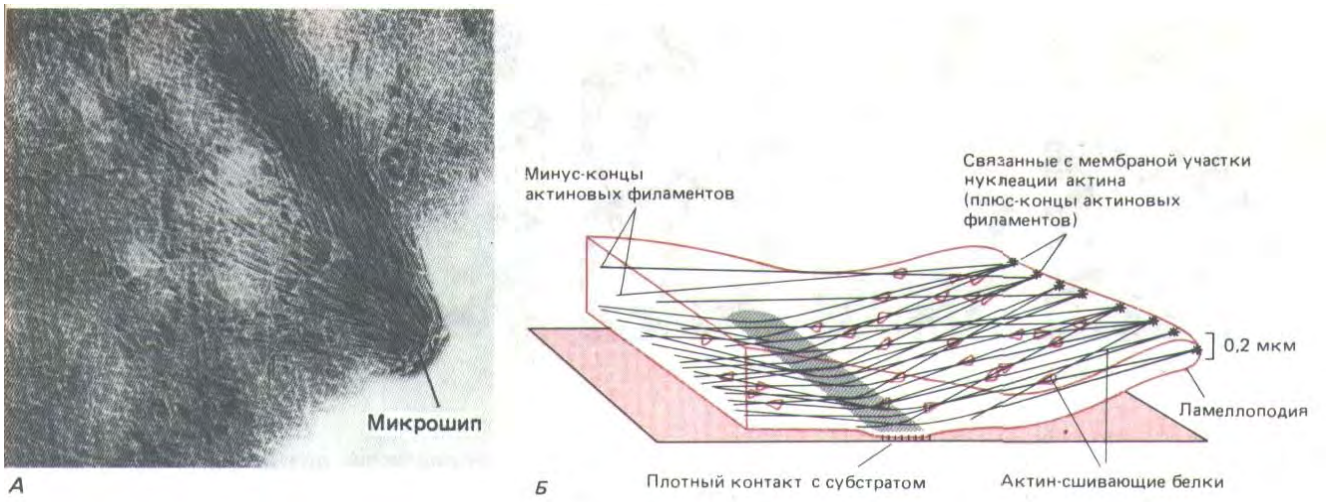


Рис. 11-43. Актиновые филаменты в переднем крае культивируемого фибробласта. *А.* Электронная микрофотография цельного переднего края клетки, экстрагированной неионным детергентом для удаления плазматической мембраны и основной массы растворимых белков. Обратите внимание на ориентированную сетку актиновых филаментов в ламеллоподии, в которую погружен микрошип. Б. Схема расположения актиновых филаментов ламеллоподии. (A-J.V. Small, J. Cell Biol. 91: 695-705, 1981. С разрешения Rockefeller University Press.)

другие же «соскальзывают» и в этом случае тоже волнообразно перемещаются назад по верхней поверхности клетки - этот процесс получил название «раффлинга» (ruffling-волнение, рябь) (рис. 11-42).

Ламеллоподию можно рассматривать как двумерный вариант микрошипа; на ее переднем крае нередко находится ряд коротких микрошипов. Если клетку осторожно зафиксировать и окрасить для электронной микроскопии, актиновые филаменты в ламеллоподиях двигавшейся клетки будут выглядеть гораздо более организованными, чем в других участках кортекса; упорядоченные группы филаментов вытянуты к переднему краю, где их плюс-концы упираются в плазматическую мембрану (рис. 11-43).

Исследование движущихся клеток в культуре показывает, что тредмиллинг мономеров в актиновых филаментах на переднем крае клетки идет гораздо быстрее, чем в филаментах, образованных in vitro. Движение молекул актина в клетке можно выявить в экспериментах с «гашением» флуоресценции. Если флуоресцентно меченные молекулы актина инъецировать в движущуюся клетку, они быстро включаются во все актиновые филаменты. Если теперь с помощью лазерного луча разрушить флуоресцирующую метку в небольшом пятнышке на тонком переднем крае клетки, то можно увидеть, как это темное пятнышко постепенно перемещается от края клетки внутрь со скоростью около 0,8 мкм/мин, что указывает на быстрый тредмиллинг молекул актина в филаментах ламеллоподии и микрошипов (рис. 11-44). Очевидно, мономеры актина все время присоединяются к плюс-концам у плазматической мембраны и отделяются от минус-концов в глубине клетки.

Если таким же образом погасить флуоресценцию актиновых филаментов на небольшом участке в любой другой области клетки, свечение через несколько минут восстановится без всякого видимого перемещения: очевидно, в организации или поведении актина в переднем крае клетки есть какие-то особенности. Было высказано предположение, что непрерывная полимеризация актина непосредственно под плазматической мембраной может использоваться для вытягивания переднего края клетки и помогать тем самым ее движению вперед (см. разд. 11.6.5). Изучение механизма перемещения спермиев некоторых беспозвоночных действительно показало участие в этом процессе полимеризации актина.

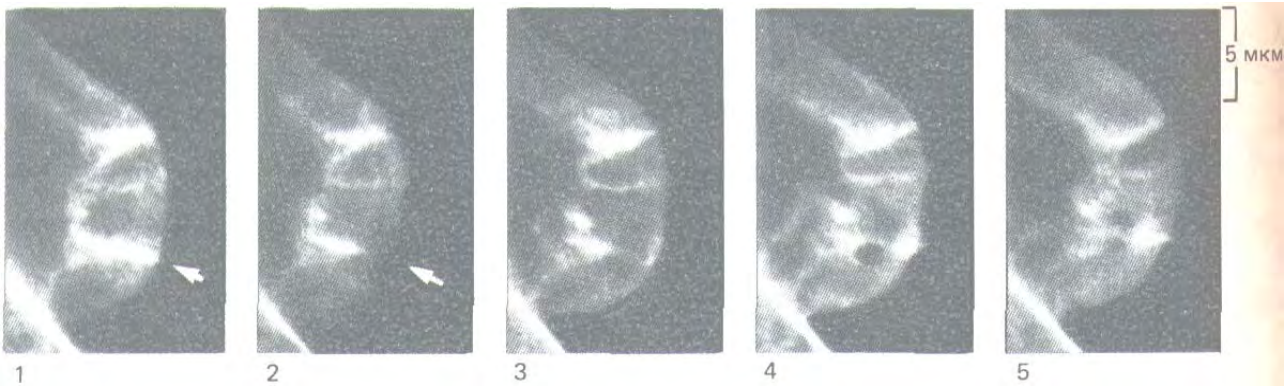


Рис. 11 -44. Тредмиллинг актина в культивируемых фибробластах. Флуоресцирующие молекулы актина были введены путем микроинъекции в клетку, где они включились в актиновые филаменты. Небольшое пятнышко на актиновом филаменте в переднем крае клетки было «погашено» лучом лазера. Затем клетку фотографировали через определенные промежутки времени при помощи флуоресцентного микроскопа с видеоприставкой (разд. 4.1.6). Быстрое перемещение пригашенного пятна назад говорит о том, что молекулы актина непрерывно движутся по филаменту, удаляясь от переднего края.

11-13

11.2.12. Взрывообразная полимеризация актина способствует образованию акросомалыгого отростка у спермиев некоторых беспозвоночных [27]

Хотя появление многих выступов на клеточной поверхности, как полагают, зависит от полимеризации актиновых филаментов, о механизме запуска этого процесса мало что известно. Одно из исключений-*акросомальная реакция у* спермиев некоторых беспозвоночных (разд. 15.4.1). У спермия голотурии, например, область акросомы (в головке) «битком набита» неполимеризованным актином, связанным с небольшим белком **профилином,** которого довольно много в большинстве животных клеток. Профилин образует с молекулами актина эквимолярный комплекс и блокирует тем самым стадию нуклеации при самопроизвольной полимеризации актиновых филаментов, однако на рост плюс-концов уже имеющихся филаментов он значительного влияния не оказывает. Когда спермий вступает в контакт с наружной оболочкой яйцеклетки, pH его цитоплазмы возрастает и актин отделяется от профилина. Происходит взрывообразная полимеризация актина, благодаря которой быстро формируется одетый мембраной длинный и тонкий *акросомалъныт отросток,* который, как гарпун, прокалывает оболочку яйца, позволяя мембранам яйца и спермия слиться (рис. 11-45). Кроме полимеризации актина вытягиванию акросомального отростка, видимо, способствует также поступление воды в головку спермия, создающее в ней гидростатическое давление.

Процесс образования акросомального отростка указывает на то, что полимеризация актина, вероятно, может вызывать быстрое выпячивание плазматической мембраны, не нарушая ее непрерывности. Хотя маловероятно, что ламеллоподии и микрошипы образуются за счет изменения доступного для полимеризации пула мономеров актина, все же выпячивание их, по-видимому, происходит точно так же - благодаря локальному росту актиновых филаментов у самой плазматической мембраны.

11.2.13. Сборка актина находится под контролем плазматической мембраны [28]

Клетка должна каким-то образом регулировать образование актинсодержащих выростов на своей поверхности, чтобы они появлялись только там, где нужно, и тогда, когда нужно. Например, макрофаг выпускает псевдоподии для захвата бактерии только в области контакта с ней (разд. 6.5.15), а полимеризация актина, помогающая выбросу акросомального отростка у активированного спермия голотурии, про-

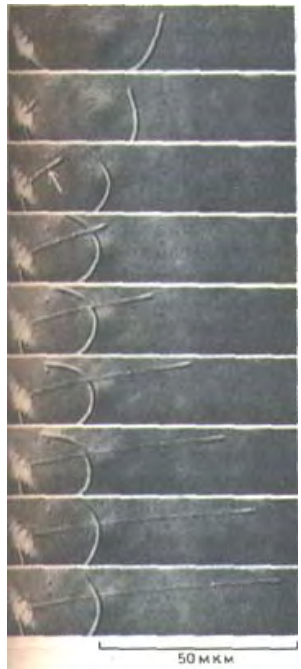


Рис. 11-45. Последовательные стадии удлинения акросомального отростка у спермия голотурии. Фотографии сделаны с помощью светового микроскопа, первая - через 2 с после искусственной стимуляции акросомальной реакции, остальные - с интервалами 0,75с. Дуга справа от головки спермия - часть его изогнутого хвоста, попавшая в поле зрения. (L. G. Tilney, S, Inoufe, J. Cell Biol. 93: 820-827, 1982. С разрешения Rockefeller University Press.)

исходит лишь тогда, когда головка спермия соприкасается со студенистым слоем на поверхности яйца.

«Время и место» для таких актин-зависимых ответов, по-видимому, регулируются путем контроля над участками нуклеации для роста актиновых филаментов около плазматической мембраны. В качестве иллюстрации можно взять хемотаксическую реакцию нейтрофилов. При местной бактериальной инфекции эти фагоцитирующие лейкоциты в больших количествах проникают сквозь стенки кровеносных капилляров и ползут сквозь ткани, пробираясь к очагу инфекции. К цели их направляют небольшие, свободно диффундирующие молекулы, которые высвобождаются в инфицированном участке. Процесс этот носит название *хемотаксиса:* клетки «чувствуют» градиент химического вещества и реагируют на него, изменяя направление своего движения. На поверхности нейтрофилов имеются белки-рецепторы, с помощью которых они могут обнаруживать очень низкие концентрации (~ 10^{-10} М) специфических хемоаттрактантов. При благоприятных условиях нейтрофилы способны воспринимать разницу концентраций пептида-хе-моаттрактанта на противоположных сторонах клетки всего лишь в 1 % и соответствующим образом переориентировать свой передний край, чтобы двигаться вверх по градиенту.

Некоторый свет на то, как связаны активация рецепторов и переориентация, пролили эксперименты, где изучали реакцию нейтрофилов на внезапное повышение концентрации пептида-хемоаттрактанта. Нейтрофилы при этом начинали выбрасывать микрошипы и ламеллоподии по всей своей поверхности, а доля полимеризованного актина в клетке за 20 секунд возрастала с 30 до 60%. Такая быстрая полимеризация актина происходила, вероятнее всего, благодаря увеличению числа участков нуклеации в плазматической мембране: когда такие обработанные хе-моаттрактантом клетки подвергали лизису, лизат обладал повышенной способностью к нуклеации роста актиновых филаментов in vitro; кроме того, каждый активированный рецептор клеточной поверхности индуцировал рост значительного числа актиновых филаментов. К роли контролируемой полимеризации актина в направленной миграции клеток мы вернемся позже, когда будем рассматривать клеточную подвижность как интегрированный ответ целой клетки (разд. 11.6.3).

11.11.

11.2.14. Некоторые вещества влияют на поведение клеток, изменяя состояние полимеризации актина [29]

Можно было бы думать, что многие из производимых клеточным кортексом движений, как, например, фагоцитоз или локомоция, зависят от динамического равновесия между свободным (неполимерным) актином и актиновыми филаментами. Однако по сравнению со «взрывными» изменениями, происходящими в активированном спермин, изменения в полимеризации актина при этих движениях обычно слишком малы и краткоеременны, чтобы их легко было обнаружить. Однако на важную роль полимеризации и деполимеризации актина в таких движениях указывают эффекты ряда веществ, которые предотвращают изменения в состоянии актина и тем самым нарушают его двигательную функцию. Например, **цитохалазины** (рис. 11-46)-семейство метаболитов, выделяемых различными плесневыми грибами,-подавляют многие формы подвижности клеток позвоночных, включая локомоцию, фагоцитоз, цитокинез, образование ламеллоподии и микрошипов и сворачивание эпителиальных пластов в трубки. В то же время эти вещества не влияют на расхождение хромосом в митозе, которое зависит в основном от функции микротрубочек веретена, и на мышечное сокращение, в кото-

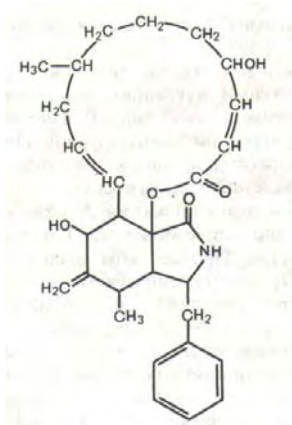


Рис. 11-46. Химическая структура цитохалазина В.

ром участвуют стабильные актиновые филаменты, не подвергающиеся сборке и разборке. Главная «точка приложения» для цитохалазинов - быстро растущие плюс-концы актиновых филаментов, с которыми цитохалазины специфически связываются и блокируют присоединение к ним новых мономеров актина.

Фаллоидин - высокотоксичный алкалоид бледной поганки *(Amnita phalloides)* - в отличие от цитохалазинов стабилизирует актиновые филаменты, подавляя их деполимеризацию. Однако он очень плохо проникает сквозь плазматическую мембрану, и для того, чтобы он подействовал, его нужно вводить в клетку путем микроинъекции. При таком способе введения фаллоидин блокирует миграцию как амеб, так и культивируемых клеток позвоночных, что указывает на ключевую роль динамической сборки-разборки актиновых филаментов в этой форме подвижности. Так как фаллоидин специфически связываете именно с нитями актина, его флуоресцентные производные часто используют вместо антител к актину для выявления актиновых филаментов в клетке.

11.2.15. Свойства клеточного кортекса зависят от баланса кооперативных и конкурентных взаимодействий обширной группы актин-связывающих белков

Об актин-связывающих белках сейчас известно куда больше, чем о белках, взаимодействующих с двумя другими важными видами нитчатых

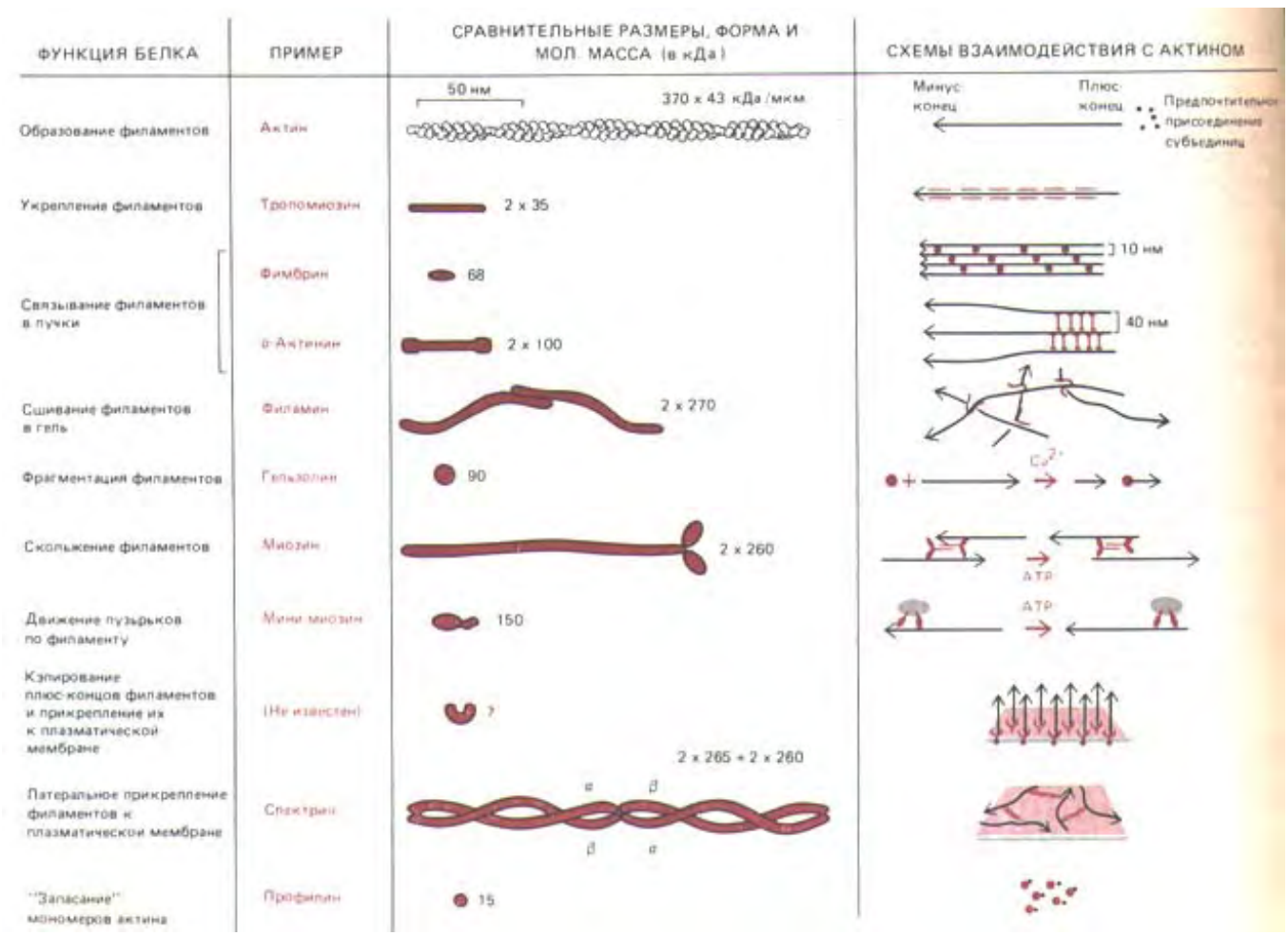


Рис. 11-47. Некоторые главные классы актин-связывающих белков, имеющихся в большинстве клеток позвоночных.

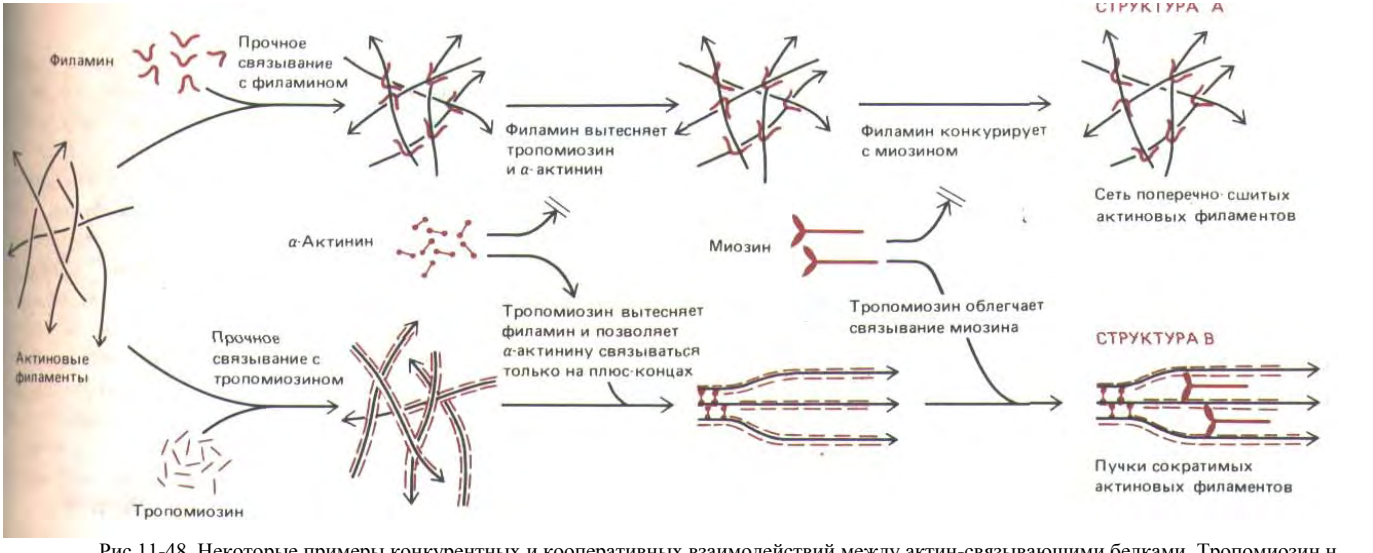


Рис 11-48. Некоторые примеры конкурентных и кооперативных взаимодействий между актин-связывающими белками. Тропомиозин н филамин прочно связываются сатиновыми филаментами, но при этом конкурируют друг с другом. Так как тропомиозин связывается с актиновыми нитями кооперативно, на обширных участках их сети будет преобладать либо тропомиозин, либо филамин. Другие актин-связывающие белки, такие как и актинин или миозин, будут конкурентно вытесняться из специфических участков; например, а-актинин in vitro связывается по всей длине очищенных актиновых филаментов, но с такими же филаментами в клетке он связывается относительно слабо - там он находится в основном вблизи плюс-концов из-за конкуренции с другими белками. Напротив, кооперативные взаимодействия могут усиливать связывание; так, тропомиозин, по-видимому, способствует связыванию миозина. Как полагают, множество подобных взаимодействий между актин-связывающими белками, представленными на рис. 11-47 (и некоторыми другими), обусловливает необычайное многообразие актиновых структур во всех эукариотических клетках.

цитоскелетных структур - промежуточными филаментами и микротрубочками. Наши знания о тех актин-связывающих белках немышечных клеток позвоночных, которые мы рассмотрели в этой главе, резюмированы на рис. 11-47. Эта картина далека от завершения; каждая из указанных здесь функциональных категорий включает несколько их представителей, свойства которых слегка различаются. Кроме того, известны актин-связываюшие белки без каких-либо очевидных функций, и несомненно также, что существуют еще не открытые актин-связывающие белки. В частности, клетки должны как-то различать противоположные концы актиновых филаментов и контролировать их ориентацию и местонахождение в цитоплазме. По-видимому, в механизмах такого различения используются *«кэшрующие белки»,* которые избирательно связываются с плюс-концами актиновых филаментов, удерживают их вблизи плазматической мембраны и регулируют присоединение мономеров актина. В отличие от этого минус-концы, относительно инертные в отношении как полимеризации, так и деполимеризации, возможно, часто остаются «открытыми». Немало еще предстоит узнать о природе мембраносвязанных центров организации актина; например, почти ничего не известно о молекулярной природе электроне плотного вещества в кончиках микроворсинок, которое, по-видимому, ответственно за организацию актиновой сердцевины этих выступов и за контроль их роста и регенерации (разд. 11.2.7).

Даже после того, как все компоненты актиновых сетей будут идентифицированы, останется еще более трудная задача - выяснить, к каким последствиям приводят их многочисленные взаимодействия. Белки, представленные на рис. 11-47, связываются с актином не одновременно и не случайным образом: они кооперируются или(и) конкурируют друг с другом, благодаря чему и возникает упорядоченная картина их взаимоотношений, столь важная для клетки (рис. 11-48). Кроме того, взаимодействия компонентов сети модулируются локальными изменениями в концентрациях ионов и механическими силами, растягивающими или сжимающими сеть и тем самым сдвигающими ее компоненты относительно друг друга. В связи с этим понятно, что изучение всей этой ключевой части цитоскелета находится еще в начальной стадии.

Заключение

В эукариотических клетках имеется особый кортикальный слой акт новых филаментов, лежащий непосредственно под плазматической мембраной. В целом он представляет собой однородную трехмерную сеть обладающую благодаря поперечным сшивкам, свойствами геля. Вместе с тем кортикальные актиновые филаменты образуют и ряд специализированных структур. Например, пучки актиновых филаментов, находящихся в комплексе с миозином, прикрепляются к плазматической мембране и обеспечивают клетку структурами, способными к сокращению. В других участках контролируемая полимеризация актиновых филаментов на их плюс-концах способна выпячивать плазматическую мембрану наружу, создавая подвижные выступы клеточной поверхности. Разнообразие структур кортекса и выполняемых ими функций за-висит от обширного спектра актин-связывающих белков, которые сшивают актиновые филаменты в рыхлый гель, объединяют их в жесткие пучки, движутся по актиновым филаментам, создавая механическое усилие, или прикрепляют их к плазматической мембране. Некоторые из белков, выполняющих эту последнюю функцию, прикрывают плюс-концы актиновых филаментов, контролируя тем самым их полимеризацию и деполимеризацию в клетке. Именно этим белкам, как полагают, принадлежит ключевая роль в сложных движениях клеточной поверхности, например при фагоцитозе или при перемещении клеток по субстрату.

11.3. Движение ресничек [30]

После мышечного сокращения наиболее изученным видом клеточной подвижности является биение ресничек. **Реснички - это** миниатюрные волосовидные образования толщиной около 0,25 мкм, построенные из *микротрубочек* (микротрубочки - это вторая из трех главных груші нитевидных элементов цитоскелета). Реснички имеются у клеток многих типов и встречаются у большинства животных и некоторых низших растений. Их главная функция - создавать ток жидкости около поверхности клетки или продвигать клетку вперед сквозь толщу воды. Простейшие, например, используют реснички и для передвижения, и для сбора пищевых частиц. У человека огромное множество ресничек (10' и более на 1 $см^2$), принадлежащих клеткам эпителия нижних дыхательных путей, непрерывно перемещает слизь с частицами пыли и остатками отмерших клеток вверх, к ротовой полости, где слизь проглатывается и удаляется. Реснички обеспечивают также передвижение яйцеклетки по яйцеводу, а сходная с ними структура - жгутик -движет сперматозоиды позвоночных.

Подобно тому как изучение мышечного сокращения вносит большой вклад в наше понимание двигательных процессов на основе актина и миозина в немышечных клетках, так и наши знания о механизме биения ресничек помогают понять, каким образом системы микротрубочек порождают движение иного рода - например, обеспечивают внутриклеточный транспорт или процессы, связанные с митозом.

11.3.1. Для ресничек и жгутиков характерны колебательные движения - волны изгиба

Реснички движутся координированно, образуя на поверхности клетки однонаправленные бегущие волны (рис. 11-49). Каждая ресничка работает подобно крошечному хлысту: активный удар вперед, при котором ресничка полностью выпрямляется и преодолевает сопротивление окру-

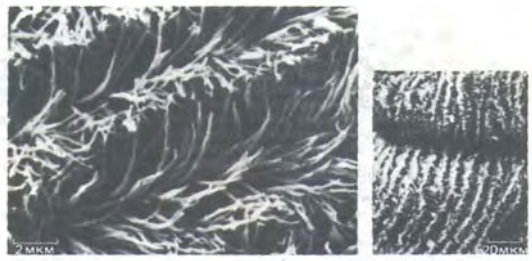


Рис. 11-49, Микрофотографии ресничного эпителия из кишки морского червя, полученные с помощью панирующего электронного микроскопа. Хотя реснички распределены по всей поверхности равномерно, их биение координируется таким образом, что возникают ряды бегущих в одном направлении волн. Эти волны более отчетливо видны при меньшем увеличении *справа).*

жающей жидкости, сменяется пассивной фазой, во время которой она возвращается в исходное положение, изгибаясь при этом так, чтобы уменьшить сопротивление среды (рис. 11-50, *А).* Циклы соседних ресничек едва заметно сдвинуты во времени, что приводит к волнообразной картине, которую можно видеть под микроскопом.

Жгутики спермиев и многих простейших по своей внутренней структуре очень похожи на реснички, но обычно они гораздо длиннее, и характер движения у них иной: не удары хлыста, а бегущие квазисинусоидальные волны (рис. 11-50, *Б).* Тем не менее молекулярная основа движения здесь одна и та же. Следует, однако, отметить, что жгутики бактерий - это нечто совсем иное, чем реснички и жгутики эукариотических клеток (см. разд. 12.5.4).

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

Биение реснички обусловлено изгибанием ее осевой структуры - так называемой **аксонемы.** Это сложный комплекс микротрубочек и связанных с ними белков. Микротрубочки обычно представляют собой полые белковые цилиндры с наружным диаметром 25 нм (см. ниже). В аксономе они видоизменены и расположены весьма характерным образом. Открытие этой системы явилось одним из самых впечатляющих результатов ранних электронно-микроскопических исследований: девять сдвоенных трубочек расположены по окружности, в центре которой находятся две одиночные микротрубочки (рис. 11-51). Такая структура типа 9 + 2 характерна для ресничек и жгутиков почти всех эукариотических организмов, от простейших до человека. Микротрубочки тянутся



Рис. 11-50. Различный характер биения ресничек и жгутиков. *А.* Удар реснички (например, реснички эпителия дыхательных путей) напоминает гребное движение пловца. За рабочим ходом (стадии 1 и 2), при котором жидкость прогоняется по поверхности клетки, следует совершенно иной по характеру возвратный ход (стадии 3, 4, 5). Каждый цикл длится обычно 0,1-0,2 с и создает силу, перпендикулярную оси аксонемы. *Б.* Здесь для сравнения показано волнообразное движение жгутика у спермия оболочника. Клетка была заснята при стробоскопическом освещении с частотой 400 вспышек в 1 с. Обратите внимание, что волны, имеющие постоянную амплитуду, непрерывно движутся от основания жгутика к его концу. В результате клетка движется прямо вперед, как бы отталкиваясь от своей аксонемы, т.е. совершенно иначе, чем в случае с ресничкой. *(Б-с* любезного разрешения С. J. Brokaw.)



Рис. 11-51. Электронная микрофотография жгутика зеленой водоросли *Chlamydomonas* (поперечный срез) (с любезного разрешения Lewis Tilney). Видна характерная структура типа 9 + 2, свойственная почти всем ресничкам и жгутикам эукариот. Схема, показывающая основные компоненты этой структуры, представлена на рис. 11-53.

по всей длине аксонемы, которая обычно составляет около 10 мкм, в некоторых клетках может достигать 200 мкм.

Если микротрубочки *центральной пары* одинаковы, и каждая представляет собой отдельный полный цилиндр, то наружные дублеты состоят из двух слившихся микротрубочек - одной полной и одной неполной *(субфибриллы А и В* соответственно). По линии контакта **эти** субфибриллы имеют участок общей стенки. На поперечных срезах видно, что полная микротрубочка дублета образована кольцом из 13 субъединиц, а неполная (субфибрилла В)-только из 11.

11.3.3. Микротрубочки - полые цилиндры, образованные молекулами тубулина [31]

Микротрубочки состоят из молекул тубулина, каждая из которых представляет собой гетеродимер, образованный двумя прочно связанными глобулярными субъединицами. Эти субъединицы - родственные белки (около 450 аминокислот в каждом), получившие название α- и β-*тубули нов.* Хотя тубулин присутствует практически во всех клетках эукариот, главным источником его для биохимических исследований служит головной мозг позвоночных: 10-20% растворимого белка, экстрагируемого из мозга большинством методов, составляет тубулин; и это неудивительно, так как отражает высокое содержание микротрубочек в длинных аксонах и в дендритах нервных клеток.

В ходе сборки микротрубочек молекулы тубулина образуют линейные протофиламенты, в которых α -тубулин одного димера контактирует с β-тубулином следующего. Целая микротрубочка содержит 13 таких протофиламентов, уложенных параллельно бок о бок вокруг центральной области, которая на электронных микрофотографиях кажется пустой (рис. 11-52). Так как все протофиламенты уложены параллельно и имеют одинаковую ориентацию, микротрубочки, подобно актиновым филаментам, являются полярными структурами, у которых есть плюс-концы, растущие быстро, и минус-концы, растущие медленно (см. схему 11-2). Плюс-концы микротрубочек находятся на кончике реснички.

Подобно актину и многим другим белкам цитоскелета, тубулин у большинства организмов закодирован целым семейством близко родственных генов. У одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas* оказалось два гена α-тубулина и два гена β -тубулина, а у плодовой мушки *Drosophila-no* четыре и того и другого. Аминокислотные по-

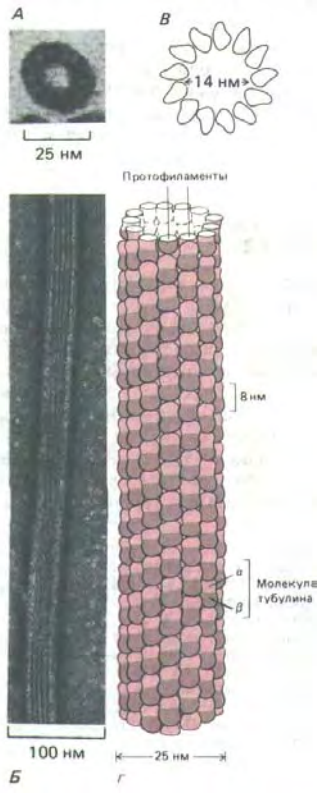


Рис. 11-52. *А.* Электронная микрофотография поперечного среза микротрубочки, где видно кольцо из 13 субъединиц, каждая из которых соответствует отдельной молекуле тубулина. *Б.* Электронная микрофотография микротрубочки (негативный контраст). *В и Г.* Схемы строения микротрубочки, показывающие, как молекулы тубулина образуют стенку цилиндра. В-13 молекул на поперечном разрезе микротрубочки; *Г* - вид сбоку короткого отрезка микротрубочки с уложенными в продольные ряды *(протофиламенты)* молекулами тубулина. Каждый из 13 протофиламентов состоит из цепи молекул тубулина, представляющих собой αβ-гетеродимеры. Микротрубочка-полярная структура; разные концы молекулы тубулина (α и β) обращены к разным концам микротрубочки. [С любезного разрешения Richard Linck *(А)* и Rolley Williams (Б); Г-по данным Linda Amos.]

следовательности тубулинов у разных организмов также очень сходны, хотя они не столь консервативны, как у актина: β-тубулин дрожжей, например, на 70% идентичен с куриным β-тубулином, тогда как актины этих видов имеют более 90% идентичных аминокислотных остатков.

Необычайная эволюционная консервативность актина и тубулина может, по крайней мере отчасти, быть следствием структурных ограничений, которые накладываются связыванием их с многочисленными (и разнообразными) белками. Молекулы тубулина, так же как и актина, взаимодействуют не только между собой, но и со многими вспомогательными белками. Как мы увидим, эти белки модифицируют свойства микротрубочек и соединяют их с другими структурами клетки. По-видимому, большинство случайных мутационных изменений нарушают хотя бы одну из функций микротрубочек или актиновых филаментов и поэтому оказываются вредными для организма.

Все ныне известные тубулины, будучи смешаны in vitro, образуют одинаковые микротрубочки. Тем не менее кажется вероятным, что некоторые вариации в структуре тубулинов имеют для клетки функциональное значение. В частности, у высших позвоночных участки тубулинов обоих типов (α и β), содержащие необычно много кислых аминокислотных остатков, обнаруживают явные тканеспецифические различия. Эта область в молекулах тубулина, как полагают, участвует в связывании *вспомогательных белков,* и изменения ее аминокислотной последовательности могут изменять функции микротрубочек, влияя на связывание этих белков.

11.3.4. Вдоль стенки дублета микротрубочек проходит длинная тонкая нить [32]

Хотя большинство микротрубочек состоит, по-видимому, только из субъединиц тубулина, для построения специальных видов микротрубочек (каковы, например, дублеты микротрубочек в ресничке) используются дополнительные белки. Если заставить микротрубочки ресничек или жгутиков диссоциировать в разбавленном солевом растворе, то из такой смеси удается выделить особенно устойчивые фрагменты субфибриллы А-ленты, состоящие из двух-четырех протофиламентов. Помимо тубулина эти фрагменты содержат белок *тектин,* образующий длинные нити толщиной 2-3 нм, видимо, родственные промежуточным филаментам. Тектиновые филаменты вытянуты вдоль стенки дублета микротрубочек и, вероятно, способствуют образованию общей стенки А- и В-субфибрилл. Как полагают, эти филаменты или какие-то еще не известные нитевидные молекулы определяют расположение на микротрубочках специальных периодических структур, которые будут описаны ниже.

11.3.5. Аксонема ресничек и жгутиков содержит белковые связки, «ручки» и «спицы» [33]

В аксонеме с микротрубочками связано много других белковых структур, взаимодействие которых обеспечивает ресничку энергией и дает возможность использовать эту энергию для волнообразных движений. Пожалуй, самые важные из этих структур - короткие боковые выступы («ручки»), отходящие от каждого дублета микротрубочек внешнего кольца по направлению к соседнему дублету (рис. 11-53). Пары таких выступов располагаются по всей длине субфибриллы А с интервалами в 24 нм. Они состоят из белка, называемого *динеином,* и, как мы увидим, играют важную роль в движении ресничек и жгутиков. Другой белок – *нексин* - образует между соседними дублетами поперечные связи, рас-

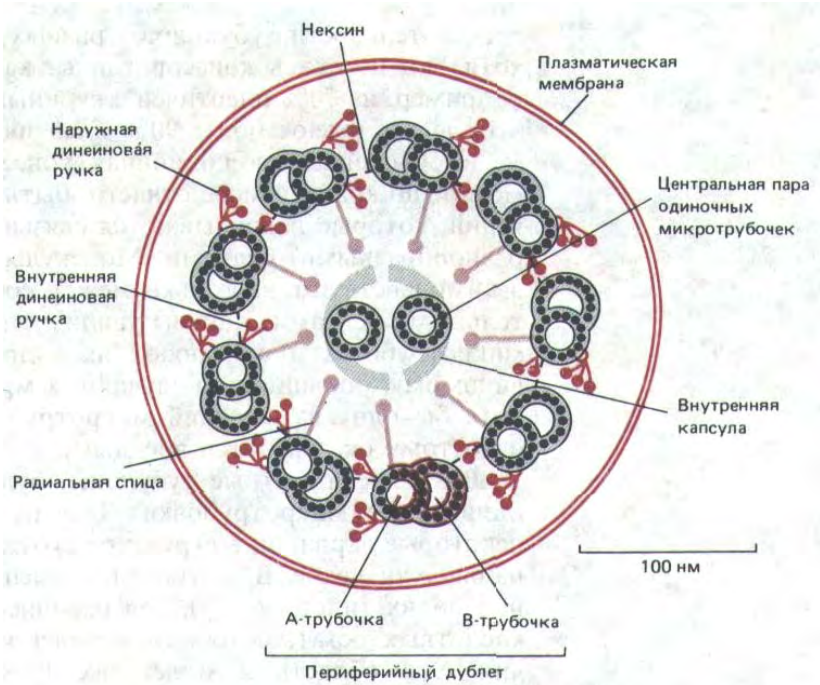


Рис. 11-53. Схема поперечного среза реснички (соответствующая микрофотографии на рис. 11-51). Вдоль всей реснички с определенной периодичностью расположены различные структуры, отходящие от микротрубочек (см. табл. 11-2).

положенные на несколько большем расстоянии друг от друга, чем динеиновые «ручки»; по-видимому, они весьма эластичны и стягивают аксонему по окружности, ограничивая скольжение соседних микротрубочек.

От каждого наружного дублета внутрь отходит *радиальная «спица»,* доходящая до *внутреннего чехла,* окружающего центральную пару одиночных микротрубочек (рис. 11-53). Если смотреть на аксонему сбоку, то все эти структуры - динеиновые ручки, нексиновые связки, радиальные «спицы» и отростки центрального чехла - предстанут в виде боковых выступов, повторяющихся с характерной для каждой из этих структур периодичностью (табл. 11-2).

Таблица 11-2. Основные белковые структуры аксонемы

Компоненты аксонемы (периодичность расположения вдоль аксонемы)	**Функция**
Тубулин (8 нм) Динеиновые ручки (24 нм)	Главный компонент микротрубочек Выступают из дублетов микротрубочек, взаимодействуют с соседними дублетами, вызывая изгибание
Нексиновые связки (86 нм)	Удерживают соседние дублеты микротрубочек вместе
Радиальные спицы (29 нм)	Тянутся от каждого из 9 наружных дублетов по направлению к центральной паре
Выступы внутреннего чехла (14 нм)	Отходят в виде ряда боковых ручек от центральной пары микротрубочек; вместе с радиальными спицами регулируют характер биения реснички



Рис. 11-54. Электронная микрофотография изолированной аксонемы (из реснички *Tetrahymena),* подвергнутой кратковременному воздействию трипсина с целью частично разрушить белковые связи, поддерживающие ее нормальную структуру. После обработки ATP отдельные дублеты микротрубочек скользят относительно друг друга, что ведет к значительному-вплоть до 9-кратного-увеличению длины аксонемы. (F.D. Warner, D.R. Mitchell, J. Cell Biol. 89: 35-44, 1981. С разрешения Rockefeller University Press.)

11-18

11.3.6, Аксонема движется благодаря скольжению микротрубочек [34]

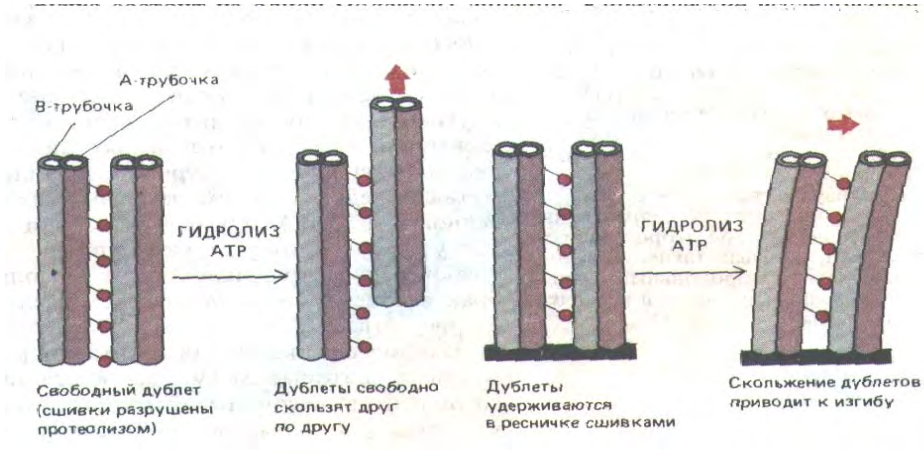
Если жгутик отделить от клетки с помощью лазерного луча, он сохраняет способность производить волнообразные движения. Это означает, что двигательный аппарат находится в самой аксонеме жгутика, а не в его основании (как в случае жгутиков бактерий, см. разд. 12.5.4). Действительно, даже изолированная аксонема может совершать движения в солевом растворе, содержащем ATP.

Изгибание ресничек и жгутиков обусловлено взаимным скольжением микротрубочек. Это было показано в экспериментах, где изолированную аксонему обрабатывали протеолитическими ферментами, которые разрушают нексиновые связки и радиальные спицы, оставляя неповрежденными динеиновые ручки и сами микротрубочки. Если к такой частично «переваренной» аксонеме добавить ATP в концентрации всего лишь 10 мкМ, она начинает удлиняться (причем длина ее может превысить первоначальную в 9 раз); это происходит из-за того, что образующие аксонуму волокна (дублеты) телескопически выдвигаются из ослабленной структуры (рис. 11-54). По-видимому, соседние наружные дублеты активно скользят относительно друг друга, будучи освобождены от скрепляющих боковых сшивок (например, нексиновых). В интактной же структуре это скользящее движение преобразуется в изгиб, что схематически показано на рис. *11-55.*

11.3.7. За скольжение ответствен динеин [35]

Если дублеты микротрубочек способны активно скользить друг по другу, то должна существовать сила, вызывающая это движение. Эта сила не может создаваться нексиновыми сшивками, так как после их разрушения путем протеолиза способность к скольжению сохраняется. Между тем *динеиновые ручки* при протеолизе не разрушаются. Обычно ручки, отходящие от каждого наружного дублета аксонемы, не дотягиваются до соседнего дублета, однако они приходят в соприкосновение с ним, когда ресничка израсходует весь свой запас ATP (рис. 11-56).

Динеин - это крупный белковый комплекс, содержащий две или три (в зависимости от источника) глобулярные головки, соединенные с общим основанием тонкими гибкими нитями (рис. 11-57). Каждая глобулярная головка обладает ATPазной активностью, которая усиливается примерно в шесть раз при ассоциации с микротрубочкой. Вся динеиновая ручка состоит из одной молекулы динеина. Кинетические исследования



Рис, 11-55. Взаимное скольжение двух наружных дублетов микротрубочек *(слева)* приводит к изгибу, если дублеты скреплены на одном из концов *(справа)*. Основания молекул динеина соединены только с А-трубочкой, оставляя головки свободными, так что они могут контактировать с соседней В-трубочкой. По-видимому, иная структура В-трубочки мешает связыванию с ней основания молекулы динеина. Такая асимметрия в организации молекул динеина необходима, чтобы предотвратить бесплодное «перетягивание каната» между соседними микротрубочками; возможно, именно поэтому каждая из девяти внешних микротрубочек представляет собой дублет А-В.



Рис. 11-56. Электронная микрофотография реснички (после замораживания-травления). Видны динеиновые ручки, отходящие от дублета микротрубочек через равные интервалы. (С любезного разрешения John Heuser.)

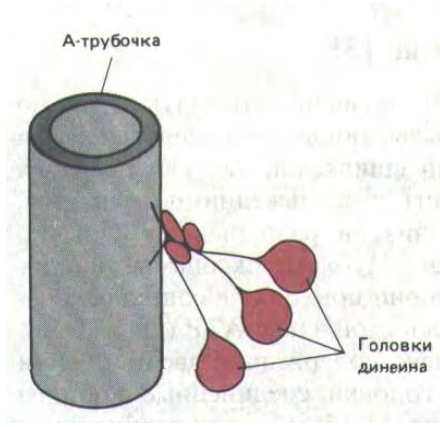


Рис. 11-57. Динеин - крупный белковый комплекс (мол. масса около 2 млн.), в его состав входят от 9 до 12 полипептидных цепей, самая большая из которых с мол. массой около 450 000. Основание молекулы прочно связано с А-трубочкой (это связывание независимо от АТР), тогда как большие глобулярные головки имеют участки для АТР-зависимого присоединения к другой микротрубочке. Когда головки гидролизуют связанный с ними АТР, они движутся по направлению к минус-концу этой второй микротрубочки, вызывая таким образом относительный продольный сдвиг двух соседних дублетов в ресничке или жгутике (см. рис. 11-55).

показывают, что головки, видимо, вызывают скольжение микротрубочек в ресничке с помощью механизма, который в своей основе похож на работу миозиновых головок в мышце (разд. 11.1.10): однонаправленное - от плюс-конца к минус-концу-движение головок динеина по микротрубочке обеспечивается повторными циклами конформационных изменений в каждой головке, обусловленных связыванием и гидролизом АТР. Это движение и создает силу, которая стремится сдвинуть сосед-ний дублет микротрубочек к концу аксонемы (см. рис. 11-55).

11-17
11-19

11.3.8. Скольжение микротрубочек должно регулироваться, чтобы оно могло вызвать изгиб ресничек [36]

Если бы все динеиновые ручки активировались одновременно, как головки миозина в сокращающейся мышце, то аксонема попросту закрутилась бы в тугую спираль. Поэтому для того, чтобы возник локальный изгиб реснички и чтобы этот изгиб распространялся в виде волны от ее основания до самого кончика, должны существовать специальные регуляторные механизмы, координирующие активность молекул динеина. Эта регуляция не может зависеть от потоков Ca^{2+} или других ионов, поскольку аксонема способна изгибаться и после удаления плазматической мембраны. Судя по всему, активация отдельных динеиновых ручек зависит от механических перемещений других компонентов аксонемы, и сигнал передается динеину через белок-белковые взаимодействия. Важную роль играет также упругость жгутика, который в отсутствие активной работы стремится восстановить равновесную конфигурацию всей структуры.

11-20

11.3.9. Аксонему можно изучать генетическими методами [37]

Если выделить аксонемы в очищенном виде и подвергнуть их белки анализу с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (разд. 4.4.5), в них можно обнаружить около 200 различных полипептидов. Изучение функций этих белков и их локализации в аксонеме значительно облегчается при использовании для этой цели мутантних организмов. Излюбленный объект для таких исследований - одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii,* имеющая два жгутика, с помощью которых она плавает (рис. 11-58). Было выделено много мутантов этой водоросли с нарушенной подвижностью. У некоторых из них имеются дефекты в механизме сборки жгутика, и поэтому жгутики не образуются или получаются рудиментарными; у других жгутики есть, но они неподвижны или движутся очень медленно. На электронных микрофотографиях таких мутантных жгутиков можно видеть различные структурные аномалии. У одного класса неподвижных мутантов единственным заметным изменением оказалась потеря динеиновых ручек. У другого класса нет только радиальных спиц, тогда как у третьего отсутствуют одновременно центральная пара микротрубочек и центральная капсула. Изолированные, свободные от мембран аксонемы от мутантов всех трех классов не способны двигаться в присутствии АТР.

Наиболее ценными для понимания работы жгутиков оказались такие мутанты, которые могут двигаться несмотря на утрату некоторых компонентов аксонемы. Выделены, например, медленно плавающие мутанты, у которых нет внутренних или внешних динешювых ручек;

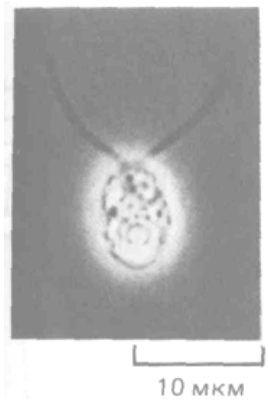


Рис. 11-58. Одноклеточная зеленая водоросль *Chlamydomonas reinhardtii.* Этот организм плавает с помощью двух жгутиков, которые совместно производят хлыстообразные движения, напоминающие гребок пловца (в отличие от жгутика спермия). (С любезного разрешения John Hopkins.)

следовательно, для создания движущего усилия достаточно присутствия одного-любого - типа динеина, но в норме каждый из них вносит свой вклад в подвижность жгутика. Более неожиданными оказались вторичные мутации, которые восстанавливают подвижность неподвижных жгутиков, лишенных центрального дублета или радиальных спиц, без восстановления исчезнувших компонентов. Существование таких мутантов позволяет думать, что отсутствие центрального дублета или комплекса радиальных спиц каким-то образом выключает активность динеиновых ручек, «замораживая» мотор жгутика, а мутация во втором гене «отключает выключатель» и восстанавливает биение аксонемы. Интересно, что подвижные двойные мутанты с дефектной сердцевиной могут двигаться только по жгутиковому типу и не способны к обычным для *Chlamydomonas* хлыстообразным ударам, характерным для ресничек. По-видимому, ресничный тип движения требует более сложной структуры, чем волнообразное движение типичного жгутика (см. рис. 11-50).

Дефекты ресничек и жгутиков встречаются и у человека, например при различных формах наследственного мужского бесплодия, обусловленного неподвижностью спермиев. В зависимости от типа генетической аномалии жгутик спермия может быть лишен динеиновых ручек, головок радиальных спиц или центральной капсулы с одной или обеими центральными микротрубочками. Точно такие же дефекты обнаруживаются в клетках ресничного эпителия этих индивидуумов, и нередко они страдают хроническими респираторными заболеваниями - рецидивирующим бронхитом и хроническим синуситом: из-за нарушенной функции ресничного эпителия у них не происходит надлежащего удаления слизи из бронхов и придаточных пазух носа. Примечательно, что около половины людей, страдающих таким *синдромом неподвижных ресничек,* имеют также весьма редкую особенность - situs inversus viscerum, т. е. обратную симметрию тела, когда сердце расположено справа, печень и аппендикс слева и т.д. (весь комплекс аномалий носит название *синдрома Картагенера).* В связи с этим было высказано предположение, что однонаправленное биение ресничек на ранних стадиях развития организма может играть ключевую роль в определении нормальной асимметрии нашего тела.

Рассмотрев движение ресничек и жгутиков, мы перейдем теперь к вопросу о том, как они образуются.

11.3.10. Центриоли выполняют в клетке две различные функции [38]

Можно оторвать у *Chlamydomonas* пару ее жгутиков так, что центриоли сохранятся; в этом случае жгутики быстро образуются вновь. Почти все необходимые для этого белковые компоненты имеются в растворимой форме в цитоплазме клетки; из них и строятся новые жгутики. Некоторые стадии сборки могут происходить и в бесклеточных экстрактах: молекулы тубулина полимеризуются в микротрубочки (этот процесс мы подробнее рассмотрим в разделе 11.4), а динеиновые ручки могут снова прикрепляться к аксонеме, с которой они были предварительно смыты раствором с высокой ионной силой. Однако сами по себе белки аксонемы не способны восстановить характерную структуру 9 + 2. Для этого необходима «затравка», играющая роль матрицы, на которой происходит дальнейший рост. В клетке такой затравкой служит *центриоль.*

Центриоль - это небольшая цилиндрическая органелла толщиной около 0,2 мкм и длиной 0,4 мкм. Стенку центриоли образуют девять групп из трех слившихся микротрубочек (9 триплетов), причем каждый триплет наклонен в сторону центральной оси под углом 45° к огибающей окружности - как лопатки турбины (рис. 11-59). Соседние триплеты

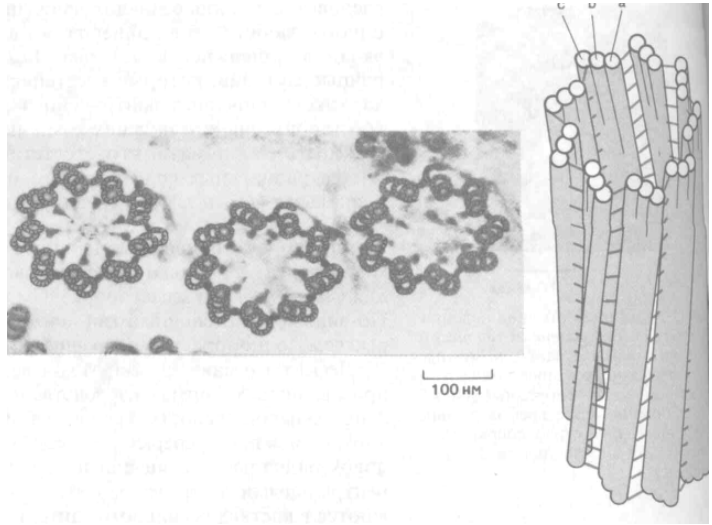


Рис. 11-59. Электронная микрофотография поперечного среза, проходящего через три центриоли в кортексе простейшего. Каждая центриоль (называемая также базальным тельцем) образует нижнюю часть аксонемы реснички. Справа схематическое изображение центриоли. Центриоль состоит из девяти триплетов микротрубочек, причем каждый триплет (c b a) содержит одну полную микротрубочку и две примыкающие к ней неполные микротрубочки. Особые белки образуют поперечные сшивки, поддерживающие цилиндрическую структуру (выделены цветом). (С любезного разрешения D. T. Woodrum, R. W. Linck.)

соединены между собой через определенные интервалы, а на электронных микрофотографиях часто видны бледные белковые «спицы», идущие к каждому триплету из центральной области, что напоминает колесо телеги (рис. 11-59, А). Нередко центриоли бывают объединены в пары, где они расположены под прямым углом друг к другу (рис. 11-60).

Центриоль - неизменный компонент аксонемы реснички, и в этом случае ее по традиции называют *базалъным тельцем.* Специальные отростки, называемые *исчерченными корешками,* соединяют эту центриоль с другими компонентами цитоскелета. При образовании или регенерации каждый дублет микротрубочек аксонемы берет начало от двух из трех микротрубочек триплета центриоли, так что девятилучевая симметрия центриоли сохраняется в строении аксонемы. Данные радиоавтографии указывают на то, что тубулин и другие белки аксонемы пристраиваются к дистальному концу всей структуры, т. е. к плюс-

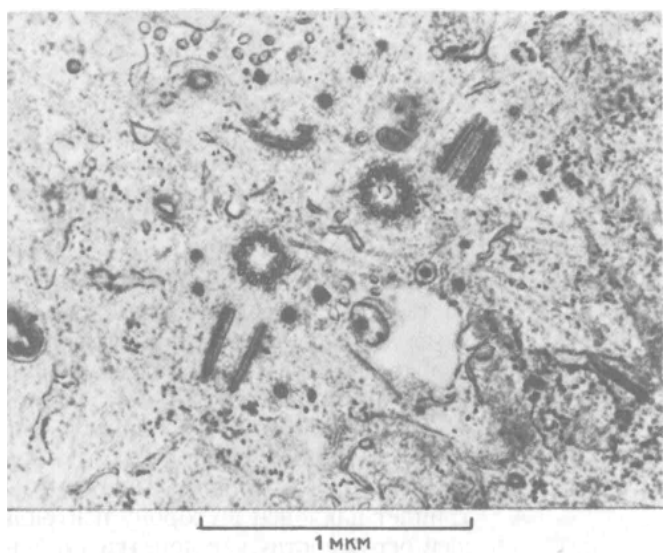


Рис. 11-60. На этой электронной микрофотографии показаны две новые центриоли, которые образовались в результате репликации двух материнских центриолей. На срезе одна центриоль в каждой паре видна в поперечном сечении, а другая в продольном, т.е. в каждой паре центриоли расположены перпендикулярно друг другу. (M. McGill, D. P. Highfield, T. M. Monahan, R. B. Brinkky. J. Ultrastruct. Res. 57: 43-53, 1976.)

концам микротрубочек. Как в аксонеме возникает центральная пара микротрубочек, не известно; в центриоли этой пары нет.

Те центриоли, которые образуют базальные тельца ресничек, выполняют в клетке весьма специализированную функцию, так как реснички сами по себе - структуры специализированные. Наряду с этим почти во всех животных клетках имеется пара центриолей, которая служит как бы срединным элементом *центросомы,* или *клеточного центра.* Центросома (разд. 13.5.2) организует цитоплазматические микротрубочки в интерфазных клетках, а в делящихся клетках удваивается и дает начало двум полюсам митотического веретена (мы обсудим это в следующем разделе). Иногда центриоли могут выполнять поочередно то одну функцию, то другую: у *Chlamydomonas,* например, перед каждым митозом оба жгутика исчезают, а базальные тельца покидают свое место, чтобы стать полюсами веретена.

11.3.11. Новые центриоли обычно возникают путем дупликации уже имеющихся [39]

На фоне непрерывного увеличения массы животной клетки в ходе клеточного цикла выделяются два дискретных акта дупликации: удвоение числа хромосом (репликация ДНК) и удвоение центриолей. В культивируемых фибробластах последний процесс приблизительно совпадает по времени с началом синтеза ДНК. Прежде всего происходит разделение двух «половинок» центриолярной пары, а затем на каждой такой «половинке» достраивается дочерняя центриоль - снова под прямым углом к исходной (рис. 11-60). Незрелая центриоль содержит 9 *одиночных* микротрубочек; по-видимому, каждая микротрубочка затем становится матрицей при сборке триплетов, свойственных зрелой центриоли.

У позвоночных ресничные клетки могут нести сотни ресничек, и центриоли клеток-предшественников обеспечивают образование необходимого числа базальных телец. Например, при дифференцировке клеток ресничного эпителия яйцеводов и трахеи пара центриолей перемещается со своего обычного места около ядра в апикальную область клетки, где будут формироваться реснички. Там, вместо того чтобы образовать, как обычно, одну дочернюю центриоль, каждая материнская центриоль дает начало многочисленным электроноплотным «сателлитам». Из этих сателлитов и образуются затем базальные тельца, которые мигрируют к плазматической мембране, чтобы инициировать там рост ресничек.

Однако известны случаи, когда центриоли, по всей видимости, возникают de novo. Так, хотя неоплодотворенные яйцеклетки многих животных лишены функционирующих центриолей и для первого митотического деления (после оплодотворения) используют центриоли спермиев (разд. 15.4.8), в определенных экспериментальных условиях (резкое нарушение ионного баланса или электрическая стимуляция) они могут образовывать различное число центриолей. Каждая такая центриоль инициирует образование небольшой фигуры звезды, и одна из этих звезд может затем использоваться клеткой для деления; при этом из неоплодотворенной яйцеклетки развивается гаплоидный организм (такой ход событий называется партеногенезом - см. разд. 13.4.8). Вероятно, в цитоплазме неоплодотворенных яйцеклеток имеются какие-то предшественники центриолей, которые при особых обстоятельствах могут превращаться в новые настоящие центриоли.

Необычный способ удвоения центриолей и их непрерывность в длинном ряду клеточных поколений заставили в свое время предположить, что центриоли представляют собой полностью автономные, саморепли-

цирующиеся органеллы. Хотя сейчас мы знаем, что это не так и при определенных условиях они могут образовываться в цитоплазме de novo, возможно все же, что какая-то часть информации, необходимая для формирования центриолей, содержится в них самих (подобно тому как размножение митохондрий и хлоропластов зависит от их собственных, внехромосомных генов-см. разд. 7.5). У *Chlamydomonas* группа генов, которые кодируют белки, участвующие в создании структуры базальных телец и аксонем, находится в дискретном генетическом элементе, и этот элемент передается дочерним клеткам независимо от основных хромосом; его природу и локализацию, однако, еще предстоит выяснить.

Заключение

Реснички и жгутики эукариот содержат цилиндрический пучок из девяти дублетов микротрубочек. Скольжение дублетов относительно друг друга преобразуется в изгиб реснички или жгутика. Силу, сдвигающую дублеты, создают боковые динеиновые ручки, которые тянутся от каждого дублета к соседнему; они используют для этого энергию гидролиза АТР. Ряд вспомогательных белков «увязывает» дублеты в цилиндрическую структуру и ограничивает амплитуду их скольжения. Другие вспомогательные белки образуют своего рода «молекулярна-механическое реле», регулирующее активность динеина таким образом, что изгибание реснички совершается циклически, и это обеспечивает характерное для ресничек биение. Сложная структура аксонемы образуется путем самосборки белковых компонентов, а нуклеацию процесса сборки осуществляет цент-риоль (базальнеє тельце), которая служит матрицей для формирования специфической структуры аксонемы-системы дублетов микротрубочек типа 9 + 2.

11.4. Цитоплазматические микротрубочки [40]

Почти во всех животных клетках актин и тубулин содержатся в больших количествах, но тубулина в них все же, как правило, меньше. Кроме того, поскольку микротрубочки толще, чем актиновые филаменты, для образования полимера одинаковой длины тубулина требуется примерно в 10 раз больше, чем актина (см. табл. 11-4). Поэтому общая длина актиновых филаментов в клетке по крайней мере в 30 раз больше общей длины микротрубочек. Это отражает фундаментальную разницу в структурной организации и функциях этих двух цитоскелетных полимеров: в то время как актиновые филаменты образуют соединенные сшивками сети и небольшие пучки в периферической цитоплазме, микротрубочки обычно существуют в виде отдельных нитей, которые расходятся в стороны через всю цитоплазму из небольшой области вблизи ядра. Микротрубочки образуют систему волокон, по которой могут перемещаться различные пузырьки и другие органеллы, ограниченные мембраной; тем самым они влияют на полярность клетки, могут регулировать ее форму и движение и определяют ориентацию плоскости клеточного деления.

11.4.1. Микротрубочки - это высоколабильные структуры, чувствительные к антимитотическим агентам [41]

Многие системы микротрубочек в клетках весьма лабильны, причем эта лабильность важна для их функции. Один из наиболее ярких примеров-митотическое веретено, которое образуется после того, как в начале митоза микротрубочки цитоплазмы распадаются (разд. 13.5.2).

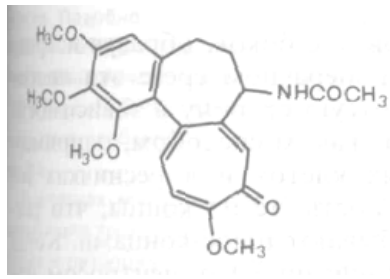


Рис 11-61. Химическая структура колхицина.

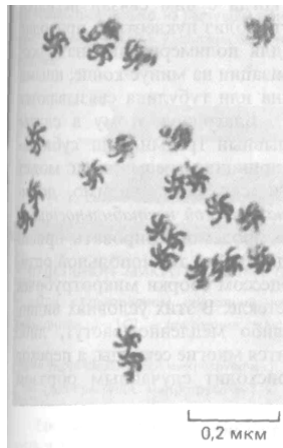


Рис. 11-62. Полярность микротрубочек, выявленная методом «навешивания крючков». В данной группе все микротрубочки (они видны на этой электронной микрофотографии в поперечном разрезе) имеют одинаковую полярность. Крючки, образованные присоединившимися сбоку молекулами тубулина, изогнуты по часовой стрелке, и это означает, что мы смотрим на микротрубочки вдоль в направлении от плюс-конца к минус-концу. Полярность микротрубочки можно также выявить путем присоединения молекул динеина (не показано). (По U. Euteneuer, Cell Muscle Motil. 5: 1-82, 1984, с изменениями.)

Таблица 11-3. Некоторые вещества, связывающиеся с тубулином (антимитотические агенты)

Вещество	**Механизм действия**
Колхицин, колцемид, нокодазол	Ингибируют присоединение молекул тубулина к микротрубочкам, вызывая деполимеризацию последних
Винбластин, винкристин	Вызывают образование паракристаллических агрегатов тубулина, что приводит к деполимеризации микротрубочек
Таксол	Стабилизирует микротрубочки, прочно связываясь с полимером

Микротрубочки митотического веретена пребывают в состоянии необычайно быстрой сборки и разборки, что объясняет крайнюю чувствительность веретена к различным препаратам, способным связываться с тубулином (разд. 13.5.2). Один из алкалоидов безвременника осеннего, *колхицин,* использовался в лечебных целях еще древними египтянами. Молекулы колхицина (рис. 11-61) прочно связываются с молекулами тубулина (образуя эквимолярный комплекс) и препятствуют тем самым их полимеризации; поэтому обработка делящихся клеток колхицином вызывает через несколько минут исчезновение митотического веретена и блокирует клетки в митозе. Вещества, обладающие подобным действием, называются *антимитотическими агентами* (табл. 11-3). Во многих случаях их действие обратимо, и удаление препарата дает возможность веретену образоваться вновь, а митозу завершиться. Так как разрушение микротрубочек веретена избирательно убивает многие быстро делящиеся клетки, ряд антимитотических препаратов, в частности вин-бластин и винкристин, широко используются в терапии рака.

Другое вещество - таксол - оказывает противоположное действие. Он прочно связывается с микротрубочками и стабилизирует их. Будучи добавлен к клеткам, он заставляет значительную часть тубулина включиться в микротрубочки. Подобно тому как стабилизация актиновых филаментов фаллоидином останавливает миграцию клеток, стабилизация микротрубочек таксолом фиксирует делящиеся клетки в митозе.

Так же как и полимеризация актиновых филаментов, сборка микротрубочек имеет сложную кинетику, что играет важную роль во многих клеточных процессах. Большая часть наших знаний о динамическом поведении микротрубочек была получена при изучении полимеризации очищенного тубулина in vitro.

11.4.2. Противоположные концы микротрубочек различны и растут с разной скоростью [42]

Мы уже говорили о том, что микротрубочки обладают полярностью: мономеры тубулина в них определенным образом ориентированы. Как и в случае актиновых филаментов, структурная полярность микротрубочек обусловливает различия между их двумя концами, важные для понимания того, как образуются микротрубочки в клетках. Если растворенному тубулину дать возможность некоторое время полимеризовать-ся на фрагментах аксонемы, а затем исследовать в электронном микроскопе то, что получилось, будет видно, что одни концы микротрубочек удлиняются втрое быстрей других. Быстро растущие концы были названы *плюс-концами,* а медленно растущие -*минус-концами.*

Полярность микротрубочек можно определить и на их поперечных срезах, если предварительно добавить к ним растворенные молекулы тубулина; в определенных условиях мономеры тубулина будут при-

соединяться к микротрубочкам не с концов, а с боков, образуя искривленные листки из протофиламентов. На поперечном срезе эти листа напоминают крючья, загнутые в ту или другую сторону в зависимости от полярности микротрубочки (рис. 11-62). Таким способом, например, удалось показать, что в аксонах нервных клеток и в ресничках все микротрубочки имеют одинаковую полярность: те их концы, что расположены дальше от тела клетки, всегда бывают плюс-концами. Когда микротрубочки растут от центров их организации (от центросом или полюсов веретена), их плюс-концы тоже всегда обращены вперед по направлению роста (рис. 11-63).

11-23

11.4.3. Гидролиз нуклеотида усиливает нестабильность медленно растущих микротрубочек [43]

В некоторых отношениях сборка молекул тубулина в микротрубочкя напоминает полимеризацию актина. Она самопроизвольно протекает in vitro и в норме сопровождается гидролизом одной молекулы связанного нуклеотида на каждый присоединенный мономер (нуклеотид в случае сборки тубулина - не ATP, а GTP, см. табл. 11-4). Энергия, освобождаемая при гидролизе нуклеотида, для полимеризации не нужна: тубулин благополучно полимеризуется и тогда, когда с ним связан негидролизуемый аналог GTP-GTPγS. Однако гидролиз нуклеотида приводит к тому, что критическая концентрация для полимеризации на плюс-конце оказывается ниже, чем для полимеризации на минус-конце; иными (словами, с плюс-концом мономеры актина или тубулина связываются прочнее (см. схему 11-1 в разд. 11.2.10). Благодаря этому в случае актиновых филаментов возможен непрерывный тредмиллинг субъединиц по полимеру (разд. 11.2.10). Хотя в принципе тредмиллинг может происходить и в микротрубочках, фактически здесь, видимо, доминирует явление, получившее название *динамической нестабильности.*

Динамическую нестабильность можно продемонстрировать просто с помощью светового микроскопа, оборудованного темнопольной оптикой и видеоприставкой, наблюдая за процессом сборки микротрубочек из очищенного тубулина на предметном стекле. В этих условиях видно, что концы отдельных микротрубочек либо медленно растут, либо быстро укорачиваются; каждая стадия длится многие секунды, а переход ; от роста к укорочению и обратно происходит случайным образом

Таблица 11-4. Сравнение полимеров актина и тубулина

	Актин	**Тубулин**
Мол. масса полипептида	42000	50000 (α-тубулин) 50000 (β-тубулин)
Неполимерная форма	Глобулярный мономер	Глобулярный димер (1α +1β)
Нуклеотид, связываемый неполимерной формой	ATP (1 на мономер)	GTP (2 на димер)
Структура полимера	Спиральная нить	Полая трубка из 13 протофиламентов
Толщина фибриллярной структуры	8 нм	25 нм
Число субъединиц на 1 мкм длины полимера	370 мономеров	1600 димеров
Мол. масса на 1 мкм длины полимера	370 x 42000 = 15,5 x 10^6	1600 x 100000 =160 x 10^6

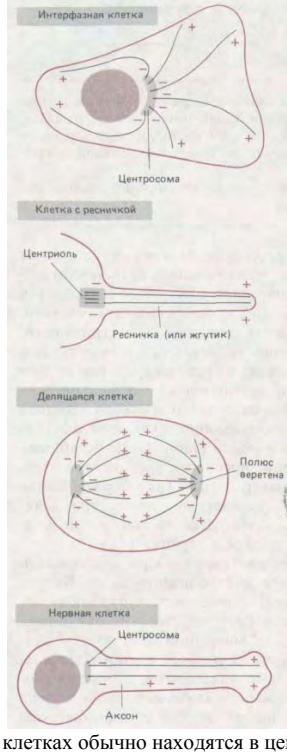


Рис. 11-63. Минус-концы микротрубочек в клетках обычно находятся в центре организации микротрубочек, а плюс-концы часто располагаются вблизи плазматической мембраны.

НАБЛЮДАЕМОЕ ПОВЕДЕНИЕ МИКРОТРУБОЧЕК

Микротрубочки - динамичные структуры, и процессы их сборки и разборки определяют, где и когда они будут существовать в клетке. Подобно актиновым филаментам, они растут за счет обратимого присоединения субъединиц, которое сопровождается их информационным изменением и гидролизом нуклеотида (см. схему 11-1 в разд. 11.2.10). Однако полимеризация микротрубочек имеет некоторые особенности, отличающие ее от сборки актиновых филаментов.

В клетках минус-концы микротрубочек прочно связаны с центрами организации микротрубочек, что предотвращает (или контролирует) сборку и разборку субъединиц на этих концах (разд. 11.4.4). Поэтому мы будем рассматривать только плюс-концы. In vitro плюс-конец отдельной микротрубочки самопроизвольно переходит от состояния *медленного роста* к состоянию *быстрого укорочения* и обратно, причем каждое состояние продолжается много секунд. В любой данный момент популяция микротрубочек в целом состоит из полимеров двух типов, переходы между которыми происходят относительно медленно:

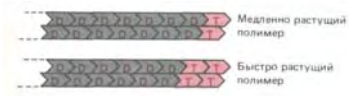


Это поведение, названное динамической нестабильностью, можно объяснить, если вспомнить, как влияет на полимеризацию задержка гидролиза GTP.

СТРУКТУРНАЯ ОСНОВА ДИНАМИЧЕСКОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТИ

Изменения, которые происходят с молекулами тубулина при их полимеризации, в основе своей такие же, как и в случае с актином. Поэтому мы воспользуемся теми же обозначениями, что и в схеме 11-1: T будет означать мономер, несущий GTP, T — субъединицу в составе полимера, уже претерпевшую конформационное изменение, но все еще с GTP (до его гидролиза), а D - субъединицу в составе полимера, несущую GDP (после гидролиза GTP).

Поскольку гидролиз GTP осуществляется лишь после включения субъединицы в полимер, субъединицы типа T будут обычно обнаруживаться только на растущем конце мТIкротрубочки. Эта "шапка' из субъединиц типа T должна быть тем больше, чем быстрее растет трубочка:



Так как субъединицы типа D диссоциируют легче, чем T, всякий конец, потеряв "шапку" из T, начнет терять субъединицы (деполимеризоваться) с большей скоростью. (От конца с D микротрубочки отделяются примерно в 100 раз быстрее, чем от конца с T. Поэтому, если началась быстрая деполимеризация, новой T шапке образоваться трудно. Вдобавок микротрубочки, видимо, могут претерпевать дальнейшее структурное изменение, в результате которого они теряют способность легко присоединять субъединицы тубулина.



В показанном здесь случае "шапка" на микротрубочке зачастую так и не образуется, и тогда микротрубочка продолжает укорачиваться вплоть до полного распада.

У ОТДЕЛЬНОЙ МИКРОТРУБОЧКИ СТАЦИОНАРНОЕ СОСТОЯНИЕ ОТСУТСТВУЕТ

При стационарном состоянии концентрация свободных субъединиц - [C] -постоянна, так что

[доля укорачивающихся микротрубочек] x [скорость деполимеризации] =
= [доля растущих микротрубочек] x [скорость полимеризации]

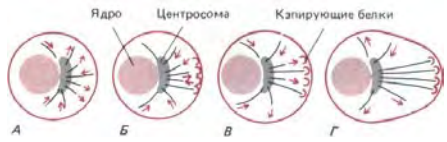
Так как скорость деполимеризации гораздо выше скорости роста, в любой момент времени много микротрубочек растет и лишь малая доля их укорачивается. Критической концентрации свободного тубулина, при которой отдельная микротрубочка имела бы неизменную длину, просто не существует; вместо этого в широком диапазоне [C] мы находим смесь растущих и укорачивающихся микротрубочек. Хотя при высоких [C] наблюдаемая доля растущих микротрубочек возрастает, каждая отдельная микротрубочка (в отличие от актинового филамента) никогда не достигает стабильного "стационарного состояния".

ВАЖНОСТЬ "ЗАЩИТЫ" КОНЦОВ ПОЛИМЕРА

Из-за своей динамической нестабильности вновь организованная микротрубочка сможет сохраниться лишь в том случае, если оба конца защищены от деполимеризации. Минус-концы микротрубочек в клетках обычно защищены тем центром организации микротрубочек, из которого они растут, а некоторые плюс-концы, как полагают, прикрыты специальными белками, контролирующими стабильность, а тем самым и расположение микротрубочек в клетке. Так, в неполяризованной клетке *(А)* новые микротрубочки могут расти и укорачиваться равновероятно во всех направлениях от центросомы. Затем какая-то часть их вступает в определенном участке в контакт со структурами клеточного кортекса, которые могут кэпировать свободные плюс-концы микротрубочек *(Б)*. Избирательная стабилизация тех микротрубочек, которые случайно столкнулись с этими кэпирующими структурами, приведет в результате к быстрому перераспределению всей массы микротрубочек и превращению клетки в полярную *(В* и Г).

Схема 11-2. Полимеризация микротрубочек.

Вообще говоря, можно было бы ожидать, что и актиновые филаменты будут проявлять динамическую нестабильность. Однако концы этих филаментов устроены много проще, чем концы микротрубочек, и сами филаменты, судя по всему, так легко переходят от фазы роста к фазе укорочения и обратно, что их поведение выглядит иначе — см. схему 11-1.



(рис. 11-64). Вероятное объяснение этой динамической нестабильное приведено на схеме 11-2. Как полагают, это следствие «запаздывающего» гидролиза GTP, происходящего при сборке микротрубочки. При ее быстром росте присоединение молекул тубулина к полимеру идет быстрее, чем гидролиз связанных с ними молекул GTP. В результате на растущем конце микротрубочки образуется «шапочка» из GTP; а так как молекулы тубулина, несущие GTP, связываются между собой с большим сродством, чем несущие GDP, эта «шапочка» благоприятствует дальнейшему росту микротрубочки. Если же микротрубочка почему-либо лишится своей шапочки из GTP (например, вследствие замедлении полимеризации), то она начнет укорачиваться и будет склонна продолжать укорачиваться и дальше. Следует отметить, правда, что укорочению микротрубочек, по-видимому, существенно способствуют и другие факторы, например устойчивое искажение упаковки тубулина, обычно возникающее на конце микротрубочки (см. схему 11-2).

Как мы сейчас увидим, динамическая нестабильность позволяет клетке контролировать расположение своих микротрубочек с помощью специальных цитоплазматических структур, которые связываются с концами микротрубочек и стабилизируют их.

11-24

11.4.4. Большинство микротрубочек в животных клетках растет от центросомы, которая служит центром организации микротрубочек [44]

Микротрубочки в цитоплазме интерфазной клетки, растущей in vitro, можно увидеть, если клетку зафиксировать и окрасить флуоресцентными антителами к тубулину. Наиболее густо они расположены вокруг ядра, откуда расходятся радиально к периферии в виде тонких переплетенных нитей (рис. 11-65, *А*). Откуда начинается рост микротрубочек в клетке, становится ясно, если их деполимеризовать с помощью колхицина, а затем позволить вырасти заново (рис. 11-65, *Б*). Регенерирующие микротрубочки вначале появляются в виде небольшой околоядерной лучистой структуры, называемой *звездой.* Затем ее лучи удлиняются по направлению к периферии клетки, пока не восстановится их первоначальное распределение. Если пометить микротрубочки культивируемой клетки тубулиновыми «крючками» (для определения полярности), можно увидеть, что у всех у них плюс-концы обращены в сторону *от* **центра организации микротрубочек** - точки, в которой образуется звезда, Главным центром образования микротрубочек почти во всех животных клетках служит *клеточный центр,* или **центросома.** Центросома расположена сбоку от ядра и содержит пару центриолей, лежащих под прямым углом друг к другу (в форме буквы L, см. рис. 11-60). Однако не во всех центрах организации микротрубочек есть центриоли. Например, в митотических клетках высших растений концы микротрубочек погружены в слабо структурированную электроноплотную область, где никаких центриолей нет. Центриоли не обнаруживаются также в мейоти-



Рис. 11-64. Изменения длины одной микротрубочки, выявленные с помощью видеосъемки в темном поле микроскопа. Изображения регистрировали с интервалом 1 -2 мин и располагали в последовательном порядке на экране монитора. Два конца проходят через циклы удлинения и укорочения независимо, причем флуктуации на плюс-конце сильнее. (T. Horio и H. Hotani, Nature 321: 605-607, 1986.)

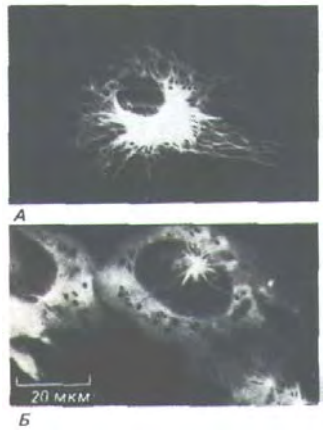


Рис. 11-65. Распределение микротрубочек в культивируемых клетках (иммунофлуоресцентные микрофотографии, окраска антителами к тубулину). *А.* Нормальная клетка. *Б.* Клетки были обработаны колцемидом в течение часа, чтобы деполимеризовать их микротрубочки, после чего им дали возможность восстановиться: микротрубочки появляются вначале как маленькие звездочки, а затем удлиняются по направлению к периферии клетки. *(А-с* любезного разрешения Eric Karsenti и Marc Kirschner; *Б-из* M. Osborn, K. Weber, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 867-871, 1976.)

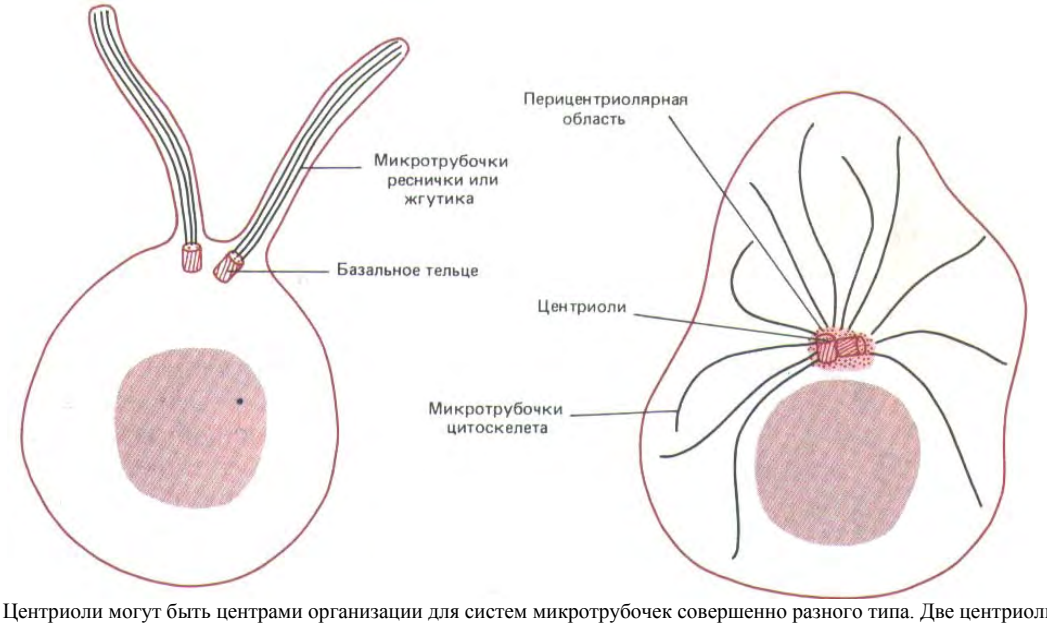


Рис. 11-66. Центриоли могут быть центрами организации для систем микротрубочек совершенно разного типа. Две центриоли в клетке слева служат *базальними тельцами* для аксонем ресничек, тогда как в клетке справа две центриоли образуют часть организующего центра *(центросомы)* для микротрубочек, радиально расходящихся по всей цитоплазме. Обратите внимание, что во втором случае микротрубочки растут не из самой центриоли, а из аморфного перицентриолярного материала.

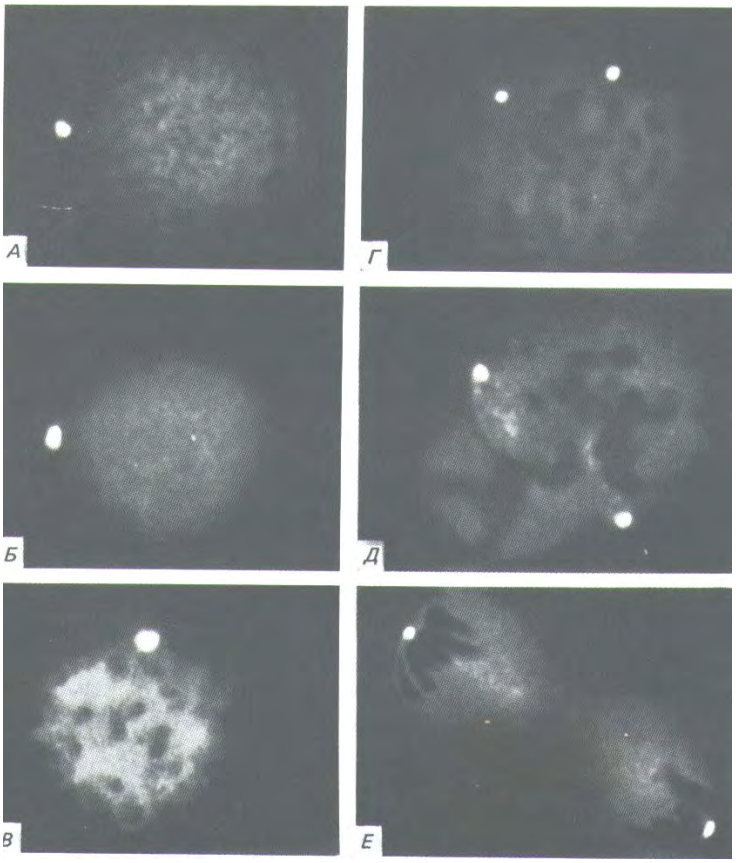


Рис. 11-67. Центросоми в интерфазных и митотических животных клетках, окрашенных флуоресцентными антителами к центросомному белку. Эти микрофотографии иллюстрируют удвоение и расхождение центросом в процессе деления клетки. *А* и Б-интерфаза; *В* и *Г*-профаза; Д-метафаза; Е-телофа-за. Описание стадий митоза см. в разд. 13.5.1. (S. L. Brenner, B.R. Brinkley, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46: 241-254, 1981. С любезного разрешения Bill Brinkley.)

ческом веретене мышиных ооцитов, хотя позже в ходе развития эмбриона они появляются.

Таким образом, в отличие от аксонемы ресничек, которая вырастает непосредственно из края центриоли (разд. 11.3.10), цитоплазматические микротрубочки прямо от центриоли не растут: для их нуклеации необходимо только облако окружающего центриоль аморфного материала (рис. 11-66). Из чего он состоит, в точности не известно, однако антителами к одному из его белковых компонентов можно окрашивать центр организации микротрубочек как в растительных, так и в животных клетках; значит, этот белок эволюционно очень консервативен (рис. 11-67). Если центросомы (центриоли вместе с перицентриолярным веществом) выделить из клетки и смешать с очищенным тубулином, они будут быстро инициировать сборку микротрубочек in vitro. В таких микротрубочках, как и в образующихся in vivo, минус-концы погружены в перицентриолярное вещество. При этом каждая изолированная центросома, по-видимому, может дать начало строго определенному числу микротрубочек, и это число близко к тому, которое образует центросома в соответствующей клетке (например, в интерфазном фибробласте - около 250). Создается впечатление, что центросома имеет фиксированное число нуклеирующих элементов.

У растений и простейших встречаются разные типы центров организации микротрубочек. Например, клеточный рот инфузорий снабжен корзинкой - сложной структурой, которая играет роль глотки и состоит из рядов микротрубочек, расходящихся от нижней поверхности трехслойной пластинки (рис. 11-68). С самого начала процесса сборки эти микротрубочки расположены в виде гексагональной решетки: по-видимому, этот центр организации содержит соответственно упорядоченную систему нуклеирующих элементов.

11-25

11.4.5. Динамическая нестабильность микротрубочек может служить одной из основ клеточного морфогенеза [45]

В животных клетках цитоплазматические микротрубочки расходятся во всех направлениях от центросомы, к которой прикреплены их минус-концы. Однако большинство животных клеток обладает полярностью. и сборка молекул тубулина в них регулируется таким образом, что многие микротрубочки направляются к определенным участкам клетки. Еще не вполне ясно, как это достигается, но кажется вероятным, что механизм этого процесса основан на динамической нестабильности микротрубочек.

Как мы уже видели, in vitro отдельные микротрубочки чаще всего находятся в одном из двух состояний: в состоянии постепенного роста или же быстрой, «катастрофической» деполимеризации. В клетке они тоже, по-видимому, существуют в этих двух состояниях. Например, в интерфазных фибробластах в культуре среднее время жизни микротрубочи весьма мало, менее 10 мин. Это означает, что весь массив расходящихся от центросомы микротрубочек непрерывно обновляется - одни микротрубочки деполимеризуются, но вместо них вырастают новые.

Присущая микротрубочкам нестабильность позволяет объяснить, как может регулироваться их рост в определенных нужных направлениях в ползущей клетке, например, к переднему краю, а в делящейся к конденсированным хромосомам (разд. 13.5.4). Микротрубочка, у которой оба конца «открыты», в цитоплазме быстро исчезает. Однако центр организации все время порождает новые трубочки. Они направлены случайным образом, а их минус-концы защищены от деполимеризации,

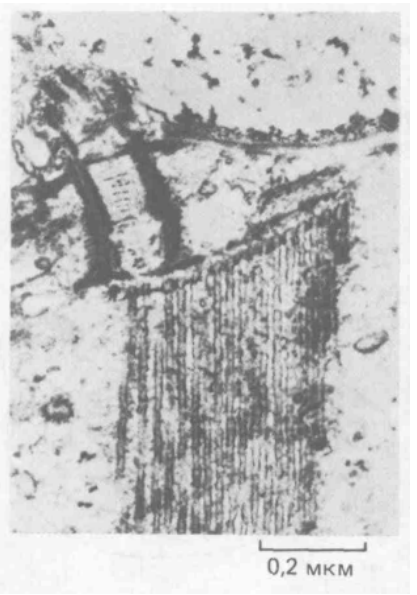


Рис. 11-68. Большой и необычайно упорядоченный центр организации микротрубочек в области ротовой корзинки (цитофаринкса) инфузории *Nassula.* Микротрубочки растут регулярным гексагональным пучком от поверхности плоского трехслойного листка, образующего один из элементов сложного ротового аппарата этой клетки. (J. B. Tucker, J. Cell Sci. 6: 385-429, 1970.)

так как заякорены в центре организации. Растущая из такого центра микротрубочка может стать стабильной при условии, что ее плюс-конец окажется каким-то образом закрыт - «кэпирован» - и поэтому не будет распадаться. Если микротрубочку кэпировала структура, находящаяся в определенном участке клетки, то между этой структурой и центром организации микротрубочек образуется довольно устойчивая связь. Таким образом, микротрубочки, берущие начало в своем центре организации, могут избирательно стабилизироваться событиями, происходящими в других участках клетки. Как полагают, именно таким путем какие-то не известные пока структуры или факторы, локализованные в определенных областях клеточного кортекса и «захватывающие» плюс-концы микротрубочек, влияют на полярность клеток. Аналогичным образом могла бы определяться и плоскость деления клетки (разд. 13.5.13).

Во многих клетках первоначальная стабилизация микротрубочек путем кэпирования их плюс-концов в дальнейшем закрепляется другими механизмами, обеспечивающими более устойчивую поляризацию клетки. К рассмотрению этих механизмов мы сейчас и перейдем.

11.4.6. Микротрубочки постепенно «созревают» благодаря посттрансляционным модификациям, которым подвергаются их тубулиновые субъединицы [46]

Непрерывное образование и исчезновение микротрубочек характерно: для клеток, претерпевающих значительную внутреннюю реорганизацию, например делящихся или ползущих по субстрату. Если же клетки становятся частью сформировавшейся ткани, их микротрубочки превращаются в относительно постоянные структуры, особенно в таких клетках, которые, дифференцировавшись, больше уже не делятся (например, нейронах). Это своеобразное «созревание» микротрубочек отчасти зависит от посттрансляционной модификации молекул тубулина и отчасти - от взаимодействия со специфическими белками, ассоциированными с микротрубочками.

Ряд ферментов модифицирует определенные аминокислоты в тубулине. Один из них - тубулин-ацетилтрансфераза, ацетилирующая один из лизиновых остатков α-тубулина. У *Chlamydomonas* этот фермент находится главным образом в аксонеме жгутика; по-видимому, он ацетилирует молекулы тубулина после их присоединения к дистальному концу аксонемы (разд. 11.3.2). Специфическая дезацетилаза содержится в цитоплазме и удаляет ацетильные группы с неполимерного тубулина. В результате такой локализации этих двух ферментов у *Chlamydomonas* молекулы тубулина в микротрубочках аксонемы ацетилированы, а в цитоплазматических микротрубочках, большая часть которых быстро обновляется, в основном неацетилированы. Ниже мы еще коснемся вопроса о возможных последствиях ацетилирования тубулина.

Второй, менее обычный способ модификации тубулина - это удаление С-концевого тирозина у молекул α-тубулина, включенных в микротрубочку. Отщепление тирозина катализируется специальным ферментом, имеющимся в цитоплазме многих клеток позвоночных. Как и в случае ацетилирования, есть и фермент, осуществляющий обратную реакцию-восстановление тирозина на С-конце деполимеризованных молекул тубулина. В клетках с быстро обновляющимися микротрубочками большинство молекул тубулина находится в их составе в исходной форме (с тирозином), так как просто не успевают детирозилироваться до отделения от полимера. Зато все более «старые» микротрубочки-те, что «сумели сохраниться» за короткое время обновления,-оказываются обогащены детирозилированным тубулином. Таким образом, и ацети-

лирование, и детирозилирование служат маркерами превращения микротрубочек из временно стабилизированной формы в гораздо более устойчивую (рис. 11-69). Если культуру фибробластов обработать препаратом, вызывающим деполимеризацию микротрубочек (разд, 11.4.1), то окажется, что немногие сохранившиеся микротрубочки способны избирательно связывать антитела, узнающие ацетилированную или детирозилированную форму тубулина.

Микротрубочки, образующиеся из ацетилированного и детирозили-рованного тубулина in vitro, ничуть не более устойчивы, чем образованные из обычного, немодифицированного тубулина; значит, модификации, видимо, служат лишь «сигналом» для связывания специфических белков, которые уже стабилизируют микротрубочки и изменяют их свойства в клетках.

11.4.7. Свойства цитоплазматических микротрубочек изменяются под влиянием белков, которые с ними связаны [47]

Посттрансляционные модификации тубулина, во-первых, маркируют микротрубочки как «зрелые» и, во-вторых, способствуют их стабилизации. Однако наиболее значительные и важные модификации, которым подвергаются микротрубочки, обусловлены присоединением к ним других белков. Эти- **белки, ассоциированные с микротрубочками** (БАМ, или MAPs-microtubule-associated proteins), повышают устойчивость микротрубочек к деполимеризации и обеспечивают взаимодействие их с другими компонентами клетки. Зная, сколь разнообразны в клетках функции микротрубочек, можно ожидать, что должно существовать много разных видов БАМ.

Две важные группы БАМ, которые можно выделить из мозга вместе с микротрубочками, - это *высокомолекулярные* белки (с мол. массой около 200-300 тыс. и даже больше) и *тау-белки* (с мол. массой 40-60 тыс.). Белки обеих групп имеют два домена, один из которых ответствен за связывание с микротрубочками; так как этот домен соединяется одновременно с несколькими неполимерными молекулами тубулина, БАМ ускоряют нуклеацию микротрубочек in vitro. Другой домен, как полагают, обеспечивает взаимодействие микротрубочек с другими клеточными компонентами (рис. 11-70). И высокомолекулярные БАМ, и тау-белки «сидят» на микротрубочках цитоплазмы по всей их длине, что показано с помощью антител к этим белкам.

Выделено уже немало белков, которые избирательно связываются с микротрубочками. Функции большинства из них не известны. Некоторые, вероятно, играют роль структурных компонентов, стабилизируя микротрубочки и обеспечивая постоянную связь их с другими

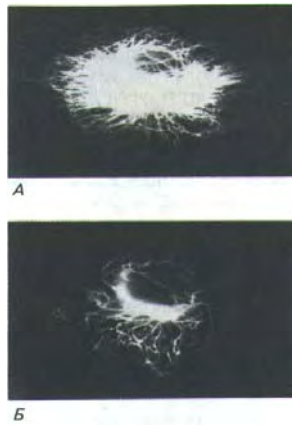


Рис. 11-69. Иммунофлуоресцентные микрофотографии, на которых видно, что одни микротрубочки в цитоплазме культивируемой клетки весьма динамичны *(А),* а другие относительно стабильны *(В).* В клетку инъецировали тубулин, ковалентне связанный с небольшой молекулой - биотином; через час клетку окрашивали сначала меченными флуоресцеином антителами к биотину, а затем антителами к тубулину, меченными другим флуоресцентным красителем - родамином. Быстро обновлявшиеся микротрубочки включали биотинилированный тубулин и поэтому выявлялись антителами к биотину *(А),* которые покрывали микротрубочки и препятствовали связыванию антител к тубулину. В стабильные микротрубочки биотинилированный тубулин не включался, поэтому они не окрашивались антителами к биотину, но зато красились антителами к тубулину *(Б).* Стабильные микротрубочки окрашиваются также антителами, узнающими детирозилированный или ацетилированный тубулин. (С любезного разрешения Eric Schulze и Marc Kirschner.)

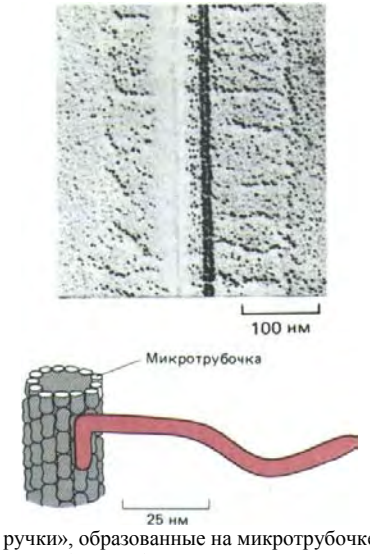


Рис. 11-70. Регулярно расположенные «боковые ручки», образованные на микротрубочке крупным ассоциированным с микротрубочками белком (БАМ-2) из мозга позвоночных. На электронной микрофотографии показан участок микротрубочки, с которым связано много молекул БАМ-2. Часть молекулы БАМ-2 отходит от микротрубочки в сторону, как показано на схеме внизу (Фото любезно предоставили William Voter и Harold Erickson.)

компонентами клетки (в том числе с другими элементами цитоскелета и мембранами некоторых органелл); другие же ответственны за перемещение органелл вдоль по микротрубочкам.

11-32

11.4.8. Микротрубочки часто направляют передвижение органелл в цитоплазме [48]

Если мы рассмотрим живую клетку позвоночного животного в фазово-конграстный микроскоп или в микроскоп с дифференциальным интерференционным контрастом (разд. 4.1.5), мы увидим, что ее цитоплазма находится в непрестанном движении. Митохондрии и более мелкие мембранные органеллы за несколько минут успевают изменить свое местоположение в клетке путем характерных периодических *скачков,* которые слишком упорядоченны и направленны, чтобы их можно было спутать со столь же безостановочным броуновским движением-результатом случайного теплового движения молекул. Многие из таких внутриклеточных перемещений происходят в тесной связи с микротрубочками. Если клетку, в которой движутся органеллы, быстро зафиксировать и приготовить из нее срезы для электронной микроскопии, то можно увидеть, что мембрана таких органелл зачастую соединена с микротрубочками цитоплазмы тонкими нитевидными структурами. Можно предположить поэтому, что микротрубочки играют важную роль в подобном движении, хотя, как мы уже говорили (разд. 11.2.4), некоторые перемещения пузырьков в цитоплазме происходят вдоль актиновых филаментов, а не микротрубочек. Наиболее яркой демонстрацией транспортной роли микротрубочек явилось изучение *быстрого аксонного транспорта* в нервных клетках, где перемещение мембранных пузырьков в обоих направлениях по аксону - между телом клетки и нервным окончанием - идет с большой интенсивностью.

11.4.9. Кинезин и цитоплазматический динеин осуществляют движение пузырьков вдоль микротрубочек аксона в противоположных направлениях, используя энергию гидролиза ATP [49]

Гигантский аксон кальмара можно извлечь из тела животного, а его цитоплазму выдавить, как зубную пасту из тюбика. Если капельку выдавленной аксоплазмы расплющить покровным стеклом и заснять через микроскоп на видеопленку (разд. 4.1.6), то можно увидеть, как органеллы движутся вдоль тонких нитевидных «дорожек». Методом иммунофлуоресценции в сочетании с электронной микроскопией удается показать, что эти «дорожки» представляют собой отдельные микротрубочки.

Выделенные внутриклеточные пузырьки и даже искусственные частицы вроде полистироловых шариков способны связываться с микротрубочками в выдавленной аксоплазме и двигаться вдоль этих микротрубочек практически так же, как это происходит в живой клетке. Поскольку выдавленная аксоплазма больше не укрыта плазматической мембраной, можно без труда изменять содержание в ней различных ионов и низкомолекулярных веществ и исследовать их влияние на аксонный транспорт. Таким образом было показано, что AMPPNP-негидролизуемый аналог ATP - останавливает транспорт и фиксирует органеллы в неподвижном, связанном с микротрубочками состоянии.

Такой эффект AMPPNP позволяет выявить компоненты, ответственные за перемещение пузырьков. При поиске в экстрактах аксоплаз-

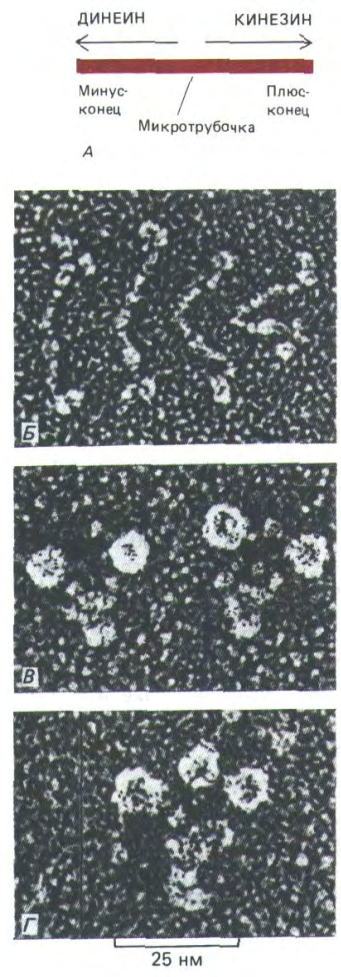


Рис. 11-71. Кинезин и цитоплазматический динеин-крупные белки, ассоциированные с микротрубочками (БАМ), которые способны двигаться по микротрубочке в противоположных направлениях, используя энергию гидролиза АТР *(А).* Эти белки представляют собой комплексы из двух одинаковых «тяжелых цепей» и нескольких меньших «легких цепей». Каждая тяжелая цепь образует глобулярную головку, с помощью которой белок при участии АТР присоединяется к микротрубочке. Таким образом, подобно миозину, кинезин *(Б,* показаны четыре молекулы) и цитоплазматический динеин *(В,* две молекулы) имеют две головки. В отличие от этого динеин ресничек *(Г)* имеет три головки (см. рис. 11-57). [Электронные микрофотографии получил John Heuser методом замораживания-травления; белки выделили Trina Schroer, Jeff Gelles, Michael Scheetz (£); Eric Steuer (В); Ursula Goodenough (Г).]

мы белков, которые связываются с микротрубочками в присутствии AMPPNP, но отделяются от них при добавлении АТР, был выделен крупный белковый комплекс, названный **кинезином.** Кинезин оказался АТРазой, использующей энергию гидролиза АТР для однонаправленного перемещения пузырьков вдоль по микротрубочке (разд. 3.4.11). Это движение осуществляется со скоростью от 0,5 до 2 мкм/с, без перерывов и скачков, характерных для движения в интактном аксоне и обусловленных, как полагают, частыми столкновениями перемещаемого пузырька с различными элементами цитоплазмы.

Направление движения, создаваемого кинезином, было определено с помощью полистироловых шариков, которые перемещались по микротрубочкам, полимеризованным in vitro на центросомах. В то время как неочищенные экстракты аксоплазмы перемещают частицы в обоих направлениях, очищенный кинезин обеспечивает транспорт только в одном направлении-«наружу», т.е. к плюс-концам микротрубочек (напомним, что динеин в ресничках осуществляет движение в противоположном направлении-см. разд. 11.3.10). Поскольку микротрубочки в аксоне, как известно, ориентированы плюс-концами от тела клетки (см. рис. 11-63), перемещение пузырьков с помощью кинезина должно быть направлено от тела к кончику аксона. Кажется вероятным, что за транспорт в обратном направлении ответствен динеиноподобный белок. И действительно, недавно из нескольких источников, включая мозг млекопитающего, был выделен высокомолекулярный БАМ с такими свойствами (рис. 11-71). Этот белок был назван **цитоплазматическим динеином.**

11.4.10. Микротрубочки определяют местоположение эндоплазматического ретнкулума и аппарата Гольджи внутри клетки [50]

Двигательные белки, сходные с кинезином и динеином, существуют не только в нейронах. По-видимому, они имеются во всех клетках, где есть микротрубочки, и ряд важных организующих функций микротрубочек осуществляется, судя по всему, именно благодаря этим белкам. Как показали недавние исследования in vitro, кинезин прикрепляется к мембране эндоплазматического ретикулума и может растягивать ее вдоль ориентированных микротрубочек, превращая эту органеллу в характерную сложную сеть. Работы, проведенные на интактных клетках, тоже указывают на то, что ретикулум растягивается по ходу микротрубочек в направлении от центросомы, как и следует ожидать, если это происходит при участии кинезина. Наконец, иммунофлуоресцентными методами показано, что тонкие края цистерн ретикулума в периферических участках клеток часто располагаются вдоль микротрубочек (рис. 11-72, *А* и *Б).*

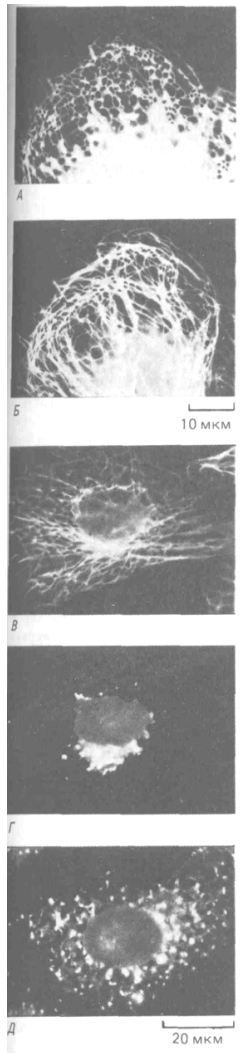


Рис. 11-72. Расположение мембран эндоплазматического ретикулума (ЭР) и микротрубочек в культивируемых клетках. *А.* Иммунофлуоресцентное окрашивание белков ЭР выявляет цистерны ЭР в виде кружевной сети на периферии клеток. *Б.* Расположение микротрубочек в той же клетке. *В, Г и Д.* Влияние микротрубочек на аппарат Гольджи. Если в культивируемой клетке одновременно окрасить флуоресцентными антителами и микротрубочки *(В),* и мембраны Гольджи *(Г),* последние обнаружатся в виде скопления вокруг центросомы. Но если клетку обработать нокодазолом, вызывающим деполимеризацию микротрубочек, то мембраны Гольджи будут распределены по всей цитоплазме *(Д),* как это бывает во время митоза. [С любезного разрешения Mark Terasaki и Lan Bo Chen *(А, Б);* Viki Allan и Thomas Kreis *(В, Г.* Д).]

В то время как мембрана эндоплазматического ретикулума активно перемещается в сторону от центросоми по «дорожкам» из микротрубочек (оставаясь соединенной на другом конце с ядерной оболочкой), мембраны цистерн Гольджи, по-видимому, транспортируются в обратном направлении, как если бы они были связаны с динеиноподобными белками; в результате аппарат Гольджи оказывается вблизи центросомы (рис. 11-72,5 и *Г).* И аппарат Гольджи, и эндоплазматический ретикулум во время митоза подвергаются сильной фрагментации (разд. 13.5.16), и когда потом в цитоплазме вновь образуются микротрубочки, именно их ориентация, вероятно, направляет восстановление этих органелл из мелких пузырьков и фрагментов мембран (рис. 11-72, *Д).*

Заключение

Микротрубочки образуются путем полимеризации молекул тубулина, после чего эти молекулы гидролизуют прочно связанный с ними GTP (этот процесс несколько отстает от полимеризации). Микротрубочки растут медленно, нестабильны и склонны к взрывообразной, «катастрофической» деполимеризации: однако они могут стабилизироваться при ассоциации с другими структурами, которые прикрывают («кэпируют») их концы. Центры организации микротрубочек, такие как центросомы, все время инициируют образование новых микротрубочек, которые растут в случайных направлениях. Любая микротрубочка, которая натолкнется на какую-либо структуру, способную кэпировать свободный плюс-конец этой микротрубочки, будет избирательно стабилизирована, тогда как другие со временем деполимеризуются. Полагают, что именно этот процесс в основном определяет полярность и расположение систем микротрубочек в клетке.

В тех микротрубочках, которые образовались в нужных местах, субъединицы тубулина подвергаются модификации - ацетилированию и детирозилированию. Эти модификации играют роль «маркеров» зрелых микротрубочек и создают участки для связывания специальных белков, ассоциированных с микротрубочками (БАМ), которые еще больше повышают устойчивость микротрубочек к деполимеризации и адаптируют их для выполнения специфических функций в клетке. Особая группа таких белков использует энергию гидролиза АТР для однонаправленного перемещения вдоль по микротрубочке, обеспечивая этим направленное движение в цитоплазме клеточных органелл и их правильную пространственную организацию.

11.5. Промежуточные филаменты [51]

Промежуточные филаменты (ПФ)-это жесткие и прочные белковые волокна в цитоплазме большинства клеток высших эукариот. Структура их напоминает переплетенные канаты, а толщина составляет 8-10 нм,

т. е. промежуточная между толщиной толстых и тонких филаментов в мышцах, где ПФ были впервые описаны; по толщине они занимают также промежуточное место между актиновыми филаментами и микротрубочками. В большинстве животных клеток они формируют характерную «корзинку» вокруг ядра, откуда по слегка искривленным путям тянутся к периферии клетки. Особенно много ПФ там, где клети подвергаются механическим нагрузкам, например в эпителиях, где это нити участвуют в соединении клеток друг с другом (при помощн десмосом, см. разд. 14.1.4), в нервных волокнах и во всей цитоплазме гладкомышечных клеток. При экстракции клеток растворами с высокой и низкой ионной силой и солюбилизации неионными детергентами ПФ остаются целыми, тогда как большая часть остальных цитоскелетных структур разрушается. Фактически термин «цитоскелет» был первоначально введен именно для обозначения этих чрезвычайно стойких и нерастворимых волокон.

11.5.1. Промежуточные филаменты образуются из фибриллярных полипептидов четырех типов [51, 52]

В отличие от мономеров актина и тубулина, которые представляют собой глобулярные белки, субъединицы ПФ имеют вытянутую, фибриллярную форму. Они объединяются в продольные пучки, где перекрываются по длине, так что образуют длинные нити с высокой механической прочностью. В латеральных взаимодействиях, за счет которых строятся ПФ, нередко участвует лишь часть молекулы белковой субъединицы ПФ, поэтому структура остальной ее части может значительно варьировать, не изменяя общего строения нити. В связи с этим ПФ в отличие от актиновых филаментов и микротрубочек построены из полипептидов с весьма различной молекулярной массой - от 40 до 130 тыс. в зависимости от типа клеток.

Промежуточные филаменты по их первичной структуре делят на четыре большие группы (табл. 11-5). Белки ПФ *muna I* наиболее характерны для эпителиальных клеток и включают два подсемейства **керати-**

Таблица 11-5. Главные типы белков промежуточных филаментов

	Образующий полипептид (мол. масса)	**Локализация**
Тип I	Кислые кератины (40000-70000) Нейтральные и основные кератины (40 000-70 000)	Эпителиальные клетки и производные эпидермиса (волосы, ногти и т.п.)
Тип II	Виментин (53000)	Многие клетки мезенхимного происхождения; часто экспрес-сируется клетками в культуре
	Десмин (52000)	Мышечные клетки
	Глиальный фибриллярный кислый белок (45000)	Глиальные клетки (астроциты и некоторые шванновские клетки)
Тип III	Белки нейрофиламентов (около 130000[1)], 100000[1)] и 60000)	Нейроны
Типы IV	Ядерные ламины А, В и С (65000 -75000)	Ядерная ламина во всех клетках

[1)] Из-за того, что эти белки при электрофорезе в гелях с додецилсульфатом натрия мигрируют аномально медленно, раньше их молекулярную массу считали большей.

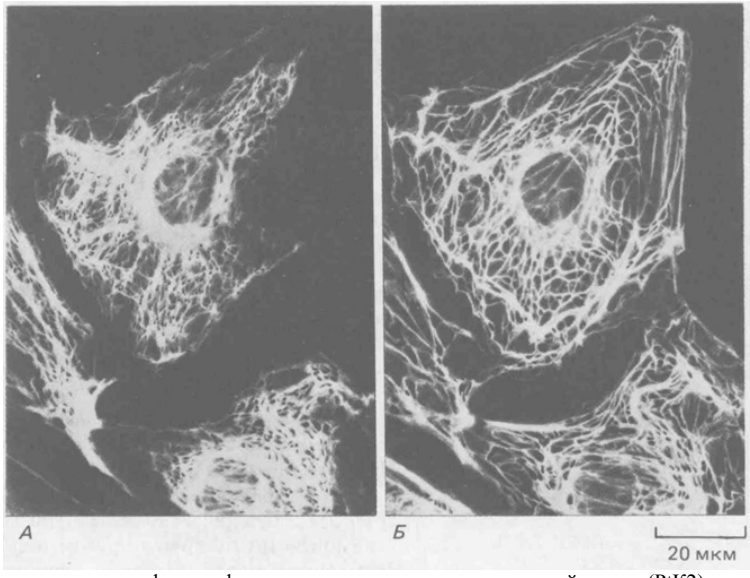


Рис. 11-73. Иммунофлуоресцентная микрофотография эпителиальных клеток кенгуровой крысы (PtK2) в интерфазе. Клетки окрашены одновременно антителами к виментину *(А)* и к кератину *(Б)*. Обратите внимание, что содержащиеся в клетке системы виментиновых и кератиновых филаментов существуют раздельно, хотя и имеют сходное распределение. (С любезного разрешения Magy Osborn.)

нов: *кислые кератины* и *нейтральные или основные кератины*. Кератиновые филаменты - всегда гетерополимеры, образованные поровну субъединицами каждого из этих двух подсемейств. Вообще кератины - самая обширная группа белков ПФ; известно уже не менее 19 различных форм в составе эпителиев человека и еще 8 в волосах и ногтях. Многие типы эпителиев, различающихся морфологически и функционально, синтезируют также разные формы кератинов.

К белкам ПФ *типа II* относятся 1) виментин, 2) десмин и 3) глиальный фибриллярный кислый белок. **Виментин** широко распространен в клетках мезенхимного происхождения, включая фибробласты, клетки эндотелия кровеносных сосудов и лейкоциты; он часто образуется в культивируемых клетках и временно появляется в различных клетках в ходе онтогенеза. **Десмин** содержится в клетках мышц, как гладких, так и поперечнополосатых, а **глиальный фибриллярный кислый белок** образует *глиальные филаменты* в определенного рода клетках глии (астроцитах и некоторых шванновских клетках) в нервной системе. Все эти белки способны in vitro к самосборке с образованием гомополимеров, а также к образованию гетерополимеров с другими белками типа II. Последняя способность проявляется и in vivo: в клетках некоторых типов были обнаружены сополимеры виментина с десмином и виментина с глиальным фибриллярным кислым белком.

Из белков ПФ *типа III* построены *нейрофиламенты* - важный компонент цитоскелета в аксонах и дендритах нервных клеток. У позвоночных три таких белка, их называют «нейрофиламентным триплетом». И наконец, белки ПФ *типа IV*-это **ядерные ламины** (разд. 11.5.5); они сходны с другими белками ПФ по аминокислотной последовательности, но имеют несколько характерных отличий. Наиболее примечательно то, что они образуют высокоупорядоченные двумерные сети из филаментов, подвергающиеся быстрой разборке и сборке на определенных стадиях митоза.

Все клетки эукариот синтезируют ядерные ламины и по крайней мере один тип цитоплазматических белков ПФ. В некоторых клетках есть цитоплазматические ПФ двух типов, образующие раздельные структу-

ры. Таковы, например, некоторые эпителиальные клетки, содержащие отдельные системы кератиновых и виментиновых филаментов (рис, 11-73).

11-28

11.5.2. Промежуточные филаменты образуются из димерных субъединиц со стержневидным срединным доменом [53]

Несмотря на значительную разницу в размерах, все белки ПФ цитоплазмы кодируются генами одного мультигенного семейства. У всех этих белков в первичной структуре полипептида есть гомологичный срединный участок примерно из 310 аминокислот, образующий протяженную а-спираль с тремя короткими не-α-спиральными вставками (рис. 11-74). Кроме того, большие отрезки этой срединной области имеют последовательность, характерную для полипептидов, способных к образованию спирали из двух спиралей (см. разд. 11.1.6). Подобно тропомиозину или хвосту мышечного миозина, эта двухцепочечная спираль представляет собой димер из двух одинаковых полипептидов ПФ. Эти две цепи в гомодимере ПФ уложены параллельно друг другу, причем к срединному стержневидному домену примыкают на обоих концах глобулярные домены. При сборке ПФ стержневидные домены взаимодействуют друг с другом и формируют однородную сердцевину филамента, а глобулярные, величина которых сильно варьирует у разных белков ПФ, выступают с поверхности филамента наружу. Одна из моделей сборки ПФ из димерных субъединиц показана на рис. 11-75.

11.5.3. Промежуточные филаменты простираются от ядерной оболочки до периферии клетки [54]

Если окрасить культивируемые клетки антителами к одному из цитоплазматических белков ПФ (например, виментину), то обычно будет видна ажурная сеть нитей, окружающая ядро и охватывающая всю, цитоплазму (см. рис. 11-73). По структуре эта сеть отлична от других компонентов цитоскелета, хотя местами ее нити, по-видимому, идут параллельно микротрубочкам цитоплазмы. Вероятно, организация цитоплазматических ПФ зависит от взаимодействия с микротрубочками, так как деполимеризация микротрубочек при обработке веществами типа колхицина ведет к «осаждению» всей сети ПФ в виде околоядерной «шапки». Можно думать, что многие ПФ цитоплазмы связаны с ядерной оболочкой и в норме оттягиваются от нее к периферии клетки микротрубочками, с которыми они соединены.

Организация ПФ в цитоплазме может также определяться их взаимодействием с плазматической мембраной. В эритроцитах птиц (которые

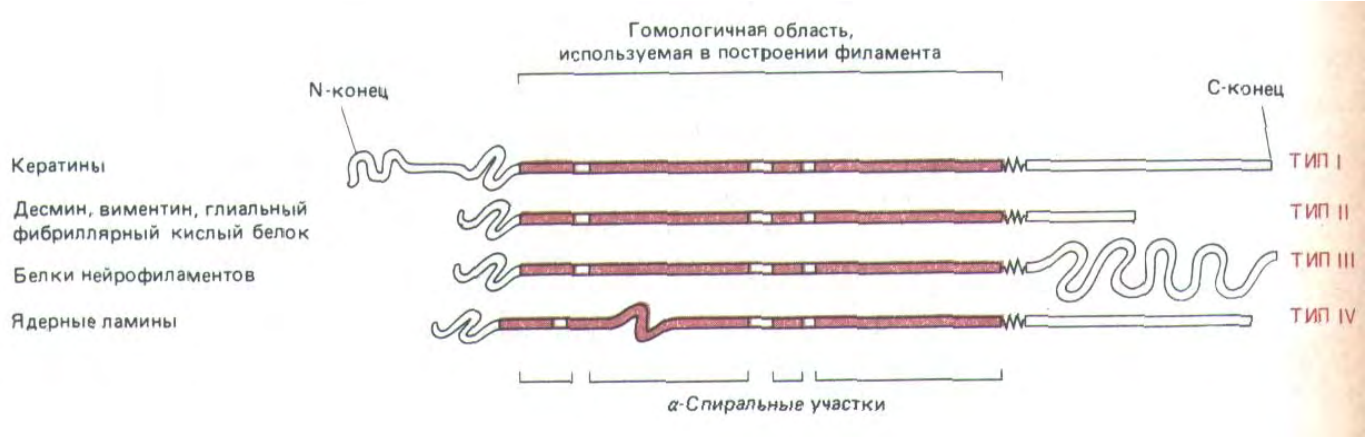


Рис. 11-74. У всех белков промежуточных филаментов имеется гомологичная центральная область (около 310 аминокислотных остатков), формирующая протяженную α-спираль с тремя короткими участками иной структуры. N-концевой и С-концевой домены не состоят из α -спирали и сильно варьируют по размерам и последовательности аминокислот у белков разных промежуточных филаментов.

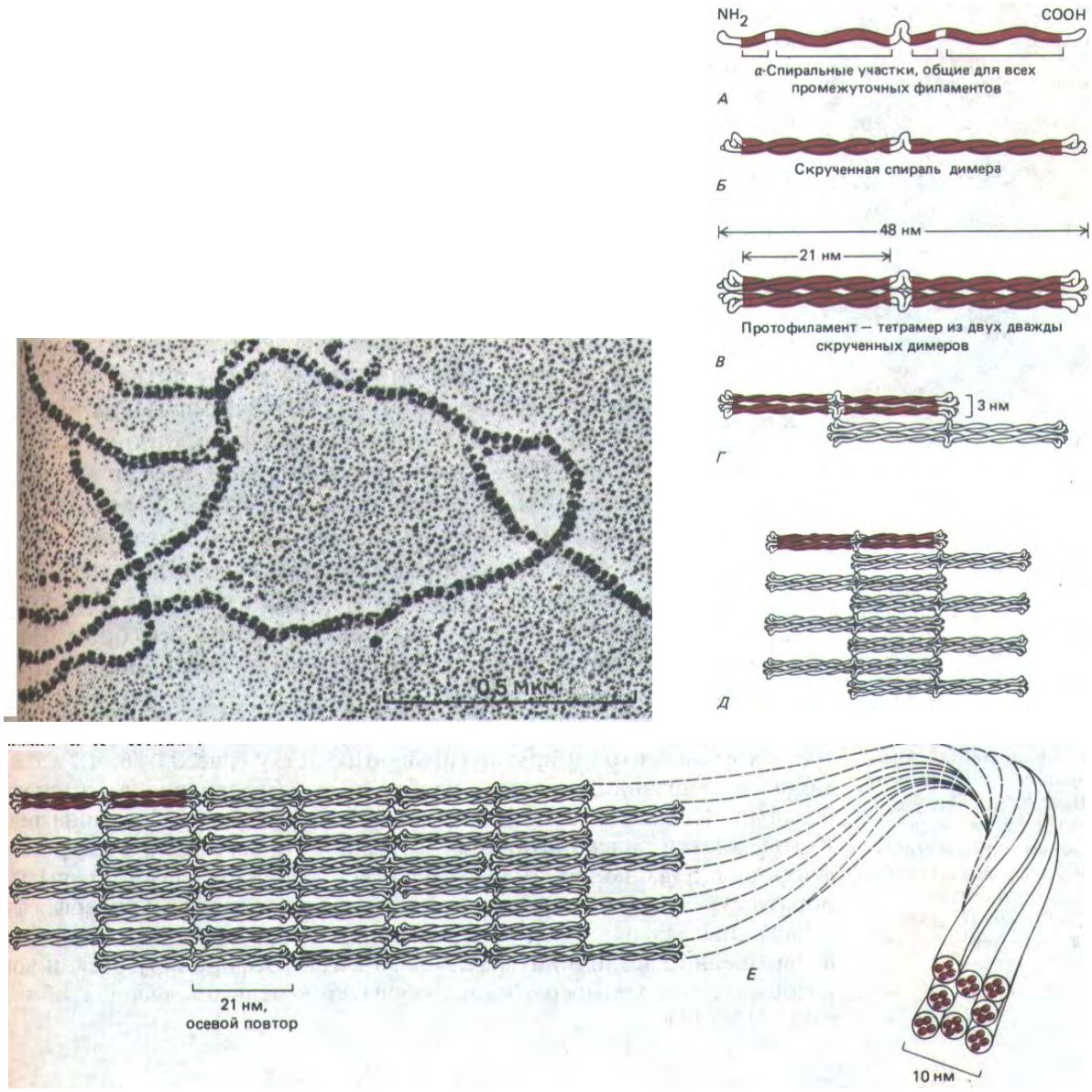


Рис. 11-75. Одна из современных моделей сборки промежуточных фнламентов (ПФ). Мономер *(А)* объединяется с таким же мономером, образуя димер (Б), в котором консервативные α-спиральные участки лежат параллельно, обвиваясь друг около друга. Затем два таких димера укладываются бок о бок, образуя *протофиламент* длиной 48 нм и толщиной 3 нм, который состоит из четырех полипептидных цепей *(В)*. Такие протофиламенты затем образуют все более крупные структуры, укладываясь с продольным сдвигом *(Г* и Д). Окончательная структура промежуточного филамента толщиной 10 нм состоит из восьми рядов протофиламентов (32 полипептидных цепей), соединенных в длинный тяж, похожий на канат *(Е)*. Вверху представлена электронная микрофотография такого «окончательного» филамента. Неизвестно, являются ли ПФ полярными структурами, как актин и тубулин, или неполярными, как двойная спираль ДНК (или, что то же самое, лежат ли две скрученные спирали в составе протофиламента в параллельной ориентации или же в антипараллельной. (Микрофотография любезно предоставлена N. Geisler и K. Weber.)

в отличие от эритроцитов млекопитающих имеют ядро и ПФ) виментин, как полагают, связан с плазматической мембраной через анкирин (разд. 6.2,4). В эпителиальных клетках кератиновые ПФ присоединены к плазматической мембране в десмосомах - специализированных межклеточных соединениях, помогающих удерживать соседние клетки вместе (разд. 14.1.4). Так как кератиновые филаменты каждой клетки через десмосомы соединены с такими же филаментами соседних клеток, они образуют непрерывную сеть, охватывающую весь эпителий.
11-29

11.5.4. Сборка промежуточных филаментов может контролироваться с помощью фосфорилирования [55]

Изолированные промежуточные филаменты (ПФ) в ионной среде, соответствующей цитоплазме, чрезвычайно стабильны; более того, сколько-нибудь значительного пула неполимеризованных белков ПФ (какой

имеется в случае актина и тубулина) в клетке нет. И все же клетка явно может регулировать число, длину и расположение своих промежуточных филаментов, что указывает на ее способность контролировать их сборку и разборку. Важный фактор этого контроля-фосфорилирование определенных остатков в белках ПФ. Виментин, например, существует как в нефосфорилированной, так и в фосфорилированной форме. Если фосфорилировать изолированные виментиновые нити с помощью протеинкиназы, они распадаются на меньшие фрагменты. Однако самый впечатляющий пример того, насколько важную роль играет в контроле разборки ПФ фосфорилирование, - это ядерные ламины, которые подвергаются деполимеризации всякий раз, когда клетка вступает в митоз,

11.5.5. Ядерная ламина образована особым классом промежуточных филаментов [56]

Ядерная ламина - это белковая сеть (обычно толщиной от 10 до 20 нм), подстилающая изнутри поверхность внутренней ядерной мембраны (см. рис. 9-1). Она представляет собой прямоугольную решетку из промежуточных филаментов (рис. 11-76, Д), построенных у млекопитающих из трех белков ПФ типа *VI-ламинов А, В* и *С* (см. рис. 11-74 и табл. 11-3), Ламины образуют димеры, у которых имеется стержневидный домен и две глобулярные головки на одном из концов (рис. 11-76, *Б).* При подходящих pH и ионной силе димеры самопроизвольно ассоциируют, образуя филаменты, которые по толщине и повторяющейся структуре сходны с цитоплазматическими ПФ.

Однако по ряду признаков ядерные ламины отличаются от белков ПФ цитоплазмы. Наиболее очевидное отличие-это организация образуемых филаментов в прямоугольную решетку (рис. 11-76, *А),* хотя для такой организации, видимо, необходимо объединение их с другими белками. Кроме того, ядерная ламина - структура очень динамичная. Когда клетки млекопитающих вступают в митоз, кратковременное фосфорилирование нескольких остатков серина в ламинах вызывает обратимую диссоциацию ядерной ламины на тетрамеры гиперфосфорилированных ламинов А и С и связанного с мембраной ламина В. При возвращении клетки в интерфазу ламины дефосфорилируются, и вокруг разошедшихся хромосом вновь образуется цельная ядерная оболочка (разд. 13.5.11).

11.5.6. Кератиновые филаменты удивительно разнообразны [52]

Из всех типов промежуточных филаментов наиболее стабильные и долгоживущие - кератиновые, они же и самые разнообразные. Эпителии с примитивной организацией, например в развивающемся эмбрионе, а также некоторые зрелые ткани (такие, как печень) содержат кератины двух типов - один кислый и один нейтральный. В эпителиях других органов (например, языка, мочевого пузыря, потовых желез) имеются шесть или больше различных кератинов, причем их конкретный спектр зависит от анатомической локализации. Кератиновые филаменты ввиду их многообразия и стабильности могут служить своего рода «отпечатками пальцев», позволяющими уточнить происхождение некоторых опухолей эпителиальной природы.

Еще разнообразнее кератины в эпидермисе, который представляет собой плотный многослойный эпителий (разд. 17.4.2). В клетках разных слоев эпидермиса экспрессируются разные наборы кератинов. Кератиновые филаменты в них постепенно сшиваются поперечными ковалентными связями друг с другом и с ассоциированными белками, и по мере

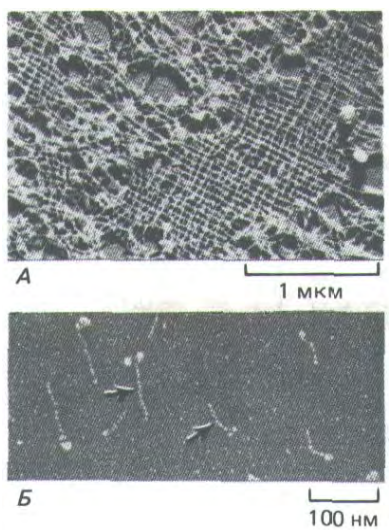


Рис. 11-76. *А.* Электронная микрофотография участка ядерной ламины в ооците *Xenopus* (препарат получен методом лиофилизации и напыления металлом). Ламину образует высокоупорядоченная прямоугольная сеть из промежуточных филаментов, состоящих из ядерных ламинов. *Б.* Изолированные димеры ламина (L) (электронная микрофотография, напыление металлом). По форме они напоминают мышечный миозин (М): у них есть стержневидный хвост и две глобулярные головки, но они гораздо меньше. Глобулярные головки образованы двумя большими С-концевыми доменами. (С любезного разрешения Ueli Aebi.)

гибели клеток в самых наружных слоях эпидермиса поперечносшитый кератиновый скелет становится важнейшим защитным барьером на поверхности тела. Специализированные эпителиальные клетки, образующие такие поверхностные структуры, как волосы, когти и перья, обеспечивают дополнительные локальные вариации в наборе кератинов. Таким образом, промежуточные филаменты защищают животное от потери тепла и воды, предоставляют ему «оружие» и средства камуфляжа или, наоборот, привлечения партнера (окраска).

11.5.7. Какова функция промежуточных филаментов?

Животные клетки могут обходиться и без промежуточных филаментов. В ЦНС глиальные клетки, вырабатывающие миелин, совершенно лишены их. Если культивируемым фибробластам сделать внутриклеточную инъекцию антител к белкам промежуточных филаментов, то последние разрушатся, и это не окажет заметного влияния на организацию или поведение клеток. Кажется вероятным, что главная функция большинства ПФ состоит в чисто механической «поддержке» клетки и ее ядра. Промежуточные филаменты в эпидермальных пластах образуют «трансклеточную» (соединяющую множество клеток воедино) сеть, роль которой, скорее всего, заключается в противодействии внешним нагрузкам. Нейрофиламенты в нервных волокнах противостоят механическим деформациям, возникающим при движении животного, иначе эти длинные тонкие цилиндры из цитоплазмы легко рвались бы. Десминовые нити в клетках мышц создают механическую опору для саркомеров, а виментиновые окружают (и, вероятно, поддерживают) крупные жировые капли в жировых клетках.

Но если функция промежуточных филаментов сводится всего лишь к сопротивлению растягивающим силам, для чего нужно так много различных вариантов их белковых субъединиц? Какова роль вариабельных частей их молекул - ведь они как будто бы не участвуют в построении самого филамента? Детальных ответов на эти вопросы пока нет, но ясно, что как характер опорной функции промежуточных филаментов, так и способ их соединения с другими компонентами клетки сильно различаются в клетках разного типа. Например, десминовые филаменты, скрепляющие края Z-дисков в поперечнополосатых мышцах, по-видимому, имеют участки для связывания специфических белков Z-диска; нейрофиламенты подвергаются меньшим нагрузкам, но они могут соединяться вместе боковыми поверхностями, образуя непрерывный «трос» до метра и больше длиной; вероятно, именно поэтому

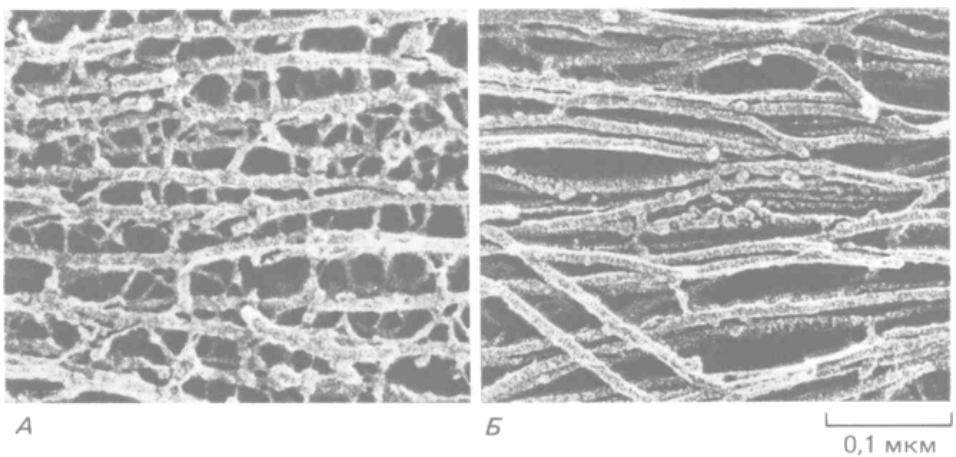


Рис. 11-77. Электронная микрофотография промежуточных филаментов двух типов, встречающихся в нервной ткани (препарат после быстрого замораживания и глубокого травления). *А.* Нейрофиламенты в аксоне соединены многочисленными поперечными белковыми сшивками; как полагают, такая организация придает этому длинному клеточному отростку большую прочность на разрыв. По-видимому, сшивки образованы длинными неспиральными участками С-концевой части наиболее крупного белка нейрофиламентов (см. рис. 11-74). *Б.* Промежуточные филаменты (называемые глиальными филаментами) в астроците. Они подвергаются меньшим механическим нагрузкам. Их поверхность довольно гладкая, и поперечных сшивок между ними мало. (С любезного разрешения N. Hirokawa.)

нейрофиламенты имеют по всей своей длине большие выступы, которых нет у других промежуточных филаментов (рис. 11-77).

Различные потенции к связыванию других белков могут обеспечиваться вариабельными участками белков промежуточных филаментов, Влияя на свойства филамента, эти вариабельные участки определяют не только его способность к самосборке, но и то, как он будет взаимодействовать с другими компонентами клетки (например, с микротрубочками и плазматической мембраной). Это совершенно иная стратегии чем в случае двух других важнейших элементов цитоскелета - актиновых филаментов и микротрубочек; как мы уже знаем, эти полимеры в основном инвариантны по структуре, а к выполнению различных функций они приспосабливаются *с* помощью разных наборов актин-связывающих белков и белков, ассоциированных с микротрубочками. Таким образом, роль вариабельных участков в белках промежуточных филаментов та же, что и у вспомогательных белков актиновых филаментов и микро-трубочек, - разница лишь в том, что одни ковалентно связаны с субъединицами филамента, а другие представляют собой отдельные молекулы.

Заключение

Промежуточные филаменты (ПФ) - это полимеры, по структуре подобные канатам, собранным из нитевидных полипептидов. По-видимому, они поддерживают структуру клеток или противостоят растягивающим нагрузкам. Существует много тканеспецифических форм ПФ, построенных из различных полипептидов: кератиновые филаменты эпителиальных клеток, нейрофиламенты нейронов, глиальные филаменты астроцитов и шванновских клеток, десминовые филаменты мышечньа волокон и виментиновые филаменты фибробластов и клеток многих других типов. Отдельное семейство белков ПФ составляют ядерные ламины, из которых построена волокнистая пленка (ламина), выстилающая изнутри оболочку ядра; они имеются во всех эукариотических клетках.

Полипептиды, входящие в состав промежуточных филаментов различных типов, различаются по аминокислотной последовательности, а также - и очень сильно - по молекулярной массе. Однако у всех имеется гомологичный центральный домен, который при димеризации белка образует жесткую структуру из обвивающих друг друга спиралей. Такие димерные субъединицы складываются в большие пучки «внахлест», формируя промежуточные филаменты. Стержневидные домены субъединиц при этом создают структурную сердцевину ПФ, а глобулярные домены на обоих концах выступают наружу и обусловливают разнообразие свойств ПФ. Именно благодаря этой вариабельности механические свойства ПФ и взаимодействия их с другими клеточными компонентами приспособлены к специфическим нуждам клеток того или иного типа.

11.6. Организация цитоскелета

До сих пор мы рассматривали микротрубочки, актиновые филаменты и промежуточные филаменты так, как будто это независимые составные части цитоскелета. В действительности, конечно, различные элементы цитоскелета должны быть связаны в единое целое, а их функции скоординированы, чтобы клетка могла осуществлять разного рода движения и изменять свою форму. Например, когда находящийся в культуре фибробласт округляется, готовясь к делению, реорганизуется весь его цитоскелет в целом: исчезают стрессовые волокна и цитоплазматические микротрубочки, появляется митотическое веретено,

а затем и сократимое кольцо, и все это происходит как единая контролируемая цепь событий.

В этом разделе мы рассмотрим взаимодействия между главными системами филаментов цитоскелета в связи с тремя его функциями. Сначала мы выясним, каким образом цитоскелет организует содержимое цитоплазмы, включая те ее компоненты, которые обычно считают свободно растворенными. Затем мы перейдем к вопросу о том, как координированная работа цитоскелета обеспечивает направленное передвижение животной клетки по твердому субстрату. И наконец, мы обсудим, как цитоскелет порождает те многочисленные морфологические изменения, которые происходят в процессе развития зародыша. В результате этого рассмотрения станет ясно, насколько фрагментарны пока наши представления о молекулярных механизмах этих фундаментальных процессов.

11.6.1. В цитоплазме имеется сложная трехмерная сеть белковых нитей [58]

Мы уже знаем, что кортикальная цитоплазма многих животных клеток содержит сети из поперечносшитых актиновых филаментов. Подобные же сети, но образованные взаимодействующими актиновыми филаментами, микротрубочками и промежуточными филаментами, пронизывают всю цитоплазму. Наиболее отчетливо они видны после экстракции клеток неионным детергентом, которая удаляет фосфолипиды и растворимые белки. Если обработанные таким образом клетки быстро заморозить и подвергнуть глубокому травлению, то металлическая реплика с полученного препарата выявит поразительную картину цитоскелета (рис. 11-78). Различные типы белковых филаментов можно распознать по их толщине, а в некоторых случаях и по расположению их белковых субъединиц. Часто бывает видно, что соседние филаменты соединены более тонкими нитями, белки которых тоже были в ряде случаев идентифицированы с помощью антител. Это оказались различные виды белков, ассоциированных с микротрубочками, и длинные гибкие боковые отростки, отходящие от субъединиц промежуточных филаментов некоторых типов (см. рис. 11-77, *А)*. Однако в большинстве случаев белки, образующие поперечные сшивки, пока не известны.

В клетках, не обработанных детергентом, структура цитоплазмы еще сложнее. Пространство между филаментами цитоскелета заполнено зернистым «основным веществом» ("ground substance"), которое, как считают, представляет собой очень концентрированную смесь «растворимых» белков, имеющихся в живой клетке. Разнообразные мембранные органеллы тоже погружены в этот плотный матрикс и соединены с филаментами цитоскелета тонкими белковыми нитями. И гранулярного материала, и органелл тем больше, чем ближе к центральной области клетки, где сосредоточены микротрубочки и промежуточные филаменты и где, как можно увидеть при помощи светового микроскопа с видеоприставкой, происходит большая часть процессов цитоплазматического транспорта. В более периферийных участках значительно гуще сеть актиновых филаментов, которые как бы вытесняют оттуда большую часть мембранных органелл, а возможно, и какую-то долю гранулярного материала (рис. 11-79). Эта густая сеть прикреплена к плазматической мембране и соответствует богатому актином кортексу клетки, о котором уже говорилось ранее (разд. 11.2).

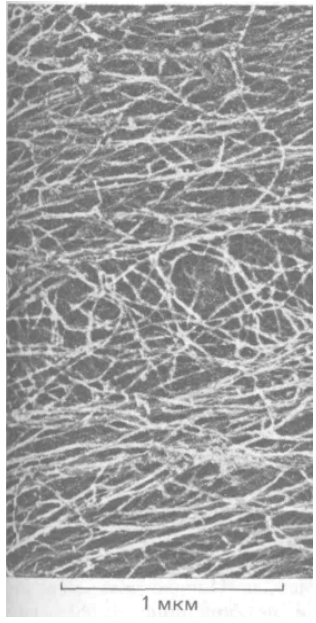


Рис. 11-78. Цитоплазма фибробласта, экстрагированного неионным детергентом (электронная микрофотография, глубокое травление). Большинство тянущихся слева направо прямых волокон, образующих рыхлые пучки, - это актиновые филаменты, а перепутанные волокна в середине фото - в основном промежуточные филаменты. (С любезного разрешения John Heuser и Marc Kirschner.)

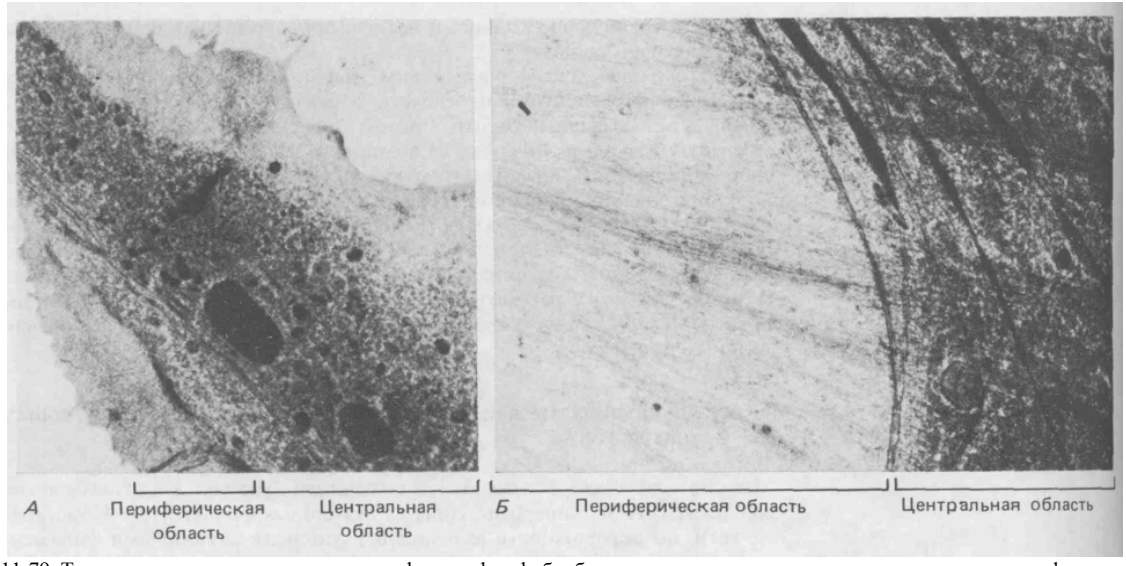


Рис. 11-79. Трансмиссионная электронная микрофотография фибробласта, замороженного «живьем», выявляет на периферии клетки участок, свободный от органелл, а ближе к центру-наоборот, богатую органеллами область *(А)*. Граница между этими двумя областями при сильном увеличении видна более отчетливо *(Б)*. (P. C. Bridgman, B. Kachar, T. S. Reese, J. Cell Biol. 102: 1510-1521, 1986. С разрешения Rockefeller Univ. Press.)

11.6.2. Насколько упорядочена организация цитоплазмы? [59]

Когда мембранные органеллы цитоплазмы быстро перемещаются с места на место, они движутся по белковым «дорожкам», с которыми соединены специальными мостиками. Как мы уже говорили, движение вдоль микротрубочек осуществляется с помощью кинезина и динеиноподобных белков (разд. 11.4.9), а вдоль актиновых филаментов с помощью миозиноподобных белков (разд. 11.2.4). Кластеры рибосом в цитозоле тоже нередко находятся в ассоциации с филаментами; при экстрагировании клеток неионными детергентами значительная часть аппарата белкового синтеза остается связанной с цитоскелетом. Даже растворимые ферменты, в том числе некоторые ферменты гликолиза, по-видимому, «сидят» на специфических участках миофибрилл в мышечных клетках и стрессовых волокон в фибробластах, и здесь их можно выявить с помощью флуоресцентных антител.

Степень структурной организованности цитозоля в настоящее время является предметом споров. Источник наших знаний об идущих в цитозоле процессах - это в основном биохимические исследования, а они начинаются с гомогенизации клетки, так как только после этого можно определять активность ферментов и выделять их в очищенном виде. Успехи такого подхода привели многих биохимиков к представлению о цитозоле как о простом растворе ферментов. Однако другие исследователи склонны полагать, что едва ли не большинство ферментов цитозоля собрано в группы по принадлежности к тому или иному биохимическому пути и прикреплено к цитоскелету так, чтобы обеспечить более быстрое и эффективное прохождение метаболитов по каждому из таких путей. Поскольку это прикрепление, вероятно, непрочно и связи легко разрушаются, для его убедительной демонстрации могут потребоваться новые методы - такие, например, как инъекции в живые клетки белков с флуоресцентными метками (разд. 4.2.3).

11.6.3. Растягивание актинового кортекса способно вызывать поляризацию клетки, необходимую для ее направленного движения [60]

Цитоскелет не только служит каркасом для прикрепления и перемещения питоплазматических компонентов, но и обеспечивает возможность миграции клеток. Несмотря на новейшие успехи в выяснении структуры и функции цитоскелета, механизм, с помощью которого животные клетки ползают по поверхности субстрата, пока еще плохо изучен. Для эффективного передвижения необходимо, чтобы клетка была поляризована: нужно, чтобы вся ее плазматическая мембрана находилась в относительном покое, за исключением **переднего края,** где клетка периодически выпускает ламеллоподии и микрошипы, когда движется вперед.

Когда неполяризованная мигрирующая клетка первоначально прикрепляется к поверхности культуральной чашки, микрошипы и ламеллоподии выдвигаются во всех направлениях и тянут клетку в разные стороны, в результате чего она остается на месте. Но, если случайно две противоположно направленные ламеллоподии достаточно прочно прикрепятся к субстрату, мы увидим, что растягивание клеточного кортекса между ними подавляет дальнейшее образование микрошипов и ламеллоподии в растянутой области-вероятно, потому, что актиновые филаменты в этом участке лежат параллельно плазматической мембране (рис. 11-80), а не перпендикулярно к ней, как нужно для возникновения ламеллоподии и микрошипов (разд. 11.2.11). Таким образом, тот факт, что в растянутых участках выступы цитоплазмы не образуются, можно объяснить чисто механическими причинами.

Дальнейшая «борьба» между ламеллоподиями похожа на перетягивание каната: те, что тянут клетку слабее, отрываются от субстрата и становятся частью пассивного растянутого кортекса. В конце концов останется только один активный участок плазматической мембраны; он и будет передним краем теперь уже поляризованной клетки, которая начнет движение в одном направлении (рис. 11-81).

Когда клетка находится на ровной плоской поверхности, выбор направления движения (т. е. «победа» каких-то ламеллоподии) будет делом непредсказуемым, зависящим от случайных вариаций в организации цитоскелета. Однако на неоднородной поверхности, например на культуральном субстрате с градиентом вещества, способствующего адгезии, «отбор» ламеллоподии и микрошипов будет направляться факторами внешней среды; эти выступы будут работать как щупальца, которые определяют, куда клетке двигаться.

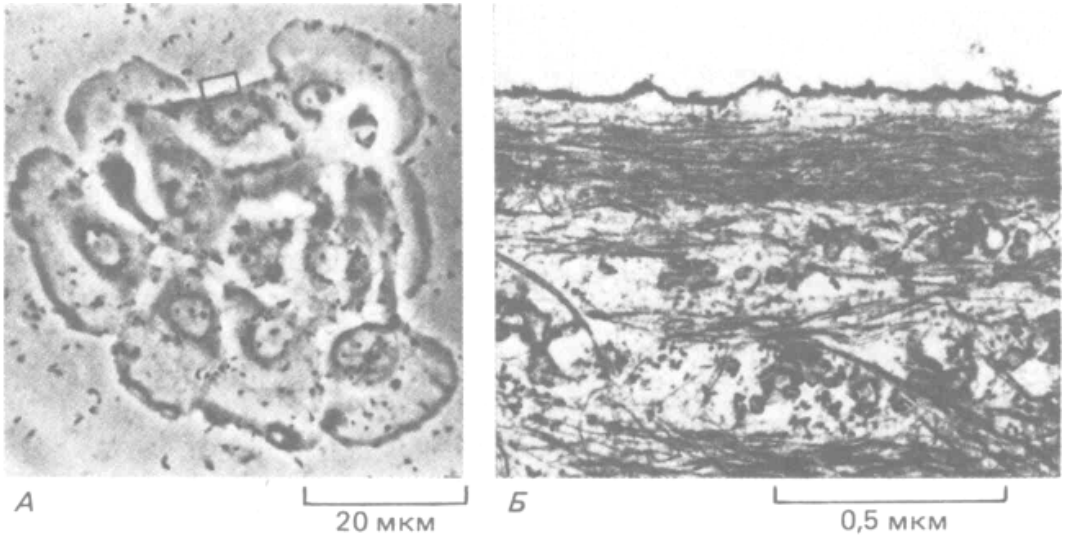


Рис. 11-80. Организация актиновых филаментов в зоне растянутого клеточного кортекса. Тянущее действие противоположных ламеллоподии в группе из восьми эпителиальных клеток, показанных на световой микрофотографии *(А),* создает в одной из клеток покоящийся участок, где образование выступов подавлено (показан прямоугольником). При исследовании этого участка в электронном микроскопе *(Б) в* нем можно видеть пучки актиновых филаментов, идущих параллельно плазматической мембране, т. е. перпендикулярно к той ориентации, которая нужна для образования ламеллоподии и микрошипов. (John Kolega, *i.* Cell Biol. 102: 1400-1411, 1986. С разрешения Rockefeller Univ. Press.)

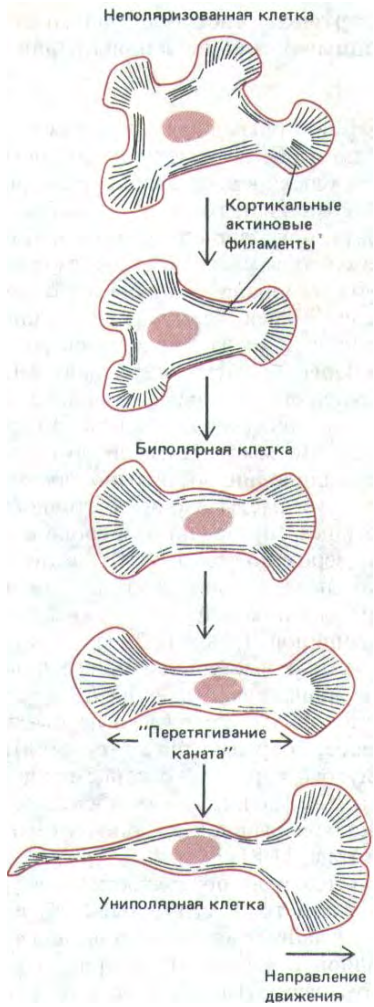


Рис. 11-81. Возникновение полярности у мигрирующей клетки. Хотя здесь изображена клетка в культуре, сходные процессы, вероятно, играют фундаментальную роль в морфогенезе многих тканей. Прикрепившись к поверхности культуральной чашки, клетка выбрасывает ламеллоподий во всех направлениях. По мере того как они растягивают клетку, возникают участки, где кортекс растянут и дальнейшее образование ламеллоподий подавлено (см. рис. 11-80). «Перетягивание каната» продолжается до тех пор, пока не возьмет верх какая-то одна ламеллоподия - вероятно, случайно, например потому, что субстрат под ней оказался более «липким», или благодаря небольшому хемотаксическому градиенту, который благоприятствует движению вперед одной из сторон клетки (разд. 11.2.13). Теперь клетка становится униполярной и перемещается в направлении «удачливой» ламеллоподий. С помощью подобного механизма клетки в развивающихся тканях будут двигаться в сторону тех клеток или элементов внеклеточного матрикса, к которым они прикрепляются наиболее прочно, зачастую делая выбор между субстратами, лишь слегка различающимися по адгезивности (разд. 14.3.9).

11-34

11.6.4. Относительная роль актиновых филаментов и микротрубочек в миграции зависит от типа клеток [61]

При миграции клеток микротрубочки и актиновый цитоскелет обычно работают совместно, так что вклад их разделить трудно. Степень участия микротрубочек в направленном движении клетки у разных типов клеток различна. Если деполимеризовать микротрубочки фибробласта колхицином, он перестает двигаться в определенную сторону и начинает выпускать ламеллоподии в случайных направлениях. С другой стороны, на направленное движение нейтрофила колхицин практически не влияет. Более того, если нейтрофил кратковременно прогреть до 42 °С, значительная часть его кортикальной цитоплазмы отделяется от остальной клетки и начинает двигаться сама по себе. Хотя эти подвижные фрагменты клеток лишены микротрубочек и ядра, они способны ползать по культуральной чашке в течение дня и дольше, прежде чем подвергнутся распаду (рис. 11-82). Поначалу фрагменты обладают такой же способностью к хемотаксису, как и исходные нейтрофилы; например, они направленно движутся «вверх» по градиенту концентрации N-формилированных пептидов (разд. 11.2.13). Однако миграция прекращается, если актиновые нити в нейтрофилах (или в образовавшихся из них фрагментах) деполимеризовать цитохалази-ном. По-видимому, этим клеткам для направленной миграции необходимы актиновые филаменты, но не микротрубочки.

Однако движение конусов роста нервных клеток, судя по всему, зависит и от микротрубочек, и от актиновых филаментов. В аксонах и дендритах (обобщенно называемых *нейритами)* содержатся необычайно упорядоченные пучки микротрубочек. Каждый нейрит «вытягивается» из тела нервной клетки под действием тянущей силы, создаваемой конусом роста на его кончике. Если нервные клетки в культуре обработать колхицином, рост нейритов останавливается, что указывает на участие микротрубочек в продвижении конуса роста. Конус роста эквивалентен переднему краю нейтрофила или фибробласта, и формирование на нем ламеллоподий и микрошипов тоже зависит от актиновых филаментов и подавляется при обработке цитохалазином. Тем не менее у нервных клеток, растущих на высокоадгезивной поверхности (например, на культуральной чашке, покрытой поликатионом полилизином), нейриты будут расти и в присутствии цитохалазина, хотя направление их

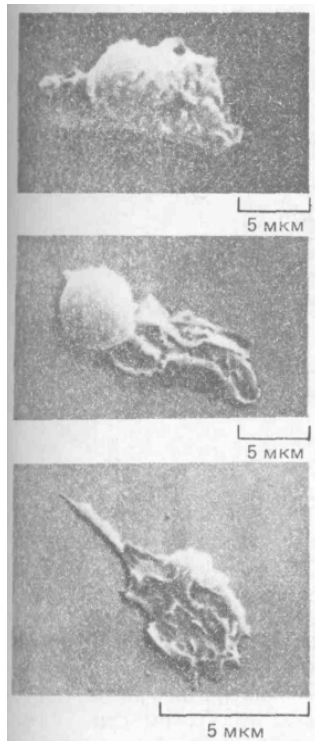


Рис. 11-82. Нейтрофил, из которого в результате кратковременной тепловой обработки (42°С) был получен большой фрагмент, способный к непрерывному движению и хемотаксису, хотя в нем не было ядра и митохондрий. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. (S. R. Malawista и A. DeBoisfleury Chevance, J. Cell Biol. 95: 960-973. 1982; с разрешения Rockefeller Univ. Press.)

роста будет меняться неупорядоченным образом. По-видимому, ламеллоподии и микрошипы нужны для того, чтобы направлять конус роста и позволять ему преодолевать слабоадгезивные поверхности. Организация микротрубочек и актиновых филаментов в конусе роста и в переднем крае фибробласта для сравнения показана на рис. 11-83.

11.6.5. Натяжение актинового кортекса, возможно, помогает управлять движением животных клеток [62]

Каков молекулярный механизм продвижения клетки вперед? Ответа на этот ключевой вопрос пока нет. Одна из гипотез, отводящая главную роль актиновому кортексу, представлена на рис. 11-84. Есть четкие свидетельства того, что кортекс в животных клетках находится в натянутом состоянии. *Это* натяжение кортекса, которое удалось измерить в очень крупных клетках, например в яйцеклетках морского ежа, стремится придать клеткам суспензии сферическую форму (т.е. такую, при которой их поверхность минимальна). Кроме того, клетки, видимо, способны «расслаблять» кортекс в определенных участках своей поверхности, например в переднем крае, хотя механизм этого расслабления неизвестен. В результате на переднем крае периодически образуются ламеллоподии - предположительно вследствие активации в плазматической мембране специальных кэпирующих белков, которая позволяет субъединицам актина присоединяться к плюс-концам актиновых филаментов в этом участке (разд. 11.2.15). Те ламеллоподии, которым не

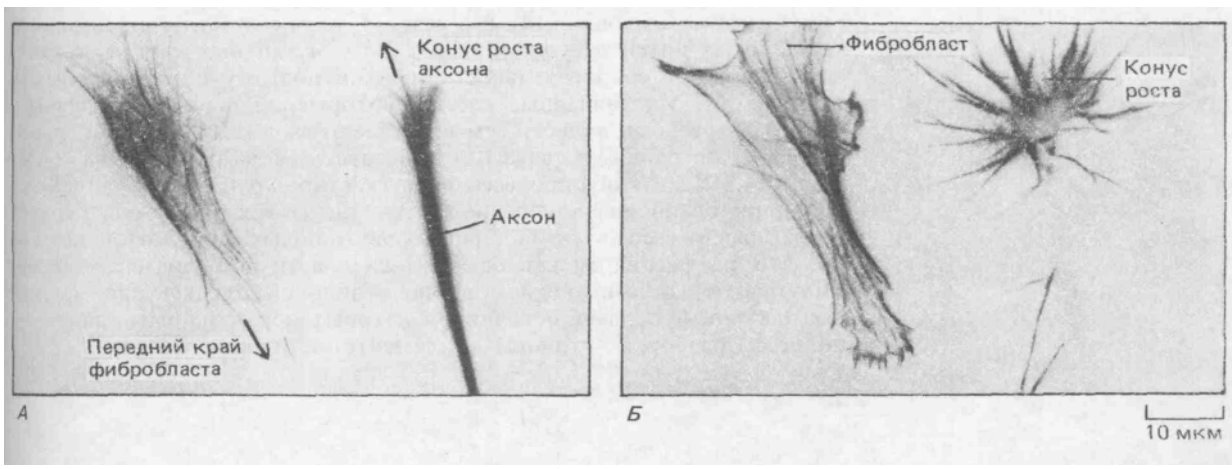


Рис. 11-83. Организация микрогрубочек и актиновых филамектов в подвижных клетках двух типов. Окраска антителами к тубулину, меченными флуоресцеином *(А),* выявляет микротрубочки в виде тонкой сети во всей цитоплазме фибробласта и в виде плотного пучка, идущего по оси аксона. При окраске тех же клеток родамин-фаллоидином *(Б)* видны актиновые филаменты как пучки, которые в фибробласте тянутся к переднему краю, а в аксоне концентрируются в микрошипах конуса роста. (С любезного разрешения Peter Hollenbeck.)

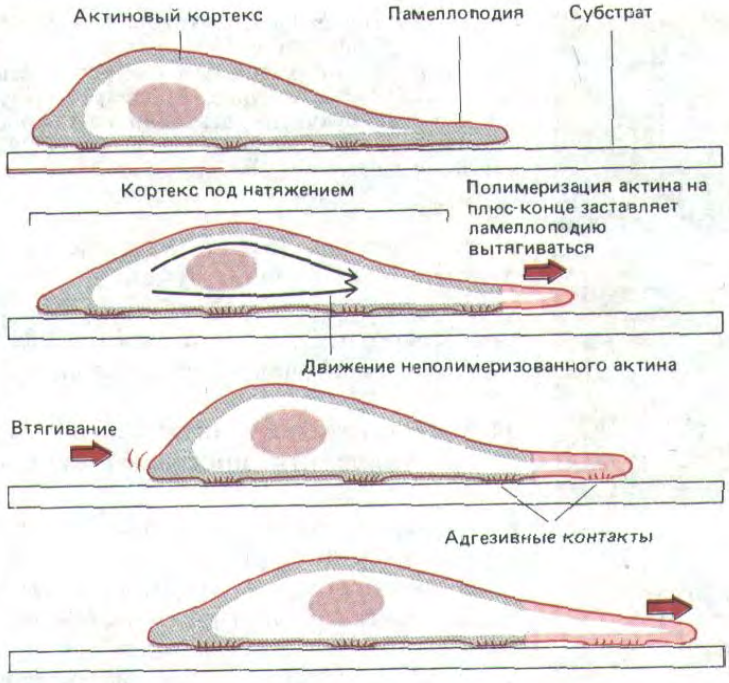


Рис. 11-84. Одна из моделей, показывающая, как богатый актином кортекс мог бы продвигать клетку вперед. Полимеризация актина ведет к вытягиванию ламеллоподии на переднем крае; прикрепившись к субстрату, ламеллоподия растягивает актиновый кортекс, и в результате его натяжения тело клетки продвигается вперед, частично ослабляя это натяжение. Такой цикл может повторяться снова и снова, шаг за шагом продвигая клетку.

удалось прочно прикрепиться к субстрату, оттягиваются назад за счет кортикального натяжения, и это приводит к «раффлингу» (см. рис. 11-42). Но если какая-нибудь ламеллоподия прочно прикрепится, то ее актиновые филаменты будут связаны с субстратом при помощи трансмембранных соединительных белков (см. рис. 11-43); теперь то самое натяжение кортекса, которое оттягивало свободную ламеллоподию назад, будет двигать всю клетку вперед к новой точке прикрепления (см. рис. 11-84).

По аналогии с мышцей - наиболее изученной двигательной системой на основе актина - можно было бы ожидать, что вызывающие сокращение силы в кортексе создаются при взаимодействии актиновых и миозиновых филаментов. Однако против этой возможности говорят эксперименты с клеточным слизевиком *Dictyostelium discoideum* (разд. 14.3.1). Удалось получить таких мутантов этого слизевика, у которых нормальный ген фибриллярного миозина был заменен искусственно модифицированным геном. В этом гене был вырезан длинный участок, кодирующий белок (см. разд. 4.6.14), и в результате эти мутанты были лишены миозиновых нитей. Неудивительно, что у мутантных клеток не могло формироваться сократительное кольцо, и поэтому они превращались в гигантские многоядерные клетки, которые лишь изредка делились, просто разрываясь надвое. Тем не менее эти клетки сохраняли способность к миграции и даже к хемотаксической реакции на cAMP (разд. 14.3.2), хотя оба процесса были заметно нарушены. По-видимому, координированное перемещение клетки, так же как и натяжение кортекса, не зависит всецело от биполярных миозиновых филаментов; возможно, что натяжение может создаваться эластичной сетью актиновых филаментов (действующей подобно резиновой пленке) или другими стягивающими силами, источником которых могли бы быть, например, процессы разборки актиновых филаментов или мини-миозин.

11.6.6. Движению переднего края мигрирующей клетки может способствовать эндоцитозный цикл [63]

Как уже говорилось в гл. 6, все животные клетки непрерывно «заглатывают» небольшие участки своей плазматической мембраны и возвращают их обратно на клеточную поверхность в процессе, получившем название *эндоцитозного цикла* (разд. 6.5), Есть данные о том, что у ползущих по субстрату поляризованных клеток кусочки мембраны переходят внутрь со всей поверхности клетки, а возвращаются главным образом на передний край. По-видимому, такая асимметрия эндоцитозного цикла мигрирующей клетки помогает продвижению переднего края (разд. 6.5.13). Вероятно, возврат перешедших в цитоплазму участков мембраны на передний край поляризованной клетки зависит от ориентированных микротрубочек и актиновых филаментов: те и другие способны при участии вспомогательных белков направлять активный транспорт мембранных пузырьков в сторону своих плюс-концов (разд. 11.1.10 и 11.4.9). Таким образом, в мигрирующей клетке есть по меньшей мере два типа направленных «движителей», обеспечивающих ее локомоцию: 1) механизм на основе актиновых филаментов в клеточном кортексе - он выдвигает ламеллоподии и создает кортикальное натяжение; и 2) механизм, находящийся в глубине клетки, для которого нужны ориентированные микротрубочки или актиновые филаменты (или те и другие),- он обеспечивает активный транспорт мембранных пузырьков к переднему краю клетки (рис. 11-85).

11.6.7. Общими организаторами цитоскелета могут быть микротрубочки

Помимо участия в движении клеток микротрубочки играют также ключевую роль в определении их формы. Всем эукариотическим клеткам свойственна определенная геометрия, которая проявляется как во внешней структуре клетки, так и в расположении органелл. В то время как все другие компоненты цитоскелета лишь отражают эту геометрию, микротрубочки, по-видимому, часто играют уникальную роль в ее создании. Хорошо известно, например, что микротрубочки обычно располагаются вдоль длинной оси клетки и что во многих случаях их присутствие необходимо для поддержания удлиненной формы клетки в целом.

Как уже упоминалось, микротрубочки определяют положение аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума в каждой клетке (разд. 11.4.10), а также влияют на распределение промежуточных филаментов, которые спадаются в околоядерную шапку при обработке клетки колхицином (разд. 11.5.3); кроме того, от них может зависеть и распределение актиновых нитей. Сократимое кольцо, которое постро-

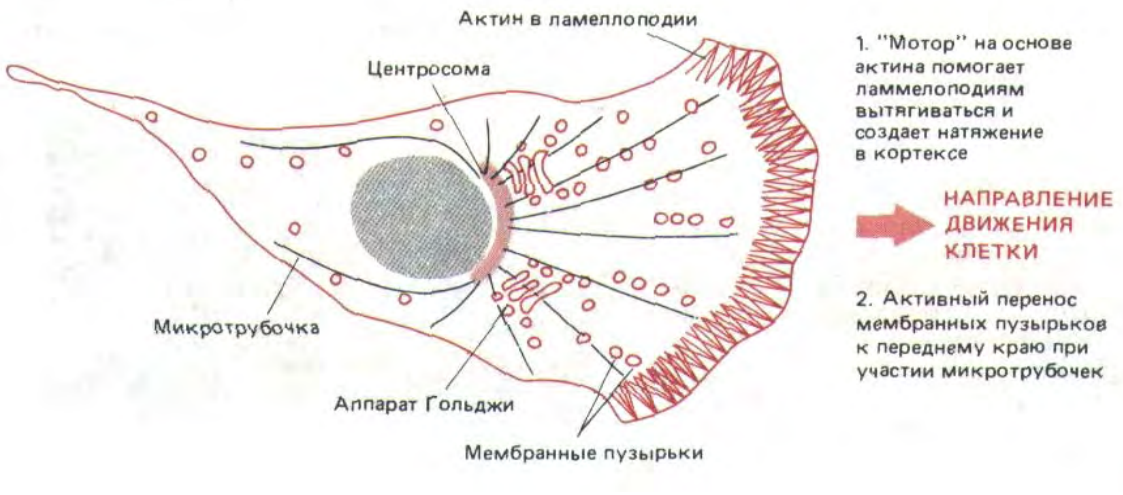


Рис. 11-85. Два направленных «двигателя» в мигрирующей клетке: в основе одного лежат актиновые филаменты кортекса, а другой основан на переносе мембранных пузырьков к переднему краю вдоль микротрубочек (и, возможно, актиновых филаменюв). Вероятно, эти механизмы совместно обеспечивают движение клетки в одном направлении.

ено из актиновых филаментов и перетягивает клетку пополам при завершении клеточного деления, всегда образуется в плоскости, перпендикулярной оси митотического веретена. Если образующееся веретено механически сместить, то соответственно изменится и место, где образуется затем сократимое кольцо; значит, положение этого кольца определяется положением веретена (разд. 13.5.13).

Механизмы, с помощью которых микротрубочки влияют на положение актиновых филаментов кортекса и промежуточных филаментов, неизвестны, хотя предположительно в них участвуют белки, образующие связи между белковыми нитями разных типов.

11.6.8. Структурная организация цитоскелета одной клетки может передаваться соседним клеткам [64]

Цитоскелет данной клетки может влиять на цитоскелет ее соседей. Как полагают, этот способ межклеточной коммуникации играет важную роль в определении морфологии тканей и органов. Один из простейших видов взаимодействия между цитоскелетами можно наблюдать, когда передние края двух мигрирующих клеток касаются друг друга. У клеток большинства типов это вызывает немедленный «паралич» переднего края у той и другой клетки - феномен, известный как **контактное ингибирование движения.** В результате два столкнувшихся in vitro фибробласта перестают вытягивать микрошипы и ламеллоподии в зоне соприкосновения и начинают выпускать их повсюду, кроме этого места, так что постепенно клетки «уходят» друг от друга, меняя направление движения (рис. 11-86). По-видимому, такая реакция связана с быстрыми изменениями в кортикальном актиновом цитоскелете в зоне контакта, но молекулярные механизмы этих изменений не выяснены.

Контактное ингибирование движения не следует смешивать с *контактным ингибированием (торможением) клеточного деления',* последнее наблюдается у клеток в культуре, которые делятся до тех пор, пока не покроют всю поверхность культуральной чашки. Как мы увидим в гл. 13, остановка роста и пролиферации в этих условиях зависит не только от контакта между клетками; она зависит также от той формы, которую клетки вынуждены принимать в условиях скученности, и от возрастающего дефицита питательных веществ (разд. 13.3.5).

Контактное ингибирование движения играет важную роль в заживлении ран. Пласты эпителиальных клеток на краях раны, вытягивая ламеллоподии, начинают быстро двигаться, стремясь «наползти» на поврежденную поверхность; это движение прекращается, как только клетки различных краев вступают в контакт, закрыв щель раны. Теперь. когда непрерывный пласт клеток восстановлен, между новыми соседями образуются межклеточные соединения, которые становятся точками прикрепления для белковых филаментов, соединяющих цитоскелеты всех клеток пласта (разд. 14.1.2). Контактное ингибирование движения может

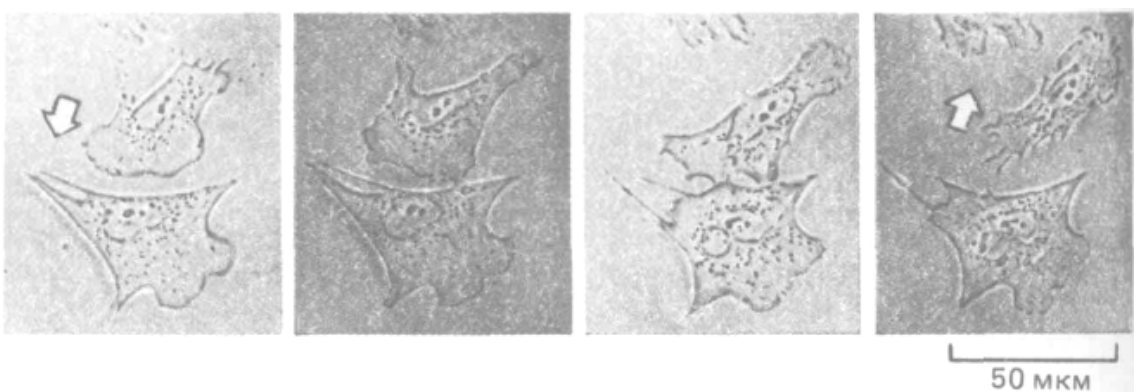


Рис. 11-86. Контактное торможение движения фибробластов. Если два ползущих по поверхности культуральной чашки фибробласта сталкиваются, их ламеллоподии в точке контакта парализуются. Спустя 10-15 мин клетки обычно начинают двигаться в разные стороны друг от друга. (С любезного разрешения Graham Dunn.)

также способствовать избирательному объединению аксонов в пучки в развивающейся нервной системе: конусы роста центральных нейронов останавливаются и даже втягиваются обратно, если сталкиваются с аксонами нейронов периферической нервной системы, хотя вдоль аксонов других центральных нейронов они продолжают охотно расти.

Еще один механизм, с помощью которого цитоскелет одной клетки может оказывать влияние на цитоскелет ее соседей, обусловлен взаимодействием между цитоскелетом и секретируемым клеткой внеклеточным матриксом. Как выяснилось (см. гл. 14), клетка с ориентированным цитоскелетом нередко образует сходным образом ориентированный внеклеточный матрикс, а это в свою очередь влияет на ориентацию цитоскелетов в других клетках, соприкасающихся с таким матриксом (см. рис. 14-84). Так благодаря межклеточным взаимодействиям через места соединения клеток и внеклеточный матрикс организация цитоскелета отдельной клетки часто определяется не автономно самой этой клеткой, а организацией ткани в целом.

11.6.9. В основе изгибания эпителиальных слоев у зародыша лежат координированные сокращения цитоскелета [65]

Взаимодействие между цитоскелетами соседних клеток лежит в основе изгибания клеточных пластов - одного из фундаментальных морфогенетических процессов у животных. Как реализуется это взаимодействие? Возможно, оно передается с помощью механических стимулов, передающихся от клетки к клетке. Представьте себе, например, слой эпителиальных клеток, в которых кратковременное натяжение всего слоя ведет к сокращению апикальных пучков актиновых филаментов, расположенных в *опоясывающих десмосомах* (разд. 14.1.3). Если в одной

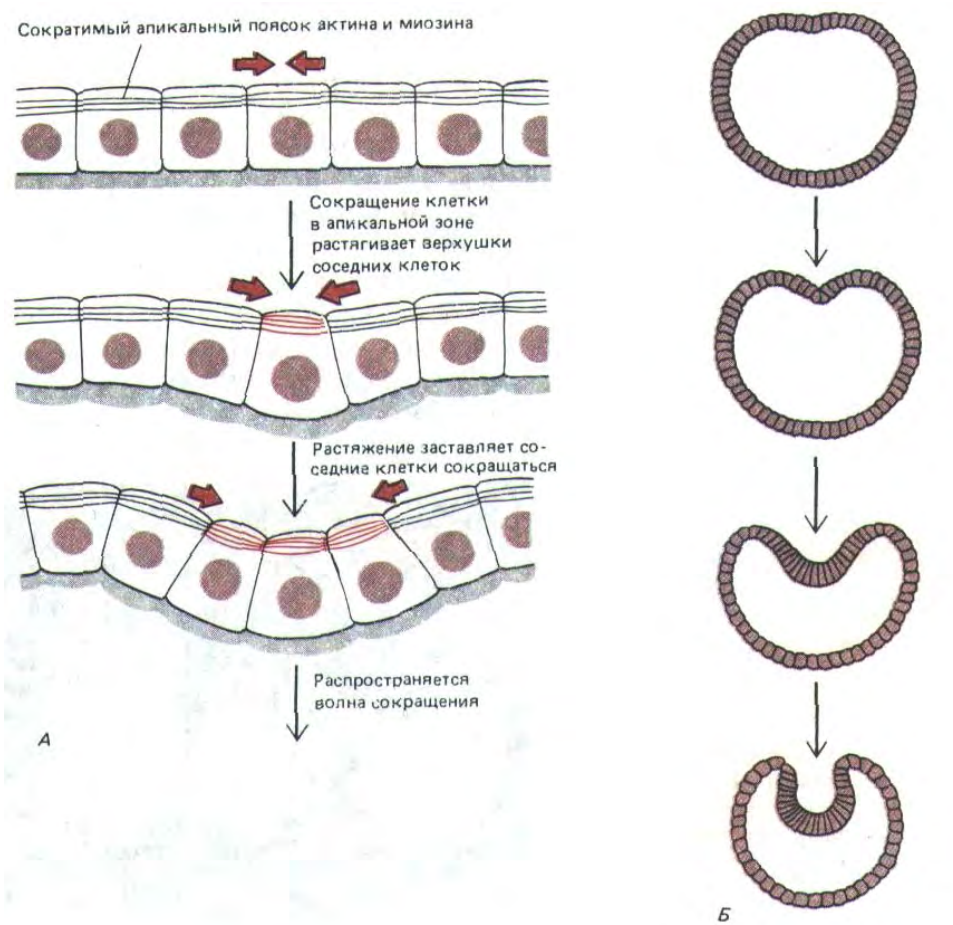


Рис. 11-87. Компьютерная модель гаструляции, в основу которой положена волна сокращений цитоскелета, распространяющаяся от клетки к клетке. Каждая клетка эпителиального пласта имеет опоясывающую десмосому (межклеточное соединение с сократительным пучком актиновых филаментов, который, как было постулировано, сокращается в ответ на растяжение). А так как опоясывающая десмосома расположена в апикальном конце клетки, сокращение изменяет форму последней с цилиндрической на коническую. В пласте, состоящем из соприкасающихся клеток, сокращение одной из них будет растягивать соседние, заставляя их в ответ тоже сокращаться *(А)*. Если такой принцип будет действовать в сферическом или цилиндрическом слое клеток, это приведет к инвагинации (Б). Точная геометрическая форма этой инвагинации будет зависеть от механических свойств модельной системы клеток; система, представленная справа (Б), рассчитана на моделирование гаструляции у эмбриона морского ежа. (G. Odell st al., Dev. Biol. 85: 446-462, 1981.)

клетке такой пучок сократится, то в соседних с ней клетках возникнет натяжение, которое может заставить сократиться аналогичные структуры и в этих клетках, и тогда волна сокращения распространится по всему клеточному пласту. Созданные на основе этого простого механизма компьютерные модели дают большое разнообразие конечных форм, зависящих от первоначальной геометрии пласта. Например, слой эпителиальных клеток, окружающих сферическую полость, будет впячиваться, образуя двуслойную структуру, что весьма напоминает гаструляцию у зародышей морского ежа (рис. 11-87).

Хотя эти модели полностью умозрительны, нет сомнений, что цитоскелет играет фундаментальную роль в формообразовании тканей. Сложная форма и организация клеток в тканях и органах позвоночных зависит от белков цитоскелета в их разнообразных структурных сочетаниях. Часто тем элементом, который, видимо, управляет морфогенетическими движениями, бывают микротрубочки. В других случаях ведущую роль играют актиновые филаменты, как, например, при развитии волосковых клеток в ухе позвоночных.

11.6.10. Развитие волосковых клеток в улитке внутреннего уха зависит от точного контроля полимеризации актина [66]

Волосковые клетки - это специализированные эпителиальные клетки, находящиеся в улитке и преддверии внутреннего уха. Эти клетки чрезвычайно чувствительны к малейшему движению, будь то вибрация, вызываемая звуковыми волнами, или перемещение жидкости в полукружных каналах при изменении положения головы. Эти движения детектируются с помощью пучков *стереоцилий,* расположенных на поверхности каждой волосковой клетки в гексагональном порядке; в каждом таком пучке стереоцилий расположены рядами «по росту», подобно трубам органа (рис. 11-88). Едва заметные колебания стереоцилий, вызываемые звуками, преобразуются в волосковой клетке в электрические сигналы, которые затем передаются в мозг (разд. 19.6.2).

Тонкость структурной организации стереоцилий выражается не только в их строго упорядоченном расположении на поверхности волосковой клетки, но и в закономерном изменении их размеров, числа и ориентации от одного конца улитки к другому. У кур каждая волосковая клетка на проксимальном конце улитки несет более 250 стереоцилий со средней длиной 1,7 мкм, тогда как на противоположном конце каждая клетка имеет только 50 стереоцилий, средняя длина которых 5,2 мкм. Эти и другие градации в структуре отражают функциональную организацию волосковых клеток, которые «настроены» в одном конце улитки на

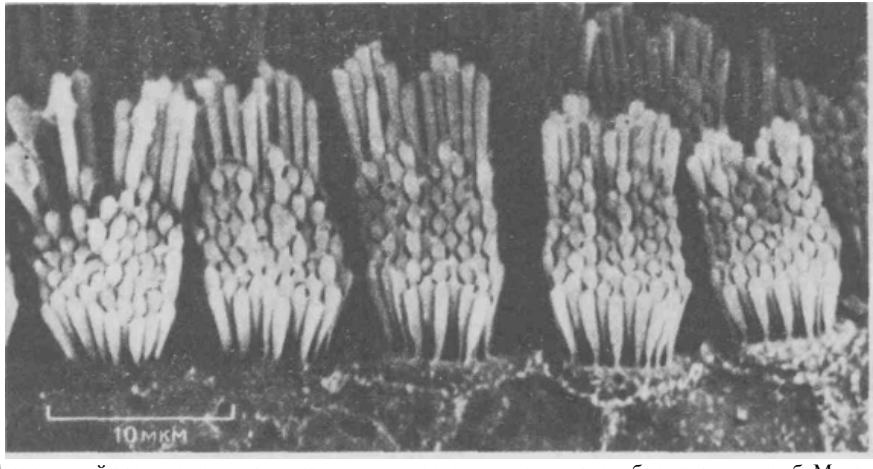


Рис. 11-88. Стереоцилий расположены на поверхности волосковых клеток наподобие органных труб. Микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения Lewis Tilney.)

низкие частоты, а в другом - на высокие. Размеры пучка стереоцилий на любой клетке удивительно точны и воспроизводимы - их можно использовать как надежный признак локализации клетки в определенном месте между двумя концами улитки.

Стереоцилий - это очень крупные специализированные микроворсинки, не имеюшие никакого отношения к настоящим ресничкам (цилиям). Они образуются как выпячивания плазматической мембраны и содержат пучок актиновых филаментов (рис. 11-89). Таким образом, формирование улитки четко демонстрирует способность клеток контролировать число, местоположение и длину актиновых филаментов совершенно определенным образом во всем пространстве ткани.

С помощью сканирующего электронного микроскопа можно увидеть, что у куриного эмбриона рост стереоцилий проходит три раздельные стадии (рис. 11-90). Сначала более или менее одновременно на поверхности каждой волосковой клетки появляются коротенькие стереоцилий. Затем они начинают удлиняться; первыми удлиняются те, которые будут в зрелом пучке самыми длинными, затем – будущие

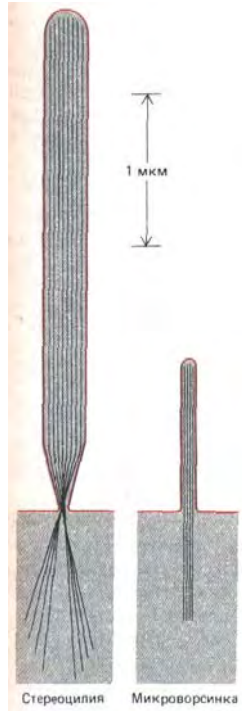


Рис. 11-89. Сравнение размеров типичной стереоцилий и типичней микроворсинки; структура той и другой поддерживается находящимся внутри пучком актиновых филаментов.

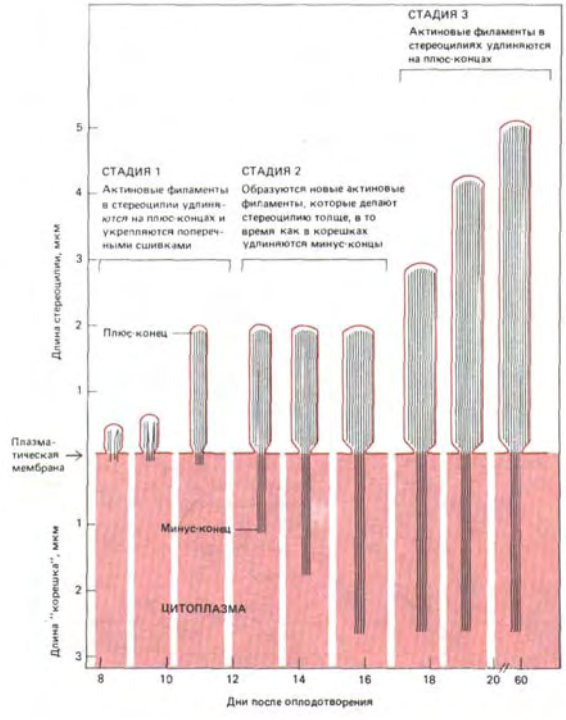


Рис. 11-90. Три стадии роста единичной стереоцилий в улитке уха цыпленка. Все стереоцилий проходят в своем развитии одни и те же три стадии, но время начала и продолжительность роста варьируют как у отдельных стереоцилий одной волосковой клетки, так и от клетки ї клетке. Таким образом создается весьма точная ступенчатая градация длин стереоцилий. Цыплята вылупляются на 21-й день. (Из L.C. Tilney, M. S. Tilney, Hearing Research 22: 55-77, 1986.)

«вторые по росту» и т.д. Начав расти, стереоцилии данного ряда продолжают удлиняться с постоянной малой скоростью (около 0,5 мкм в день), по-видимому, за счет присоединения мономеров актина на дистальном конце *(плюс-конце,* см. разд. 11.2.10) каждого актигнового филамента. Через три-четыре дня такого равномерного роста на поверхности каждой волосковой клетки образуется нечто вроде подстрижен-ного газона из небольших стереоцилии.

В течение следующих шести дней присоединение мономеров актина происходит, видимо, только в основании стереоцилии, так что актине-вые филаменты растут своими «корешками», уходящими в кортекс волосковых клеток. На этой стадии рост, очевидно, происходит на минус-концах актиновых филаментов; значит, при необходимости клетка может использовать и этот необычный способ роста. В это же время стереоцилии в определенных участках улитки утолщаются за счет добавления новых актиновых филаментов к их сердцевинным пучкам.

Наконец, на третьей стадии роста (от 17-го дня эмбрионального развития до вылупления) возобновляется присоединение мономеров актина к плюс-концам филаментов в пучках, и стереоцилии вновь начинают удлиняться. Теперь быстрее растут волосковые клетки в дистальном конце улитки; они перестают расти, когда создается градиент длины стереоцилии, присущий взрослой курице.

Механизм, позволяющий клеткам так точно регулировать сборку актиновых филаментов, не известен. Чем столь жестко определяется первоначальное число стереоцилии на поверхности каждой волосковой клетки? Каким образом клетка контролирует конечную длину каждого пучка актиновых филаментов, обеспечивая при этом строгую градацию длин стереоцилии? Это лишь два из множества интригующих вопросов, которые встают перед исследователями цитоскелета.

Заключение

Актиновые филаменты, микротрубочки, промежуточные филаменты и связанные с ними белки способны к самопроизвольной сборке в сложную сеть белковых нитей, структурирующих цитоплазму. Цитоскелет играет ведущую роль в определении формы и полярности клеток, а также в их подвижности. Когда .животная клетка движется, пучок актиновых филаментов периодически «выталкивает» наружу ламеллоподии и микрошипы на одной из сторон клетки (переднем крае) и растягивает клеточный кортекс, поляризуя клетку, что помогает ей продвигаться вперед. Эта полярность поддерживается с помощью микротрубочек или актиновых филаментов, которые направляют поток материала плазматической мембраны к переднему краю клетки.

Цитоскелет одной клетки может влиять на цитоскелет ее соседей как через межклеточные соединения, так и опосредованно, через внеклеточный матрикс. Таким способом координируются изменения формы клеток в процессе развития тканей и органов.

Литература

Общая

Bershadsky A.D., Vasiliev J.M. Cytoskeleton. New York. Plenum Press, 1988.

Lackie J. M. Cell Movement and Cell Behaviour. London, Alien and Unvvin, 1985.

Schliwa M. The Cytoskeleton. New York, Springer-Verlag, 1986.

Shcterline P. Mechanisms of Cell Motility. London, Academic Press, 1983.

Цитированная

1. *Amos L. A.* Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 14, 291-313, 1985.
   Huxley A. F. Reflections on Muscle. Princeton, NJ, Princeton University Press, 1980.
   Squire J. M. Muscle: Design, Diversity and Disease. Menlo Park CA, Benjamin-Cummings, 1986.
2. *Cooke R.* The mechanism of muscle contraction. CRC Crit. Rev. Biochem., 21, 53-118, 1986.
   Huxley H, E. The mechanism of muscular contraction. Science, 164, 1356-1366, 1969.
3. *Cohen C., Parry D. A. D.* α-Helical coiled coils a widespread motif in proteins. Trends Biochem. Sci., 11, 245-248, 1986.
   Davis J. S. Assembly processes in vertebrate skeletal thick filament formation. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 17, 217 239, 1988.
4. *Bessman S. P., Carpenter C. L.* The creatine-creatine phosphate energy shuttle. Annu. Rev. Biochem., 54, 831-862, 1985.
5. *Warrick H.M., Spudich J.A.* Myosin structure and function in cell motility. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 379-421, 1987.
6. *Pollard T.O., Cooper J.A.* Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Annu. Rev. Biochem., 55, 987-1035, 1986.
7. *Irring M.* Muscle mechanics and probes of the crossbridge cycle. In: Fibrous Protein Structure (J. M. Squire, P. J. Vibert, eds.). San Diego, CA, Academic Press, 1987.
   Pollard T.O. The myosin crossbridge problem. Cell, 48, 909, 910, 1987.
8. *Katz B.* Nerve, Muscle and Synapse. New York, MaGraw-Hill, 1966. [Имеется перевод: Катц Б. Нерв, мышца и синапс. М.: Мир, 1969].
   LaiF.A., Erickson H.P., Rousseau E., Liu O.-Y., Meissner G. Purification and reconstruction of the calcium release channel from skeletal muscle. Nature, 331, 315-319, 1988.
   Saito A., Inui M., Radermacher M., Frank J., Fleischer S. Ultrastructure of the calcium release channel of sarcoplasmatic reticulum. J. Cell Biol., 107, 211 219, 1988.
9. *Murray J. M., Weber A.* The cooperative action of muscle proteins. Sci. Am., 230(2), 59-71, 1974.
   Phillips G. N., Fillers J. P., Cohen C. Tropomyosin crystal structure and muscle regulation. J. Moï. Biol., 192, 111-131, 1986.
   Zot A.S., Potter J. D. Structural aspects of troponin-tropomyosin regulation of skeletal muscle contraction. Annu. Rev. Biophys. Chem., 16, 535-559, 1987.
10. *Wang K.* Sarcomere-associated cytoskeletal lattices in striated muscle. Review and hypothesis. In: Cell and Muscle Motility (J.W. Shay, ed.). Vol. 6, pp. 315-369. New York, Plenum Press, 1985.
11. *Fawcett D.W.* A Textbook of Histology, llth ed. Philadelphia, Saunders, 1986.
12. *Korn E.D., Hammer J.A.* Myosins of nonmuscle cells. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 17, 23-45, 1988.
    Sellers J. R., Adelstein R. S. Regulation of contractile activity. In: The Enzymes (P. Bover, E.G. Krebs, ed), Vol. 18, pp. 381-418. San Diego, CA, Academic Press, 1987.
13. *Citi S., Kendrick-Jones J.* Regulation of non-muscle myosin structure and function. Bioessays, 7, 155- 159, 1987.
14. *ByersH.R., Fujiwara K.* Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with anti-actin, anti-myosin and anti-alpha-actinin. J. Cell Biol., 93, 804-811, 1982.
    Langanger B. et al. The molecular organization of myosin in stress fibers of cultured cells. J. Cell Biol., 102, 200-209, 1986.
    Schroeder T.E. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1688-1692, 1973.
15. *Buckingham M.E.* Actin and myosin multigene families: their expression during the formation of skeletal muscle. Essays Biochem., 20, 77-109, 1985.
    Emerson C. P., Bernstein S. I. Molecular genetics of myosin. Annu. Rev. Biochem., 56, 695-726, 1987.
    Otey C.A., Kalnoski M.H., Bulinski J.C. Identification and quantification of actin isoforms in vertebrate cells and tissues. J. Cell. Biochem., 34, 113-124, 1987.
16. *Breitbart R.E., Andreadis A., Nadal-Ginard B.* Alternative splicing: a ubiquitous mechanism for the generation of multiple protein isoforms from single genes. Annu. Rev. Biochem., 56, 467-495, 1987.
17. *Bray D., Heath J., Moss D.* The membrane-associated "cortex" of animal cells: its structure and mechanical properties. J. Cell Sci. Suppl. 4, 71-88, 1986.

Korn E. D. Actin polymerization and its regulation by proteins from nonmuscle cells. Physiol. Rev., 62, 672-737, 1982.
Pollard T.O., Cooper J. A. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. Annu. Rev. Biochem., 55, 987-1035, 1986.
Tilney L. G. Interactions between actin filaments and membranes give spatial organization to cells. In: Modern Cell Biology, Vol. 2. Spatial Organization of Eukaryotic Cells (J. R. Mclntosh, B. H. Satir esdl.) pp. 163-199. New York: Liss, 1983.

18. *Sato M., Schwartz W.H., Pollard T.O.* Dependence of the mechanical properties of actin/alpha-actinin gels on deformation rate. Nature, 325, 828-830, 1987.
Stossel T. P. et el. Non-muscle actin binding proteins. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 353-402, 1985.
19. *Matsudaira P., Janmev P.* Pieces in the actin-severing protein puzzle. Cell, 54, 139-140, 1988.
Yin H. L. Gelsolin: calcium and polyphosphoinositide-regulated actin modulating protein. Bioessays, 7, 176 179, 1987.
20. *Korn E. D., Hammer J. A.* Myosins of nonmuscle cells. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 17, 23-45, 1988.
Warrick H.M., Spudlich J.A. Myosin structure and function in cell motility. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 379-421, 1987.
21. *Adams R. J., Pollard T.D.* Propulsion of organelles isolated from *Acanthamoeha* along actin filaments by myosin-I. Nature, 322, 754 756, 1986.
Sheetz M. P., Spudich J. A. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. Nature, 303, 31-35, 1983.
22. *Bennett V.* The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells. Annu. Rev. Biochem., 54, 273-304, 1985.
23. *Conzelman K.A., Mooseker M.S.* The 110-kD protein-calmodulin complex of the intestinal microvillus in an actin-activated MgATPase. J. Cell Biol., 105, 313-324, 1987.
Mooseker M. S. Organization, chemistry, and assembly of the cytoskeletal apparatus of the intestinal brush border. Annu. Rev. Cell. Biol., 1, 209-241, 1985.
24. *Burridae K. et al.* Focal adhesions: transmembrane junctions between the extracellular matrix and cytoskleton. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 487-525, 1988.
Horwitz A., Duyaan K., Buck C., Beckerle M.C., Bur ridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. Nature, 320, 531-533, 1986.
25. *Bonder E. M., Fishkind D.J., Mooseker M.S.* Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. Cell, 34, 491-501, 1983.
Korn E.D., Carlier M.-F., Pantaloni D. Actin polymerization and ATP hydrolysis. Science, 238, 638-644, 1987.
26. *Abercrombie M.* The crawling movement of metazoan cells. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 207, 129-147, 1980.
Small J. V., Rinnerthaler G., Hinssen H. Organization of actin meshworks in cultured cells: the leading edge. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 46, 599-611, 1982.
Wany Y. Exhange of actin subunits at the leading adge of living fibroblasts: possible role of treadmiling. J. Cell Biol., 101, 597 602, 1985.
27. *Tilney L. G., Inoue S.* Acrosomal reaction of *Thyone* sperm. II. The kinetics and possible mechanism of acrosomal process elongation. J. Cell Biol., 93, 820-827, 1982.
28. *Carson M., Weber A., Zigmond S. H.* An actin-nucleating activity in poly-morphonuclear leukocytes is modulated by chcrnotactic peptides, J. Cell Biol., 103, 2707-2714, 1986.
Devreotes P., Zigmond S. Chemotaxis in eukaryotic cells. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 649-686, 1988.
Tilney L. G., Bonder E. M., DeRosier D.J. Actin filaments elongate from their membrane-associated ends. J. Cell Biol., 90, 485-494, 1981.
29. *Cooper J.A.* Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. J. Cell Biol., 105, 1473-1478, 1987.
30. *Dustin P.* Microtubules, 2nd ed., pp. 127-164. New York, Springer-Verlag, 1984.
Gibbons I.R. Cilia and flagella of eukaryotes. J. Cell Biol., 91, 107s-124s, 1981.
Roberts K., Hyams J.S., eds. Microtubules. New York. Academic Press, 1979. *Satir P.* How cilia move. Sci. Am., 231(4), 44-63, 1974.
31. *Amos L. A., Baker T.S.* The three dimensional structure of tubulin protofilaments. Nature, 279, 607-612, 1979.
Mandelkow E.-M., Schultheiss R., Rapp R., Muller M., Mandelkow E. On the surface lattice of microtubules: helix starts, protofilament number, seam and handedness. J. Cell Biol., 102, 1067-1073, 1986.
RaffE.C. Genetics of microtubule systems. J. Cell Biol., 99, 1-10, 1984.

Sulivan K. F. Structure and utilization of tubulin isotypes. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 687-716, 1988.

32. *Linck R. W., Amos W. B.* Localization of tektin filaments in microtubules of sea urchin sperm flagella by immunoelectron microscopy, J. Cell Biol., 100, 126-135, 1985.
33. *Goodenough U. W., Heuser J. E.* Substructure of inner dynein arms, radial spokes, and the central pair/projection complex of cilia and flagella. J. Cell Biol., 100, 2008 2018, 1985.
34. *Summers K. E., Gibbons 1. R.* ATP-induced sliding of tubules in trypsin-treated flagella of sea urchin sperm. Proc. Natl. Acad. Sci. UDA, 68, 3092-3096, 1971. *Warner F. D., Satir P.* The structural basis of ciliary bend formation. J. Cell Biol., 63, 35-63, 1974.
35. *Johnson K. A.* Pathway of the microtubule-dynein ATPase and structure of dynein: a comparison with actomyosin. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 14, 161-188, 1985.
36. *Brokaw C.J.* Future directions for studies of mechanisms for generating flagellar bending waves. J. Cell Sci., Suppl. 4, 103 113, 1986.
Brokaw C. J., Luck D. J. L., Huang B. Analysis of the movement of *Chlamydomonas* flagella: the function of the radial-spoke system is revealed by comparison of wild-type and mutant flagella. J. Cell Biol., 92, 722-732, 1982.
37. *Afzelius B. A.* The immotile-cilia syndrome: a microtubule-associated defect. CRC Crit. Rev. Biochem., 19, 63-87, 1985.
Huang B. Chlanydomonas reinhardtii: a model system for genetic analysis of flagellar structure and motility. Int. Rev. Cytol., 99, 181 215, 1986.
Luck D. J. L. Genetic and biochemical dissection of the eucaryotic flagellum. J. Cell Biol., 98, 789 794, 1984.
38. *Lefebvre P. A., Rosenbaum J. L* . Regulation of the synthesis and assembly of ciliary and flagellar proteins during regeneration. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 517-546, 1986.
Wheatley D. N. The Centriole: A Central Enigma of Cell Biology. New York, Elsevier, 1982.
39. *Karsenti E., Mozo B.* Centrosomes and the spatial distribution of microtubules in animal cells. Trends Biochem. Sci., 11, 460-463, 1986.
Ramanis Z., Luck D. J. L. Loci affecting flagellar assembly and function map to an unusual linkage group in *Chlamydomonas reinhardtii.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 423 436, 1986.
Vorobjev LA., Chentsov Y.S. Centrioles in the cell cycle. 1. Epithelial cells. J. Cell Biol., 93, 938 949, 1982.
40. *Dustin P.* Microtubules, 2nd ed. Berlin, Springer-Verlag, 1984.
41. *De Brabander M. et al.* Microtubule dynamics during the cell cycle: the effects of taxol and nocodazole on the microtubule system of Ptk2 cells at different stages of the mitotic cycle. Int. Rev. Cytol., 101, 215-274, 1986.
Inoue S. Cell division and the mitotic spindle. J. Cell Biol., 91, 13Is-147s, 1981.
Salmon E. D., McKeel M., Hays T. Rapid rate of tubulin dissociation from microtubules in the mitotic spindle in vivo measured by blocking polymerization with colchicine. J. Cell Biol., 99, 1066-1075, 1984.
42. *Farrell K. W., Jordan M.A., Miller H.P., Wilson L.* Phase dynamics at microtubule ends: the coexistence of microtubule length changes and treadmilling. J. Cell Biol., 104, 1035-1046, 1987.
Mclntosh J. R., Euteneuer U. Tubulin hooks as probes for microtubule polarity: an analysis of the method and evaluation of data on microtubule polarity in the mitotic spindle. J. Cell Biol., 98, 525 533, 1984.
43. *Carlier M.-F.* Role of nucleotide hydrolysis in the polymerization of actin and tubulin. Cell Biophys., 12, 105-117, 1988.
Horio H. Hotani H. Visualization of the dynamic instability of individual microtubules by dark field microscopy. Nature, 321, 605-607, 1986.
Mitchison T., Kirschner M. Dynamic instability of microtubule growth. Nature, 312, 237-342, 1984.
44. *Karsenti E., Maro B.* Centrosomes and the spatial distribution of microtubules in animal cells. Trends Biochem. Sci., 11, 460-463, 1986.
Mitchison T., Kirschner M. Microtubule assembly nucleated by isolated Centrosomes. Nature, 312, 232-237, 1984.
45. *Kirschner M., Mitchison T.* Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. Cell, 45, 329-342, 1986.
Sammak P. J., Borisy G. G. Direct observation of microtubule dynamics in living cells. Nature, 332, 724-726, 1988.
46. *Barra H. S., Arce C. A., Argarana C. E.* Posttranslational tyrosination and detyrosination of tubulin. Molec. Neurobiol., 2, 133-153, 1988. *Gundersen G. G., Khawja S., Bulinski J. C.* Postpolymerization detyrosination of [α]-tubulin: a mechanism for subcellular differentiation of microtubules. J. Cell Biol., 105, 251-264, 1987.

Maruta H., Greer K., Rosenbaum J. L. The acetylation of a-tubulin and its relationships to the assembly and disassembly of microtubules. J. Cell Biol., 103, 571-579, 1986.
Schulze E., Asai D. J., Bulinski J. C., Kirschner M. Post-translational modification and microtubule stability. J. Cell Biol., 105, 2167-2177, 1987.
47. *Olmstcd J. B.* Microtubule-associated proteins. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 421-457, 1986.
ValleeR.B., Bloom G. S., Theurkauf W. E. Microtutbule-associated proteins: subunits of the cytomatrix. J. Cell Biol., 99, 38s-44s, 1984.
48. *Alien R.D.* The microtubule as an intracellular engine. Sci. Am., 256(2), 42-49, 1987.
Alien R.D. ct al. Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. J. Cell Biol., 100, 1736 1752, 1985.
49. *Vale R.* Intracellular transport using microtubule-based motors. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 347-378, 1987.
Vale R.D., Reese T.S., SheetzM.P. Identification of a novel force-generating protein, kinesin, involved in microtubule-based motility. Cell, 42, 39 50, 1985.
Vallee R. B., Wall J. S., Paschal B. M., Shpetner H. S. Microtubule-associated protein 1C from brain is a two-headed cytosolic dynein. Nature, 332, 561 563, 1988.
50. *Allan V.J., Kreis T.E.* A microtubule-binding protein associated with membranes of the Golgi apparatus. J. Cell Biol., 103, 2229-2239, 1986.
Dabora S. L., Sheet- M. P. The microtubule-dependent formation of a tubulovesicular network with characteristics of the ER from cultured cell extracts. Cell, 54, 27-35, 1988.
Lee C., Chen L. B. Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. Cell, 54, 37-46, 1988.
Lucocq J. M., Warren G. Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells. EMBO J., 6, 3239-3246, 1987.
51. *Geiger B.* Intermediate filaments: looking for a function. Nature, 329, 392-393, 1987. *Steinert P. M., Roop D. R.* Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annu. Rev. Biochem., 57, 593-626, 1988.
Traub P. Intermediate Filaments: A Review. New York, Springer-Verlag, 1985. *Wang E., Fischman D., Liem B.K.H., Sun T.-T., eds.* Intermediate Filaments. Ann. N.Y. Acad. Sci., 455, 1985.
52. *Osborn M., Weber K.* Tumor diagnosis by intermediate filament typing: a novel tool for surgical pathology. Lab. Invest., 48, 372-394, 1983.
53. *Ip W., Hartzer M. K., Pang S. Y.-Y., Robson R. M.* Assembly of vimentin in vitro and its implications concerning the structure of intermediate filaments. J. Mol. Biol., 183, 365-375, 1985.
Quintan R. A. ct al. Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins. J. Mol. Biol., 192, 337-349, 1986.
54. *Geuens G., De Brabander M., Nuydens R., De Mey J.* The interaction between microtubules and intermediate filaments in cultured cells treated with taxol and nocodazole. Cell Biol. Int. Rep., 7, 35-47, 1983.
Goldman R. et al. Intermediate filaments: possible functions as cytoskeletal connecting links between the nucleus and the cell surface. Ann. N. Y. Acad. Sci., 45, 1-17, 1985.
55. *Geisler N., Weber K.* Phosphorylation of desmin in vitro inhibits formation of intermediate filaments: identification of three kinase A sites in the aminoterminal head domain. EMBO J., 7, 15 20, 1988.
Inagaki M., Nishi Y., Nishizawa K., Matsuyama M., Sato C. Site-specific phosphorylation induces disassembly of vimentin filaments in vitro. Nature, 328, 649 652, 1987.
56. *Aebi U., Cohn J., Buhle* L., *Gerace L.* The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. Nature, 323, 560-564, 1986.
McKeon F.D., Kirschner M. W., Caput D. Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. Nature, 319, 463-468, 1986.
57. *Abercrombie M.* The crawling movement of metazoan cells. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 207, 129-147, 1980.
Bridgman P. Structure of cytoplasm as revealed by modern electron microscopy techniques. Trends Neurosci., 10, 321-325, 1987.
Singer S. J., Kupfer A. The directed migration of eukaryotic cells. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 337-365, 1986.
Trinkaus J. P. Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo. 2nd ed. Englewood Clifis, NJ, Prentice-Hall, 1984.
58. *Bridgman P. C., Reese T. S.* The structure of cytoplasm in directly frozen cultured cells. 1. Filamentous meshworks and the cytoplasmic ground substance. J. Cell Biol., 99, 1655-1668, 1984.

Heuser J., Kirschner M. W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. J. Cell Biol., 86, 212-234, 1980.

59. *Fulton A.B.* How crowded is the cytoplasm? Cell, 30, 345-347, 1982.
Luby-Phelps K., Taylor D. L., Lanni F. Probing the structure of the cytoplasm. J. Cell Biol., 102, 2015-2022, 1986.
60. *Kolega J.* Effects of mechanical tension on protrusive activity and microfilament and intermediate filament organization in an epidermal epithelium moving in culture. J. Cell Biol., 102, 1400 1411, 1986.
Trinkam J. P. Cells into Organs: The Forces That Shape the Embryo, 2nd ed., pp. 157 244. Englewood Cliffs, NJ. Prentice-Hall, 1984.
61. *Bray D., Hollcnbeck P.J.* Growth cone motility and guidance. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 43-62, 1988.
Euteneuer U., Schliwa M. Persistent, directional motility of cells and cytoplasmic fragments in the absence of microtubules. Nature, 310, 58-61, 1984.
Malawista S. E., De Boisfleury Chevance A. The cytokinetoplast: purified, stabile, and functional motile machinery from human blood polymorphonuclear leukocytes. J. Cell Biol., 95, 960-973, 1982.
Marsh L., Letourneau P. C. Growth of neurites without filopodial or lamellipodial activity in the presence of cytochalasin B. J. Cell Biol., 99, 2041-2047, 1084.
Vasiliev J. M. et at. Effect of colcemid on the locomotion of fibroblasts. J. Embryol. Exp. Morphol., 24, 625-640, 1970.
62. *Bray D., White J.G.* Cortical flow in animal cells. Science, 239, 883-888, 1988.
De Lozannc A., Spudich J.A. Disruption of the *Dictyostelium* myosin heavy chain gene by homologous recombination. Science, 236, 1086-1091, 1987.
Knecht D. A., Loomis W. F. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene expression in *Dictyostelium discoideum.* Science, 236, 1081 1086, 1987.
63. *Bergmann J.E., Kupfer A., Singer S.J.* Membrane insertion at the leading edge of motile fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 1367-1371, 1983.
Bretscher M.S. How animal cells move. Sci. Am., 257(6), 72 90, 1987.
64. *Lackie J.M.* Cell Movement and Cell Behaviour, pp. 253-275. London, Alien and Unwin, 1986.
Trinkaus J. P. Cells into Organs: The Forces That Shape the Embryo, 2nd ed., pp. 157 244. Englewood Cliffs, NJ. Prentice-Hall, 1984.
65. *Ode/I G. M., Oster G., Alberch P., Burnside B.* The mechanical basis of morphogenesis. 1. Epithelial folding and invagination. Dev. Biol., 85, 446-462, 1981.
66. *Tilncy L. G., Tilney M. S., Cotanche D. A.* Aclin filaments, stereocilia, and hair cells of the cochlea. V. How the staircase pattern of stereociliary lengths in generated. J. Cell Biol., 106, 355-365, 1988.
Tilney L. G., De Rosier D. J. Actin filaments, stereocilia, and hair cells of the bird cochlea. IV. How the actin filaments become organized in developing stereocilia and in the cuticular plate. Dev. Biol., 116, 119-129, 1986.

12 **Межклеточная сигнализация**

Клетки многоклеточного организма нуждаются в обмене информацией друг с другом - для регуляции своего развития и организации в ткани, для контроля процессов роста и деления и для координации функций. Взаимодействие животных клеток осуществляется тремя способами: 1) клетки выделяют химические вещества, служащие сигналами для других клеток, расположенных на некотором расстоянии; 2) они несут на своей поверхности связанные с плазматической мембраной сигнальные молекулы, оказывающие влияние на другие клетки при непосредственном физическом контакте; 3) образуют щелевые контакты, прямо соединяющие цитоплазму двух взаимодействующих клеток, что делает возможным обмен малыми молекулами (рис. 12-1).

Взаимодействие клеток через щелевой контакт будет рассматриваться в гл. 14, а сейчас речь пойдет в основном о коммуникации на расстоянии, которая осуществляется с помощью секретируемых химических сигналов. Такой план изложения отражает современное состояние наших знаний в этой области. Секретируемые молекулы изучать несравненно легче, чем связанные с мембраной, и о механизмах их действия известно уже многое. Контактную же сигнализацию с помощью молекул

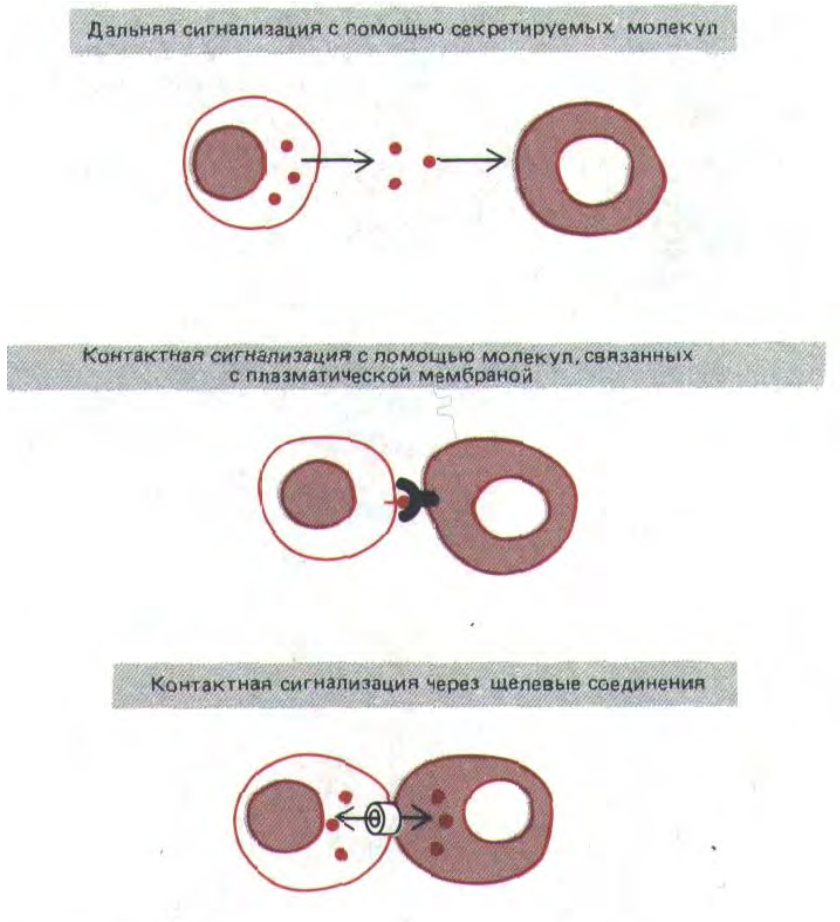


Рис. 12-1. Три различных способа межклеточной химической сигнализации.

наружной клеточной поверхности выявлять значительно труднее, и поэтому она изучена гораздо хуже; она, однако, тоже важна, особенно в процессах индивидуального развития и в иммунном ответе (разд. 18.6.1), а ее молекулярные основы, по-видимому, весьма сходны с таковыми дальней сигнализации. Особенности химической передачи сигналов в нервной системе и уникальные принципы, используемые в сигнализации у растений, будут рассмотрены отдельно в гл. 19 и 20 соответственно.

12.1. Три стратегии химической сигнализации: использование гормонов, локальных химических медиаторов и нейромедиаторов

Химические сигнальные механизмы различаются по расстояниям, на которых они действуют: 1) в случае **эндокринной сигнализации** специализированные эндокринные клетки выделяют гормоны, которые разносятся кровью и воздействуют на клетки-мишени, находящиеся иногда в самых разных частях организма; 2) в случае **паракринной сигнализации** клетки выделяют локальные химические медиаторы, которые поглощаются, разрушаются или иммобилизуются так быстро, что успевают подействовать только на клетки ближайшего окружения, быть может, в радиусе около миллиметра; 3) при **синаптической передаче,** используемой только в нервной системе, клетки секретируют нейромедиаторы в специализированных межклеточных контактах, называемых *химическими синапсами,* Нейромедиаторы диффундируют через синаптическую щель, обычно на расстояние около 50 нм, и воздействуют только на одну постсинаптическую клетку-мишень (рис. 12-2). В каждом случае мишень реагирует на определенный внеклеточный сигнал с помощью специальных белков, называемых **рецепторами,** которые связывают сигнальную молекулу и инициируют ответ. Многие сигнальные молекулы и рецепторы используются в передаче сигнала и по эндокринному, и по паракринному, и по синаптическому типу. Главные различия касаются быстроты и избирательности воздействия сигнала на определенные мишени.

12-3
12-4

12.1.1. Эндокринные клетки и нервные клетки специализированы для разных типов химической сигнализации [1]

Эндокринные и нервные клетки совместно координируют разнообразные функции миллиардов клеток, из которых состоит тело у высших животных. Эндокринные клетки обычно собраны в специальные железы

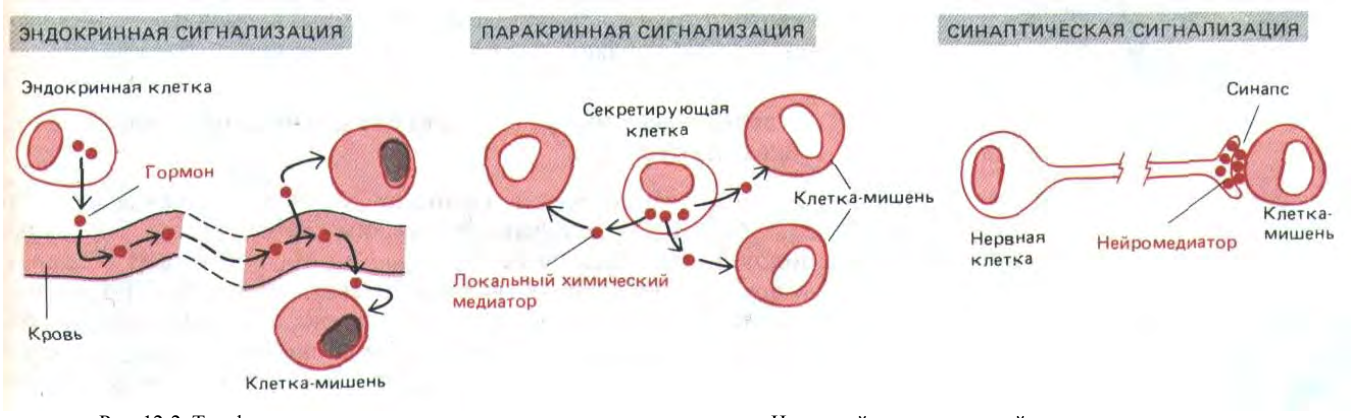


Рис. 12-2. Три формы сигнализации с помощью секретируемых молекул. Не все нейромедиаторы действуют в синапсах, как показано на рисунке; некоторые из них работают как локальные химические медиаторы (по паракринному типу), влияя сразу на целую группу соседних клеток-мишеней.

и выделяют свои гормоны во внеклеточную (интерстициальную) жидкость, окружающую все клетки в тканях. Отсюда молекулы диффундируют в капилляры и разносятся с кровью по всему телу. В каждой ткани они проникают из капилляров в интерстициальную жидкость и могут связываться клетками-мишенями. Поскольку распространение эндокринного сигнала определяется диффузией и кровотоком, оно происходит сравнительно медленно: обычно требуются минуты, чтобы гормон достиг своей мишени. Кроме того, специфичность сигналов в эндокринной системе всецело зависит от химической природы сигнального вещества и рецепторов на поверхности клетки-мишени: каждый тип эндокринной клетки секретирует в кровь свой гормон, и любая клетка, имеющая комплементарный рецептор для этого гормона, ответит реакцией, характерной для данной клетки (рис. 12-3, *А).*

Работа нервных клеток отличается гораздо большей быстротой и точностью. Они могут передавать информацию на большие расстояния по нервному волокну с помощью электрических импульсов со скоростью более 100 м/с. Только в нервных окончаниях, где высвобождается нейромедиатор, эти импульсы преобразуются в химические сигналы. Химический сигнал нервной клетки может действовать как паракринный или как синаптический. В первом случае нейромедиатор, подобно локальному химическому медиатору, диффундирует наружу и влияет на все соседние клетки-мишени, у которых имеется надлежащий рецептор. При синаптической передаче сигнал гораздо более точен и действие нейромедиатора ограничено единственной клеткой-мишенью, даже если соседние клетки имеют рецепторы для того же нейромедиатора (рис. 12-3, *Б).* Поскольку расстояние, на которое нейромедиатор должен в таких случаях диффундировать, меньше 100 нм, процесс длится менее миллисекунды (рис. 12-2).

Гормоны в крови и интерстициальной жидкости очень сильно разбавляются, и поэтому они должны быть способны действовать в чрезвычайно низких концентрациях (обычно менее 10^{-8} М); разбавление же нейромедиаторов на их коротком пути незначительно, и их концентрация около мембраны постсинаптической клетки может быть сравнительно высокой. Например, концентрация ацетилхолина в синаптической щели нервно-мышечного соединения составляет около $5\text{-}10^{-4}$ М. В соответствии с этим рецепторы нейромедиатора в синапсе обладают относительно низким сродством к своему лиганду и не могут заметным образом реагировать на низкие концентрации нейромедиатора, приходящего путем диффузии от соседних синапсов. Нейромедиатор быстро удаляется из синаптической щели специальными гидролитическими ферментами или мембранными транспортными белками, которые перекачивают его обратно в нервное окончание. Этим достигается точность воздействия сигнала не только в пространстве, но и во времени: короткое, «импульсное» освобождение нейромедиатора вызывает быстрый и краткий ответ, что позволяет сохранять временные характеристики сигнала при передаче его от клетки к клетке.

12.1.2. Главным регулятором эндокринной системы служит гипоталамус [1, 2]

В определенном участке мозга-**гипоталамусе**-эндокринная и нервная системы физически и функционально связаны друг с другом. Гипоталамус расположен непосредственно над *гипофизом, с* которым соединен *ножкой гипофиза.* Гипоталамус выполняет свою связующую роль с помощью клеток, сочетающих особенности нейрона и эндокринной клетки; соответственно их называют *нейроэндокринными (нейросекреторными) клетками.* Большая часть таких клеток гипоталамуса отвечает на

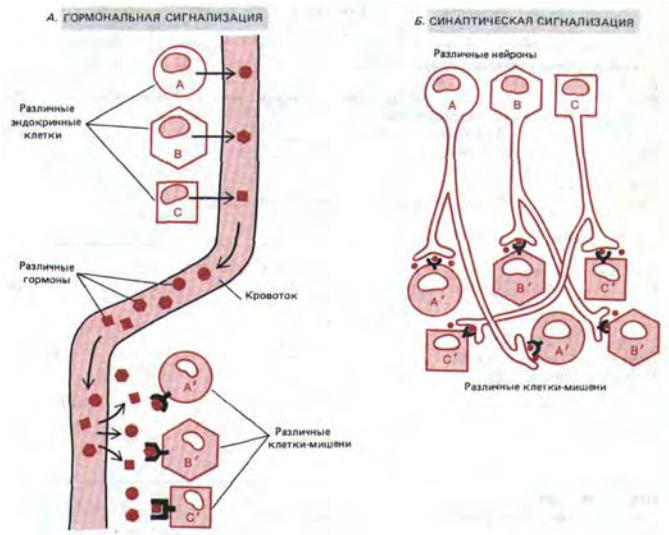


Рис. 12-3. Различие между гормональной *(А)* и синаптической *(Б)* передачей сигналов. Эндокринные клетки выделяют в кровь множество гормонов, и клетки-мишени, чувствительные к данному гормону, т.е. имеющие рецепторы для его связывания, «вылавливают» соответствующий гормон из внеклеточной жидкости. При синаптической же передаче специфичность определяется тесным контактом между окончанием нервного волокна и той клеткой-мишенью, которой это волокно передает сигнал: медиатор, выделяемый нервным окончанием, достигает только этой клетки. Для специфической коммуникации с различными клетками-мишенями разные эндокринные клетки должны использовать разные гормоны, в то время как многие нервные клетки могут использовать один и тот же нейромедиатор, сохраняя при этом специфичность воздействия.

стимуляцию их нейронами других отделов мозга, выделяя в кровеносные сосуды гипофизарной ножки определенный пептидный гормон, который затем специфически стимулирует или подавляет секрецию гипофизом другого гормона. (Другие нейроэндокринные клетки гипоталамуса посылают аксоны в гипофиз и через них выделяют свои секреты

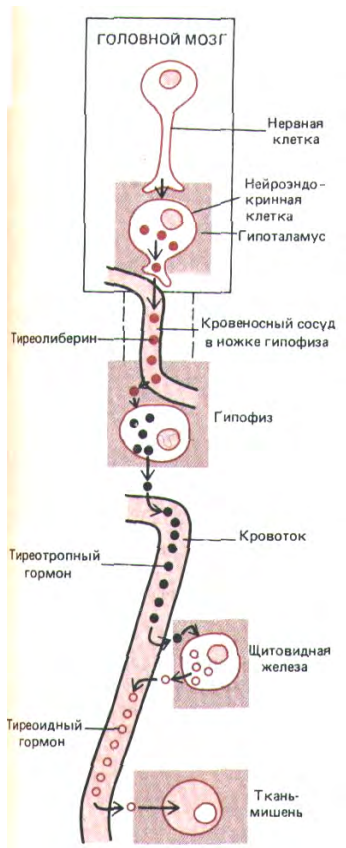
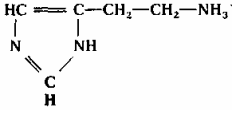
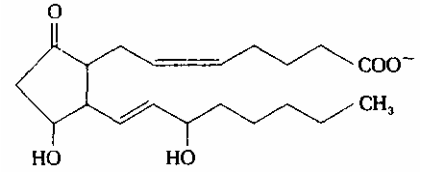
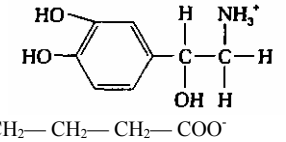
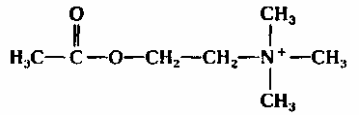


Рис. 12-4. Секреция тиреоидного гормона опосредованно регулируется нервной системой. Определенные нейросекреторные клетки гипоталамуса при стимуляции их нейронами высших отделов мозга выделяют в кровеносные сосуды ножки гипофиза тиреолиберин, который, воздействуя на специфические клетки гипофиза, заставляет их высвобождать тиреотропный гормон (ТТГ). ТТГ током крови транспортируется к щитовидной железе и побуждает ее клетки синтезировать и выделять тиреоидный гормон. Этот гормон стимулирует разнообразные метаболические процессы в большинстве клеток организма. При этом повышение концентрации тиреоидного гормона в крови тормозит секрецию тиреолиберина и ТТГ (на схеме не показано). Эта отрицательная обратная связь препятствует чрезмерному повышению уровня тиреоидного гормона в крови. Подобного рода механизм регулирует секрецию многих гормонов.

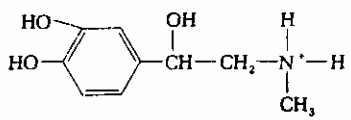
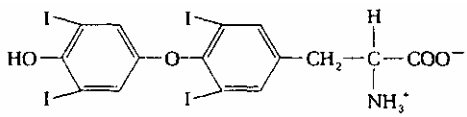
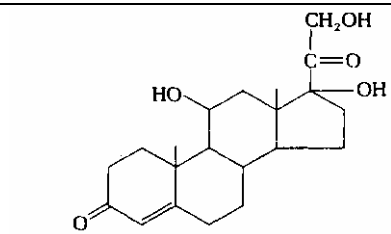
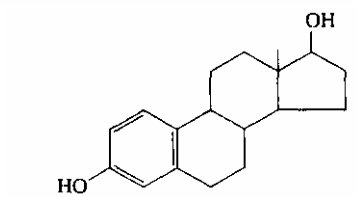
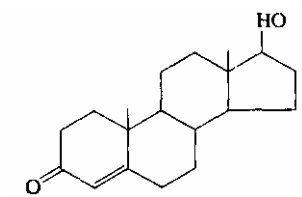
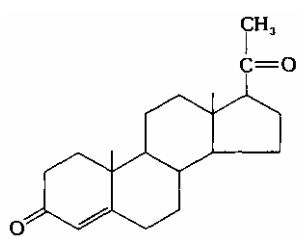
Таблица 12-1. Некоторые примеры внеклеточных сигнальных молекул

	Источник	Структура	Главные эффекты
Локальные химические медиаторы			
Белки			
Фактор роста нервов	Кожа; все ткани, иннервируемые симпатическими нервами	Две идентичные цепи из 118 аминокислот	Выживание и рост сенсорных и симпатических нейронов и некоторых нейронов в ЦНС
Олигопсптиды			
Фактор хемотаксиса эозинофилов	Тучные клетки	4 аминокислоты	Хемотаксический сигнал для лейкоцитов определенного типа (эозинофилов)
Производные аминокислот			
Гистамин	Тучные клетки		Вызывает расширение кровеносных сосудов и повышение их проницаемости
Производные жирных кислот			
Простагландин	Клетки многих типов		Сокращение гладкой мускулатуры
Нейромедиаторы [1]			
Аминокислоты и родственные соединения			
Глицин	Нервные окончания	$^{+}H_3M—CH_2—COO^-$	Тормозный медиатор в ЦНС
Норадреналин	Нервные окончания		Возбуждающий и тормозный медиатор центральной и периферической нервной системы
γ-Аминомасляная кислота	Нервные окончания	$^{+}H_3M—CH_2—CH_2—CH_2—COO^-$	Тормозный медиатор в ЦНС
Ацетилхолин	Нервные окончания		Возбуждающий медиатор в нервно-мышечном соединении; возбуждающий и тормозный медиатор в центральной и периферической нервной системе
Олигопептиды			
Энкефалин	Нервные окончания	5 аминокислот	Подобно морфину, тормозит передачу болевых сигналов в ЦНС
Гормоны[2]			
Белки			
Инсулин	β-Клетки поджелудочной железы	Белок: α-цепь-21 аминокислота, β-цепь-30 аминокислот	Утилизация углеводов (включая захват глюкозы клетками); стимуляция белкового синтеза; стимуляция синтеза липидов в жировых клетках
Соматотропин (гормон роста)	Передняя доля гипофиза	Белок, 191 аминокислота	Стимулирует синтез в печени соматомедина-1, вызывающего рост мышц и костей; сти-

Продолжение табл. 12.1

	Источник	Структура	Главные эффекты
			мулирует дифференцировку жировой, мышечной и хрящевой ткани
Соматомедин-1 (инсулино-подобный фактор роста 1)	Главным образом печень	Белок, 70 аминокислот	Рост костной и мышечной ткани; влияние на метаболизм Ca^{2+} , фосфата, углеводов и липидов
Адренокорти-котропный гормон (АКТГ)	Передняя доля гипофиза	Белок, 39 аминокислот	Стимуляция синтеза кортизола корой надпочечников; освобождение жирных кислот из жировых клеток
Паратгормон	Паращитовидные железы	Белок, 84 аминокислоты	Усиливает резорбцию кости, как следствие - повышает уровень Ca^{2+} и фосфата в крови; усиливает реабсорбцию почками Ca^{2+} и Mg^{2+} и уменьшает реабсорбцию фосфата
Фолликулостимулиру ющий гормон (ФСГ)	Передняя доля гипофиза	Гликопротеин, α-цепь-92 аминокислоты, β-цепь 118 аминокислот	Стимуляция роста фолликулов яичника и секреции ими эст-радиола; стимуляция сперматогенеза в семенниках
Лютеинизирующий гормон (Л Г)	Передняя доля гипофиза	Гликопротеин, α-цепь-92 аминокислоты, β-цепь - 115 аминокислот	Стимуляция созревания ооцитов, овуляции и секреции прогестерона яичником; стимуляция выработки тестостерона семенниками
Фактор роста эпидермиса	Неизвестен	Белок, 53 аминокислоты	Стимуляция клеток эпидермиса и других клеток к делению
Тиреотропный гормон (ТТГ)	Передняя доля гипофиза	Гликопротеин, α-цепь-92 аминокислоты, β-цепь-112 аминокислот	Стимуляция синтеза тироксина в щитовидной железе; освобождение жирных кислот жировыми клетками
Олигопептиды			
Тиреолиберин	Гипоталамус	3 аминокислоты	Стимуляция синтеза тиреотропного гормона (ТТГ) передней долей гипофиза
Люлиберин	Гипоталамус	10 аминокислот	Стимуляция синтеза лютеинизирующего гормона (ЛГ) передней долей гипофиза
Вазопрессин (антидиуретический гормон)	Задняя доля гипофиза	9 аминокислот	Повышение кровяного давления в результате сужения мелких кровеносных сосудов; усиленная реабсорбция воды в почечных канальцах
Соматостатин	Гипоталамус	14 аминокислот	Подавление секреции соматотропина передней долей гипофиза

Продолжение табл. 12.1

	Источник	Структура	Главные эффекты
Производные аминокислот			
Адреналин	Мозговое вещество надпочечников		Повышение кровяного давления, ускорение сердечного ритма; усиление гликогенолиза в печени и мышцах; выброс жирных кислот жировыми клетками
Тиреоидный гормон (тироксин)	Щитовидная железа		Повышение метаболической активности большинства клеток
Стероидные гормоны			
Кортизол	Кора надпочечников		Влияние на метаболизм белков, углеводов и липидов в большинстве тканей; подавление воспалительных реакций
Эстрадиол	Яичники, плацента		Развитие и поддержание женских вторичных половых признаков; созревание и циклическая активность придаточных органов половой системы, развитие протоков молочной железы
Тестостерон	Семенники		Развитие и поддержание мужских вторичных половых признаков; созревание придаточных органов и поддержание их нормальной функции
Прогестерон	Яичники (желтое тело), плацента		Подготовка матки к беременности; сохранение беременности; развитие альвеолярной системы молочных желез

[1] Норадреналин и энкефалин чаще действуют по паракринному, чем по синаптическому типу; ацетилхолин может действовать и тем и другим способом. Возбуждающие нейромедиаторы стимулируют активность клеток-мишеней, а тормозные подавляют ее.

[2] Многие нестероидные гормоны синтезируются также некоторыми нейронами головного мозга.

в общий кровоток.) Многие из гормонов гипофиза, выделяемых под контролем гипоталамуса, стимулируют какую-либо из других эндокринных желез и вызывают секрецию в кровь третьего гормона. Таким образом, гипоталамус служит у позвоночных главным регулятором эндокринной системы. В качестве примера на рис. 12-4 показано, каким образом он регулирует секреторную функцию щитовидной железы.

В табл. 12-1 приведены сведения о некоторых локальных химических медиаторах, нейромедиаторах и гормонах - указаны места их синтеза, структура и основное действие. Видно, что структура сигнальных молекул так же разнообразна, как и их функции. Среди этих молекул есть короткие пептиды, более крупные белки и гликопротеины, аминокислоты и родственные им соединения, стероиды (вещества, образующиеся из холестерола и очень сходные между собой по структуре) и производные жирных кислот. Каждая сигнальная молекула представлена в табл. 12-1 только в одном разделе, хотя многие из них могут действовать несколькими способами. Например, некоторые пептидные гормоны в головном мозгу позвоночных действуют как нейромедиаторы (в качестве паракринных факторов).

12.1.3. Разные клетки по-разному реагируют на один и тот же сигнал

Большинство клеток у взрослых животных специализировано для выполнения какой-то одной главной функции, и все они имеют характерный набор рецепторов, который позволяет им реагировать на химические сигналы, запускающие или модулирующие эту функцию. Многие сигнальные молекулы действуют в очень низкой концентрации (обычно не более 10^{-8} М), и связывающие их рецепторы, как правило, имеют к ним высокое сродство (константа сродства $K_a \geq 10^8$ л/моль).

Одни и те же сигнальные молекулы часто оказывают различное действие на разные клетки-мишени. Например, ацетилхолин стимулирует сокращение волокон скелетной мускулатуры, но уменьшает частоту и силу сокращения клеток сердечной мышцы. В данном случае рецепторы ацетилхолина в скелетных мышцах отличаются от рецепторов на клетках миокарда. Но не всегда причина состоит в различии рецепторов. Часто одинаковые сигнальные молекулы связываются с идентичными рецепторами, и все же это ведет к совершенно разным реакциям у различных клеток-мишеней (рис. 12-5). Это означает, что ответы клеток-мишеней могут быть запрограммированы двумя способами: либо самим набором рецепторов клеточной поверхности, либо теми внутриклеточными системами, с которыми эти рецепторы сопряжены.

12.1.4. Реакция клетки на химический сигнал может быть в одних случаях быстрой и кратковременной, в других - медленной и продолжительной [2, 3]

Химические сигналы, приводящие клеточные функции в соответствие с изменениями среды, обычно вызывают быстрые и кратковременные ответы. Например, повышение уровня глюкозы в крови стимулирует секрецию белкового гормона *инсулина* эндокринными клетками поджелудочной железы. В считанные минуты повышение концентрации инсулина заставляет клетки печени и мышц усиленно поглощать глюкозу, и ее концентрация в крови падает. Этот ответ состоит из трех частей, ни одна их которых не требует синтеза нового белка:

1) в поджелудочной железе повышение уровня глюкозы заставляет клетки освобождать (путем экзоцитоза) запасенный в них инсулин;

2) в жировых и мышечных клетках во внутриклеточных пузырьках имеется некоторый резерв белков, транспортирующих глюкозу, и повышение уровня инсулина стимулирует включение этих пузырьков с их белками в плазматическую мембрану, что повышает скорость поглощения глюкозы; тогда уровень глюкозы в крови падает, и это снижает секрецию инсулина;

3) поскольку при снижении уровня инсулина добавочные переносчики

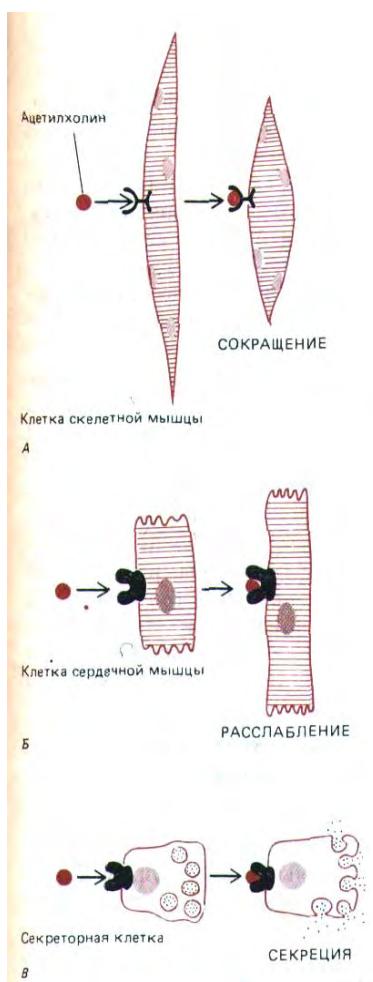


Рис. 12-5. Одни и те же сигнальные молекулы могут вызывать в разных клетках-мишенях различные ответы. В некоторых случаях это обусловлено тем, что сигнальная молекула связывается с разными белками-рецепторами *(А* и *Б)*. В других случаях такие молекулы связываются с одинаковыми рецепторами, но активируют в разных клетках разные механизмы ответа *(В* и *Г)*.

глюкозы быстро удаляются с клеточной поверхности путем эндоцитоза и снова включаются во внутриклеточный пул, скорость поглощения глюкозы жировыми и мышечными клетками возвращается к исходному уровню. Таким способом поддерживается относительно постоянная концентрация глюкозы в крови.

Нейромедиаторы вызывают еще более быстрые реакции: в ответ на освобождение ацетилхолина из двигательных нервных окончаний волокна скелетной мышцы сокращаются и вновь расслабляются всего лишь за несколько миллисекунд.

Химические сигналы играют важную роль и в процессах индивидуального развития животных, нередко определяя время и тип дифференцировки тех или иных клеток. Некоторые из вызываемых эффектов проявляются медленно и бывают продолжительными. Например, в период полового созревания клетки яичника начинают секретировать в больших количествах стероидный женский половой гормон *эстрадиол.* Этот гормон вызывает изменение многих клеток в различных частях организма, что в конце концов приводит к развитию вторичных женских половых признаков, например к увеличению грудных желез. Если секреция эстрадиола прекращается, эти эффекты постепенно исчезают, но некоторые реакции, вызываемые стероидными половыми гормонами на очень ранней стадии развития млекопитающих, необратимы. Сходным образом, десятикратное повышение концентрации тиреоидного гормона в крови головастика стимулирует ряд радикальных и необратимых изменений, приводящих к его превращению в лягушку (рис. 12-6),

12.1.5. Только жирорастворимые сигнальные молекулы могут самостоятельно проникать в клетку

Все известные нейромедиаторы, а также большинство гормонов и локальных химических медиаторов водорастворимы. Есть, однако, исключения, и они образуют отдельный класс сигнальных молекул. Важными примерами служат сравнительно плохо растворимые в воде стероидные и тиреоидные гормоны, которые переносятся кровью в виде растворимых комплексов со специфическими белками-переносчиками. С таким различием в растворимости связаны фундаментальные различия в механизмах действия этих двух классов молекул на клетки-мишени. Водорастворимые молекулы слишком гидрофильны, чтобы прямо приходить через липидный бислой плазматической мембраны; поэтому они связываются со специфическими белковыми рецепторами на клеточной поверхности. Напротив, стероидные и тиреоидные гормоны растворимы в липидах и, отделившись от белка-носителя, могут легко проникать через плазматическую мембрану клетки-мишени. Эти гормоны связываются с белковыми рецепторами *внутри* клетки (рис. 12-7).

Еще одно важное различие между двумя описанными классами сигнальных молекул - это разная продолжительность жизни в кровотоке или тканевой жидкости. Водорастворимые молекулы, перейдя в кровь,

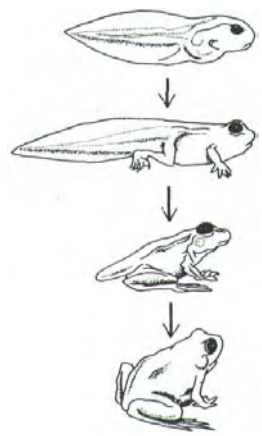


Рис. 12-6. Превращение головастика в лягушку. Показанные радикальные изменения вызываются тиреоидным гормоном. Если у развивающегося эмбриона удалить зачаток щитовидной железы, животное будет продолжать расти как головастик, не претерпевая метаморфоза. При введении тиреоидного гормона этот гигантский головастик превращается в лягушку.

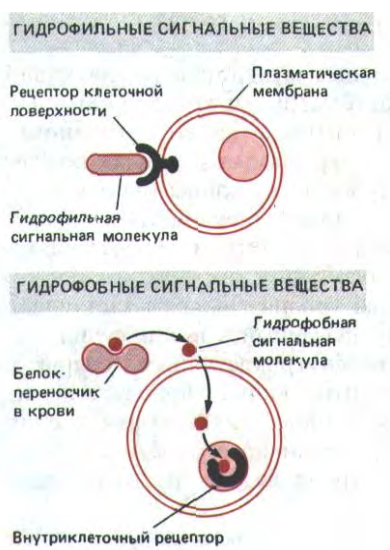


Рис. 12-7. Внеклеточные сигнальные молекулы в зависимости от своей растворимости связываются с поверхностными или внутриклеточными рецепторами. Гидрофильные молекулы не способны прямо проходить через плазматическую мембрану, поэтому они связываются с рецепторами на поверхности клетки-мишени. Многие гидрофобные молекулы могут диффундировать через плазматическую мембрану и связываться с рецепторами внутри клетки. Будучи нерастворимы в водных средах, гидрофобные сигнальные молекулы транспортируются кровью в виде комплексов со специальными белками-переносчиками, от которых они отделяются, перед тем как проникнуть в клетку-мишень.

обычно удаляются и/или разрушаются за время, измеряемое минутами, а локальные химические медиаторы и нейромедиаторы после выхода в межклеточное пространство инактивируются еще быстрее - за время порядка секунд или даже миллисекунд. В отличие от этого стероидные гормоны циркулируют в крови часами, а тиреоидные могут сохраняться несколько дней. Поэтому водорастворимые сигнальные молекулы обычно вызывают кратковременные реакции, а водонерастворимые - более продолжительный ответ. Здесь, однако, тоже есть исключения из основного правила: *простагландины,* например, являются гидрофобными локальными медиаторами, но они связываются с поверхностными клеточными рецепторами и вызывают кратковременный ответ.

12-3

12.1.6. Локальные химические медиаторы после их секреции быстро разрушаются, подвергаются обратному захвату или иммобилизуются [4]

Сигнальные молекулы паракринного типа воздействуют только на ближайшее окружение выделяющей их клетки. Такие *локальные химические медиаторы* столь быстро поглощаются клетками, разрушаются внеклеточными ферментами или иммобилизуются во внеклеточном матриксе, что, как правило, не попадают в кровь в сколько-нибудь значительном количестве.

Некоторые локальные медиаторы вырабатываются специально приспособленными для этого клетками. Например, *гистамин* (производное аминокислоты гистидина, см. табл. 13-1) выделяют главным образом *тучные клетки.* Эти клетки, встречающиеся в соединительной ткани всех частей тела, накапливают гистамин в больших секреторных пузырьках и в случае повреждения ткани, при местной инфекции или при некоторых иммунных реакциях быстро освобождают его путем экзоцитоза (разд. 18.2.5). Гистамин вызывает местное расширение кровеносных сосудов и увеличивает их проницаемость, что облегчает доступ к поврежденному участку фагоцитирующим лейкоцитам и белкам сыворотки (например, антителам и компонентам системы комплемента-см. гл. 18). Тучные клетки выделяют также два тетрапептида, привлекающих к месту своей секреции лейкоциты из группы *эозинофилов;* эозинофилы же содержат разнообразные ферменты, участвующие в инактивации гистамина и других освобождаемых тучными клетками медиаторов, что способствует прекращению реакции.

Некоторые локальные химические медиаторы после их секреции не уничтожаются, а быстро иммобилизуются. В эту группу входят фибронектин, протеогликаны и ряд других макромолекул внеклеточного матрикса. Эти секретируемые клетками макромолекулы можно рассматривать как специальную группу локальных медиаторов, так как они оказывают влияние только на соседние клетки (разд. 14.2). В отличие от других локальных медиаторов они объединяются во внеклеточном пространстве в нерастворимую сеть, утрачивают подвижность и не могут поэтому диффундировать из того места, где образовались. Таким образом, хотя их эффект и локален, он может быть продолжительным. Внеклеточный матрикс тоже иногда связывает растворимые сигнальные молекулы, иммобилизуя их так, что они действуют только в определенном участке. Например, фактор роста фибробластов (fibroblast growth factor, FGF), - небольшой белок, стимулирующий деление самых разнообразных клеток в культуре, - in vitro прочно связывается с протеогликаном внеклеточного матрикса и, возможно, таким же способом иммобилизуется в тканях.

12.1.7. У млекопитающих клетки всех тканей непрерывно выделяют простагландины [5]

Для синтеза многих химических медиаторов существуют специальные клетки, но есть и такие медиаторы, источники которых более разнообразны. Важным примером служат **простагландины -** семейство производных жирной кислоты с 20 атомами углерода, образующихся во всех тканях млекопитающих. Эти локальные медиаторы непрерывно синтезируются в мембранах клеток из предшественников, отщепляемых от мембранных фосфолипидов фосфолипазами (рис. 12-8), и столь же непрерывно разрушаются ферментами во внеклеточной жидкости. Существует не менее 16 различных простагландинов, подразделяемых на 9 классов (PGA, PGB, PGC, ... PGI), которые, связываясь со специфическими рецепторами клеточной поверхности, вызывают разнообразные биологические эффекты.

В отличие от большинства других сигнальных молекул простагландины не накапливаются в клетках, а по мере их синтеза все время освобождаются во внеклеточное пространство. Однако, когда клетки активируются при повреждении ткани или под действием некоторых химических факторов, скорость синтеза простагландинов возрастает; повышение локальной концентрации простагландинов оказывает воздействие не только на клетку, которая их выделяет *(аутокринная стимуляция),* но и на соседние клетки. Аутокринная стимуляция, возникающая в ответ на другой химический сигнал, может усиливать эффект последнего и (или) его продолжительность, а также его распространение на большую локальную популяцию однотипных клеток.

С простагландинами связывают множество разнообразных биологических эффектов. Они вызывают сокращение гладкой мускулатуры, агрегацию тромбоцитов, участвуют в воспалительной реакции. Некото-

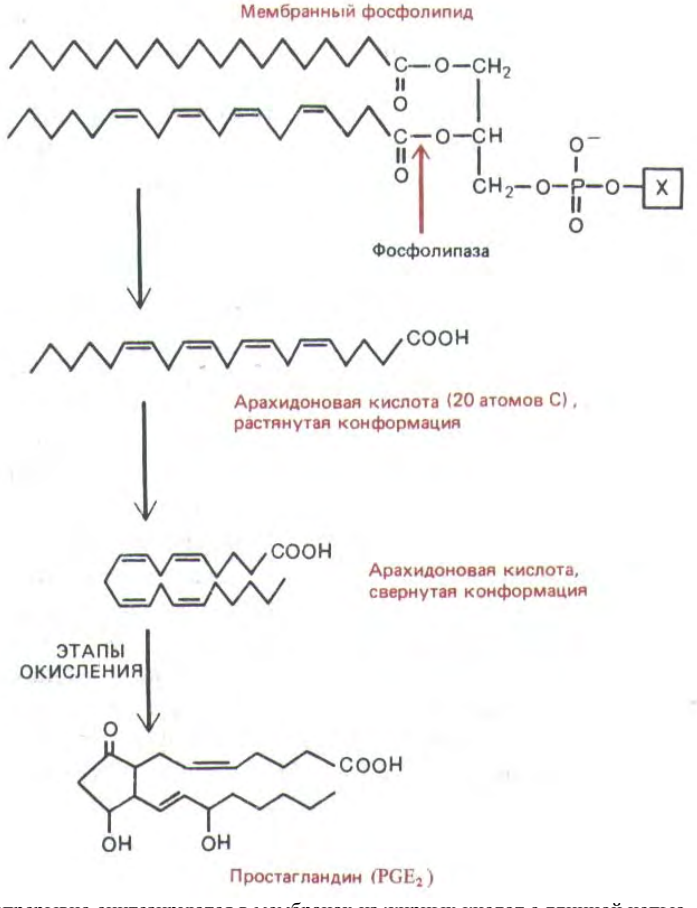


Рис. 12-8. Простагландины непрерывно синтезируются в мембранах из жирных кислот с длинной цепью, состоящих из 20 углеродных атомов и содержащих не менее трех двойных связей. *На* схеме показан синтез POE_2. Индекс указывает на две двойные углерод-углеродные связи вне кольца PGE_2. Простагландины вместе с химически родственными им сигнальными молекулами - *тромбоксонами, лейкотриенами* и *липоксинами*- образуются главным образом из арахидоновой кислоты и носят общее название эйкозаноидов. Этот метаболический путь служит важной мишенью для лекарственных препаратов, так как эйкозаноиды играют большую роль в развитии воспаления. Кортикостероидные гормоны, такие как кортизон, широко применяются при лечении неинфекционных воспалительных заболеваний, например некоторых форм артрита. Один из возможных механизмов их действия - индукция синтеза и (или) секреции лейкоцитами локальных химических медиаторов, называемых *липокортшими* (или кальпактинами). Это белки, каким-то образом подавляющие активность фосфолипазы на первом этапе показанного здесь пути синтеза эйкозаноидов. Такие нестероидные противовоспалительные препараты, как аспирин, блокируют окислительные этапы синтеза простагландинов. Для лечения артритов применяют как кортикостероиды, так и аспирин.

рые простагландини, образующиеся в матке во время родов, по-видимому, важны для стимуляции сокращений гладкой мускулатуры матки. Эти простагландины сейчас широко используют в качестве фармакологических агентов, вызывающих аборт. С другой стороны, действие таких противовоспалительных средств, как аспирин, основано на подавлении биосинтеза прост аг лан динов в очагах воспаления.

Заключение

Внеклеточные сигнальные молекулы можно разделить по степени их «дальнодействия» на три основных класса: 1) локальные химические медиаторы, которые быстро поглощаются или разрушаются и поэтому оказывают влияние только на соседние клетки; 2) гормоны, которые переносятся к своим мишеням, распределенным нередко по всему организму, с кровотоком; 3) нейро медиаторы, действующие только на постсинаптическую клетку. Каждый тип клеток организма имеет свойственный ему набор белков-рецепторов, позволяющий запрограммированным и характерным образом реагировать на соответствующий набор сигнальных молекул.

Сигнальные молекулы можно также классифицировать по их растворимости в воде. Небольшие гидрофобные молекулы, такие как стероидные гормоны или гормоны щитовидной железы, свободно проходят через плазматическую мембрану клетки-мишени и активируют рецепторний белок в ее цитоплазме. В отличие от этого гидрофильные молекулы, в частности нейр о медиаторы и большинство гормонов и локальных химических медиаторов, активируют белковый рецептор на поверхности клетки-мишени.

12.2. Сигнализация с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов

Множество онтогенетических и физиологических процессов у самых разных организмов - от грибов до человека- регулируется небольшим числом **стероидных гормонов,** синтезируемых из холестерола. Будучи сравнительно небольшими (мол. масса около 300) гидрофобными молекулами, эти гормоны проходят через плазматическую мембрану путем простой диффузии. Оказавшись внутри клетки-мишени, стероидный гормон каждого типа прочно, но обратимо связывается со своим специфическим рецепторным белком. Присоединение гормона ведет к аллостерическому изменению конформации рецепторного белка (процесс, называемый *активацией рецептора},* что повышает сродство последнего к ДНК; это позволяет рецептору связываться со специфическими генами в ядре и регулировать их транскрипцию. Аналогичным образом действуют гормоны щитовидной железы (тиреоидные гормоны), связываясь со своими рецепторами, которые очень сходны с рецепторами стероидов.
12-10

12.2.1. Комплексы стероидных гормонов с рецепторами присоединяются к специфическим последовательностям ДНК и регулируют транскрипцию генов

Типичная клетка-мишень содержит около 10000 рецепторов для стероидных гормонов. Каждый рецептор может обратимо связать одну молекулу определенного гормона с высоким сродством (константа



Рис. 12-9. Модель белка-рецептора для стероидного гормона. Как полагают, в неактивном состоянии он связан с ингибиторным белком, который блокирует ДНК-связывающий домен рецептора. Связывание гормона рецептором приводит к отделению белка-ингибитора, и в результате рецептор активируется. Прообразом для этой модели послужил рецептор кортизола (глюкокортикоида), но сходную структуру имеют также рецепторы для эстрогенов, тестостерона, прогестерона, альдостерона, тиреоид-ного гормона, ретиноевой кислоты и витамина D (см. рис. 10-25); вместе все эти белки образуют надсемейство *рецепторов стероидных гормонов.* В случае рецепторов кортизола и эстрогенов белком-ингибитором служит «белок теплового шока» hsp90 с мол. массой около 90000 (разд. 8.2.7).

сродства K_a от 10^8 до 10^{10} л/моль). Поскольку рецепторы составляют менее 0,01% общей массы белка в клетке, очистить и охарактеризовать их очень трудно. Недавно, однако, последовательности ДНК, кодирующие некоторые рецепторы стероидных гормонов позвоночных (их кДНК), были клонированы и секвенированы. Оказалось, что рецепторные белки имеют очень сходную структуру. Их полипептидная цепь длиной около 800 аминокислотных остатков образует три отдельных домена: С-концевой домен, который связывает гормон, центральный домен, связывающийся с ДНК, и N-концевой, который активирует транскрипцию гена (рис. 12-9).

Некоторые типы рецепторов стероидных гормонов изначально, в отсутствие гормона, находятся в цитозоле, а другие - в ядре. В обоих случаях присоединение гормона повышает сродство рецептора к ДНК, что позволяет рецептору прочно связываться с определенными нуклеотидными последовательностями в гене, который регулируется данным гормоном. Связывание гормон-рецепторного комплекса со специфическими участками гена активирует (или иногда подавляет) транскрипцию данного гена.

Получить прямое доказательство того, что активированные рецепторы стероидных гормонов связываются со специфическими генами, было очень трудно, и это удалось сделать лишь в 1983г., когда была разработана технология рекомбинантных ДНК. Она позволила клонировать гены, регулируемые стероидными гормонами, и получать в больших количествах специфические последовательности ДНК. Необходимо было еще очистить рецепторные белки, что само по себе является весьма трудоемкой и длительной процедурой. Как только удалось получить рецепторы в очищенном виде, связывающие их последовательности ДНК были картированы in vitro методом *футпринтинга* (разд. 4.6.6); оказалось, что присоединение рецептора защищает от мягкого расщепления нуклеазами или химическими реагентами группу специфических нуклеотидных последовательностей ДНК. Если эти короткие *узнаваемые последовательности* из гена удалить, то стероидный гормон уже не будет активировать его транскрипцию. Более того, если короткий фрагмент ДНК, который содержит узнаваемую последовательность, слить с другим геном (репортером) и затем перенести в клетку, содержащую рецепторный белок, то соответствующий стероидный гормон будет активировать транскрипцию гена-репортера. Эти эксперименты показывают, что последовательности ДНК, узнаваемые in vitro активированными рецепторами стероидных гормонов, действительно опосредуют действие рецептора в клетке. Гены, чувствительные к стероидным гормонам, как правило, содержат несколько групп узнаваемых последовательностей, обычно расположенных «выше» (а иногда и «ниже») кодирующей области где-нибудь внутри гена (рис. 12-10). Ввиду значительной структурной гомологии между разнообразными рецепторами для стероидных гормонов близкое сходство распознаваемых ими последовательностей не вызывает удивления.

Однако под прямым влиянием стероидных гормонов находятся лишь немногие гены в любой клетке-мишени. Так, через 30 мин после добавления *кортизола* к культуре печеночных клеток крысы из тысячи белков, которые можно разделить методом двумерного гель-электрофо-

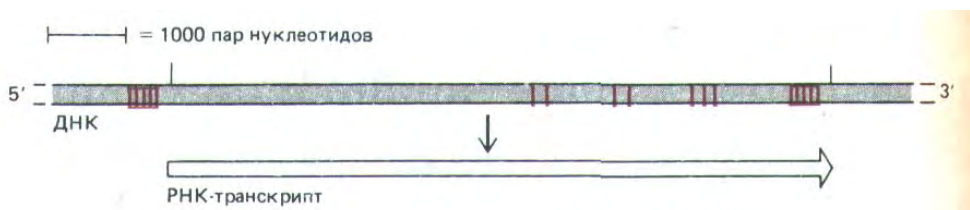


Рис. 12-10. Локализация последовательностей ДНК в том гене вируса молочной железы, который узнают активированные рецепторы кортизола. Каждая цветная полоска соответствует одному месту связывания рецептора (длиной 8 нуклеотидов). [По К.. R. Yamamoto. In: Transfer and Expression of Eukaryotic Genes (H. Ginsbcig, H. J. Vogel, eds.), pp. 79-92. New York: Academic Press, 1984.]

реза, затронутыми оказались всего семь: количества шести из них увеличились, а количество одного уменьшилось. Эффект был обратимым: после удаления гормона скорости синтеза этих белков возвратились к норме. Как полагают, упомянутым методом можно выявить около 10% клеточных белков; таким образом, присоединение кортизола к 10000 молекул его рецептора в печеночной клетке, вероятно, влияет на транскрипцию лишь около полусотни генов-гораздо меньше, чем следовало ожидать, исходя из числа мест связывания на ДНК. Это означает, что многие активированные рецепторы связываются с ДНК в местах, где их присутствие не дает никакого эффекта.

Как связывание гормон-рецепторного комплекса с геном активирует его транскрипцию? Было показано, что узнаваемые гормоном участки ДНК могут стимулировать транскрипцию даже тогда, когда они удалены на тысячи оснований от промотора, где начинается синтез РНК. Механизм действия таких участков ДНК, называемых *транскрипционными энхансерами,* обсуждается в гл. 10 (разд. 10.2.11).

12-12

12.2.2. Стероидные гормоны часто вызывают и первичный, и вторичный ответ [7]

Во многих случаях реакция на стероидный гормон бывает двухстадийной. Прямая индукция транскрипции нескольких специфических генов называется *первичным ответом.* Затем продукты этих генов могут в свою очередь активировать другие гены и вызвать через некоторое время *вторичный ответ.* Таким образом, простой гормональный пусковой сигнал способен производить весьма сложные изменения в картине экспрессии генов.

Поразительный пример мы находим у плодовой мушки дрозофилы. Уже спустя 5-10 мин после инъекции стероидного гормона линьки-*экдизона –в* гигантских политенных хромосомах слюнных желез появляются шесть новых участков интенсивного синтеза РНК (они имеют вид *пуфов;* см. разд. 9.2.6). Через определенное время некоторые из белков, синтезированных во время первичного ответа, индуцируют синтез РНК еще примерно в сотне новых участков, что приводит к появлению

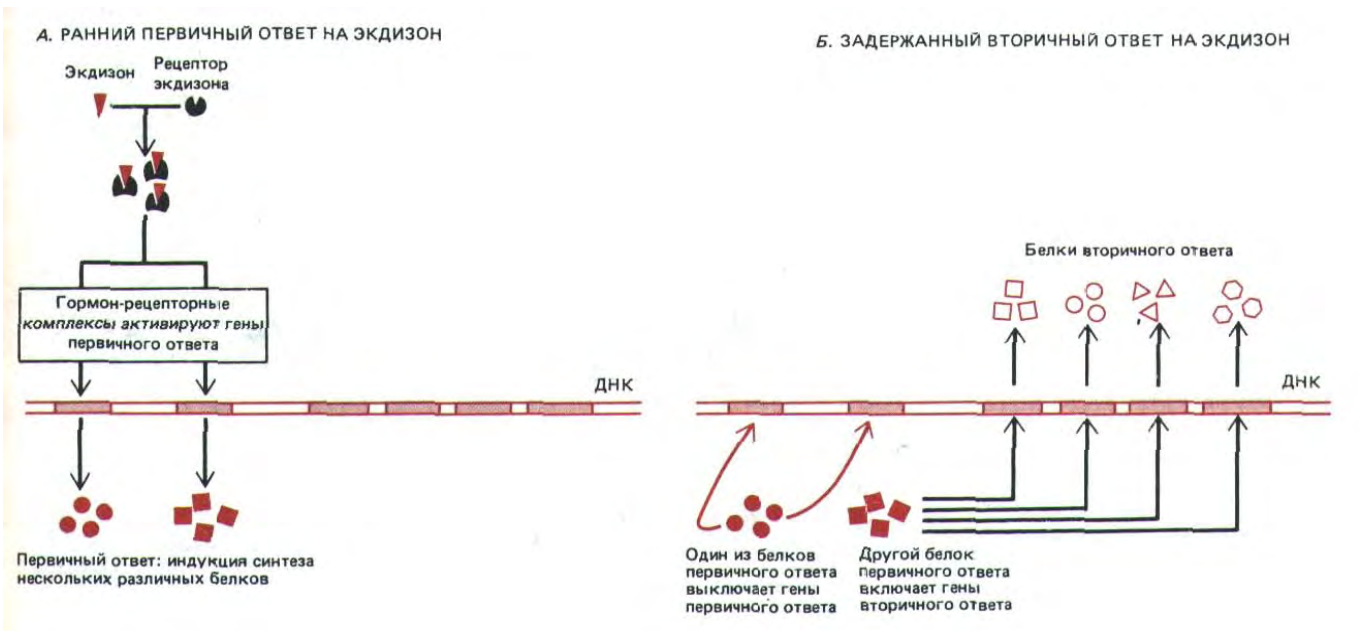


Рис. 12-11. Схема раннего первичного *(А)* и задержанного вторичного (Б) ответа клеток дрозофилы на экдизон. Некоторые из белков, синтезируемых при первичном ответе, включают гены, ответственные за вторичный ответ, а другие выключают гены, участвовавшие в первичном ответе. На самом деле в обоих ответах участвует больше генов, чем показано на схеме.

большой группы белков, характерных для вторичного ответа. Один или несколько первичных белков управляют всем ответом, выключая по принципу обратной связи транскрипцию всех генов, участвовавших в первичном ответе (рис. 12-11). Вполне вероятно, что аналогичные механизмы осуществляют усиление и регуляцию многих реакций на гормоны и в клетках млекопитающих.

12.2.3. В разных клетках-мишенях стероидные гормоны регулируют активность разных генов [8]

Реакция на стероидные гормоны, как и на гормоны вообще, определяется не только природой гормона, но в не меньшей степени и природой клетки-мишени (см. рис. 12-5). В принципе этому может быть два объяснения: либо разные типы клеток имеют разные рецепторы для одного и того же гормона, либо рецепторы одинаковы, но они активируют разные гены. Имеющиеся данные говорят в пользу второго объяснения.

Такие данные были получены в молекулярногенетических экспериментах, показавших, что рецепторные белки для эстрадиола, кортизола и прогестерона кодируются каждый своим собственным единичным геном, и при изучении мутантов млекопитающих с дефектным рецептором мужского полового гормона *тестостерона.* Все млекопитающие, не подвергшиеся в эмбриональном периоде воздействию тестостерона, развиваются по женскому пути. Мутантные генетические самцы имеют нормальные семенники, вырабатывающие тестостерон, но ткани этих самцов не реагируют на гормон из-за дефектности соответствующих рецепторов. Поэтому у таких самцов развиваются все вторичные половые признаки самок, и семенники их не опускаются в мошонку, а остаются в брюшной полости. Этот *синдром тестикулярной феминизации* встречается у мышей, крыс, крупного рогатого скота, а также у человека. Хотя изменен только ген, кодирующий рецептор тестостерона, затронутыми оказываются все разнообразные типы клеток, в норме реагирующих на этот гормон (рис. 12-12).

Почему в клетках разного типа один и тот же стероидный гормон активирует разные группы генов? Как описано в гл. 10, для активации эукариотического гена нужно, чтобы с ним, как правило, связалось несколько регуляторных белков (разд. 10.1.5). Поэтому рецептор сте-

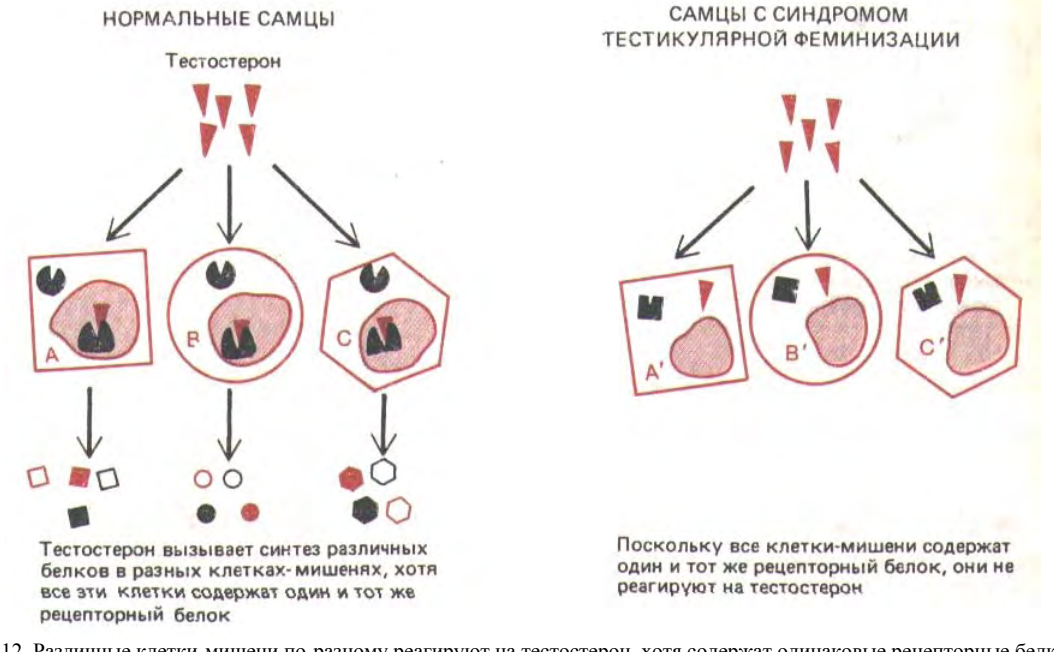


Рис. 12-12. Различные клетки-мишени по-разному реагируют на тестостерон, хотя содержат одинаковые рецепторные белки. При *синдроме тестикулярною феминизации* мутация в одном-единственном гене, изменяющая рецептор тестостерона, приводит к тому, что все клетки-мишени теряют способность реагировать на этот гормон.

роидного гормона может активировать ген только в присутствии необходимой комбинации регуляторных белков, причем некоторые из этих белков тканеспецифичны.

Таким образом, каждый стероидный гормон вызывает характерный комплекс ответов, так как 1) рецепторы для данного гормона имеются только в клетках определенных типов и 2) клетки каждого из этих типов содержат различные комбинации других тканеспецифичных регуляторных белков, которые совместно с активированным стероидным рецептором влияют на транскрипцию специфических групп генов.

Заключение

Стероидные гормоны - это небольшие гидрофобные молекулы, производные холестерола. В крови они находятся в форме водорастворимого комплекса со специальным белком-переносчиком. Освободившись от переносчика, они диффундируют через плазматическую мембрану клетки-мишени и обратимо связываются в цитоплазме или в ядре со специфическими белками-рецепторами. Присоединив к себе гормон, рецептор приобретает повышенное сродство к определенным последовательностям ДНК, которые начинают действовать как энхансеры, т. е. стимулируют транскрипцию нескольких соседних генов. Продукты некоторых из этих генов могут в свою очередь активировать другие гены и вызывать более поздний вторичный ответ, усиливая таким образом действие гормона. Каждый стероидный гормон узнается своим особым рецептором-представителем группы гомологичных белков. Один и тот же рецептор в разных клетках-мишенях регулирует разные наборы генов, вероятно потому, что для транскрипции специфических генов нужны также и другие связывающиеся с ДНК белки, которые в разных клетках различны.

12.3. Механизмы передачи сигнала с участием рецепторных белков клеточной поверхности [9]

Все водорастворимые сигнальные молекулы (в том числе нейромедиаторы, пептидные гормоны и факторы роста), как, впрочем, и некоторые жирорастворимые, присоединяются к специфическим белковым рецепторам на поверхности клеток-мишеней. Поверхностные рецепторы связывают сигнальную молекулу (лиганд) с высоким сродством, и это внеклеточное событие порождает внутриклеточный сигнал, изменяющий поведение клетки.

Используя лиганды, меченные радиоактивными атомами, флуоресцентными красителями или электроноплотными частицами (типа коллоидного золота), можно изучать распределение рецепторов на поверхности клетки. Было показано, что число рецепторов для конкретного лиганда может варьировать в пределах от 500 до более чем 100000 на клетку и что они либо располагаются на мембране случайным образом, либо сосредоточены в определенных ее участках. Подобно другим мембранным белкам, рецепторы клеточной поверхности с трудом поддаются выделению в чистом виде и изучению, особенно в связи с тем, что они составляют менее 0,1% общей массы белка плазматической мембраны. Методы клонирования последовательностей ДНК, кодирующих поверхностные рецепторы, и здесь позволили преодолеть многие трудности и в корне изменили наши представления о структуре и функциях рецепторов.

В отличие от внутриклеточных рецепторов для стероидных и тиреоидных гормонов, рецепторы клеточной поверхности не регулируют

непосредственно экспрессию генов. Они лишь передают сигнал через плазматическую мембрану, а влияние, которое они оказывают на процессы в цитозоле или в ядре, связано с образованием новых внутриклеточных сигналов. Можно было бы подумать, что рецепторы клеточной поверхности просто переносят внешние сигнальные молекулы через мембрану в цитозоль, превращая их во внутриклеточный сигнал, однако это не так. Правда, многие белковые сигнальные молекулы, например инсулин, действительно поглощаются клеткой путем эндоцитоза при участии рецептора (разд. 12.5.1), но они не выходят из эндосомных или лизосомных пузырьков в цитозоль. По-видимому, задача внешнего лиганда сводится к тому, чтобы вызвать конформационное изменение белка-рецептора, находящегося на поверхности клетки. В самом деле, действие нормального лиганда нередко могут имитировать связывающиеся с рецептором антитела; этот феномен лежит в основе ряда патологических состояний. Например, весьма обычной причиной гипертиреоза - избыточной функции щитовидной железы - у человека бывает аномальная выработка антител, присоединяющихся к рецепторам тиреотропного гормона; рецепторы при этом активируются и вызывают гиперфункцию железы.

В этом разделе мы рассмотрим, как конформационное изменение белкового рецептора на клеточной поверхности, вызванное присоединением внеклеточного лиганда, позволяет рецептору прямо или косвенно превращать внешний сигнал в сигнал, действующий внутри клетки.

12.3.1. Известны по меньшей мере три класса белковых рецепторов клеточной поверхности: образующие канал, сопряженные с G-белками и каталитические [9]

Большинство белковых рецепторов клеточной поверхности можно отнести к одному из трех классов в зависимости от механизма, используемого для передачи сигнала. **Каналообразующие рецепторы - это** регулируемые медиаторами ионные каналы, участвующие главным образом в быстрой синаптической передаче сигналов между электрически возбудимыми клетками. Для управления такого рода каналами используется небольшое число нейромедиаторов, которые на короткое время открывают или закрывают образуемый рецепторами канал, изменяя таким образом ионную проницаемость плазматической мембраны, а тем самым и возбудимость постсинаптической клетки. Изучение последовательностей ДНК, кодирующих эти рецепторы, показало, что они относятся к одному семейству гомологичных белков, насквозь пронизывающих мембрану. Эти рецепторы обсуждаются в гл. 19 (разд. 19.3) и здесь рассматриваться не будут.

Каталитические рецепторы при активации лигандом начинают работать как ферменты. Большинство известных каталитических рецепторов - трансмембранные белки с цитоплазматическим доменом, обладающим тирозин-специфической протеинкиназной активностью.

Рецепторы, сопряженные с G-белками, опосредованно активируют или ингибируют определенные ферменты или ионные каналы, связанные с плазматической мембраной. Взаимодействие между рецептором и ферментом или ионным каналом происходит через третий белок, который называют *GTP-связывающим регуляторным белком* (или *G-белком).* Рецепторы, связанные с G-белком, обычно запускают целую цепь событий, изменяющих концентрацию одного или нескольких малых внутриклеточных сигнальных молекул, часто называемых **внутриклеточными посредниками** или **внутриклеточными медиаторами.** Эти молекулы в свою очередь действуют, изменяя поведение других белков-мишеней в клетке. Два наиболее важных посредника-это циклический AMP (cAMP) и

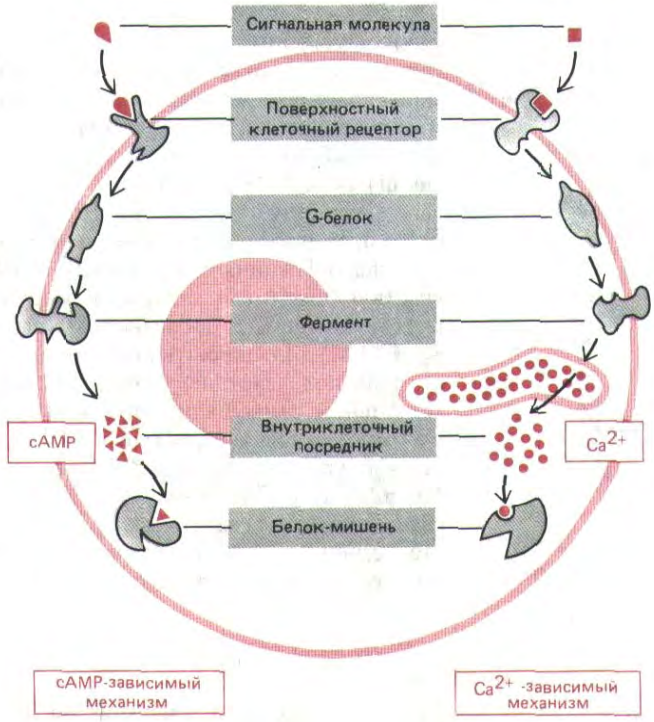


Рис. 12-13. Два главных механизма, с помощью которых рецепторы клеточной поверхности, сопряженные с G-белками, запускают образование внутриклеточных посредников. В обоих вариантах связывание внеклеточного лганда изменяет конформацию цитоплазматического домена рецептора так, что он связывается с G-белком, который затем активирует (или ингибирует) определенный фермент плазматической мембраны. В некоторых случаях G-белок взаимодействует не с ферментом, а с ионным каналом. В cAMP-пути активируемый G_s-белком фермент синтезирует циклический AMP. В Ca^{2+} -пути с помощью фермента образуется растворимый посредник, который освобождает из внутриклеточных хранилищ ионы Ca^{2+}. И cAMP, и Ca^{2+} связываются в клетке с другими специфическими белками, изменяя их активность.

Ca^{2+}. Передаваемые ими сигналы генерируются разными путями (те и другие с участием G-белков) и используются во всех животных клетках (см. рис. 12-13). Мы рассмотрим эти пути, прежде чем вернемся к каталитическим рецепторам с тирозин-специфической протеинкиназной активностью; начнем с экспериментов, которые привели к открытию cAMP и проложили путь к нынешнему пониманию того, каким образом внутриклеточные посредники появляются в ответ на внеклеточный сигнал.

12.3.2. Циклический AMP-вездесущий посредник в животных клетках [10]

В клетках мышц или печени воздействие *адреналина* стимулирует расщепление запасов гликогена. Оказалось, что адреналин активирует

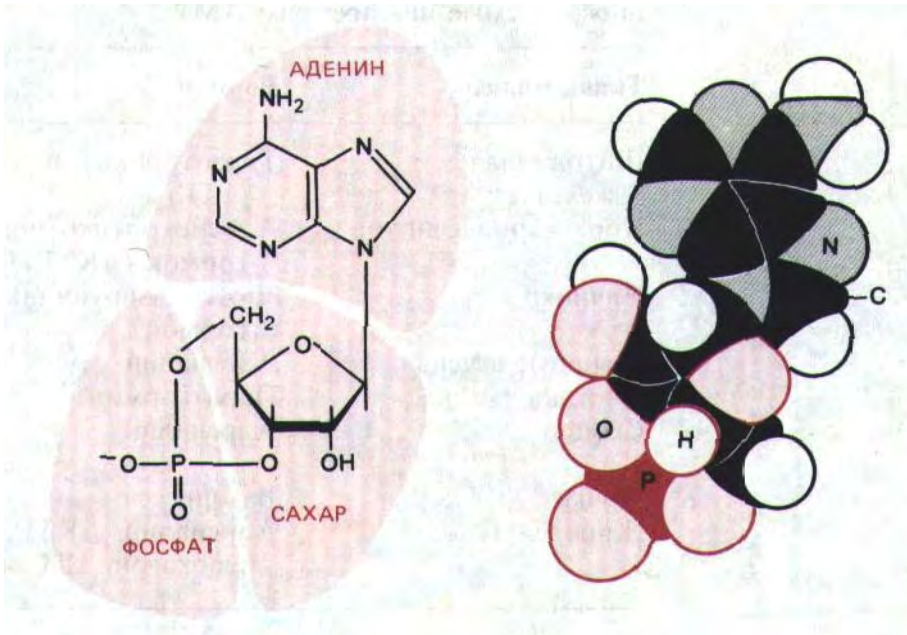


Рис. 12-14. Структурная формула и объемная модель циклического AMP (C, H, N, O и P-атомы углерода, водорода, азота, кислорода и фосфора соответственно).

фермент *гликогенфосфорилазу,* катализирующий это расщепление. Далее удалось выяснить, что обработка изолированных мембран печеночных клеток адреналином (в присутствии АТР) вызывает образование низкомолекулярного термостабильного фактора, способного заменять гормон и активировать фосфорилазу в экстракте тех же клеток, не содержащем мембран. В 1959 г. этот медиатор был идентифицирован как циклический AMP (cAMP, рис. 12-14), который, как было позже установлено, регулирует многие внутриклеточные реакции во всех до сих пор изученных прокариотических и животных клетках.

Идентификация циклического AMP привела к изучению ферментов, участвующих в его синтезе и разрушении. Чтобы cAMP мог служить внутриклеточным посредником, его концентрация в клетке (обычно $\leq 10^{-6}$ М) должна быть подвержена быстрым изменениям в ту и другую сторону под действием определенных внеклеточных сигналов (при гормональной стимуляции она может за несколько секунд увеличиться в 5 раз). Как мы увидим (разд. 12.4.7), для этого быстрый синтез молекул должен уравновешиваться быстрым их расщеплением или удалением. Циклический AMP синтезируется из АТР ферментом аденилатциклазой, связанным с плазматической мембраной клетки, но быстро расщепляется одним или несколькими ферментами - cAMP-фосфодиэстеразами, которые гидролизуют его до аденозин-5'-монофосфата (5'-AMP) (рис. 12-15).

12-16

12.3.3. Рецептор и аденилатциклаза - это отдельные белки, которые функционально взаимодействуют в плазматической мембране

Многие гормоны и локальные химические медиаторы действуют, изменяя концентрацию cAMP, причем они делают это, активируя (или в некоторых случаях ингибируя) аденилагциклазу, а не влияя на активность фосфодиэстеразы. Подобно тому как один и тот же стероидный гормон неодинаково действует на различные клетки-мишени, разные клетки весьма по-разному реагируют на изменение внутриклеточной концентрации cAMP (табл. 12-2). Любой лиганд, активирующий адени-латциклазу в данной клетке, обычно вызывает одну и ту же реакцию. Например, в жировых клетках аденилатциклазу активируют по крайней мере четыре разных гормона, и все они вызывают расщепление тригли-

Таблица 12-2. Некоторые клеточные ответы на гормоны, опосредуемые циклическим AMP

Ткань-мишень	Гормон	**Главный ответ**
Щитовидная железа	Тиреотропный гормон (ТТГ)	Синтез и секреция тироксина
Кора надпочечников	Адренокортикотропный гормон (АКТГ)	Секреция кортизола
Яичники	Лютеинизирующий гормон	Секреция прогестерона
Мышцы, печень	Адреналин	Распад гликогена
Костная ткань	Паратгормон	Резорбция кости
Сердце	Адреналин	Увеличение частоты и силы сокращений
Почки	Вазопрессин	Реабсорбция воды
Жировая ткань	Адреналин, АКТГ, глюкагон, ТТГ	Расщепление триацил-глицеролов

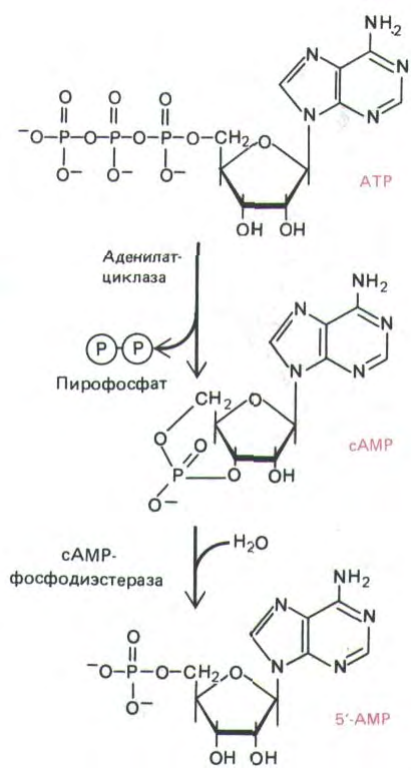


Рис. 12-15. Синтез и расщепление cAMP. Пирофосфатаза делает синтез cAMP необратимой реакцией, гидролизуя освобождаемый пирофосфат.

церидов (резервная форма жира) до жирных кислот (табл. 12-2). Похоже, что различные рецепторы для этих гормонов активируют общий пул молекул аденилатциклазы. То, что рецепторы и аденилатциклаза - отдельные молекулы, было показано в экспериментах с «трансплантацией» рецепторов. Например, рецепторы адреналина, выделенные из солюби-лизированных детергентами плазматических мембран, не обладают никакой аденилатциклазной активностью, но если поместить их в плазматическую мембрану других клеток, не имеющих собственных рецепторов для адреналина, то такие «пересаженные» рецепторы после активации их гормоном способны к функциональному взаимодействию с аденилатциклазой клетки-реципиента (рис. 12-16).

12.3.4. Рецепторы активируют аденилатциклазу через стимулирующий G-белок (G_s) [12]

У бактерий рецепторы и молекулы аденилатциклазы сопряжены напрямую, но в животных клетках это сопряжение осуществляется еще одним белком. На мысль о таком опосредованном механизме впервые навел тот факт, что для гормональной активации аденилатциклазы в разрушенных клетках необходим **GTP.** Позднее были выделены мутантные клеточные линии, у которых связывание адреналина аденилатциклазу не активирует, несмотря на наличие нормальных количеств рецепторов и самой циклазы. Смешивая препараты плазматических мембран таких «разобщенных» клеток с экстрактами мембран других клеток, полученными с помощью детергентов, можно было реконструировать чувствительную к гормону аденилатциклазную систему, для работы которой необходим GTP. Оказалось, что упомянутые экстракты содержат особый мембранный **GTP-связывающий белок (G-белок),** которого нет в «разобщенных» мутантных клетках. Поскольку этот белок участвует в *активации* фермента, он получил название **стимулирующего G-белка (G_s).** Индивидуумы с наследственным дефицитом G_s слабо реагируют на многие гормоны и поэтому страдают нарушениями роста в полового созревания, умственной отсталостью и целым рядом метаболических аномалий. Не так давно удалось реконструировать активируемую адреналином аденилатциклазную систему из очищенных компонентов (рецептора адреналина, белка G_s и каталитического компонента аденилатциклазы), встроив их в липосомы из синтетических фосфолипидов (разд. 6.2.2). Эти эксперименты показали, что для активации аденилатциклазы гормоном достаточно этих трех белков.

Чтобы G_s -белок мог передать сигнал от рецептора аденилатциклазе, он должен каким-то образом изменять свою структуру при получении сигнала. Для этого используется GTP. Когда G_s активируется комплексом гормон-рецептор, он одновременно связывает молекулу GTP, после чего и приобретает способность активировать молекулу аденилатциклазы. G_s поддерживает аденилатциклазу в активном состоянии до тех пор, пока цела молекула GTP. Когда G_s, который является GTP-азой, гидролизует GTP до GDP, активация циклазы прекращается.

12-17

12.3.5 G_s -белок - гетеротример, диссоциирующий при активации на субъединицы [13]

Функция G_s -белка решающим образом зависит от его субъединичной структуры. В его состав входят три полипептида: α-цепь ($G_{s\alpha}$), которая связывает и гидролизует GTP и активирует аденилатциклазу, и прочный комплекс β-цепи и γ-цепи ($G_{\beta\gamma}$), который заякоривает G_s на внутренней



Рис. 12-16. Функционально активные адреналиновые рецепторы можно экстрагировать из клеток, в которых аденилатциклаза инактивирована нагреванием, и встроить в плазматическую мембрану клеток, не имеющих таких рецепторов. При активации адреналином «пересаженные» рецепторы активируют аденилатциклазу в плазматической мембране клеток-реципиентов (сопрягающий рецепторы и циклазу G-белок на схеме не показан). Существует по меньшей мере три типа адреналиновых рецепторов (называемых также адренэргическими) - α_1, α_2 и β; аденилатциклазу активируют только β -рецепторы.

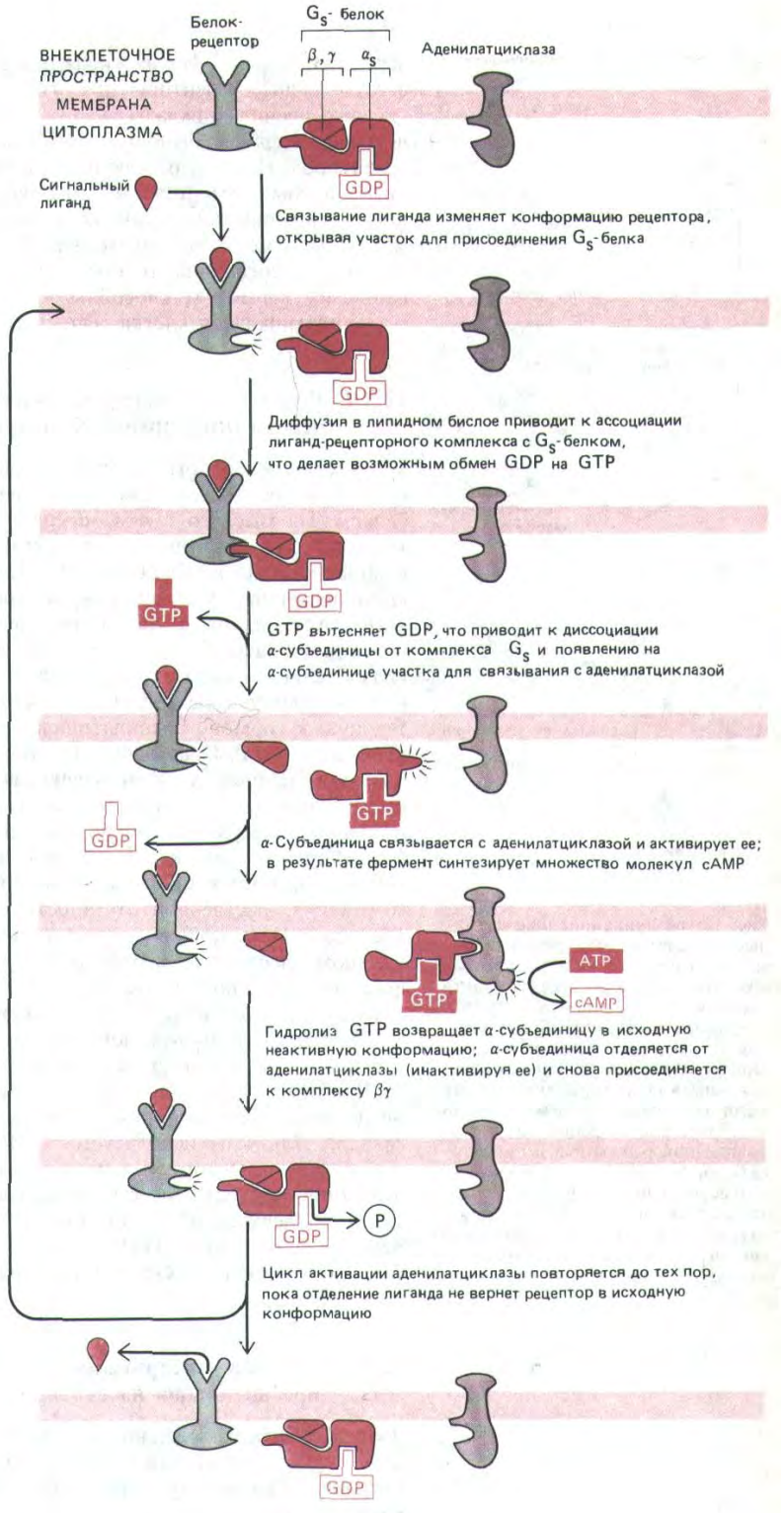


Рис. 12-17. Современная модель, иллюстрирующая, каким образом белковые рецепторы могут функционально сопрягаться с аденилатциклазой через стимулирующий G-белок-G_S,. Пока сигнальный лиганд остается связанным, рецепторный белок может активировать все новые молекулы G_S-белка, усиливая таким образом ответ. Дополнительный механизм усиления (который в некоторых сигнальных системах имеет большее значение) заключается в удержании связанного GTP на α-субъединице G_S,-белка на протяжении многих секунд, так что все это время аденилатциклаза остается активированной. Согласно другой модели, аденилатциклаза остается связанной с G_S и в активированном, и в неактивном состоянии.

стороне цитоплазматической мембраны. На рис. 12-17 показана современная модель сопряжения активации рецептора с активацией аденилатциклазы при помощи G_s. В своей неактивной форме G_s существует как тример, с α-субъединицей которого связан GDP. При активации гормон-рецепторным комплексом участок связывания гуаниловых нуклеотидов на G_s изменяется, и теперь вместо GDP здесь может присоединиться GTP. Как полагают, в результате присоединения GTP G_{sa} отделяется от $G_{\beta\gamma}$ и прочно связывается с молекулой аденилатциклазы, которая при этом активируется и начинает синтезировать cAMP. Менее чем за минуту G_{sa} гидролизует связанный с нею GTP до GDP, что приводит к отделению G_{sa} от аденилатциклазы (которая становится неактивной) и обратному присоединению G_{sa} к $G_{\beta\gamma}$ с восстановлением неактивной молекулы G_s.

В аденилатциклазной системе бактерий нет промежуточного звена в виде G_S. Почему же тогда у животных клеток выработался столь сложный многоступенчатый механизм передачи сигнала с участием G-белка, «вставленного» между рецептором и активируемым ферментом? Одной из причин может быть необходимость усиления сигнала (см. разд. 12.4.6), а другой-нужда в дополнительных уровнях для контроля.

G_S позволяет создать два вида усиления. В простейшем случае единичный активированный белковый рецептор может в принципе успеть столкнуться с многими молекулами C_S-белка (и тем самым активировать их), а они затем вызовут активацию многих молекул аденилатциклазы. В ряде случаев, однако, внеклеточный лиганд может не связываться со своим рецептором на достаточно длительное время, чтобы мог сработать этот механизм усиления: некоторые лиганды, например, отделяются от своих рецепторов быстрее чем за секунду. Между тем сам G_s, как полагают, остается активным более 10-15 с, прежде чем произойдет гидролиз связанного с ним GTP. Таким образом, он будет удерживать аденилатциклазу в активном состоянии довольно долго даже после отделения внеклеточного лиганда. Подобный эффект можно продемонстрировать в преувеличенном виде, если к разрушенным клеткам добавить негидролизуемый аналог GTP: последующая обработка гормоном приводит к весьма продолжительному синтезу cAMP.

G-белки не только усиливают сигнал, но и служат важным звеном, где может регулироваться весь процесс активации. В принципе эффективность взаимодействия между рецепторами и ферментом может быть изменена ковалентной модификацией G-белка или изменением его концентрации в плазматической мембране. Наиболее впечатляющая иллюстрация этого - действие бактериального токсина, ответственного за симптомы холеры. **Холерный токсин** представляет собой фермент, катализирующий перенос ADP-рибозы с внутриклеточного NAD на а-субъедини-цу G_S-белка. Последняя при этом теряет способность гидролизовать связанный с нею GTP. Аденилатциклаза, активированная такой видоизмененной α-субъединицей G_S-белка, может оставаться в активном состоянии неопределенно долго. В результате длительное повышение уровня cAMP в клетках кишечного эпителия вызывает массированный выход воды и натрия из этих клеток в просвет кишечника, что и приводит к тяжелому поносу - характерному симптому холеры.

G_S- только один из представителей большого семейства G-белков, обеспечивающих сопряжение рецепторов с разнообразными ферментами и ионными каналами в мембранах эукариотических клеток. Как мы сейчас увидим, другой представитель этого семейства не активирует, а, наоборот, ингибирует аденилатциклазу.

12.3.6 Рецепторы подавляют активность аденилатциклазы через ингибирующий G-белок (G_i) [13]

Одна и та же сигнальная молекула может как повышать, так и понижать внутриклеточную концентрацию cAMP в зависимости от типа рецептора, с которым она связывается. Например, есть несколько типов рецепторов для адреналина: β-*адренэргические* рецепторы активируют адени-латциклазу, а α_2-*адренэргические* ингибируют ее. Различный конечный эффект определяется G-белками, осуществляющими сопряжение этих рецепторов с аденилатциклазой: β-рецепторы действуют через G_s, а α_2-рецепторы - через **ингибиторный** G-белок (G_i), который содержит тот же βγ-комплекс, что и G_s, но другую α-субъединицу (G_{ia}). Будучи активирован, a_2-адренэргический рецептор взаимодействует с $G_{\beta\gamma}$ приводя к замене GDP на GTP в участке связывания гуаниловых нуклеотидов на α-субъединице. При этом, как полагают, G_{ia} отделяется от $G_{\beta\gamma}$ и обе эти субъединицы участвуют в ингибировании аденилатциклазы: G_{ia} прямо подавляет активность аденилатциклазы, тогда как действие $G_{\beta\gamma}$ обусловлено связыванием свободной G_{sa}-субъединицы и, как следствие, устранением ее активирующего влияния на аденилатциклазу.

Подобно тому как холерный токсин повышает уровень cAMP, ADP-рибозилируя субъединицу G_{sa} и инактивируя ее GTP-азную активность, *коклюшный токсин-продукт* бактерий, вызывающих коклюш, - дает тот же эффект, ADP-рибозилируя G_{ia}. В этом случае, однако, модификация G-белка препятствует его взаимодействию с рецепторами; поэтому при активации рецептора аденилатциклаза не ингибируется.

Хотя G-белки были открыты благодаря их влиянию на аденилатциклазу, они могут действовать и другими путями (см. табл. 12-3). В частности, активируя фосфолипазу С (разд. 12.3.9), некоторые G-белки могут

Таблица 12-3. Некоторые GTP-связывающие регуляторные белки, участвующие в передаче сигнала в клетке

Тип G-белка	α-Субъединица[1]	Функция	Модифицирующий бактериальный токсин
G_S	α_s	Активация аденилатциклазы	Холерный
G_i	α_i	Инактивация аденилатциклазы	Коклюшный
G_p	?	Активация фосфоинозитид-специфической фосфо-липазы С	Коклюшный (только в некоторых клетках)
GO	α_0	Главный G-белок головного мозга; может регулировать ионные каналы	Коклюшный
Трансдуцин	T_α	Активация cGMP-фосфо-диэстеразы в палочках сетчатки позвоночных (см. разд. 12.3.12)	Коклюшный и холерный
ras-Белки	-[2]	Участвуют в стимуляции клеточного деления факторами роста (см. разд. 12.3.11 и 13.4.5)	

[1] За исключением ras-белков (и G_p, структура которого не ясна), G-белки - гетеротримеры, в которых α-субъединица непрочно связана с димером βγ. Все известные α-субъединицы (мол. масса 40000-50000) гомологичны, и у большинства из них одинаковые (или очень сходные) β-субъединицы (мол. масса 35 000) и γ-субъединицы (мол. масса 8000).

[2] ras-Белки- одиночные полипептиды (мол. масса 21 000), гомология которых с субъединицами других G-белков незначительна; участвуют ли они в сопряжении рецепторов с эффекторными белками таким же образом, как другие G-белки, не известно.

связывать активацию рецептора с изменением концентрации Ca^{2+} в цитозоле, а Ca^{2+} используется как внутриклеточный посредник еще более широко, чем cAMP.

12.3.7 Ионы Ca^{2+} запасаются в специальном внутриклеточном компартменте [14]

Концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле клеток очень низка (порядка 10^{-7} М), тогда как концентрация их во внеклеточной жидкости (более 10^{-3} М) и в специальном внутриклеточном запасающем Ca^{2+} компартменте довольно высока. Столь значительный градиент ионов Ca^{2+} стремится «проталкивать» их в цитозоль через плазматическую мембрану и мембрану запасающих внутриклеточных органелл. Когда какой-то сигнал на короткое время открывает в этих мембранах Ca^{2+} -каналы, ионы Ca^{2+} буквально врываются в цитозоль, резко повышая свою локальную концентрацию и активируя чувствительные к ним механизмы в клетке.

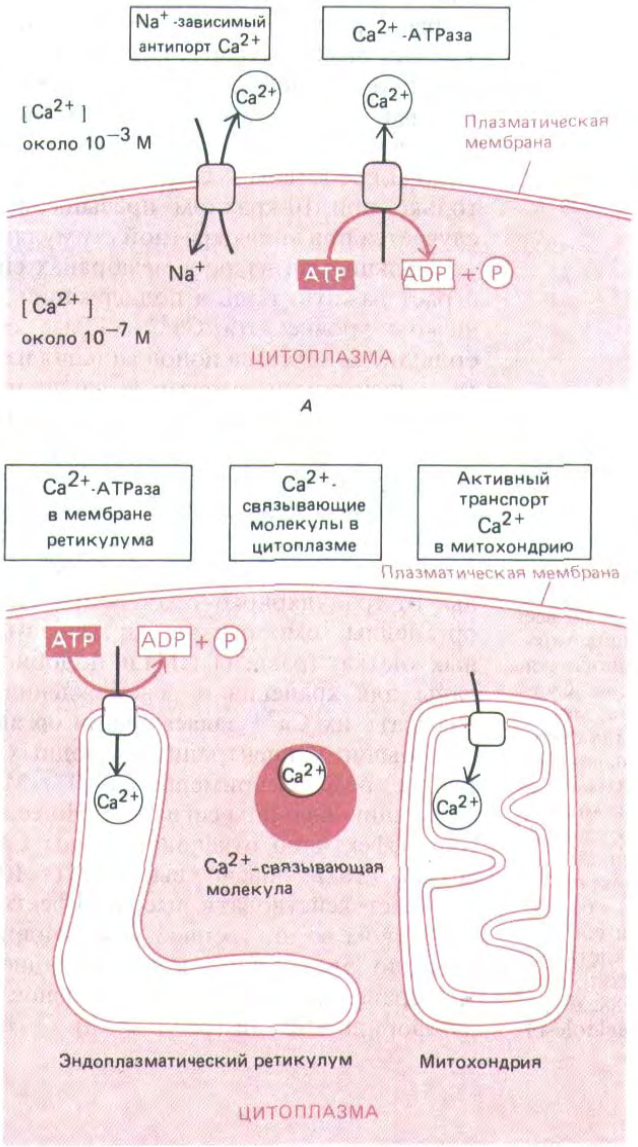


Рис. 12-18. Важнейшие механизмы, позволяющие клетке поддерживать очень низкую концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, несмотря на их высокую концентрацию во внеклеточной жидкости. Ca^{r+} активно откачивается из цитозоля во внеклеточное пространство *(А)* и в окруженные мембраной внутриклеточные органеллы, запасающие Ca^{2+} (Б). Кроме того, свободные ионы кальция прочно связываются различными внутриклеточными молекулами. Митохондрии тоже способны откачивать Ca^{+} из цитозоля, но делают это эффективно только при очень высокой концентрации Ca^{2+}, создающейся обычно при повреждении клетки.

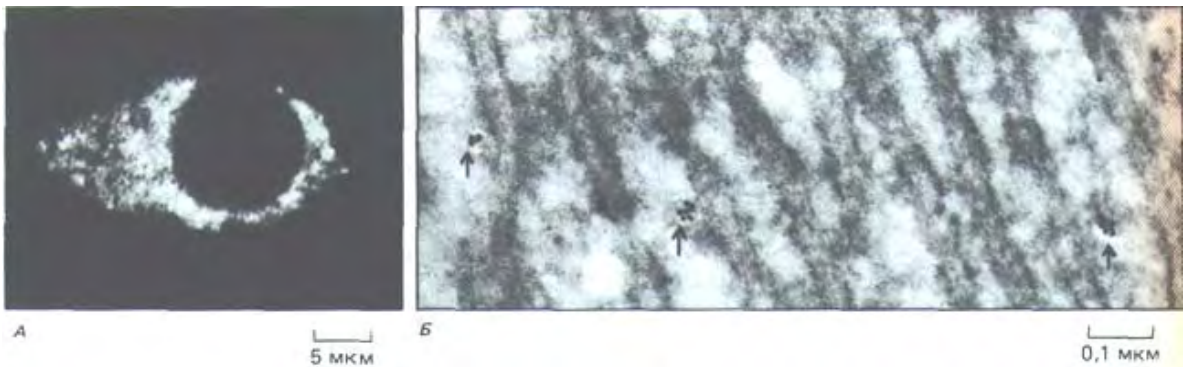


Рис. 12-19. Внутриклеточные депо для ионов Ca^{2+}, выявляемые с помощью антител к Ca^{2+}-связывающему белку кальсеквестрину. *А.* Иммунофлуоресцентная микрофотография нервной клетки крысы в культуре; видно, что места связывания кальция встречаются во всей цитоплазме. *Б.* Электронная микрофотография замороженного тонкого среза крысиной печени. Судя по распределению антител, меченных коллоидным золотом (указаны стрелкой), ионы Ca^{2+} запасаются не в гранулярном эндоплазматическом ретикулуме, хотя они могут быть в каких-то элементах гладкого ретикулума. Количественный анализ таких электронных микрофотографий позволил оценить объем запасающих органелл - он составляет менее 1% объема клетки. *(А* - P. Volpe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 1091-1095, 1988; *Б*- любезно предоставлено J. Meldolesi.)

Для работы этого сигнального механизма в цитозоле должна поддерживаться низкая концентрация Ca^{2+}, и это достигается несколькими способами (рис. 12-18). Все эукариотические клетки имеют в своей плазматической мембране Ca^{2+}-зависимую АТРазу, которая использует энергию расщепления АТР для откачивания ионов Ca^{2+} из цитозоля. У мышечных и нервных клеток, особенно широко использующих сигнализацию с помощью Ca^{2+}, в плазматических мембранах есть дополнительный кальциевый насос, который связывает выход Ca^{2+} с поступлением в клетку Na^{+}. Этот Na^{+}-Ca^{2+}-обменник обладает относительно низким сродством к Ca^{2+} и поэтому начинает действовать эффективно только при 10-кратном превышении нормального уровня Ca^{2+}, что случается при многократной стимуляции мышечной или нервной клетки.

Кальциевый насос в мембранах специализированных органелл тоже играет важную роль в поддержании концентрации Ca^{2+} в цитозоле на низком уровне: эта Ca^{2+}-АТРаза способна закачивать в органеллы большие количества ионов кальция из цитозоля против крутого градиента концентрации даже тогда, когда их уровень в цитозоле низок. Ионы Ca^{2+} хранятся в полости запасающей органеллы в состоянии непрочной ассоциации с Ca^{2+}-связывающим белком *кальсеквестрином,* который обладает низким сродством к Ca^{2+} *($K_д$* = 10^3 л/моль), но высокой емкостью (~50 ионов Ca^{2+} на молекулу). Если окрасить клетки антителами к кальсеквестрину и Ca^{2+}-АТР-азе, то выявятся одни и те же ограниченные мембранами органеллы, меньшие по размерам и отличные от гранулярного эндоплазматического ретикулума (рис. 12-19). Эти органеллы гомологичны саркоплазматическому ретикулуму в мышечных клетках (разд. 11.1.11) и, подобно этому ретикулуму, специализированы для хранения и освобождения Ca^{2+}. В дальнейшем мы будем называть их **Ca^{2+}-запасающими** органеллами.

Обычно концентрация свободных ионов кальция в цитозоле варьирует в пределах примерно от 10^{-7} М во время покоя до 5- 10^{-6} М при активации внешним сигналом. Но если клетка повреждена и не в состоянии эффективно откачивать ионы Ca^{2+} из цитозоля, их концентрация может стать опасно высокой (> 10^{-5} М). В этих обстоятельствах начинает действовать высокоэффективный кальциевый насос с низким сродством во внутренней митохондриальной мембране, использующий энергию электрохимического градиента, который создается на этой мембране за счет энергии переноса электронов при окислительном фосфорилировании (разд. 7.1.8).

12.3.8 Ион Ca^{2+} действует как вездесущий внутриклеточный посредник [15]

Первые данные о роли иона Ca^{2+} как внутриклеточного посредника были получены в 1947 г., когда выяснилось, что инъекция в клетку скелетной мышцы небольшого количества Ca^{2+} вызывает ее сокращение. В последние годы стало ясно, что Ca^{2+} служит внутриклеточным посредником в весьма разнообразных клеточных реакциях, включая секреторные процессы и пролиферацию. Были выявлены два типа передачи сигнала с участием ионов Ca^{2+} (рис. 12-20), один из которых реализуется главным образом в электрически активных клетках, а другой - почти во всех клетках эукариот. Первый из этих путей был подробно исследован на нервных клетках, где деполяризация плазматической мембраны вызывает поглощение Ca^{2+} нервным окончанием, инициируя секрецию нейромедиатора; Ca^{2+} входит через потенциал-зависимые кальциевые каналы, которые открываются при деполяризации плазматической мембраны нервного окончания в момент прихода потенциала действия (разд. 19.3.2). При втором, повсеместно распространенном способе связывание сигнальной молекулы с рецептором клеточной поверхности ведет к освобождению Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ; события на поверхности клетки сопряжены с открытием кальциевых каналов во внутриклеточной мембране с помощью другого внутриклеточного *посредника-инозитолтрисфосфата.* Он образуется в плазматической мембране в результате быстрого гидролиза минорных фосфолипидов (инозитолфосфолипидов).

12-14

12.3.9 Инозитолтрисфосфат ($InsP_3$) сопрягает активацию рецептора с освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ [16]

Предположение о роли инозитолфосфолипидов *(фосфоинозитидов)* в передаче сигнала впервые возникло в 1953 г., когда было обнаружено, что некоторые внеклеточные сигналы стимулируют включение радиоактив-

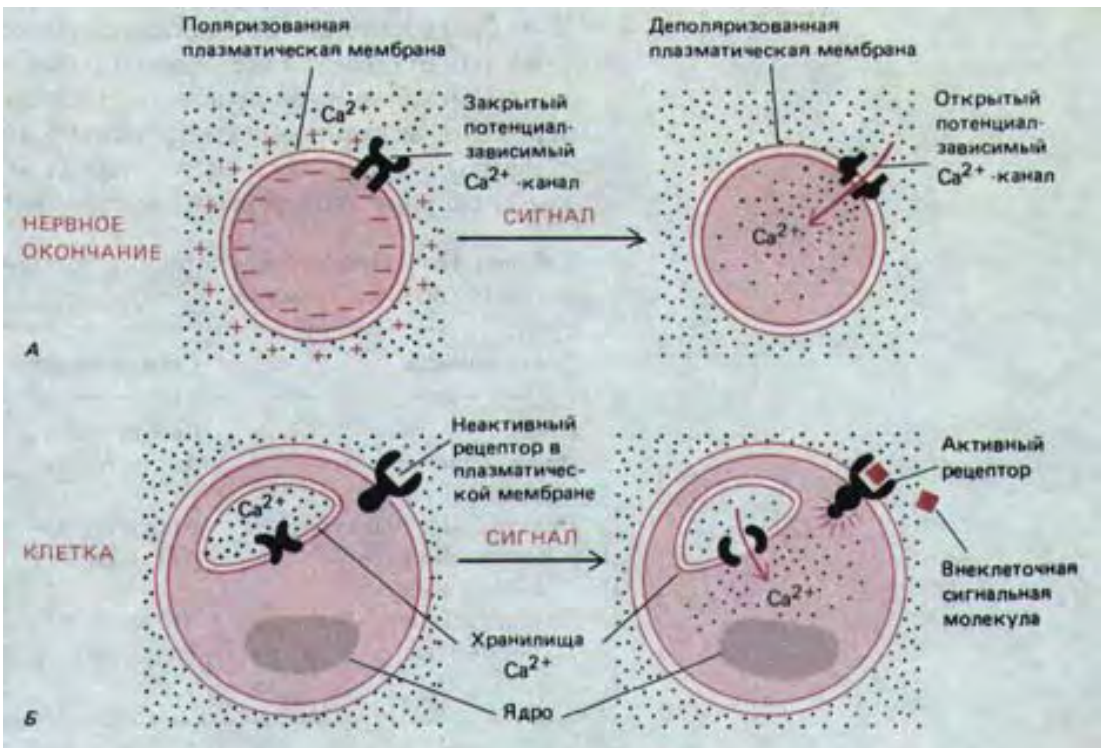


Рис. 12-20. Два главных пути, которыми Ca^{2+} может проникнуть в цитозоль, чтобы выполнить свою функцию внутриклеточного посредника для внеклеточных сигналов. В случае *А* кальций входит в нервное окончание из внеклеточной жидкости через потенциал-зависимые кальциевые каналы, когда мембрана нервного окончания деполяризуется потенциалом действия. В случае *Б* связывание внеклеточной сигнальной молекулы с поверхностным рецептором стимулирует выход Ca^{2+} из его хранилищ внутри клетки.

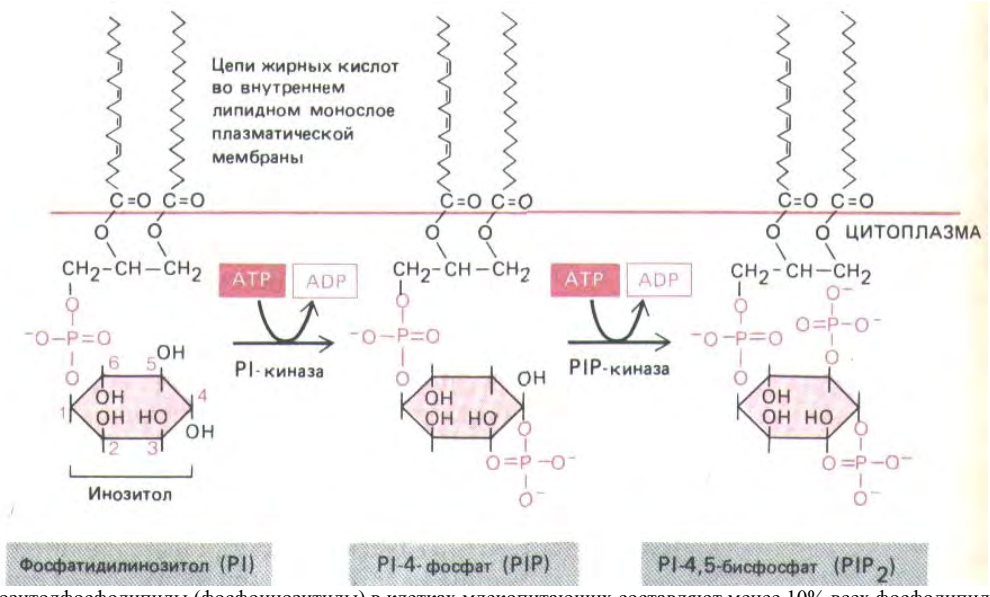


Рис. 12-21. Инозитолфосфолипиды (фосфоинозитиды) в клетках млекопитающих составляют менее 10% всех фосфолипидов клеточной мембраны. Полифосфоинозитиды (PIP и $P1P_2$)-продукты фосфорилирования фосфатидилинозитола (PI). Хотя при воздействии внешнего сигнала могут расщепляться все три инозитолфосфолипида, наибольшую роль играет расщепление $P1P_2$, хотя он составляет менее 10% общего количества инозитолфосфолипидов и менее 1% всех фосфолипидов клетки.

ного фосфата в **фосфатидилинозитол** (PI) - минорный фосфолипид клеточной мембраны. Позднее было показано, что это включение обусловлено реакциями расщепления и ресинтеза инозитолфосфолипидов, запускаемыми рецептором, который активирует фермент **фосфоинозитид-специфическую фосфолипазу С.** Из инозитолфосфолипидов наиболее важную роль в передаче сигнала играют два фосфорилированных производных PI-*P1-фосфат (PIP)* и *P1-бисфосфат ($P1P_2$),* которые, как полагают, находятся главным образом во внутреннем листе липидного бислоя плазматической мембраны (рис. 12-21). Хотя $P1P_2$ содержится в мембранах животных клеток в гораздо меньших количествах, чем PI, наибольшее значение имеет именно гидролиз $P1P_2$.

Цепь событий, соединяющих внешний сигнал и внутренний ответ через гидролиз $P1P_2$, начинается с присоединения сигнальной молекулы к ее рецептору в плазматической мембране. В настоящее время установлено, что гидролиз инозитолфосфолипидов участвует в передаче сигнала более чем от 25 различных рецепторов клеточной поверхности (табл. 12-4). Хотя детали этой активации менее ясны, чем в случае аденилатциклазы, накапливается все больше данных о том, что и здесь, в плазматической мембране, работает аналогичный многоступенчатый механизм. Вероятно, активированный рецептор активирует G-белок (пока условно названный G_p), а тот в свою очередь активирует фосфолипазу С. Менее чем за секунду этот фермент превращает PIP_2 в два продукта: *инозитол-*

Таблица 12-4. Некоторые клеточные реакции, осуществляемые через фосфоинозитидный каскад.

Ткань-мишень	**Сигнальная молекула**	**Главный ответ**
Печень	Вазопрессин	Распад гликогена
Поджелудочная железа	Ацетилхолин	Секреция амилазы
Гладкая мускулатура	Ацетилхолин	Сокращение
β-Клетки поджелудочной железы	Ацетилхолин	Секреция инсулина
Тучные клетки	Антиген	Секреция гистамина
Тромбоциты	Тромбин	Секреция серотонина и PDGF

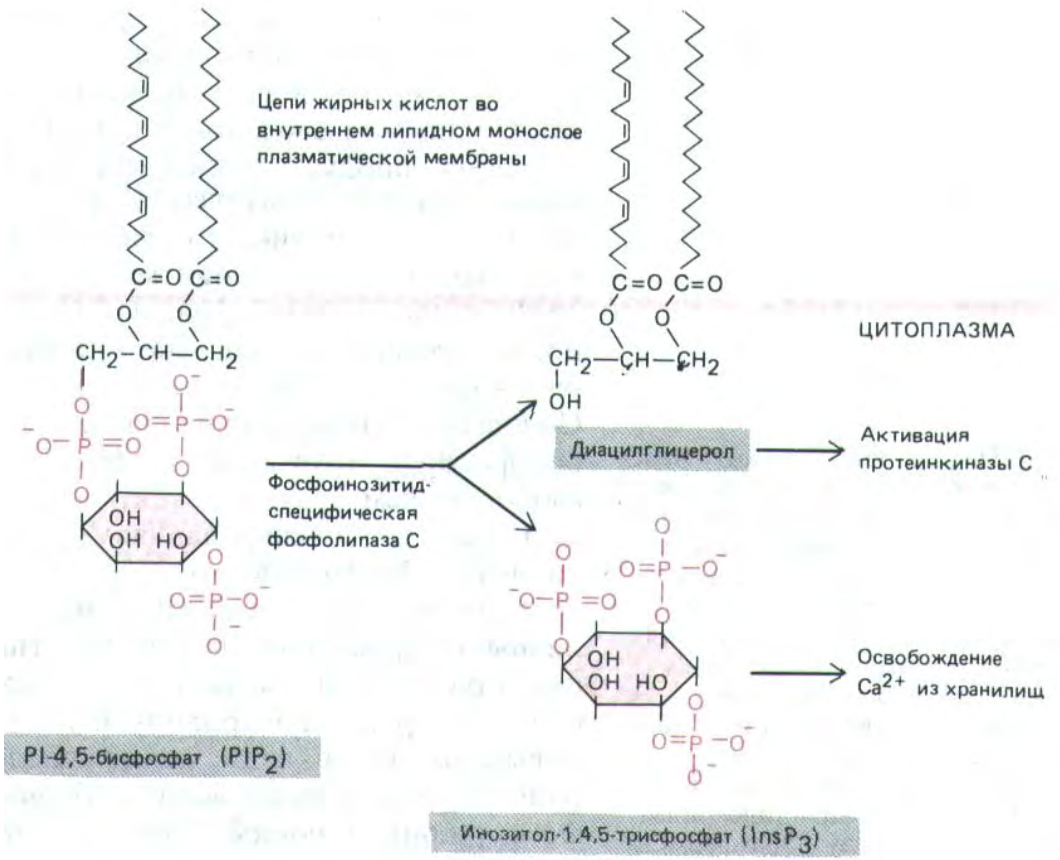


Рис. 12-22. При гидролизе $P1P_2$ образуется *инозитолтрисфосфат* ($InsP_3$), который диффундирует через цитозоль и освобождает Ca^{2+} из Ca^{2+}-запасающих органелл. Другой продукт гидролиза –*диацил-глицерол* - тоже играет важную роль во внутриклеточной передаче сигнала, активируя протеинкиназу С (см. ниже в тексте).

трисфосфат и *диацилглицерол* (рис. 12-22). Здесь путь передачи сигнала разделяется на две ветви. Поскольку обе названные молекулы играют важнейшую роль в последующем развитии ответа, мы рассмотрим их по отдельности.

Инозитолтрисфосфат ($InsP_3$)-небольшая водорастворимая молекула, которая освобождает ионы Ca^{2+} из их хранилищ внутри клетки (рис. 12-22). Когда $InsP_3$ добавляют к пермеабилизованным клеткам (мембрана которых путем специальной обработки сделана проницаемой) или *к* выделенным внутриклеточным везикулам, он вызывает выход Ca^{2+} в среду. Очевидно, связывание $InsP_3$ с рецептором на цитоплазматической поверхности внутриклеточной органеллы открывает кальциевые каналы в ее мембране. Два механизма делают выброс кальция кратковременным: 1) ионы Ca^{2+}, поступающие в цитозоль, быстро откачиваются оттуда, в основном за пределы клетки (позже, после удаления стимула, клетка постепенно восполнит свой запас Ca^{2+}, поглощая его через плазматическую мембрану); 2) часть $InsP_3$ быстро дефосфорилируется (и тем самым инактивируется) специальной фосфатазой. Однако дефосфорилируется не весь $InsP_3$: часть его, напротив, фосфорилируется до инозитол-1,3,4,5-тетракисфосфата ($InsP_4$), при участии которого в клетке, возможно, развиваются более медленные и продолжительные реакции. В некоторых клетках освобождение Ca^{2+} происходит в виде серии «импульсов», каждый из которых длится 10 с или более.

12.3.10. Диацилглицерол, образующийся при гидролизе $P1P_2$, активирует протеинкиназу С [17]

В то время как $InsP_3$, образующийся при гидролизе $P1P_2$, повышает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле, другой продукт расщепления **$P1P_2$-диацилглицерол -** производит совершенно другие эффекты. У него есть две потенциально «сигнальные» роли: он может распадаться дальше с образованием арахидоновой кислоты, необходимой для синтеза простагландинов и родственных им медиаторов липидной природы (см. рис. 12-8), или, что важнее, способен активировать специфическую про-

теинкиназу, которая затем фосфорилирует ряд белков с различными функциями в клетке-мишени.

Фермент, активируемый диацилглицеролом, называется **протеннкнназой С** или **С-киназой,** так как активность его зависит от Ca^{2+}. Диацил-глицерол - продукт активации рецептора - вместе с фосфолипидом внутреннего слоя плазматической мембраны *фосфатидилсерином* присоединяются к протеинкиназе С, повышая ее сродство к Ca^{2+} настолько, что она становится активной уже при низких концентрациях Ca^{2+} в цитозоле. Во многих клетках, однако, С-киназа в норме активируется, вероятно, совместным воздействием диацилглицерола и ионов Ca^{2+}, концентрация которых в цитозоле повышается под влиянием $InsP_3$. Активация С-киназы кратковременна, так как через несколько секунд диацилгдицерол фосфорилируется до фосфатидной кислоты или расщепляется с высвобождением арахидоновой кислоты.

С-киназа, активированная диацилглицеролом и Ca^{2+}, переносит концевую фосфатную группу с АТР на специфические сериновые или треониновые остатки белков-мишеней, которые в разных клетках различны. Например, во многих животных клетках С-киназа, по-видимому, фосфорилирует и тем самым активирует Na^+/H^+-обменник плазматической мембраны, контролирующий внутриклеточный рН (разд. 6.4.10); повышение рН в клетке может способствовать пролиферации. Концентрации С-киназы выше всего в головном мозгу, где помимо прочего она фосфорилирует ионные каналы нейронов, изменяя таким образом их свойства и возбудимость клеток (разд. 19.5). В некоторых клетках активация С-киназы усиливает транскрипцию определенных генов. В промоторах по меньшей мере некоторых из этих генов есть общая энхансерная последовательность, узнаваемая регуляторным белком, активность которого растет при активации С-киназы (см. табл. 10-1). Пока, однако, остается невыясненным, как С-киназа активирует этот белок - фосфорилируя (и соответственно активируя) его прямо или же действуя косвенно, через каскад протеинкиназ.

Каждый из двух путей фосфоинозитидного сигнала можно имитировать, добавляя к иутактным клеткам подходящий фармакологический агент. Эффекты $InsP_3$ имитируются *кальциевыми ионофорами,* такими как А23187 или иономицин, которые позволяют ионам Ca^{2+} входить в цитозоль из внеклеточного пространства (разд. 6.4.19). Действие

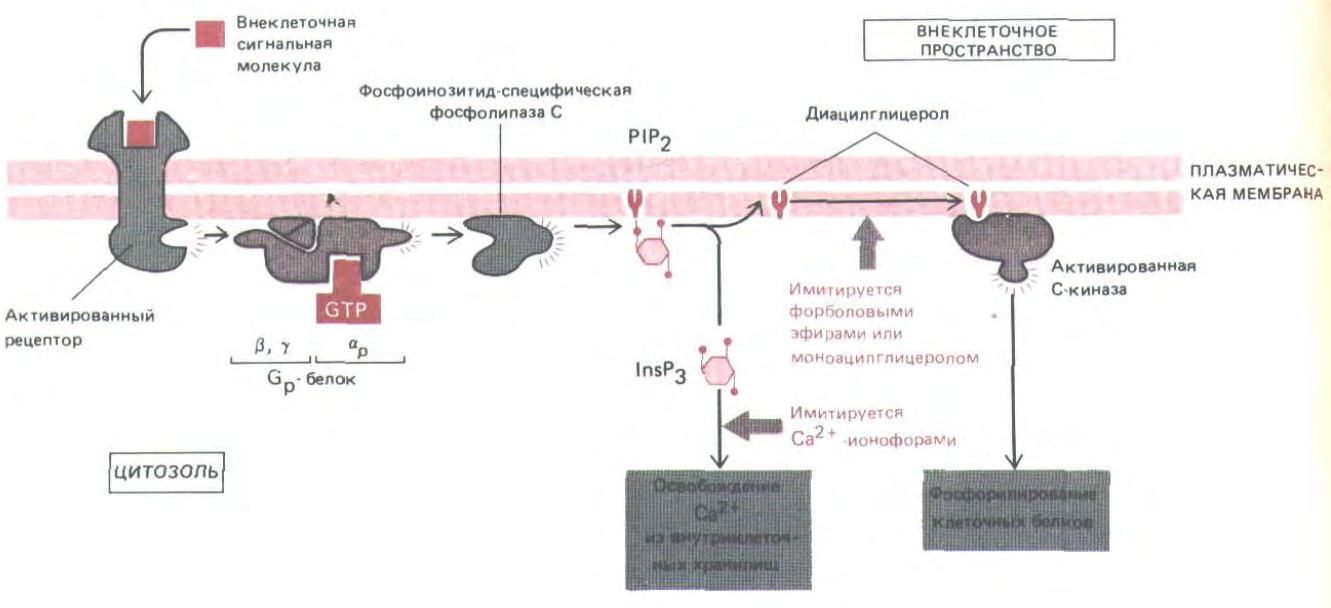


Рис. 12-23. Две ветви инозитолфос-фолипидного пути. Как полагают, активированный рецептор связывается со специфическим G-белком (G_p), заставляя его α-субъединицу диссоциировать и активировать фосфолипазу С, которая расщепляет $P1P_2$ с образованием $InsP_3$ и диацилглицерола. Истинная структура белка до сих пор не ясна. Диациглицерол (при участии не показанных на схеме связанных ионов Ca^{2+} и фосфатидилсерина) активирует С-киназу. Оба фермента и фосфолипаза С, и С-киназа-присутствуют в клетках как в растворимой, так и в мембраносвязанной форме; в процессе активации одна из них или обе они перемещаются из цитозоля на внутреннюю поверхность плазматической мембраны. Эффект $InsP_3$ можно имитировать экспериментально на интактных клетках обработкой Ca^{2+}-ионофором, а эффект диацилглицерола-обработкой моноацилпроизводными диацилглицерола или форбодовыми эфирами, которые связываются с С-киназой и активируют ее.

диацилглицерола может быть имитировано моноацильными производными диацилглицерола или *форболовыми эфирами* - веществами растительного происхождения, которые присоединяются к С-киназе и непосредственно активируют ее (рис. 12-23). С помощью этих реагентов было показано, что часто для получения полноценного клеточного ответа обе ветви должны действовать совместно. Например, пролиферацию клеток многих типов в культуре можно стимулировать, одновременно применяя кальциевый ионофор и активатор С-киназы, тогда как поодиночке эти реагенты неэффективны.

Когда по какой-то причине клетки начинают чрезмерно размножаться, это, разумеется, привлекает к себе внимание. Именно поэтому влияние форболовых эфиров на клеточную пролиферацию впервые было открыто благодаря их действию как «опухолевых промоторов» в организме животных. Опухолевые промоторы - это вещества, которые сами по себе рака не вызывают, но могут индуцировать опухолевый рост у животного после воздействия небольшой дозы канцерогена, недостаточной, чтобы вызвать рак. Когда позднее оказалось, что форболовые эфиры непосредственно активируют С-киназу, это помогло выяснить один из внутриклеточных механизмов реакции клеток на ростовые сигналы. Вообще фундаментальные исследования причин рака, и в особенности онкогенных вирусов животных, дали немало ценных сведений о путях передачи сигналов внутри клеток.

12.3.11. Так называемые *ras*-онкогены кодируют новый класс G-белков, участвующих в регуляции клеточного деления

По-видимому, для регуляции роста и деления клеток используется несколько различных сигнальных путей. Некоторые гены, в норме кодирующие белки - компоненты этих путей, иногда случайным образом захватывались ретровирусами и встраивались в их геном, нередко в модифицированной форме (эти ретровирусы известны также как онкогенные РНК-содержащие вирусы). Такие «украденные» у клетки вирусные гены в некоторых случаях придают вирусам способность вызывать неконтролируемую пролиферацию зараженных клеток и таким образом становятся причиной развития опухолей. Такие гены получили название **вирусных онкогенов.** Изучение опухолей привело к открытию опухолеродных вирусов, затем онкогенов, а это в свою очередь-к открытию нормальных клеточных *генов-протоонкогенов,* из которых произошли вирусные онкогены (разд. 13.4.2).

Большой класс онкогенов и протоонкогенов, открытых таким путем, был назван ras-генами (так как они впервые были обнаружены в вирусах, вызывающих саркому у крыс-rat sarcoma). Эти гены кодируют G-белки, которые находятся на внутренней поверхности плазматической мембраны и здесь связывают и гидролизуют GTP. Эти **ras-белки,** кодируемые вирусными ras-онкогенами, отличаются от нормальных ras-белков (кодируемых протоонкогенами) заменой аминокислоты в одном из двух положений. Этого, как правило, достаточно для нарушения GTP-азной активности, а вместе с ней и механизма собственной инактивации G-белка (разд. 12.3.4). Если в культивируемые клетки ввести антитела против продуктов ras-протоонкогенов, то эти клетки теряют способность делиться в ответ на воздействие ростовых факторов. На этом основании полагают, что ras-белки каким-то образом участвуют в сопряжении рецепторов для факторов роста с внутриклеточными белками-эффекторами. Природа эффекторных белков и механизм сопряжения остаются невыясненными, хотя накапливается все больше данных о том, что эффекторные белки могут регулировать фосфоинозитидный путь передачи сигнала - по крайней мере это одна из их функций. ras-Белки-

одиночные полипептиды, поэтому предположение, что G_p-белок, сопрягающий рецепторы с фосфолипазой С, кодируется ras-протоонкогеном, весьма маловероятно: тогда G_p слишком отличался бы от всех остальных G-белков-гомологичных гетеротримеров, рассмотренных в этой главе (см. табл. 12-3). Гораздо более правдоподобно, что семейство *ras*-протоонкогенов, включающее как минимум три члена, кодирует особую группу G-белков с новыми функциями. Несмотря на ряд неясных моментов, изучение онкогенов открыло важный новый подход к выяснению нормальных механизмов передачи клеточного сигнала с участием G-белков, а также и других клеточных сигнальных механизмов.

12.3.12. Активаторы G-белков образуют большое семейство гомологичных гликопротеинов, семикратно пронизывающих мембрану [19]

Сигнальные системы, в которых используются G-белки, удивительно многообразны. Мы видели, что некоторые G-белки (G_s и G_i) сопрягают рецепторы с аденилатциклазой, а другие (G_p) с фосфолипазой С. В глазу позвоночных G-белок, называемый трансдуцином, сопрягает поглощение фотона молекулой родопсина с активацией фермента фосфодиэстеразы, который гидролизует cGMP (разд. 12.4.5); падение концентрации этого внутриклеточного посредника приводит к электрическим изменениям в клетке-фоторецепторе. Все эти G-белки могут опосредованно, тем или иным способом изменять состояние ионных каналов, однако некоторые G-белки могут взаимодействовать с ними непосредственно. Например, присоединение ацетилхолина к рецепторам на клетках сердечной мышцы активирует G_i-подобный белок, который прямо активирует калиевый канал в плазматической мембране. (Эти рецепторы, чувствительные к алкалоиду мухомора мускарину, называют *мускаринивыми рецепторами ацетилхолина* в отличие от других - *никотиновых рецепторов ацетилхолина,* которые являются каналообразующими рецепторами скелетных мышц-см. разд. 6.4.17.)

Все до сих пор охарактеризованные G-белки, которые работают в этих столь различных системах, эволюционно родственны. Они имеют сходную субъединичную структуру и аминокислотную последовательность: *у* α-субъединицы трансдуцина и G_i, например, последовательности на 65% идентичны. Не удивительно, что многие, если не все, взаимодействующие с этими G-белками рецепторы тоже гомологичны между собой, что стало ясно после секвенирования их кДНК. Обобщение первичных структур рецепторов этого быстро растущего класса дало общую структуру, состоящую из одной полипептидной цепи, которая пронизывает липидный бислой семь раз. Это семейство семикратно трансмембранных белков-рецепторов включает β-адренэргические рецепторы (рис. 12-24), мускариновые рецепторы для ацетилхолина, несколько рецепторов для нейропептидов и даже родопсин. Похоже, что все эти гликопротеины входят в очень большое семейство эволюционно родственных рецепторов. Общий структурный «мотив», вероятно, возник в эволюции рано, так как он свойствен уже бактериородопсину (светочувствительному протонному насосу, который, правда, действует не через G-белок - см. разд. 6.27) и рецепторным белкам, участвующим в регуляции созревания дрожжей (разд. 10.3.2). Однако не все рецепторы клеточной поверхности несколько раз пронизывают мембрану, и сейчас мы переходим к другому классу рецепторов - к семейству тирозин-специфических протеинкиназ.

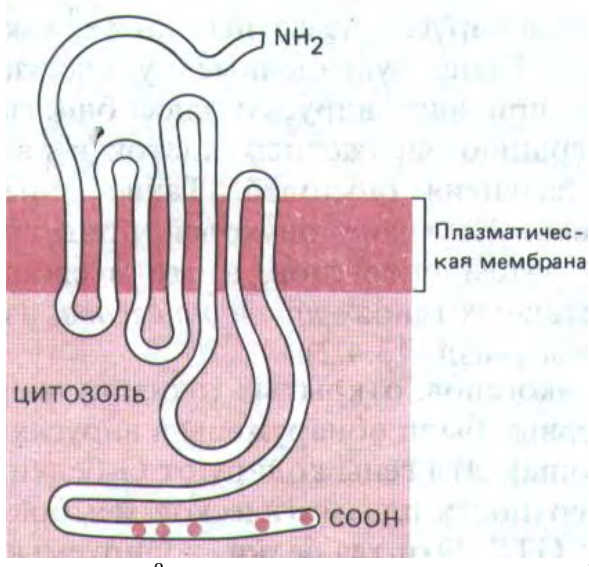


Рис. 12-24. Схема предполагаемого расположения β-адренэргического рецептора в плазматической мембране. Выделенные красным цветом участки цитоплазматического «хвоста» указывают положение остатков серина-потенциальных мишеней для фосфорилирования при десенсибилизации рецептора (разд. 15.5.2). Установлено, что у других рецепторов, сопряженных с G-белками, полипептидная цепь тоже семикратно пронизывает мембрану. (По данным R. A. Dixon et al., Nature 321: 75-79, 1986.)

12.3.13. Многие каталитические рецепторы – гликопротеины с тирозин-специфической протеинкиназной активностью, однократно пронизывающие мембрану [20]

Обширная группа поверхностных рецепторов трансформирует внешний сигнал во внутриклеточный с помощью G-белков, но есть и такие рецепторы, которые действуют более коротким путем. Это каталитические белки-рецепторы, и наиболее изученные среди них - однократно пронизывающие мембрану тирозин-специфические протеинкиназы, каталитический домен которых находится с внутренней стороны плазматической мембраны. При связывании лиганда они активируются и переносят терминальную фосфатную группу от ATP на гидроксильную группу тирозинового остатка в определенных белках клетки-мишени. К этому семейству протеинкиназ относятся рецепторы *инсулина,* многих ростовых факторов, включая тромбоцитарный фактор роста (ТФР, или PDGF - platelet-derived growth factor, см. разд. 13.3.4) и фактор роста эпидермиса (ФРЭ, или EGP - epidermal growth factor), который стимулирует деление эпидермальных и многих других клеток (см. рис. 12-25). Большинство других протеинкиназ фосфорилирует сериновые или, реже, треониновые остатки в белках, так что фосфотирозин содержится менее чем в 0,1% фосфорилированных белков клетки. Во всех изученных случаях белок-рецептор с тирозинкиназной активностью фосфорилирует и сам себя, когда активирован. В случае рецептора инсулина это самофосфорилирование повышает активность киназы по типу положительной обратной связи.

Каким образом связывание лиганда с внеклеточным доменом рецептора активирует каталитический домен на другой стороне плазматической мембраны? Трудно представить себе, как конформационные изменения могли бы передаваться через липидный бислой по одиночной трансмембранной α-спирали. В случае рецептора для EGF связывание лиганда вызывает конформационные изменения наружного домена, что приводит к димеризации рецептора. Возможно, что в результате взаимодействия двух соседних цитоплазматических доменов димер приобретает каталитическую активность.

Имеется достаточно данных о том, что важную роль в сигнальном процессе играет киназная функция рецепторов. Например, клетки, содержащие мутантный рецептор инсулина с единственной аминокислотной заменой, избирательно подавляющей киназную активность, на инсулин не реагируют. Однако идентифицировать ключевые субстраты, которые фосфорилируются наряду с самим рецептором, чрезвычайно трудно, и поэтому конкретная роль фосфорилирования тирозина в передаче сигнала остается неясной. В случае рецептора для PDGF одним из субстратов, по-видимому, является киназа, фосфорилирующая фосфатидилинозитол (PI-киназа, см. рис. 12-21). Возможно, этим объясняется тот парадоксальный факт, что PDGF вызывает медленную активацию фосфоинозитидного сигнального пути, хотя его рецептор не сопряжен с G_p[1].

После связывания лиганда многие каталитические рецепторы переходят внутрь клетки путем эндоцитоза в окаймленных пузырьках, содержащих комплексы рецептор-лиганд (разд. 6.5.7). В некоторых случаях такой эндоцитоз, по-видимому, определяется самофосфорилированием рецептора. Этот процесс может играть важную роль и в расщеплении сигнальных молекул, и в регуляции плотности рецепторов на поверх-

[1] В последнее время появились данные, что рецепторы по крайней мере некоторых факторов роста после связывания лиганда могут фосфорилировать и фосфолипазу С, усиливая гидролиз PIB_2.-*Прим. перев.*

ности клетки-мишени (разд. 12.5). Кроме того, происходящий при этом перенос домена с тирозинкиназной активностью в новый участок клетки тоже может быть существенным для сигнального процесса, хотя это пока еще не доказано.

12.3.14. Продукты некоторых онкогенов - это аномальные каталитические рецепторы с нерегулируемой киназной активностью [21]

Первая тирозиновая протеинкиназа была открыта в 1979 г. Это был не поверхностный клеточный рецептор, а внутриклеточный продукт вирусного онкогена - белок, названный pp60 *v-src* (разд. 13.4.2). Первым рецептором, у которого обнаружили тирозинкиназную активность (в 1982 г.), был рецептор для EGF. Несколькими годами позже выяснилось, что вирусный онкоген *erbB* кодирует урезанный вариант рецептора для EGF. Этот урезанный белок потерял EGF-связывающий наружный домен, но сохранил внутриклеточный домен с тирозинкиназной активностью, и поэтому клетки с такими дефектными рецепторами ведут себя так, как будто на них постоянно действует сигнал к пролиферации. Позднее выяснилось, что онкоген *neu,* активный в некоторых химически индуцированных опухолях нервной системы у крыс, кодирует аномальный рецептор, являющийся тирозиновой киназой, хотя природа лиганда (предположительно это ростовой фактор) для нормального рецептора не установлена. В этом случае аномальный и нормальный рецепторы различаются только по одному аминокислотному остатку в единственном трансмембранном сегменте белка. Такого изменения оказалось достаточно, чтобы сделать тирозиновую киназу постоянно активной. Эти исследования подчеркивают важную роль тирозиновых киназ в контроле клеточной пролиферации.

Между онкогенами и нормальными путями передачи сигнала к пролиферации было обнаружено немало и других связей. Онкоген *sis,* например, кодирует функционально активную субъединицу PDGF, а онкоген *erbA* - измененную форму рецептора тиреоидного гормона. Как мы будем более подробно обсуждать в гл. 13, исследование онкогенов открывает перспективный путь к выявлению и пониманию целого спектра механизмов, с помощью которых пролиферативные сигналы достигают своей цели.

Продукты примерно половины всех открытых до сих пор онкогенов - это протеинкиназы, фосфорилирующие белки-мишени по остаткам тирозина, серина или треонина. Это не удивительно, так как фосфорилирование играет важную роль в процессах передачи сигнала, запускаемых как каталитическими рецепторами, так и рецепторами, сопряженными с G-белками, и для его осуществления имеется весьма обширное семейство протеинкиназ. Уже известно более 70 протеинкиназ, и все они, видимо, происходят от общего предшественника, так как их каталитические домены гомологичны (рис. 12-25). Фактически сейчас уже возможно предсказать, будет ли белок киназой и если да, то какие остатки - серина, треонина или тирозина - он будет фосфорилировать, просто исходя из данных о его аминокислотной последовательности. В следующем разделе мы увидим, что два главных внутриклеточных посредника - cAMP и Ca^{2+}-реализуют многие свои эффекты, активируя протеинкиназы, специфичные в отношении серина и треонина.

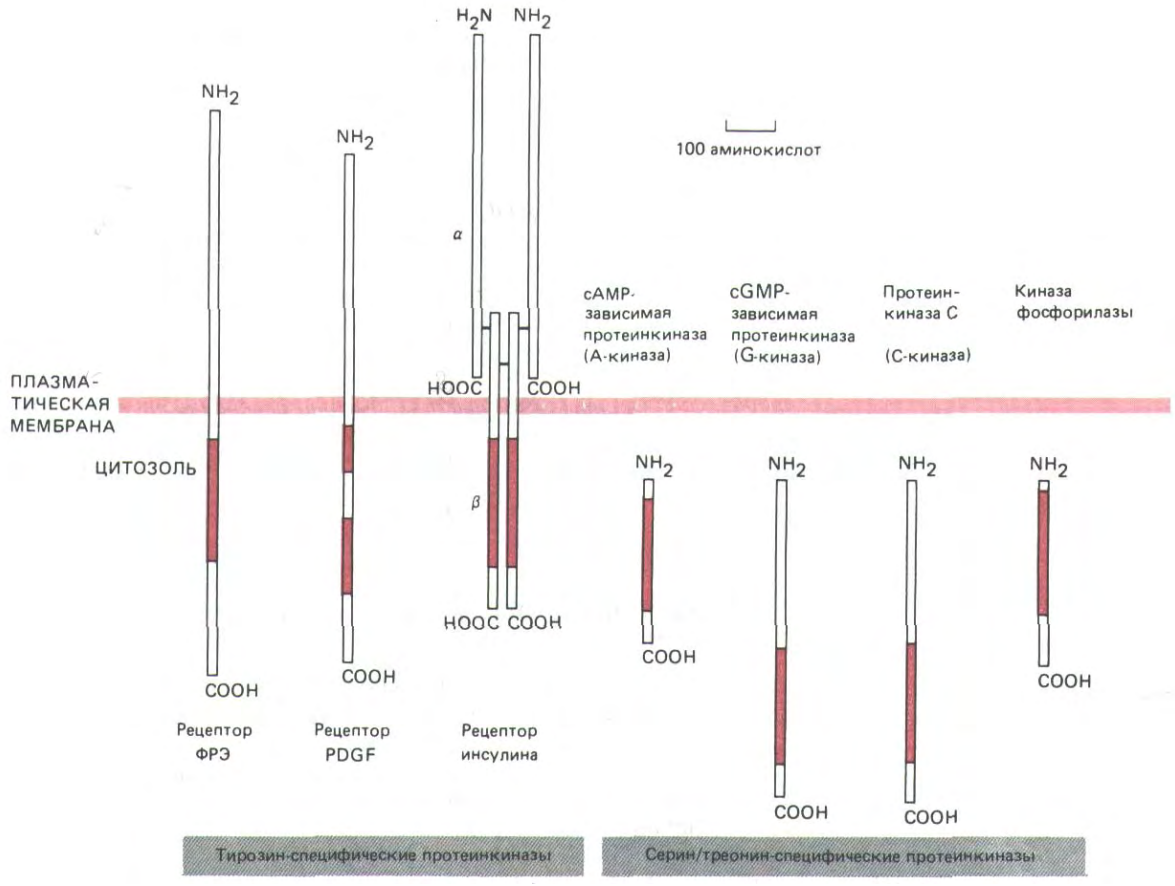


Рис. 12-25. Размеры и локализация каталитических доменов некоторых протеинкиназ, рассмотренных в этой главе. Во всех случаях каталитический домен (выделен цветом) состоит примерно из 250 аминокислотных остатков и имеет сходную аминокислотную последовательность; это позволяет предполагать происхождение их всех от общего предшественника. Три представленные здесь тирозин-специфические киназы-трансмембранные белки-рецепторы, которые при связывании специфического внеклеточного лиганда активируются и фосфорилируют ряд белков внутри клетки (в том числе и самих себя) по остаткам тирозина. Обе цепи рецептора инсулина кодируются одним геном, продукт которого - белок-предшественник - расщепляется на две цепи, связанные дисульфидными мостиками. Внеклеточная часть рецептора PDGF, по-видимому, сложена в пять иммуноглобулиноподобных доменов - возможно, этот белок относится к суперсемейству иммуноглобулинов (разд. 18.6.20). Регуляторные субъединицы А-киназы (см. рис. 12-27) и киназы фосфорилазы (см. рис. 12-31), в норме ассоциированные с этими киназами, на схеме не показаны.

Заключение

Известны три основных семейства поверхностных клеточных рецепторов, передающих внеклеточные сигналы различными способами. Рецепторы, образующие канал, - это чувствительные к нейромедиатору ионные каналы, которые быстро открываются или закрываются в ответ на связывание нейромедиатора и изменяют электрическую возбудимость клетки. Каталитические рецепторы являются в основном тирозин-специфическими киназами, которые прямо фосфорилируют определенные белки

клеток-мишеней по остаткам тирозина. Рецепторы, сопряженные с G-белками, опосредованно активируют или инактивируют ферменты или ионные каналы, связанные с плазматической мембраной, через регуляторные GTP-связывающие белки (G-белки). Эти G-белки «выключают» сами себя, медленно гидролизу я связанный GTP. Некоторые из таких рецепторов активируют или ингибируют аденилатциклазу, изменяя этим концентрацию внутриклеточного посредника cAMP. Другие активируют фосфоинозитид-специфичную фосфолипазу С, которая гидролизует фосфатидилинозитол-бисфосфат (PIP_2), образуя из него два внутриклеточных посредника: 1) инозитолтрисфосфат ($InsP_3$), освобождающий ионы Ca^{2+} из их внутриклеточных хранилищ и повышающий их концентрацию в цитозоле; и 2) диацилглицерол, остающийся в плазматической мембране и активирующий протеинкиназу С, которая фосфорилирует различные клеточные белки. Разнообразные ответы, вызываемые активацией рецепторов, сопряженных с G-белками, быстро прекращаются после удаления внеклеточного сигнального лиганда. При этом G-белки инактивируются сами, $InsP_3$ быстро дефосфорилируется фосфатазой, диацилглицерол превращается в фосфатидную кислоту или расщепляется с образованием арахидоновой кислоты, cAMP гидролизуется фосфодиэстеразой, а ионы Ca^{2+} быстро откачиваются из цитозоля.

12.4. Механизм действия циклического AMP и ионов кальция [22]

Так как cAMP и Ca^{2+}-возможно, самые важные внутриклеточные посредники, появляющиеся в результате активации рецепторов клеточной поверхности, механизм их действия заслуживает специального рассмотрения. Оба они действуют как *аллостерические эффекторы* - активируют определенные белки, присоединяясь к ним и изменяя их конформацию.

12-21

12.4.1. с AMP активирует cAMP-зависимую протеинкиназу [23]

В животных клетках cAMP действует главным образом путем активации специфического фермента, называемого **cAMP-зависимой протеинкиназой (А-киназой).** Этот фермент катализирует перенос концевого фосфата с ATP на определенные остатки серина и треонина в некоторых белках клетки-мишени. Остатки, фосфорилируемые А-киназой, отличаются тем, что со стороны N-конца около них расположены две или большее число основных аминокислот. Ковалентнеє фосфорилирование таких остатков в свою очередь регулирует активность этих белков.

Впервые cAMP-зависимое фосфорилирование белков было выявлено при изучении метаболизма гликогена в клетках скелетных мышц. Гликоген - это основная резервная форма глюкозы; как уже упоминалось, его распад в мышечных клетках регулируется адреналином (фактически адреналин регулирует как распад гликогена, так и его синтез в скелетной мускулатуре). Если, например, животное подвергнуть стрессу (испугать и т. п.), то надпочечники начнут выбрасывать адреналин в кровь, и это будет приводить различные ткани организма в состояние «готовности». Циркулирующий в крови адреналин вызывает, в частности, расщепление гликогена в мышечных клетках до глюкозо-1-фосфата и в то же время подавляет синтез нового гликогена. Глюкозо-1-фосфат превращается в глюкозо-6-фосфат, который затем окисляется в реакциях гликолиза с образованием ATP, обеспечивая энергию для интенсивной работы мышц. Таким способом адреналин подготавливает мышечные клетки к усиленной работе.

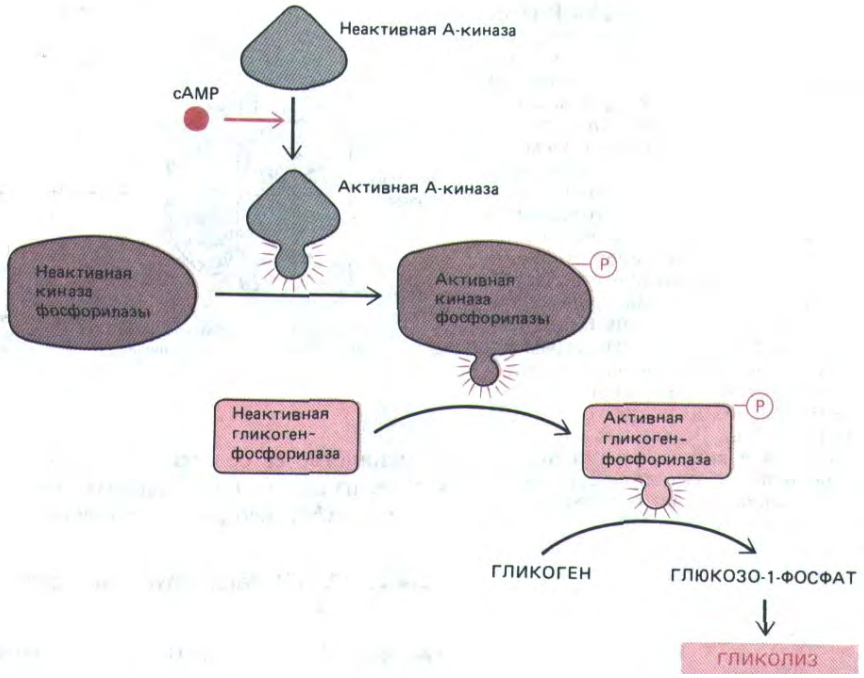


Рис. 12-26. На этой схеме показано, как повышение уровня cAMP в клетках скелетных мышц (при связывании адреналина с β-адренэргическими рецепторами клеточной поверхности) стимулирует распад гликогена. Связывание cAMP с А-киназой активирует этот фермент, который в свою очередь фосфорилирует и тем самым активирует киназу фосфорилазы, а она фосфорилирует (и активирует) гликогенфосфорилазу - фермент, расщепляющий гликоген. А-киназа также прямо и опосредованно усиливает фосфорилирование гликогенсинтетазы (которая при этом ингибируется), и это ведет к прекращению синтеза гликогена (не показано).

Как уже говорилось, на поверхности мышечных клеток адреналин связывается с β-*адренэргическими рецепторами,* что ведет к активации аденилатциклазы и повышению уровня cAMP в цитозоле. cAMP активирует А-киназу, и она фосфорилирует другой фермент -*киназу фосфорилазы* (первую протеинкиназу, которую удалось получить в очищенном виде в 1959 г.). Эта последняя в свою очередь фосфорилирует (и тем самым активирует) *гликогенфосфорилазу,* отщепляющую остатки глюкозы от молекулы гликогена (рис. 12-26). Активированная А-киназа, кроме того, усиливает фосфорилирование *гликогенсинтазы* - фермента, осуществляющего последний этап синтеза гликогена из глюкозы, фосфорилирование инактивирует гликогенсинтазу и прекращает синтез гликогена. С помощью такого каскада взаимодействий повышение уровня cAMP приводит одновременно как к уменьшению синтеза гликогена, так и к усилению его распада, что максимально увеличивает количество глюкозы, доступной для использования клеткой.

В некоторых животных клетках повышение уровня cAMP активирует транскрипцию специфических генов. В нейроэндокринных клетках гипоталамуса (разд. 12.1.2), например, cAMP «включает» ген, кодирующий пептидный гормон *соматостатин.* В промоторной области гена соматостатина есть короткая последовательность ДНК (около 30 нуклеотидов), найденная также в промоторах ряда других генов, активируемых cAMP. Эта последовательность узнается специфическим регуляторным белком, который, будучи фосфорилирован А-киназой, активирует транскрипцию этих генов.

В неактивном состоянии А-киназа - это комплекс из двух регуляторных субъединиц, связывающих cAMP, и двух каталитических субъединиц. Связывание cAMP изменяет конформацию регуляторных субъединиц, что приводит к отделению их от комплекса. Освобожденные каталитические субъединицы и представляют собой активную А-киназу; они фосфорилируют молекулы белков-субстратов (рис. 12-27).

А-киназа имеется во всех животных клетках, и полагают, что почти все эффекты, вызываемые cAMP, реализуются благодаря ей. Хотя

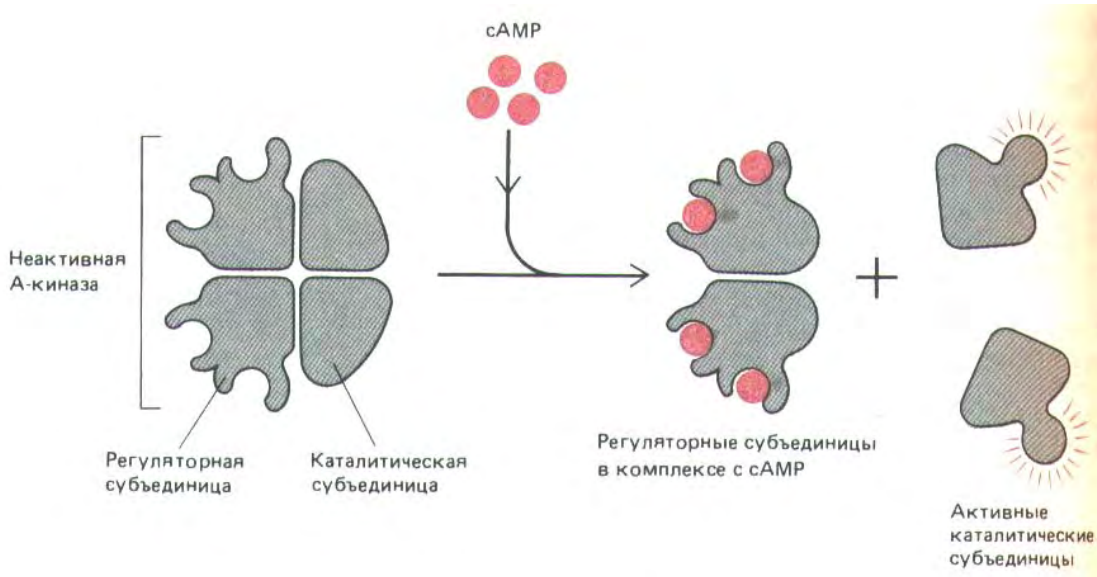


Рис. 12-27. Активация cAMP-зависимой протеинкиназы (А-киназы). Присоединение cAMP к регуляторным субъединицам фермента вызывает изменение их конформации, приводящее к отделению этих субъединиц от комплекса. Освобождаемые при этом каталитические субъединицы активируются. Каждая регуляторная субъединица имеет два участка для связывания cAMP, и освобождение каталитических субъединиц представляет собой кооперативный процесс, требующий присоединения более чем двух молекул cAMP на тетрамер. Это делает реакцию киназы на изменение концентрации cAMP значительно более резкой (см. разд. 12.4.8). Во многих клетках имеются А-киназы двух типов-с одинаковыми каталитическими субъединицами, но разными регуляторними.

большинство ее белков-субстратов еще не охарактеризовано, ясно, что многие из них в клетках разных типов различны, и это позволяет понять, почему cAMP неодинаково влияет на разные клетки-мишени.

12.4.2. cAMP ингибирует внутриклеточную протеинфосфатазу [24]

Так как эффекты cAMP обычно непродолжительны, ясно, что клетка способна дефосфорилировать белки, фосфорилированные А-киназой. Отщепление фосфата катализируют две главные *протеинфосфатазы,* одна из которых сама регулируется циклическим AMP. Уровень фосфорилирования всегда будет зависеть от баланса между активностями киназ и фосфатаз.

В клетках скелетных мышц с AMP-регулируемая протеинфосфатаза наиболее активна в отсутствие cAMP, и она дефосфорилирует все три ключевых фермента метаболизма гликогена, которые уже упоминались ранее, - киназу фосфорилазы, гликогенфосфорилазу и гликогенсинтазу. Это дефосфорилирование противодействует фосфорилированию белков под действием cAMP. Однако А-киназа в активном состоянии фосфори-

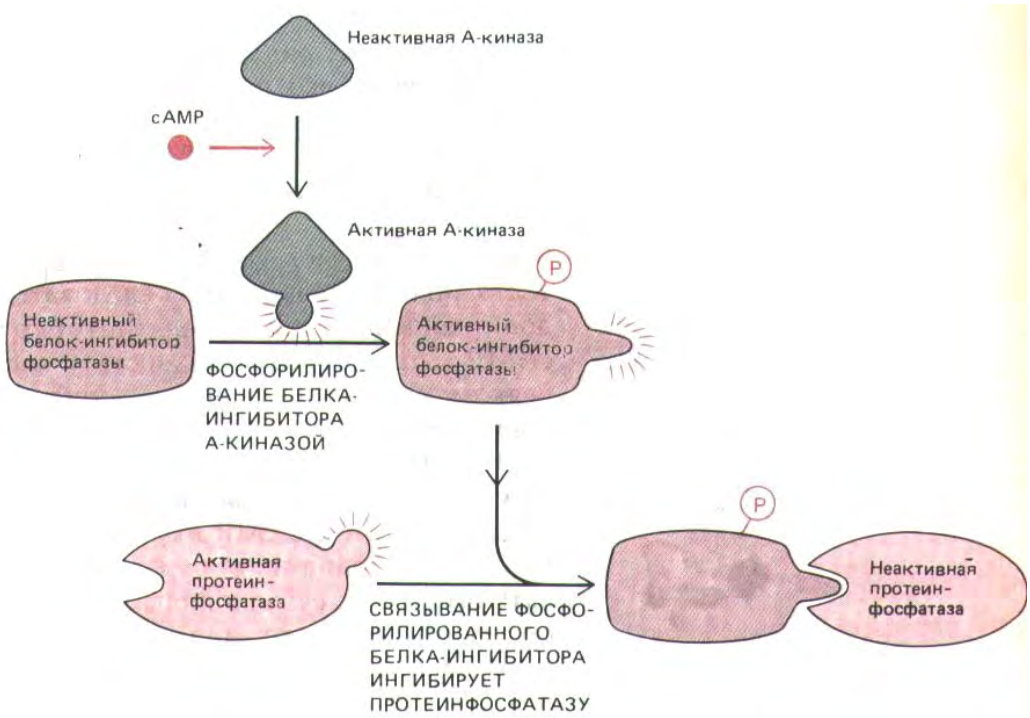


Рис. 12-28. Циклический AMP ингибирует протеинфосфатазу, которая в активном состоянии противодействовала бы реакциям фосфорилирования, запускаемым cAMP. Он активирует А-киназу, а она фосфорилирует белок-ингибитор, который после этого присоединяется к протеинфосфатазе и подавляет ее активность.

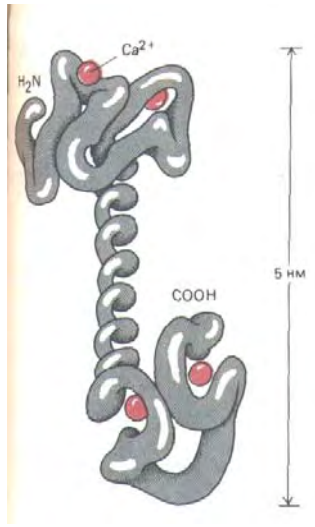


Рис. 12-29. Структура кальмодули-на (по данным рентгеноструктурного анализа). Молекула имеет форму гантели с двумя глобулярными юнцами, соединенными длинной открытой α-спиральго. Каждый конец имеет два Ca^{2+}-связывающих домена, представляющих собой петли из 12 аминокислотных остатков, в которых боковые цепи аспартата и глутамата образуют ионные связи с Ca^{2+}. У двух участков связывания ионов кальция в С-концевой части молекулы сродство к ним в десять раз больше, чем в N-концевой части. (По данным Y. S. Babu et al., Nature 315: 37-40, 1985.)

лирует и тем самым активирует также специальный белок - *ингибитор фосфатази.* Этот белок присоединяется к фосфопротеинфосфатазе и инактивирует ее (рис. 12-28). Таким образом, А-киназа, активируя киназу фосфорилазы и одновременно подавляя активность фосфопротеинфосфатазы, намного усиливает и ускоряет воздействие повышенного уровня cAMP на синтез и распад гликогена по сравнению с тем, что было бы, если бы А-киназа действовала лишь на один из этих ферментов.

12-22

12.4.3. Кальмодулин является вездесущим внутриклеточным рецептором для ионов кальция [25]

Поскольку концентрация свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле обычно составляет около 10^{-7} М и, как правило, не поднимается выше $5 \cdot 10^{-6}$ М даже при поступлении их извне, любая структура клетки, чтобы быть непосредственной мишенью кальциевой регуляции, должна иметь константу сродства к Ca^{2+} (K_a) порядка 10^6 л/моль. Если же учесть, что концентрация свободных ионов Mg^{2+} в цитозоле относительно постоянна и составляет около 10^{-3} М, то связывающие кальций центры должны обладать по меньшей мере 1000-кратной избирательностью к Ca^{2+} по сравнению с Mg^{2+}. Этим требованиям удовлетворяют несколько специфических Ca^{2+}-связывающих белков.

Первым из этих белков был открыт *тропонин С* в клетках скелетных мышц; роль его в мышечном сокращении обсуждалась в гл. 11 (разд. 11.1.12). Другой, близко родственный ему кальций-связывающий белок-кальмодулин - обнаружен во всех до сих пор изученных клетках животных и растений. Типичная животная клетка содержит более 10^7 молекул кальмодулина, что может составлять до 1% всего клеточного белка. Кальмодулин функционирует как многоцелевой внутриклеточный рецептор для Ca^{2+}, участвующий в большинстве процессов, регулируемых этими ионами. Это очень консервативный одиночный полипептид примерно из 150 аминокислот, имеющий четыре высокоаффинных Ca^{2+}-связывающих центра; при связывании кальция он претерпевает большие конформационные изменения (рис. 12-29).

Аллостерическая активация кальмодулина кальцием аналогична активации А-киназы циклическим AMP, с тем отличием что комплекс Ca^{2+}-кальмрдулин сам по себе не обладает ферментативной активностью и действует, связываясь с другими белками. В некоторых случаях кальмодулин служит постоянной регуляторной субъединицей ферментного комплекса (как в случае киназы фосфорилазы, см. ниже), но чаще

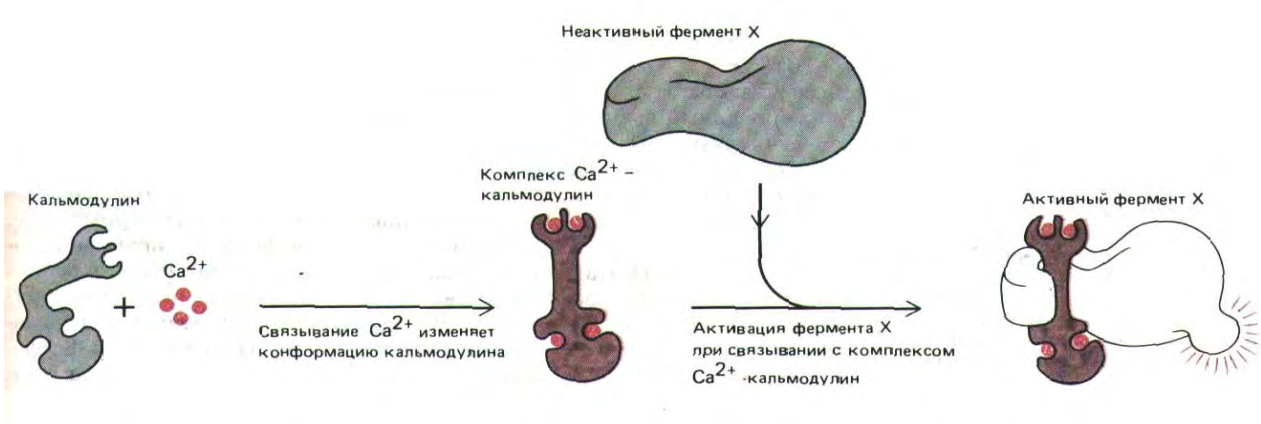


Рис. 12-30. Здесь показано, каким образом повышение концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле может косвенным образом активировать фермент, изменяя конформацию молекул кальмодулина. Подобно связыванию cAMP с А-киназой, связывание Ca^{2+} с кальмо-дулином кооперативно: для активации этого белка требуется больше одного иона Ca^{2+} (см. разд. 12.4.8).

всего связывание Ca^{2+} ведет к присоединению кальмодулина к различным белкам-мишеням и, как следствие, к изменению их активности (рис. 12-30).

К числу мишеней, регулируемых комплексом Ca^{2+}-кальмодулин, относится много ферментов и мембранных транспортных белков. Среди них **выделяются Ca^{2+}/кальмодулин-зависимые протеинкиназы** (Са-киназы), фосфорилирующие белки по остаткам серина и треонина. Первые из открытых Са-киназ -*киназа легких цепей миозина* и *киназа фосфорилазы* - имели узкую субстратную специфичность. Позже была идентифицирована широкоспецифичная Са-киназа, называемая *Ca^{2+}/кальмодулин-регулируемой «полифункциональной» киназой* (или *Са-киназой II);* она может служить посредником во многих эффектах Ca^{2+} в клетках млекопитающих. Как и в случае cAMP, ответ клетки-мишени на повышение концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле определяется тем, какие Ca^{2+}/кальмодулин-регулируемые белки имеются в клетке.

12.4.4. Пути с участием cAMP и Ca^{2+} взаимодействуют между собой [26]

Пути с участием вторичных посредников cAMP и Ca^{2+} взаимодействуют по крайней мере тремя способами. Во-первых, внутриклеточные уровни Ca^{2+} и cAMP влияют друг на друга. Например, комплексы Ca^{2+}/кальмодулин связываются с ферментами, которые разрушают или синтезируют cAMP,-с cAMP-фосфодиэстеразой и аденилатциклазой соответственно - и регулируют их активность; а в свою очередь А-киназа способна фосфорилировать некоторые кальциевые каналы и насосы и изменять их активность. Во-вторых, некоторые Са-киназы фосфорилируются А-киназой. В-третьих, А-киназа и Са-киназы нередко фосфорилируют различные участки одного белка, который, таким образом, регулируется сразу и циклическим AMP, и ионами Ca^{2+}.

В качестве примера взаимодействия путей Ca^{2+} и cAMP рассмотрим *киназу фосфорилазы* скелетных мышц, роль которой в расщеплении гликогена мы уже обсуждали. Эта киназа фосфорилирует гликогенфосфорилазу, расщепляющую гликоген (см. рис. 12-26). Киназа фосфорилазы - мультисубъединичный фермент, но только одна из его четырех субъединиц фактически катализирует фосфорилирование: три другие - регуляторные и дают комплексу возможность активироваться и циклическим AMP, и ионами кальция. Каждая из четырех субъединиц, обозначаемых α, β, γ и δ, представлена в комплексе четырьмя копиями. γ-Субъединица осуществляет катализ; чувствительность фермента к Ca^{2+} определяется в основном δ -субъединицей-кальмодулином; субъединицы же α и β - мишени для cAMP-зависимой регуляции; обе они фосфорилируются А-киназой (рис. 12-31).

Тот же Ca^{2+}-сигнал, который инициирует мышечное сокращение, обеспечивает и достаточный для этого источник энергии в виде глюкозы. Массированный выброс в цитозоль ионов Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума, вызывающий сокращение миофибрилл (разд. 11.1.11), одновременно повышает активность киназы фосфорилазы, изменяя конформацию ее δ -субъединицы, и в результате скорость расщепления гликогена за несколько секунд увеличивается в сотни раз. Кроме того, выброс Ca^{2+} ' активирует две Са-киназы, которые фосфорилируют и ингибируют гликогенсинтазу, прекращая синтез гликогена. Рассмотренная выше цепь реакций фосфорилирования, запускаемая в мышечных клетках адреналином, заранее приспосабливает их метаболизм к повышенным энергозатратам; так, например, фосфорилирование киназы фосфорилазы А-киназой делает ее более чувствительной к Ca^{2+}-для актива-



Рис. 12-31. Сильно схематизированное изображение четырех субъединиц киназы фосфорилазы из мышц млекопитающих. Каталитической активностью обладает γ-субъединица; α- и β-субъединицы участвуют в регуляции этой активности циклическим AMP, а δ-субъединица (кальмодулин)-в ее регуляции ионами Ca^{2+}. В действительности полный ферментный комплекс содержит по четыре копии каждой субъединицы.

ции требуется теперь меньшее число ионов кальция, связанных с кальмоду лином.

Используя двумерный гель-электрофорез, в эукариотических клетках удается выявить сотни различных фосфорилированных белков. Лишь малая их часть фосфорилируется известными киназами, большинство же киназ еще ждет своего открытия. Действительно, по оценкам, одна клетка млекопитающего может содержать более 100 различных протеинкиназ, регулирующих мириады внутриклеточных реакций. Помимо фосфорилирования существует и много других обратимых ковалентных модификаций, регулирующих активность белков, например метилирование - деметилирование, ацетилирование - деацетилирование, уридилирование-деуридилирование, аденилирование-деаденилирование. Кажется вероятным, что активность большинства клеточных белков, катализирующих протекание скорость-лимитирующих этапов в биологических процессах, регулируется с помощью той или иной из этих модификаций. Если же учесть, насколько сложны могут быть обратные связи в одном только метаболизме гликогена, станет ясно, что раскрытие механизмов этих важных регуляторных процессов представляет собой сложную задачу.

12-16

12.4.5. cGMP тоже служит внутриклеточным посредником [27]

cAMP - не единственный циклический нуклеотид, используемый для внутриклеточной сигнализации. Большинство животных клеток содержит также **циклический** гуанозинмонофосфат **(cGMP,** рис. 12-32), хотя его концентрация по крайней мере в 10 раз меньше концентрации cAMP. Известно, что cGMP служит активатором специфической протеинкиназы *(G-киназы),* фосфорилирующей в клетке определенные белки (см. рис. 12-25), однако роль циклического GMP в передаче сигналов от рецепторов клеточной поверхности, за несколькими исключениями, не ясна. **Гуанилатциклаза,** катализирующая образование cGMP из GTP, в отличие от аденилатциклазы обычно является растворимым ферментом и не сопряжена явным образом с поверхностными рецепторами, хотя уровень cGMP часто повышается при активации инозитолфосфолипидного пути. Однако недавно в некоторых клетках были обнаружены формы гуанилатциклазы, связанные с плазматической мембраной, которые либо сопряжены с поверхностными рецепторами, либо сами выполняют их функцию.

Лучше всего сигнальная роль cGMP выяснена в реакции на свет палочек в сетчатке позвоночных, где cGMP прямо воздействует на Na^+-каналы плазматической мембраны. В отсутствие света молекулы cGMP связаны с натриевыми каналами и удерживают их в открытом состоянии. Свет активирует в мембранных дисках палочек родопсин; активированный родопсин взаимодействует с G-белком *трансдуцином,* также активируя его. α-Субъединица трансдуцина (T_α) в свою очередь активирует *cGMP-фосфодиэстеразу,* которая гидролизует cGMP, резко снижая его концентрацию в цитозоле, и молекулы cGMP, связанные с натриевыми каналами, отделяются от них, позволяя им закрыться. Таким образом, световой сигнал преобразуется в электрический (подробнее см. разд. 19.6.7). Это прямое управление ионными каналами, осуществляемое cGMP, - один из немногих известных случаев, когда циклический нуклеотид в клетках позвоночных действует независимо от протеинкиназы. Но этот случай не единственный; другой такой пример - обонятельные рецепторные клетки носа. Связывание некоторых пахучих веществ со специфическими рецепторными белками в этих клетках активирует (через одну из форм G_5-белка) аденилатциклазу; это ведет к повышению концентрации cAMP в цитозоле, и cAMP непосредственно

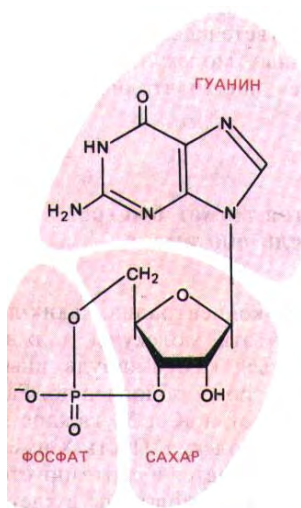


Рис. 12-32. Циклический GMP.

воздействует на натриевые каналы плазматической мембраны, открывая их и вызывая тем самым деполяризацию.

Несмотря на разницу в молекулярных деталях, все сигнальные системы, запускаемые рецепторами, сопряженными с G-белками, имеют ряд общих черт и основаны на сходных принципах. Все они, например, представляют собой сложные каскады или передаточные цепочки внутриклеточных посредников. Каковы же преимущества таких на первый взгляд запутанных систем, что они используются в столь многих типах клеток для столь разнообразных целей?

12.4.6. Использование вторичных посредников и ферментных каскадов позволяет в огромной степени усиливать реакцию на внеклеточные сигналы [28]

В отличие от более прямых сигнальных систем, таких как системы стероидных гормонов, каталитические каскады внутриклеточных посредников предоставляют много возможностей для усиления и регулирования ответов на внеклеточные сигналы. Из рис. 12-33 видно, что, например, когда внешний лиганд активирует аденилатциклазу опосредованно, связываясь с рецептором, одна молекула рецептора может активировать много молекул C_S-белка, каждая из которых способна активировать молекулу циклазы. В свою очередь каждая молекула аденилатциклазы превращает множество молекул ATP в cAMP. Такого же рода усиление происходит и в инозитолфосфо липидном пути. В результате наномолярные (10^{-9} M) концентрации внеклеточного лиганда нередко вызывают образование вторичных посредников, таких как cAMP или Ca^{2+} , в микромолярных ($10\sim^{6}$ M) концентрациях. Так как сами эти молекулы являются аллостерическими эффекторами, активирующими определенные ферменты, одна внешняя сигнальная молекула способна вызвать изменения во многих тысячах молекул внутри клетки-мишени. Кроме того, каждый белок в такой цепи может служить независимой мишенью для регуляторного воздействия, как, например, в каскаде расщепления гликогена в скелетных мышцах (разд. 12.4.1).

Работа такого рода «взрывных» метаболических каскадов должна жестко регулироваться. Не удивительно поэтому, что клетки обладают эффективными механизмами для быстрого расщепления cAMP и для понижения концентрации Ca^{2+} , а также для инактивации ферментов и транспортных белков, активированных при ответе на сигнал. Ясно, что быстрое удаление или инактивация сигнальных молекул необходимы для выключения клеточного ответа; менее очевидно то, что они столь же важны и для его быстрого включения.

12-25

12.4.7. Концентрация какого-либо вещества может быстро изменяться лишь в том случае, если оно имеет короткое время жизни [29]

Если для клетки важно очень быстро изменять концентрацию каких-либо молекул (например, с AMP или Ca^{2+}), то эти молекулы должны непрерывно разрушаться или быстро удаляться каким-нибудь иным способом - другими словами, подвергаться быстрому обновлению. Рассмотрим, например, два внутриклеточных вещества X и Y, каждое из которых обычно представлено в клетке тысячей молекул. Пусть X имеет низкую оборачиваемость - каждую секунду разрушается и синтезируется 10 молекул X; таким образом, среднее время жизни молекулы в клетке 100 с. Скорость синтеза и распада Y в 10 раз больше, т.е. 100 молекул в секунду, и соответственно время жизни молекулы Y равно 10 с. Если

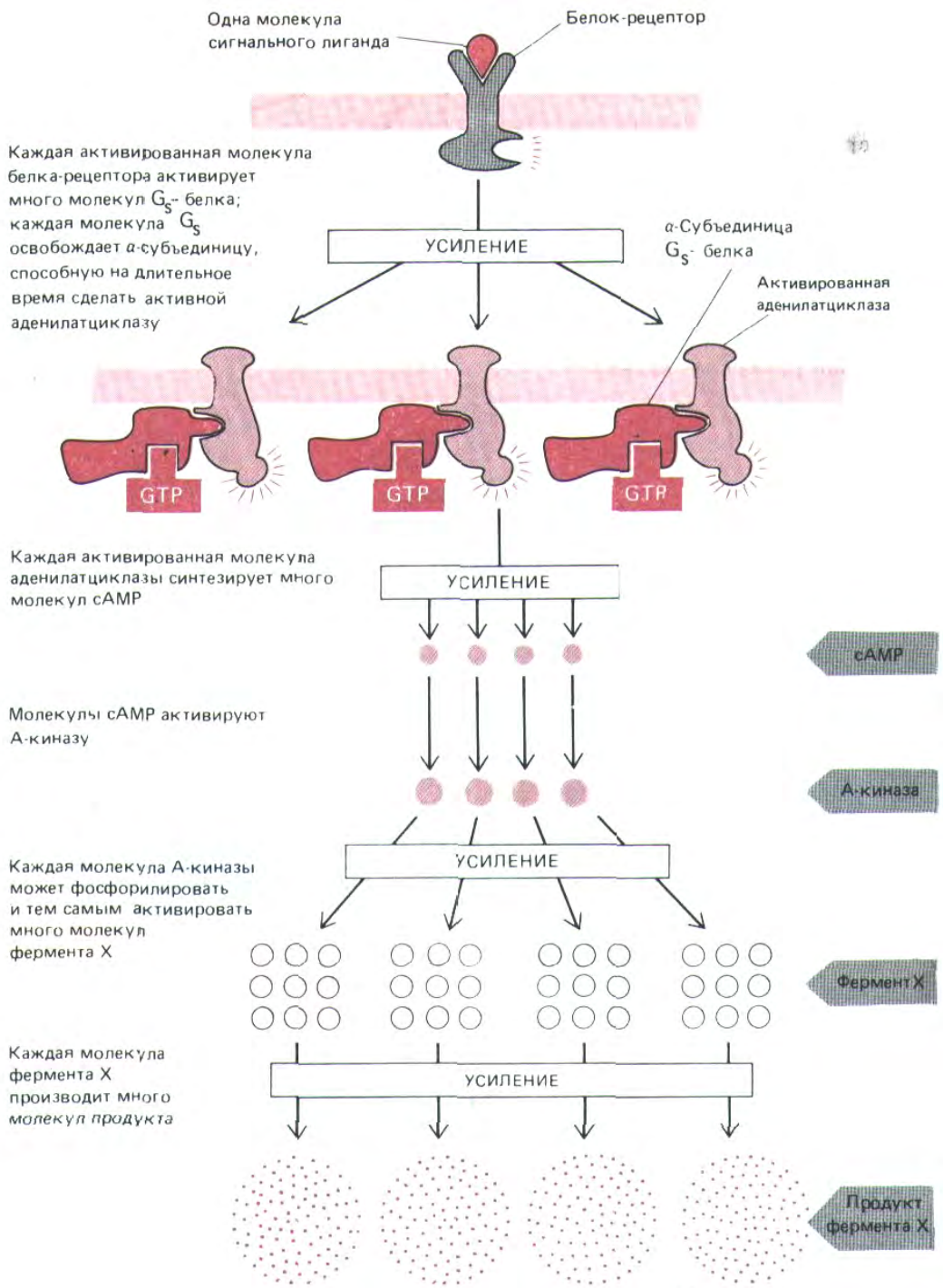


Рис. 12-33. Сопряжение поверхностных рецепторов с активацией аденилатциклазы через G-белок позволяет не только преобразовывать внеклеточный сигнал во внутриклеточный, но и многократно его усиливать. Такого же рода усиление происходит при активации инозитолфосфолипидного пути. На первом этапе усиления для активации множества молекул G_S-белка вовсе не обязательно длительное связывание сигнального лиганда с рецептором (см. разд. 12.3.5).

скорость синтеза обоих веществ увеличится в 10 раз, а скорость разрушения останется неизменной, то спустя 1 с число молекул Y в клетке возрастет почти на 900 (10-100 — 100), а число молекул X-всего лишь на 90. В общем случае время, за которое концентрация каких-либо молекул пройдет половину пути от прежней равновесной концентрации до новой после ускорения или замедления их синтеза, равно обычному времени полужизни этих молекул - времени, за которое концентрация их уменьшилась бы вдвое, если бы их синтез прекратился (рис. 12-34).

Этот принцип справедлив как для малых молекул, так и для белков, как для внутриклеточных, так и для внеклеточных веществ. Время полужизни многих внутриклеточных белков, подвергающихся быстрому расщеплению или ковалентной модификации, составляет 2 ч и меньше, а у некоторых оно не превышает 10 мин. В большинстве случаев это белки с ключевыми регуляторними функциями, и концентрация их в клетке легко контролируется изменением скорости их синтеза.

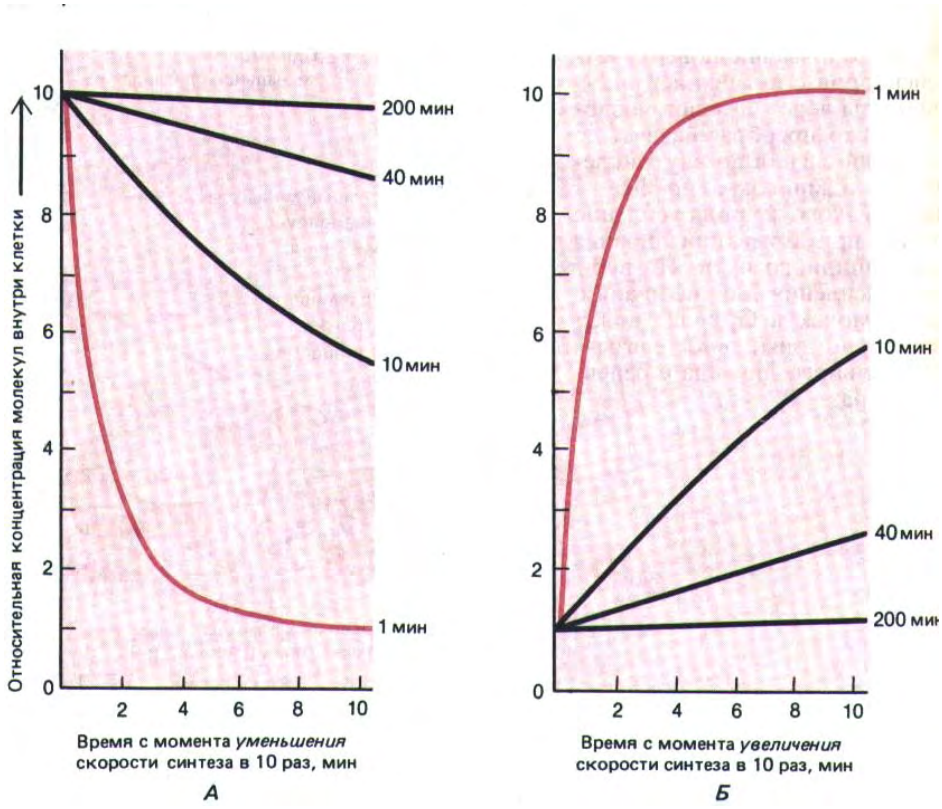


Рис. 12-34. Относительная скорость изменения внутриклеточной концентрации молекул с различным временем полуобновления при уменьшении *(А)* или увеличении *(Б)* скорости их синтеза в 10 раз (теоретические кривые). В обоих случаях концентрация молекул, быстро разрушающихся в клетке (цветные линии), изменяется быстро, а концентрация молекул с большими периодами полуобновления - пропорционально более медленно. Цветные цифры справа - время полужизни различных молекул.

12.4.8. Клетки могут резко отвечать на плавное повышение концентрации внеклеточного сигнала [30]

Некоторые реакции клеток на сигнальные молекулы бывают плавными (градуальными) и усиливаются прямо пропорционально увеличению концентрации лиганда. Таковы обычно первичные ответы клеток на стероидные гормоны, вероятно потому, что каждый рецепторный белок связывает одну молекулу гормона, а каждая специфическая узнаваемая последовательность ДНК в гормоночувствительном гене действует независимо (разд. 12.2.1). С повышением концентрации гормона пропорционально возрастает концентрация гормон-рецепторных комплексов, а значит, и число этих комплексов, присоединившихся к специфическим участкам генома. Клеточный ответ в этом случае будет градуальным и линейным.

Однако другие реакции клеток на увеличение концентрации сигнальных молекул могут начинаться более резко, а некоторые - даже практически по типу «всё или ничего». В последнем случае не наблюдается никакого ответа до тех пор, пока концентрация лиганда не достигнет определенного порогового уровня, а после достижения этого уровня сразу развивается максимальная реакция. Например, некоторые факторы роста действуют как сигналы типа «всё или ничего», заставляя клетку приступить к репликации ДНК, предшествующей клеточному делению. Каковы могут быть молекулярные основы такого резкого или даже внезапного ответа на плавно изменяющийся сигнал?

Один из возможных механизмов основан на принципе *кооперативности,* когда для активации какой-то макромолекулы-мишени необходимо присоединение к ней двух или нескольких внутриклеточных эффекторов (или их комплексов с рецептором). Например, при некоторых реакциях на стероидные гормоны для активации надлежащего гена, по-видимому, требуется одновременное связывание со специфическим участком хроматина нескольких гормон-рецепторных комплексов. В результате при увеличении концентрации гормона ген активируется более резко, чем если бы для его активации было достаточно одного такого комплекса



Рис. 12-35. Наблюдаемый ответ клеток куриного яйцевода на стероидный гормон эстрадиол. Активированные рецепторы эстрадиола переходят в ядро и включают транскрипцию нескольких генов. Показана зависимость реакции от доли активированных рецепторов для двух из этих генов, кодирующих белки яйца - *кональбумин* и овал*ьбумин.* Линейная зависимость для кональбумина указывает на то, что ген этого белка включается одной молекулой активированного рецептора. Напротив, замедленное начало синтеза овальбумина с последующим крутым подъемом кривой означает, что для запуска транскрипции овальбуминового гена, вероятно, необходимо присоединение к нему более одной молекулы активированного рецептора (в данном случае двух молекул). (Из E. R. Mulvihill, R. D. Palmiter, J. Biol. Chem. 252: 2060-2068, 1977, с изменениями.)

(рис. 12-35). Аналогичный механизм кооперативности действует при активации с участием А-киназы и кальмодулина; поскольку кальмодулин принимает активирующую конформацию только тогда, когда он свяжет два или больше ионов Ca^{2+} (см. рис. 12-30), повышение внутриклеточной концентрации этих ионов всего лишь в 10 раз вызывает уже 50-кратное усиление активации. Такие кооперативные реакции становятся тем более резкими, чем больше молекул-эффекторов нужно для активации молекулы-мишени, и если их число становится достаточно большим, то дело может дойти до реакции типа «всё или ничего» (рис. 12-36 и 12-37).

Ответы становятся намного более резкими и в том случае, если лиганд активирует один фермент и одновременно подавляет активность другого, катализирующего обратную реакцию. Мы уже рассмотрели один пример такого регуляторного принципа, когда говорили о стимуляции распада гликогена в мышечных клетках, где повышение уровня cAMP одновременно активирует киназу фосфорилазы и ингибирует фосфопротеинфосфатазу, действующую в противоположном направлении (разд. 12.4.1, 12.4.2).

Другая возможная причина реакции типа «всё или ничего» на постепенное повышение концентрации сигнального лиганда - механизм положительной обратной связи. С помощью этого механизма нервные и мышечные клетки генерируют по принципу «всё или ничего» *потенциалы действия* при связывании нейромедиаторов. Например, при активации ацетилхолиновых рецепторов нервно-мышечного соединения в плазматической мембране мышечной клетки открываются каналы для катионов, и переходящие внутрь клетки ионы Na^+ вызывают местную деполяризацию мембраны. Если эта деполяризация достигает определенного порогового уровня, в том же участке мембраны открываются потенциалзависимые натриевые каналы, что приводит к дальнейшему притоку натрия; в результате деполяризация усиливается, это приводит к открытию еще большего числа натриевых каналов и т. д. Так возникает потенциал действия, который распространяется по всей мембране мышечной клетки.

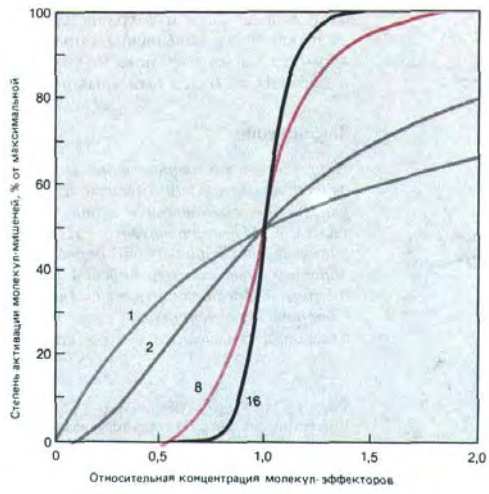


Рис. 12-36. Как видно из этого графика, кривые с крутым подъемом типа «всё или ничего» получаются в тех случаях, когда для активации макромолекулы-мишени необходимо присоединение к ней нескольких молекул-эффекторов. Приведены теоретические кривые для случаев активации при одновременном связывании различного числа (1, 2, 8 и 16) эффекторных молекул.

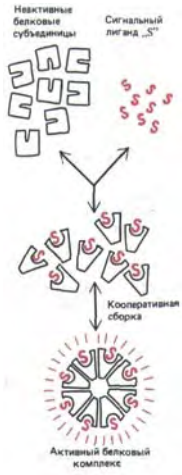


Рис. 12-37. Схема одного из возможных сигнальных механизмов, при котором следует ожидать реакции с резким порогом. В данном примере для образования активного белкового комплекса необходимо одновременное связывание восьми молекул сигнального лиганда. При низких концентрациях лиганда число активных комплексов будет возрастать пропорционально примерно восьмой степени концентрации.

Такой механизм положительной обратной связи может регулировать работу не только ионных каналов, но и рецепторов, действующих как ферменты. Представим себе, что некий сигнальный лиганд активирует фермент и что две или больше молекул продукта ферментативной реакции вновь связываются с тем же ферментом и еще больше активируют его (рис. 12-38). Количество продукта такого фермента будет расти очень медленно, пока концентрация активирующего лиганда не достигнет пороговой величины, при которой накопится достаточно продукта, чтобы вызвать самоускоряющуюся активацию фермента. В этот момент концентрация продукта начнет резко возрастать. Благодаря такому механизму клетка может отвечать на постепенное изменение концентрации сигнального лиганда скачкообразным изменением количества определенного метаболита.

Механизм, проиллюстрированный на рис. 12-38, в принципе относительно прост, но он имеет важную особенность, которая делает его непригодным для одних целей и чрезвычайно ценным для других, Если такая система была «включена» в результате достаточного повышения концентрации сигнального лиганда, то она, как правило, продолжает находиться в этом состоянии даже тогда, когда сигнал падает ниже порогового уровня: вместо того чтобы все время отражать текущую величину сигнала, система обнаруживает своего рода «память». В качестве примера можно привести Ca^{2+}/кальмодулин-регулируемую полифункциональную протеинкиназу (разд. 12.4.3), которая, видимо, работает как активируемый ионами Ca^{2+} молекулярный переключатель. При активации комплексами Ca^{2+}/кальмодулин эта киназа помимо других клеточных белков фосфорилирует также и сама себя. В результате такого самофосфорилирования ее активность становится независимой от ионов кальция и сохраняется на повышенном уровне дольше, чем вызвавший это повышение кальцевый сигнал. Такое состояние поддерживается до тех пор, пока не возрастет активность клеточных фосфатаз и фермент не будет ими «выключен».

Заключение

Непрерывное и быстрое удаление из клетки свободных ионов Ca^{2+} и cAMP делает возможными быстрые изменения концентраций этих двух внутриклеточных медиаторов в ответ на внеклеточные сигналы. Повышение уровня cAMP активирует cAMP-зависимые протеинкиназы (А-киназы), которые фосфорилируют определенные белки-мишени. Этот эффект обратим, так как при падении уровня cAMP фосфорилированные белки быстро дефосфорилируются. Аналогичным образом, повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция влияет на клетки благодаря связыванию Ca^{2+} с кальмодулином, который при этом изме-



Рис. 12-38. Схема механизма с «ускоряющей положительной обратной связью». Начальное связывание сигнального лиганда активирует фермент, а затем продукт ферментативной реакции связывается с самим ферментом, еще больше повышая его активность.

няет свою конформацию; комплекс Ca^{2+}/кальмодулин активирует много различных белков-мишеней, в том числе Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (Ca^{2+} -киназы). Клетки каждого типа имеют свой характерный набор таких белков-мишеней, поэтому изменение уровня cAMP и Ca^{2+} вызывает в клетках разного типа различные, характерные для каждого типа реакции. Использование с AMP и Ca^{2+} в качестве вторичных посредников позволяет во много раз усиливать реакцию на внеклеточный сигнал и регулировать ее разнообразными способами.

12.5. Адаптация клеток-мишеней

Реагируя на стимулы почти любого типа, клетки и целые организмы обычно могут воспринимать одинаковое относительное изменение внешнего сигнала в широком диапазоне его абсолютных величин. На клеточном уровне для этого необходимо, чтобы клетки-мишени, длительно подвергающиеся воздействию какого-то стимула, теряли способность реагировать на него с первоначальной чувствительностью. Это явление, называемое **адаптацией** или **десенситизацией** (десенсибилизацией), позволяет клеткам регулировать свою чувствительность к данному стимулу. В случае химических сигналов десенситизация дает клеткам возможность воспринимать именно *изменения* в концентрации сигнального лиганда (а не его абсолютную концентрацию).

Десенситизация к химическим сигналам достигается разными способами. Иногда она бывает результатом уменьшения числа поверхностных рецепторов или же их инактивации; в других случаях это следствие изменения белков, участвующих в передаче сигнала уже после активации рецептора.

12-28

12.5.1. Некоторые формы десенситизации - результат эндоцитоза поверхностных рецепторов [31]

Белковые гормоны и факторы роста, присоединившиеся к поверхностным рецепторам клеток-мишеней, нередко захватываются клеткой путем эндоцитоза, опосредованного рецептором (разд. 6.5.7). Эндоцитозные пузырьки (эндосомы) впоследствии переносят свое содержимое в лизосомы, где лиганды, а иногда и их рецепторы подвергаются расщеплению гидролитическими ферментами. Этот процесс не только представляет собой важный путь разрушения некоторых сигнальных лигандов, но может играть существенную роль и в регулировании концентрации определенных рецепторных белков на поверхности клеток-мишеней. Хотя распад рецепторов и замена их новыми происходит непрерывно, в отсутствие лиганда время полужизни рецептора составляет около суток. Некоторые лиганды заметно повышают скорость расщепления рецепторов, вызывая эндоцитоз: например, у фибробластов человека, растущих в культуре без EGF, время полужизни рецепторов EGF около 10 ч, а при добавлении избытка EGF рецепторы расщепляются со временем полужизни 1 ч. При высоких концентрациях таких лигандов число поверхностных рецепторов постепенно уменьшается; в результате снижается и чувствительность клетки к данному лиганду.

Большинство типов эндоцитируемых рецепторов, однако, «не доходят» до лизосом: они освобождаются в эндосомах от своих лигандов и затем возвращаются в плазматическую мембрану для дальнейшего использования (разд. 6.5.10). Но и в этом случае при повышении концентрации лиганда большая доля циркулирующих таким образом

рецепторов оказывается внутри клетки и становится недосягаемой для внеклеточного лиганда. Эту форму десенситизации называют *секвестрацией рецепторов.*

12-29
12-30

12.5.2. Десенситизация часто бывает связана с фосфорилированием рецепторов [32]

Для десенситизации многих рецепторов клеточной поверхности используется их обратимое фосфорилирование. Как уже говорилось ранее, эндоцитоз некоторых каталитических рецепторов (т.е. их удаление с поверхности или разрушение) зависит от их самофосфорилирования по тирозиновым остаткам (разд. 12.3.14). Другой пример - десенситизация эритроцитов лягушки при длительном воздействии адреналина. Их β-адренэргические рецепторы постепенно модифицируются так, что через несколько часов они уже не способны активировать аденилатциклазу; инактивированные рецепторы удаляются с поверхности, по-видимому в эндосомы. Эта модификация состоит в фосфорилировании нескольких остатков серина в рецепторном белке (см. рис. 12-24), и ее осуществляет специальная протеинкиназа, которая может фосфорилировать только активированную форму рецептора. Судя по некоторым данным, фосфорилирование косвенно выключает функцию β -рецепторов, позволяя им связываться с ингибиторным белком, что делает их неспособными активировать C_S-белки. Родопсин, структурно родственный β-адренэргическим рецепторам (разд. 12.3.12), инактивируется после фотоактивации с помощью сходного механизма: специфическая родопсинкиназа фосфорилирует его активированные молекулы, позволяя им связаться с ингибиторным белком *аррестином,* который не дает им возможности активировать G-белок трансдуцин. Это, однако, лишь один из механизмов, используемый фоторецепторами для адаптации к свету (разд. 19.6.8).

12.5.3. Некоторые формы десенситизации связаны с изменениями не в рецепторах, а в G-белках [33]

Хотя большинство известных механизмов десенситизации обусловлено модификацией рецепторов, в принципе десенситизация может быть следствием изменений в любом из компонентов сигнального пути, Показано, что в некоторых случаях она связана с изменениями в G-белке. Например, если культуру фибробластов инкубировать с простагландином PGE_1, который в норме активирует аденилатциклазу через G_S-белок, клетки вскоре станут нечувствительными не только к PGE_1, но и к другим лигандам, рецепторы которых действуют через G_S-аденилат - циклазный путь (это называется *гетерологичной* десенситизацией в отличие от *гомологичной,* при которой рецепторы эндоцитируются или инактивируются, так что клетки теряют чувствительность только к одному лиганду - тому, который связывается с этими рецепторами). Когда G_S-белки из десенситизированных фибробластов добавляли к мембранам мутантных клеток, лишенных собственного C_8-белка, они оказывались неэффективными (по сравнению с нормальными G_S-белками) активаторами аденилатциклазы. Природа изменений в G_S-белке у десенситизированных к PGE_1 фибробластов еще не известна, но если и здесь причиной окажется фосфорилирование, это не вызовет удивления.

Изменения в G-белках позволили бы также объяснить некоторые аспекты наркомании. У морфинистов клетки-мишени в мозгу десенситизированы к морфину (рис. 12-39), поэтому для достижения того же

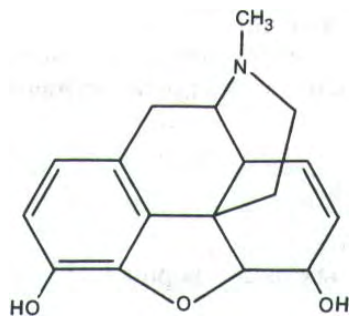


Рис. 12-39. Структура морфина, получаемого из маковых зерен. Почему некоторые из наших клеток имеют рецепторы для препаратов, подобных морфину? Фармакологи давно предполагали, что морфин имитирует какие-то эндогенные сигнальные молекулы, регулирующие восприятие боли и настроение. В 1975 г. из мозга свиньи были выделены два пептида с морфиноподобным действием, названные **энкефалинамн.** Вскоре из гипофиза и других тканей удалось выделить более длинные пептиды, получившие название **эндорфинов.** Все эти так называемые *эндогенные опиаты* содержат общую последовательность из 4 аминокислот и связываются с теми же поверхностными рецепторами, что и морфин (и родственные наркотики). Однако в отличие от морфина они быстро разрушаются в организме и поэтому не накапливаются в количествах, достаточных для развития привыкания, наблюдаемого у морфинистов.

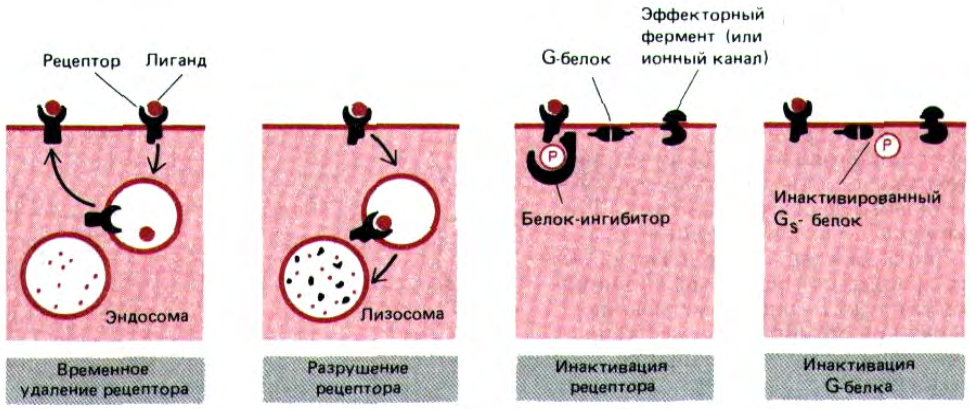


Рис. 12-40. Четыре возможных способа десенситизации клеток-мишеней при длительном воздействии сигнальной молекулы. Изображен рецептор, в норме активирующий или ингибирующий эффекторный фермент (или ионный канал) через G-белок. Хотя механизмы инактивации, показанные здесь для рецептора и для G-белка, включают фосфорилирование, возможны и другие виды модификаций (они описаны при обсуждении бактериального хемотаксиса, разд. 12.5.4). Кроме того, в инактивации рецептора путем фосфорилирования не всегда участвует белок-ингибитор.

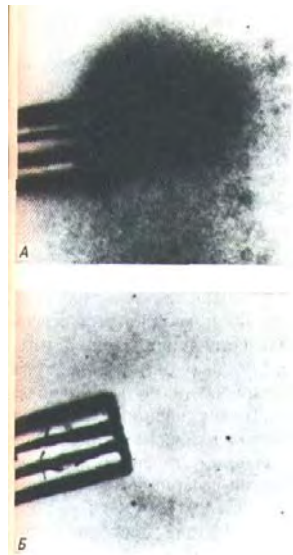


Рис. 12-41. Фотографии бактерий *Salmonella typhimurium,* собирающихся у кончика стеклянного капилляра с аминокислотой серином *(А)* и избегающих капилляра с фенолом (Б). Снимки сделаны через 5 мин после внесения капилляров в чашки с бактериями. Такой тест-простой способ демонстрации хемотаксиса. (B. A. Rubik, D.E. Koshland, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2820-2824, 1978.)

эффекта обезболивания или эйфории требуется значительно большая доза наркотика, чем нормальным людям. Десенситизированные клетки, однако, имеют нормальный уровень функциональных поверхностных рецепторов морфина (опиатных рецепторов). Механизм десенситизации изучали с помощью морфин-чувствительных линий нервных клеток. Морфиновые рецепторы на поверхности этих клеток вызывают активацию G_i-белков (разд. 12.3.6), которые ингибируют аденилатциклазу и снижают таким образом уровень **cAMP.** Клетки, культивируемые в присутствии постоянных концентраций морфина, десенситизируются, так что аденилатциклазная активность и уровень внутриклеточного cAMP у них возвращаются к норме, хотя морфин по-прежнему связывается поверхностными рецепторами. Если теперь удалить морфин из культуральной среды, произойдет заметное повышение активности аденилатциклазы и концентрация cAMP внутри клетки необычно возрастет. Возможно, именно избыток cAMP вызывает те крайне неприятные симптомы, которые возникают при резком прекращении употребления наркотика (беспокойство, потливость, дрожь и т.д.). Действительные механизмы привыкания к морфину достоверно не известны, но предполагают, что они связаны с изменениями G_i-белков.

Различные механизмы десенсибилизации клеток-мишеней, которые мы рассмотрели, суммированы на рис. 12-40.

12.5.4. Адаптация играет центральную роль в бактериальном хемотаксисе [34]

Многие виды химической сигнализации между клетками многоклеточных животных могли возникнуть из тех приспособлений, с помощью которых одноклеточные организмы реагируют на химические изменения в окружающей среде. В самом деле, как уже говорилось, некоторые внутриклеточные посредники используются организмами того и другого типа. К наиболее изученным реакциям одноклеточных на внешние сигналы относятся явления хемотаксиса, при которых движение клетки направляется к источнику определенного вещества или от него. Хемотаксис эукариотических клеток рассмотрен в разд. 14.3.2 на примере клеточной стадии слизевика *Dictyostelium discoideum* и в разд. 11.6.4 на примере нейтрофилов человека. Мы закончим эту главу описанием бактериального хемотаксиса, который в основном благодаря успехам генетического анализа - особенно четко и элегантно иллюстрирует центральную роль адаптации в ответах на химические сигналы.

Подвижные бактерии плывут в сторону более высоких концентраций питательных субстратов *(аттрактантов),* например Сахаров и аминокислот, и «убегают» от высоких концентраций вредных веществ *(репеллентов)* (рис. 12-41). Это сравнительно простое, но весьма целесообраз-

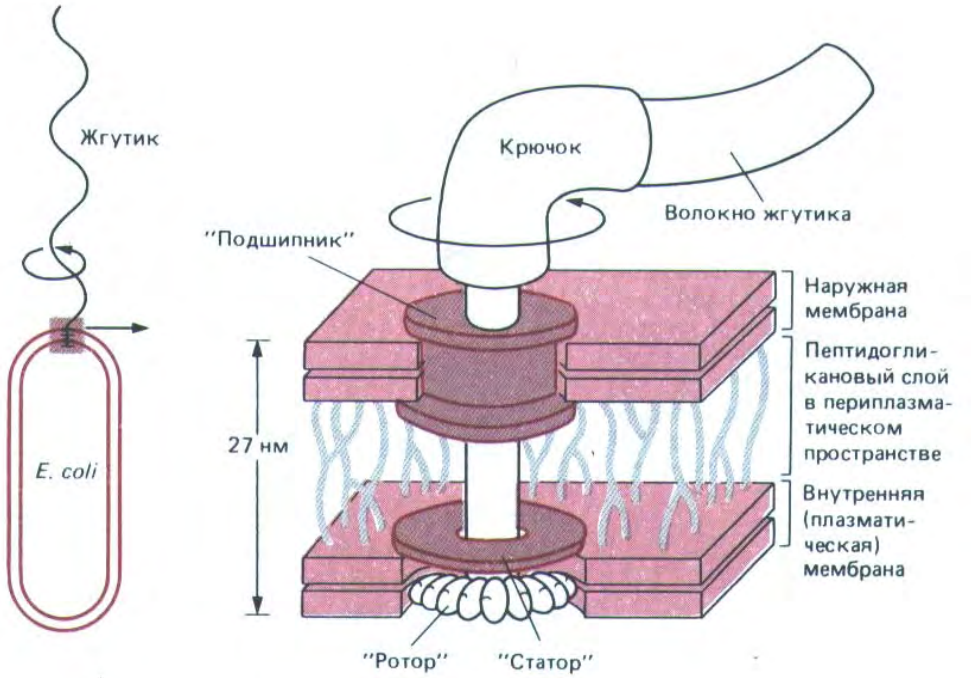


Рис. 12-42. Схема «мотора», вращающего жгутик *E. coli.* «Ротором» служит белковый диск, расположенный в плазматической мембране. Под действием трансмембранного протонного градиента он быстро вращается (около 100 об/с) в липидном бислое относительно другого белкового диска («статора»). «Ротор» расположен на одной оси с крючком и жгутиком и заставляет их вращаться. Белковый «подшипник» служит для герметизации наружной мембраны в месте прохождения через нее вращающегося стержня. На рисунке неподвижные детали окрашены, а вращающиеся оставлены белыми (По M. L. de Pamphilis, J. Adler, J. Bacteriol. 105: 384-395; 396-407, 1971, с изменениями.)

ное поведение - хемотаксис - наиболее интенсивно изучалось на бактериях *E.coli* и *Salmonella typhimurium.* Мы будем говорить здесь в основном о хемотаксисе по направлению к аттрактантам; движение прочь от репеллентов обеспечивается теми же механизмами, но действующими «наоборот».

Бактерии плавают с помощью жгутиков, устроенных значительно проще, чем жгутики эукариотических клеток (разд. 11.3.2). Бактериальный жгутик - это спиральная трубочка из одинаковых субъединиц белка *флагеллина.* Основание каждого жгутика прикреплено с помощью короткого гибкого крючка к маленькому белковому диску, погруженному в бактериальную мембрану. Этот диск составляет часть микроскопического «мотора», который приводит в быстрое вращение спиральный жгутик, используя энергию трансмембранного протонного градиента (рис. 12-42).

Поскольку жгутики на поверхности бактерии закручены в спираль в одну определенную сторону, направление их вращения не безразлично для движения. Вращение против часовой стрелки позволяет всем жгутикам собраться в общий пучок, так что бактерия равномерно плывет в одном направлении. Но при вращении по часовой стрелке пучок рассыпается на отдельные жгутики и бактерия начинает беспорядочно кувыркаться на месте (рис. 12-43). В отсутствие внешних стимулов вращение дисков изменяется на противоположное каждые несколько секунд, что приводит к характерной картине: прямолинейное движение прерывается резкими изменениями направления в периоды кувыркания (рис. 12-44, *А*\

Аттрактанты и репелленты видоизменяют обычное движение бактерий. Они присоединяются к специфическим белковым рецепторам и влияют на частоту кувырканий, увеличивая или уменьшая интервал между двумя последовательными сменами направления, в котором вращаются жгутики. Когда бактерии плывут в сторону большей концентрации аттрактанта, они кувыркаются реже, чем тогда, когда плывут в противоположную сторону (или когда вообще нет градиента). Поскольку периоды прямолинейного движения длиннее при перемещении «вверх» по градиенту концентрации, бактерии будут постепенно приближаться к источнику аттрактанта (рис. 12-44, £). И наоборот, встретив возрастающую концентрацию репеллента, бактерии будут кувыркаться чаще обычного и в результате постепенно удаляться от его источника.

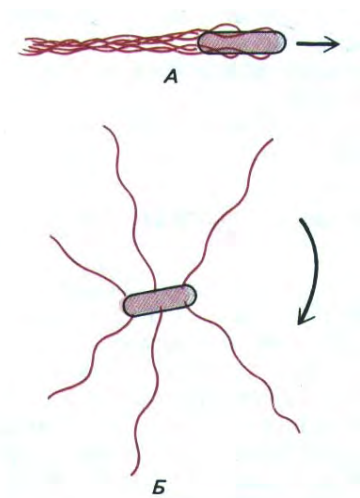


Рис. 12-43. Схема расположения жгутиков *E. coli* при движении клетки. Если жгутики вращаются против часовой стрелки *(А),* то они собираются в единый пучок, который действует как пропеллер и обеспечивает прямолинейное движение. При вращении жгутика по часовой стрелке (Б) пучок рассыпается, и бактерия начинает кувыркаться.

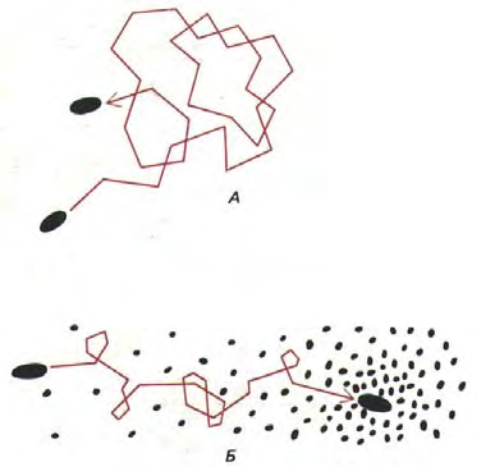


Рис. 12-44. Траектории плывущих бактерий. В отсутствие хемотаксического сигнала *(А)* периоды прямолинейного движения прерываются короткими периодами кувыркания, которые случайным образом изменяют направление движения. В присутствии аттрактанта (Б) кувыркание частично подавляется, когда бактерия случайно движется в сторону большей его концентрации. Это ведет к постепенному приближению бактерии к источнику аттрактанта.

В естественных условиях бактерии улавливают пространственные градиенты различных веществ, замечая изменения их концентрации *во времени* при своем равномерном передвижении с места на место (из-за малых собственных размеров бактериям было бы чрезвычайно трудно выявлять пространственные градиенты путем сравнения концентраций на разных концах клетки). В лабораторных условиях изменения концентраций во времени можно моделировать быстрым добавлением или удалением какого-либо вещества. Если добавить в культуральную среду аттрактант, кувыркание, как и следовало ожидать, быстро (за десятые доли секунды) подавляется, однако через некоторое время, несмотря на присутствие аттрактанта, частота кувыркания возвращается к норме. Бактерии остаются в этом адаптированном состоянии до тех пор, пока концентрация аттрактанта не изменится снова: добавление аттрактанта быстро подавляет кувыркания, а его удаление - усиливает, пока бактерия не приспособится к новому уровню. Адаптация играет в хемотаксисе важнейшую роль, так как позволяет бактериям реагировать не на постоянную абсолютную величину, а на *изменение* концентрации аттрактанта и продолжать движение, когда оно происходит в нужном направлении.

12-31

12.5.5. В бактериальном хемотаксисе участвуют четыре гомологичных трансмембранных рецептора [35]

Раскрытие молекулярных механизмов бактериального хемотаксиса стало возможным в основном благодаря выделению и анализу мутантов с различными нарушениями этого процесса. Таким путем было показано, что хемотаксические реакции на ряд веществ зависят от небольшого семейства близко родственных трансмембранных белков-рецепторов, ответственных за передачу сигналов через плазматическую мембрану. Эти хемотаксические рецепторы метилируются во время адаптации (см. ниже), и поэтому их часто называют *метил-акцептирующими белками хемотаксиса* (рис. 12-45).

В плазматической мембране есть четыре типа рецепторов хемотаксиса и каждый из них обусловливает ответ на узкую группу химических

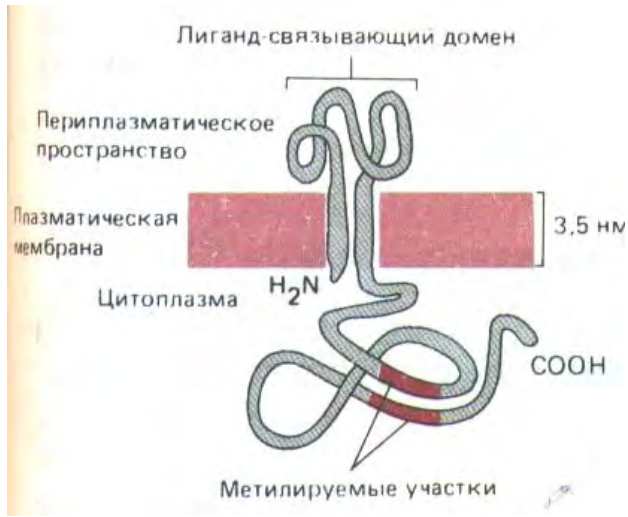


Рис. 12-45. Структура хемотаксического рецептора. Два участка полипептидной цепи, подвергающиеся метилированию, содержат весьма консервативную последовательность из 13 аминокислот.
Этот рисунок отражает структуру рецептора для аспартата, однако сходное строение имеют хемотаксические рецепторы всех четырех типов. (По A. F. Russo, D. E. Koshland, Jr., Science 220: 1016-1020, 1983. Copyright 1983 by the A A AS.)

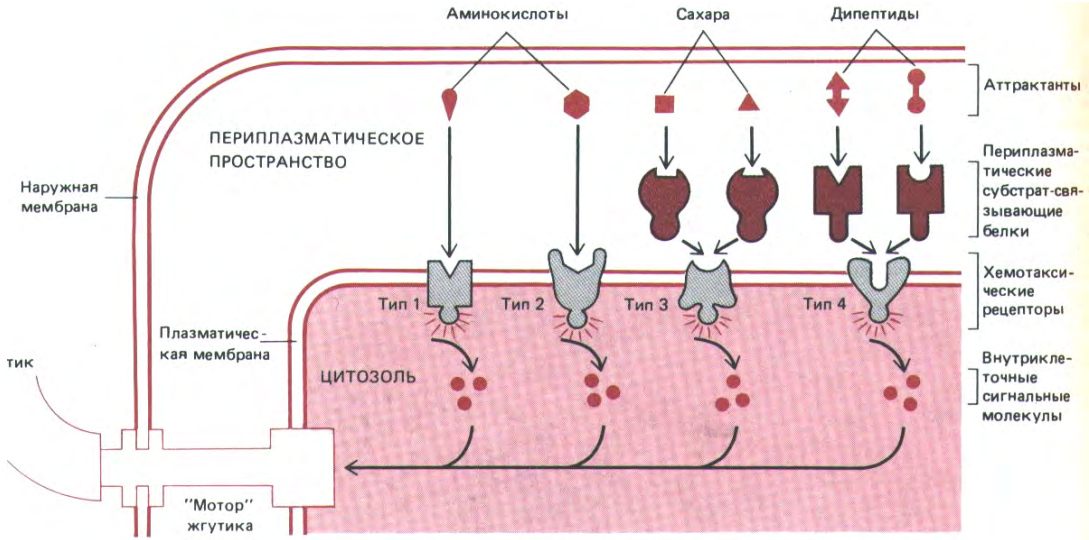


Рис. 12-46. Этапы преобразования сигнала при хемотаксисе у бактерий. Химические аттрактанты связываются с хемотаксическими рецепторами типа 1 или 2 в плазматической мембране или с периплазматическими субстрат-связывающими белками, которые затем присоединяются к хемотаксическим рецепторам типа 3 или 4. Это приводит к активации рецепторов, и они передают внутрь клетки сигнал, заставляющий «мотор» жгутика вращаться против часовой стрелки; в результате кувыркание подавляется и периоды прямолинейного движения становятся более длительными. Аттрактанты проникают в периплазматическое пространство снаружи через широкие каналы во внешней мембране (не показано).

соединений. Два опосредуют реакцию на серии и на аспартат соответственно, прямо связывая эти аминокислоты и преобразуя это событие во внутриклеточный сигнал. Два других передают ответ на сахара и дипептиды, но они активируются косвенно через *периплазматические субстрат-связывающие белки,* которые участвуют также в транспорте Сахаров и дипептидов через плазматическую мембрану (разд. 6.4.13). Эти белки, «плавающие» в периплазматическом пространстве (между внешней мембраной бактерии и плазматической мембраной), специфически связывают сахара и дипептиды и затем образуют комплексы с подходящими рецепторами хемотаксиса в плазматической мембране, активируя их (рис. 12-46). Хотя в системах транспорта этих Сахаров и дипептидов и в соответствующих системах хемотаксиса используются одни и те же первичные рецепторы (субстрат-связывающие белки), в остальном их механизмы различны. На это указывают мутации, инактивирующие транспорт, но не влияющие на хемотаксис, и наоборот.

12.5.6. Адаптация обусловлена метилированием белков [35]

Имеются убедительные данные в пользу того, что адаптацию при хемотаксисе бактерий обеспечивает ковалентное присоединение метальной группы к белковым рецепторам хемотаксиса. Если метилирование блокировано мутацией, адаптации не происходит, и тогда присутствие аттрактанта подавляет кувыркание в течение нескольких дней, а не минут. Таким образом, активация рецепторов хемотаксиса имеет два различных (и раздельных) следствия: 1) быстро развивается возбуждение, так как активированный рецептор создает внутриклеточный сигнал, заставляющий мотор жгутика продолжать вращение против часовой стрелки, и в результате клетка продвигается вперед без кувырканий; 2) происходит медленная адаптация, обусловленная тем, что активированный рецептор становится доступным для метилирования цитоплазмати-ческими ферментами, и за несколько минут его активация сходит на нет (рис. 12-47).

Метилирование рецептора катализируется растворимым ферментом *(метилтрансферазой),* который переносит метильную группу на свободный карбоксил остатка глутаминовой кислоты в активированном рецеп-

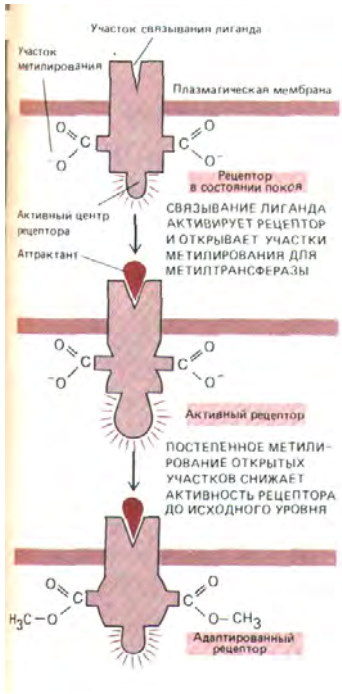


Рис. 12-47. Последовательные процессы активации и адаптации (в результате метилирования) хемотаксического рецептора. Обратите внимание, что активность рецептора (а значит, и частота кувырканий бактерии) в исходном и в адаптированном состоянии одинакова. Для простоты рецептор показан с двумя участками метилирования, в действительности же у каждого рецептора их четыре. При повышении концентрации лиганда доля времени, когда рецептор занят лигандом, увеличивается. Более высокая концентрация лиганда вызывает большее конформационное изменение рецептора, чем низкая, и приближает его состояние к предельно измененному. Однако медленное усиление метилирования через несколько минут восстанавливает исходную конформацию, причем большей концентрации аттрактанта соответствует большее число метильных групп на рецепторе. Рецептор теперь адаптирован. Хотя на схеме показано прямое присоединение лиганда к рецептору, в некоторых случаях он сначала присоединяется к периплазматическому субстрат-связывающему белку, который затем взаимодействует с рецептором.

торе (рис. 12-48). На один рецептор может быть перенесено до четырех метильных групп; степень метилирования повышается с ростом концентрации аттрактанта, когда каждый рецептор в течение большей доли всего времени находится в комплексе с лигандом. При удалении аттрактанта рецептор деметилируется растворимым ферментом (рис. 12-48). Хотя уровень метилирования во время хемотаксических реакций изменяется, у адаптированных бактерий он остается постоянным, так как при этом достигается точное равновесие между скоростями метилирования и деметилирования.

12.5.7. Активация рецептора и изменения во вращении жгутиков сопряжены через каскад фосфорилирования белков [36]

Активация рецептора хемотаксиса аттрактантами и репеллентами должна создавать внутриклеточный сигнал, влияющий на направление вращения жгутика. Генетические исследования показали, что в передаче этого сигнала участвуют четыре цитоплазматических белка - CheA, CheW, CheY я CheZ. CheY и CheZ действуют в конце зффекторного пути и контролируют направление вращения жгутика, видимо, связываясь с его «мотором». CheY дает сигнал вращаться по часовой стрелке, и бактерия начинает кувыркаться. Мутанты, у которых функциональный CheY утрачен, плавают совсем без кувыркания. CheZ оказывает действие, противоположное CheY, заставляя «мотор» вращаться против часовой стрелки, что ведет к прямолинейному движению клеток. Белки CheA и, возможно, CheW передают сигнал от рецептора хемотаксиса белкам CheY и CheZ с помощью механизма, включающего фосфорилирование и дефосфорилирование белков.

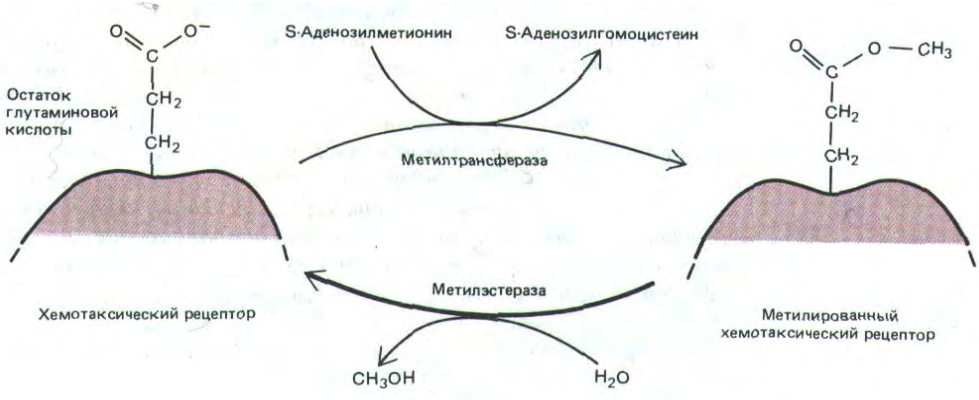


Рис. 12-48. Реакции метилирования и деметилирования белковых хемотаксических рецепторов. С помощью эфирных связей к каждому рецептору может присоединиться до четырех метильных групп.

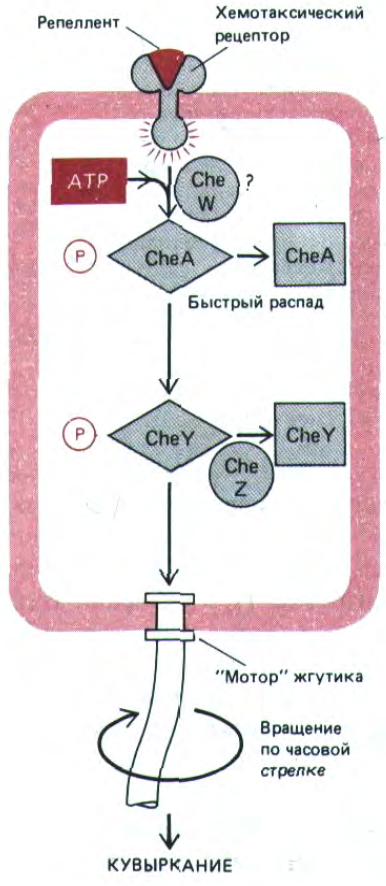


Рис. 12-49. Система фосфорилирования, с помощью которой, как полагают, хемотаксические рецепторы способны контролировать «мотор» жгутика. Связывание репеллента активирует рецептор, что приводит к кратковременному фосфорилированию CheA. CheA быстро переносит свой ковалентне связанный высокоэнергетический фосфат прямо на CheY. CheY-фосфат связывается с «мотором» жгутика и заставляет его вращаться по часовой стрелке, вызывая кувыркание. Связывание аттрактанта дает противоположный эффект, снижая фосфорилирование CheA и CheY, и вращение жгутика против часовой стрелки приводит к прямолинейному движению. CheZ ускоряет дефосфорилирование CheY-фосфата, действуя как антагонист CheY. Каждый из этих фосфорилированных интермедиатов живет около 10 с, что позволяет бактерии быстро реагировать на изменение среды (см. рис. 12-34). Как хемотаксический рецептор взаимодействует с CheA и какую роль в процессе играет CheW, пока не известно.

Опыты in vitro с очищенными белками показали, что CheA-это протеинкиназа, которая в присутствии ATP фосфорилирует сама себя, а затем быстро переносит фосфатную группу на CheY. Фосфорилирован-ный CheY дефосфорилируется с участием CheZ, который, как уже говорилось, является антагонистом CheY in vivo. По-видимому, CheY активируется (и вызывает кувыркание), будучи фосфорилирован киназой CheA, а инактивируется (что позволяет бактерии плыть прямо), когда его дефосфорилирует CheZ. Как полагают, при связывании хемотаксическими рецепторами аттрактанта фосфорилирование CheA и CheY снижается, CheY инактивируется и бактерия меньше кувыркается и дольше плывет по прямой линии; репелленты же, напротив, активируют CheA-зависимое фосфорилирование CheY, что приводит к активации CheY и стимулирует кувыркание (рис. 12-49).

Этот же набор белков осуществляет адаптацию. CheA фосфорилирует фермент, деметилирующий рецепторы хемотаксиса (см. рис. 12-48), повышая его активность и обеспечивая тем самым регуляцию хемотаксических рецепторов по принципу обратной связи.

По-видимому, все гены и белки, участвующие в бактериальном хемотаксисе, уже идентифицированы, а большинство белков секвенировано и выделено в больших количествах. Похоже, что мы быстро приближаемся к выяснению практически полной молекулярной картины этой формы адаптивного поведения.

Заключение

Временно и обратимо адаптируясь к высоким концентрациям сигнального лиганда, клетки могут регулировать свою чувствительность к величине стимула, отвечая, таким образом, на изменение концентрации лиганда, а не на ее абсолютную величину. Адаптация достигается разными способами: 1) связанный лиганд может вызывать переход рецепторов внутрь клетки, где они некоторое время остаются в «скрытом» состоянии или же разрушаются в лизосомах; 2) активированные рецепторы могут обратимо инактивироваться путем фосфорилирования или метилирования; 3) нерецепторные белки сигнального пути (типа G-белков) тоже могут обратимо инактивироваться с помощью неясных пока механизмов. Пример адаптации, лучше всего изученный на молекулярном уровне, - это бактериальный хемотаксис: обратимое метилирование ключевого мембранного белка в цепи передачи сигнала позволяет клеткам передвигаться в оптимальном направлении.

Литература

Цитированная

1. *Smith E.L. et al.* Principles of Biochemistry: Mammalian Biochemistry, 7th ed, pp. 355 619. New York, McGraw-Hill, 1983.
   Snyder S. H. The molecular basis of communication between cells. Sci. Am., 253 (4), 132-140, 1985.
2. *Norman A. W., Litwack G.* Hormones. San Diego, CA, Academic, 1987.
   Wilson J. D., Foster D. W. Williams' Textbook of Endocrinology, 7th ed. Philadelphia, Saunders, 1985.
3. *Simpson I. A., Cushman S. W.* Hormonal regulation of mammalian glucose transport. Annu. Rev. Biochem., 55, 1059-1089, 1986.
4. *Beer D. J., Matloff S. M., Rocklin R. E.* The influence of histamine in immune and inflammatory responses. Adv. Immunol., 35, 209-268, 1984.
   Gospodarowicz D., Cheng J., Lui G. M., Baird A., Bohlen P. Isolation of brain fibroblast growth factor by heparin sepharose affinity chromatography: identity with pituitary fibroblast growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6963-6967, 1984.
5. *Smith W. L., Borgeat P.* The eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and hydroxyeicosaenoic acids. In: Biochemistry of Lipids and Membranes (D. E. Vance, J. E. Vance, eds.), pp. 325-360. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1985.
6. *Evans R. M.* The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. Science, 240, 889-895, 1988.
   Gehring U. Steroid hormone receptors: biochemistry, genetics, and molecular biology. Trends Biochem. Sci., 12, 399-402, 1987.
   Ivarie R. D., O'Farrell P. H. The glucocorticoid domain: steroid-mediated changes in the rate of synthesis of rat hepatoma proteins. Cell, 13, 41-55, 1978.
   Yamamoto K. R. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and genenetworks. Annu. Rev. Genet., 19, 209-252, 1985.
7. *Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., Richards G.* Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 38, 655-662, 1974.
8. *Attardi B., Ohno S.* Physical properties of androgen receptors in brain cytosol from normal and testicular feminized (Tfrn/y♂) mice. Endocrinology, 103, 760-770, 1978.
9. *Berridge M.* The molecular basis of communication within the cell. Sci. Am., 253 (4), 142-152, 1985.
   Kahn C. R. Membrane receptors for hormones and neurotransmitters. J. Cell Biol., 70, 261-286, 1976.
   Levitski A. Receptors: A Quantitative Approach. Menlo Park, Ca. Benjamin-Cummings, 1984.
   Rees Smith B., Buckland P. R. Structure-function relations of the thyrotroprin receptor. In: Receptors, Antibodies and Disease. Ciba Foundation Symposium 90 (D. Evered, J. Whelan, eds.), pp. 114-132. London, Pitman, 1982.
   Snyder S. H. The molecular basis of communication between cells. Sci. Am., 253 (4), 132-140, 1985.
10. *Pastan I.* Cyclic AMP. Sci. Am., 227(2), 97-105, 1972.
    Sutherland E. W. Studies on the mechanism of hormone action. Science, 177, 401-408, 1972.
11. *Schramm M., Selinger Z.* Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system. Science, 225, 1350-1356, 1984.
12. *Casperson G.F., Bourne H. R.* Biochemical and molecular genetic analysis of hormone-sensitive adenylate cyclase. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 27, 371-384, 1987.
    Feder D. et al. Resonstruction of $beta_1$-adrenoceptor-dependent adenylate cyclase from purified components. EMBO J. 5, 1509-1514, 1986.
    Rodbell M. The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. Nature, 284, 17-22, 1980.
13. *Oilman A.G. G* proteins and dual control of afenylate cyclase. Cell, 36, 577-579, 1984.
    Gilman A. G. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu. Rev.
    Biochem., 56, 615 649, 1987. *Lai C.-Y.* The chemistry and biology of cholera toxin. CRC Crit. Rev. Biochem., 9, 171-206, 1980.
    Levitzki A. From epinephrine to cyclic AMP. Science, 241, 800-806, 1988. *Stryer L., Bourne H. R.* G proteins: a family of signal transducers. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 391-419, 1986.
14. *Carafoli E.* Intracellular calcium homeostasis. Annu. Rev. Biochem., 56, 395-433, 1987.
    Carafoli E., Penninston J.T. The calcium signal. Sci. Am., 253(5), 70-78, 1985.

Evered D., Whelan J., eds. Calcium and the Cell. Ciba Foundation Symposium 122. Chichester, U.K., Wiley, 1986.
Volpe P. et al. "Calciosome", a cytoplasmic organelle: the inositol 1,4,5-trisphosphate-sensitive Ca^{2+} store of nonmuscle cells? Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 85, 1091-1095, 1988.
15. *Augustine G.J., Charlton M.P., Smith S.J.* Calcium action in synaptic transmitter release. Annu. Rev. Neurosci., 10, 633-639, 1987.
Heilbrunn L. V., Wiercenski F. J. The action of various cations on muscle protoplasm. J. Cell. Comp. Physiol., 29, 15-32, 1947.
16. *Berridge M.J.* Inositol lipids and calcium signalling. Pro. R. Soc. Lond. (Biol.), 234, 359-378, 1988.
Cockcroft S. Polyphosphoinositide phosphodiesterase: regulation by a novel guanine nucleotide binding protein, Gp. Trends Biochem. Sci., 12, 75-78, 1987.
Majerus P. W. et al. The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. Science, 234, 1519-1526, 1986.
Michell R. H., Putney J. W., eds. Inositol Lipids in Cellular Signaling. Current Communications in Molecular Biology. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory, 1987.
Sekar M. C., Hokin L. L. 1 he role of phosphoinositides in signal transduction. J. Membr. Biol., 89, 193-210, 1986.
Woods N. M., Cuthbertson K. S. R., Cobbold P. H. Repetitive transient rises incytoplasmatic free calcium in hormone-stimulated hepatocytes. Nature, 319, 600-602, 1986.
17. *Angel P. et al.* Phorbol ester-inducible genes contain a common *cis* element recognized by a TPA-modulated /raws-acting factor. Cell, 49, 729-739, 1987.
Bell R. M. Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. Cell, 45, 631-632, 1986.
Lee W., Mitchell P., Tijan R. Purified transcription factor AP-1 interacts with TPA-inducible enhancer elements. Cell, 49, 741-752, 1987.
Nishizuka Y. Studies and perspectives of protein kinase C. Science, 233, 305-312, 1986.
Parker P. J. et al. The complete primary structure of protein kinase C - the major phorbol ester receptor. Science, 233, 853-859, 1986.
18. *Barbacid M. ras* genes. Annu. Rev. Biochem., 56, 779-827, 1987.
19. *Dohlman H.G., Caron M.G., Lefkowitz R.J.* A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. Biochemistry, 26, 2657-2664, 1987.
Dunlap K., Holz G. G., Rane S. G. G proteins as regulators of ion channel function. Trends Neurosci., 10, 241-244, 1987.
Kubo T. et al. Cloning, sequencing and expression of complementary DNA encoding the muscarinic acetylcholine receptor. Nature, 323, 411-416, 1986.
Masu Y. et al. cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system. Nature, 329, 836-838, 1987.
Stryer L. The molecules of visual excitation. Sci. Am., 257(1), 42-50, 1987.
20. *Carpenter G.* Receptors for epidermal growth factor and other polypeptide mitogens. Annu. Rev. Biochem., 56, 881-914, 1987.
Kaplan D. R. et al. Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity. Cell, 50, 1021-1029, 1987.
Rosen O.M. After insulin binds. Science, 237, 1452-1458, 1987. *Schlessinger J.* Allosteric regulation of the epidermal growth factor receptor kinase. J. Cell Biol., 103, 2067-2072, 1986.
Yarden Y, Ullrich A. Growth factor receptor tyrosine kinases. Annu. Rev. Biochem., 57, 443-478, 1988.
21. *Deuel T.F.* Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal cell growth. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 443-492, 1987.
Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. Science, 241, 42-52, 1988. *Hunter T.* A thousand and one protein kinases. Cell, 50, 823-829, 1987.
Ullrich A. et al. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. Nature, 313, 756-761, 1985.
22. *Cohen P.* Control of Enzyme Activity, 2nd ed. London. Chapman and Hall, 1983. *Edelman A.M., Blumenthal D.K., Krebs E. G.* Protein serine/threonine kinases. Annu. Rev. Biochem, 56, 567-613, 1987.
23. *Cohen P.* Protein phosphorylation and the control of glycogen metabolism in skeletal muscle. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), 302, 13-25, 1983.
Montminy M. R., Bilezikjian L. M. Binding of a nuclear protein to the cyclic-AMP response of the somatostatin gene. Nature, 328, 175-178, 1987.
Pilkis S. J., El-Maghrabi M. R., Claus T. H. Hormonal regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis. Annu. Rev. Biochem, 57, 755-784, 1988.
Smith S. B., White H. D.. Siegel J. B., Krebs E. G. Cyclic AMP-dependent protein

kinase I: cyclic nucleotide binding, structural changes, and release of the catalytic subunits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1591-1595, 1981.
24. *Alemany S., Pelech S., Brier ley C. H., Cohen P.* The protein phosphatases involved in cellular regulation. Evidence that dephosphorylation of glycogen phosphorylase and glycogen synthase in the glycogen and microsomal fractions of rat liver are catalysed by the same enzyme: protein phosphatase-1. Eur. J. Biochem., 156, 101-110, 1986.
Ingebritsen T.S., Cohen P. Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. Science, 221, 331 338, 1983.
25. *Baku Y.S. et al.* Three-dimensional structure of calmodulin. Nature, 315, 37-40, 1985.
Cheung W.Y. Calmodulin. Sci. Am., 246(6), 48-56, 1982.
Gerday C., Gilles R., Bolis L., eds. Calcium and Calcium Binding Proteins. Berlin, Springer-Verlag, 1988.
Klee C.B., Crouch T.H., Richman P.O. Calmodulin. Annu. Rev. Biochem., 49, 489-515, 1980.
26. *Cohen P.* Protein phosphorylation and hormone action. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 234 115-144, 1988.
27. *Golberg N. D., Haddox M. K.* Cyclic GMP metabolism and involvement in biological regulation. Annu. Rev. Biochem., 46, 823 896, 1977.
Nakamura T., Gold G. H. A cyclic nucleotide-gated conductance in olfactory receptor cilia. Nature, 325, 442-444, 1987.
Schnapf J.L., Bay lor D.A. How photoreceptor cells respond to light. Sci. Am., 256, (4), 40-47, 1987.
Stryer L. Cyclic GMP cascade of vision. Annu. Rev. Neurosci., 9, 87-119, 1986.
28. *Cohen P.* Protein phosphorylation and hormone action. Proc. R. Soc, Lond. (Biol.), 234, 115-144, 1988.
29. *Schimke R. T.* On the roles of synthesis and degradation in regulation of enzyme levels in mammalian tissues. Curr. Top. Cell. Regul., 1, 77-124, 1969.
30. *Lewis J., Slack J., Wolpert L.* Thresholds in development. J. Theor. Biol., 65, 579-590, 1977.
Miller S. G., Kennedy M. B. Regulation of brain type II Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase by autophosphorylation: a Ca^{2+}-triggered molecular switch. Cell, 44, 861-870, 1986.
Mulvihill E. R., Palmiter R. D. Relationship of nuclear estrogen receptor levels to induction of ovalbumin and conalbumin mRNA in chick oviduct. J. Biol. Chem., 252, 2060-2068, 1977.
31. *Lefkowitz R.J., ed.* Receptor regulation. Receptors and Recognition. Series B, Vol. 13. London, Chapman and Hall, 1981.
Soderquist A.M., Carpenter G. Biosynthesis and metabolic degradation of receptors for epidermal growth factor. J. Memb. Biol., 90, 97-105, 1986.
32. *Sibley D. R., Benovic J. L., Caron M. G., Lefkowitz R. J.* Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. Cell, 48, 913-922, 1987.
33. *Kassis S., Fishman P. H.* Different mechanisms of desensitization of adenylate cyclase by isoproterenol and prostaglandin E_t in human fibroblasts: role of regulatory components in desensitization. J. Biol. Chem., 257, 5312-5318, 1982.
Klee W.A., Sharma S.K., Nirenberg M. Opiate receptors as regulators of adenylate cyclase. Life Sci., 16, 1869-1874, 1975.
Snyder S.H. Opiate receptors and internal opiates. Sci. Am., 236(3), 44-56, 1977.
34. *Adler J.* The sensing of chemicals by bacteria. Sci. Am., 234(4), 40-47, 1976. *Berg H.* How bacteria swim. Sci. Am., 233(2), 36-44, 1975.
35. *Koshlad D. E., Jr.* Biochemistry of sensing adaptation in a simple bacterial system. Annu. Rev. Biochem., 50, 765-782, 1981.
Russo A.F., Koshland D.E. Receptor modification and absolute adaptation in bacterial sensing. In: Sensing and Response in Microorganisms (M. Eisenbach, M. Balaban, eds.), pp. 27-41. Amsterdam, Elsevier, 1985.
Springer M.S., Goy M.F., Adler J. Protein methylation in behavioral control mechanisms and in signal transduction. Nature, 280, 279-284, 1979.
36. *Hess J. F., Oosawa K., Kaplan N., Simon M. I.* Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. Cell, 53, 79-87, 1988.
Oosawa K., Hess J. F., Simon M. I. Mutants defective in bacterial chemotaxis show modified protein phosphorylation. Cell, 53, 89-96, 1988.

13 **Рост и деление клеток**

Клетки размножаются путем удвоения своего содержимого с последующим делением надвое. Сложные последовательности клеточных делений, периодически прерываемые слиянием гамет, приводят к образованию многоклеточных организмов. У высших животных и растений даже после достижения ими зрелости клеточное деление обычно необходимо, чтобы восполнять потери в результате «износа» клеток. Во взрослом человеческом организме просто для поддержания нормального состояния каждую секунду должно образовываться несколько миллионов клеток, и если все клеточные деления прекратятся (как, например, при массивном облучении), то человек погибнет через несколько дней.

Удвоение многих компонентов клетки не требует точного контроля. Если в клетке имеется много молекул или органелл определенного типа, то достаточно того, чтобы число их приблизительно удвоилось за один цикл и они затем примерно поровну распределились между двумя дочерними клетками. Однако существует по крайней мере одно очевидное исключение: в случае ДНК такое удвоение и распределение должно быть совершенно точным, а для этого нужен специальный механизм. Поэтому при рассмотрении клеточного цикла иногда удобно бывает различать *хромосомный цикл* и параллельный ему *цитоплазматический цикл.* В **хромосомном цикле** репликация ядерной ДНК *(синтез ДНК)* чередуется с митозом, в котором разделяются реплицированные копии генома. В **цитоплазматическом цикле** *рост клетки,* при котором удваиваются в числе другие клеточные компоненты, чередуется с *цитокинезом-делением* всей клетки на две.

Мы начнем главу с обсуждения координации и регулирования этих двух взаимосвязанных циклов. Мы рассмотрим механизмы, благодаря которым в период между двумя клеточными делениями вся ядерная ДНК обязательно удваивается, причем только один раз, и увидим, как события хромосомного цикла скоординированы с событиями цитоплазматического цикла. Затем речь пойдет о регуляции клеточного деления у многоклеточных животных факторами внеклеточной среды; этот вопрос существенно прояснился в результате последних успехов в изучении проблемы рака. И наконец, мы обсудим молекулярные механизмы, ответственные за митоз и цитокинез. Для осуществления этих двух процессов необходимо, чтобы центросома (разд. 13.5.2) надежно наследовалась и точно удваивалась для формирования двух полюсов митотического веретена; этот *центросомныи цикл* можно рассматривать как третий компонент клеточного цикла.

13.1. Фазы клеточного цикла и их причинные взаимосвязи

Под микроскопом деление эукариотической клетки выглядит как поразительный спектакль. При **митозе** содержимое ядра конденсируется,

образуя видимые хромосомы, которые в результате серии удивительно согласованных движений разделяются на два дочерних набора; затем при **цитокинезе** сама клетка делится на две дочерние, каждая из которых получает один из двух наборов хромосом. Благодаря легкости, с которой их можно наблюдать, митоз и цитокинез были в центре внимания ранних исследователей. Однако эти два события вместе составляют лишь короткую фазу всего клеточного цикла, известную как **фаза М** (от слова «митоз»). Гораздо более длительный период между двумя последовательными М-фазами известен как **интерфаза.** Под микроскопом интерфаза обманчиво выглядит как антракт без всякого действия, когда клетка просто медленно увеличивается в размерах. Более изощренные методы позволяют узнать, что на самом деле интерфаза - это период, во время которого в строго заданной последовательности происходят сложные приготовления к митозу. В этом разделе мы обсудим, как можно изучать последовательность событий в интерфазе и каковы причинные взаимосвязи между фазами клеточного цикла.

13-3

13-4

13.1.1. Репликация ядерной ДНК происходит в определенный период, составляющий часть интерфазы [1]

В большинстве клеток синтез ядерной ДНК занимает лишь некоторую часть интерфазы - период, называемый S-фазой клеточного цикла. Обычно между концом М-фазы и началом синтеза ДНК имеется интервал, известный как *фаза* G_1 (от англ, gap-промежуток); другой интервал, называемый *фазой* G_2, отделяет конец синтеза ДНК от начала следующей М-фазы. Таким образом, интерфаза состоит из последовательности фаз G_1, S и G_2 и обычно занимает не меньше 90% всего времени клеточного цикла. Например, в быстро делящихся клетках

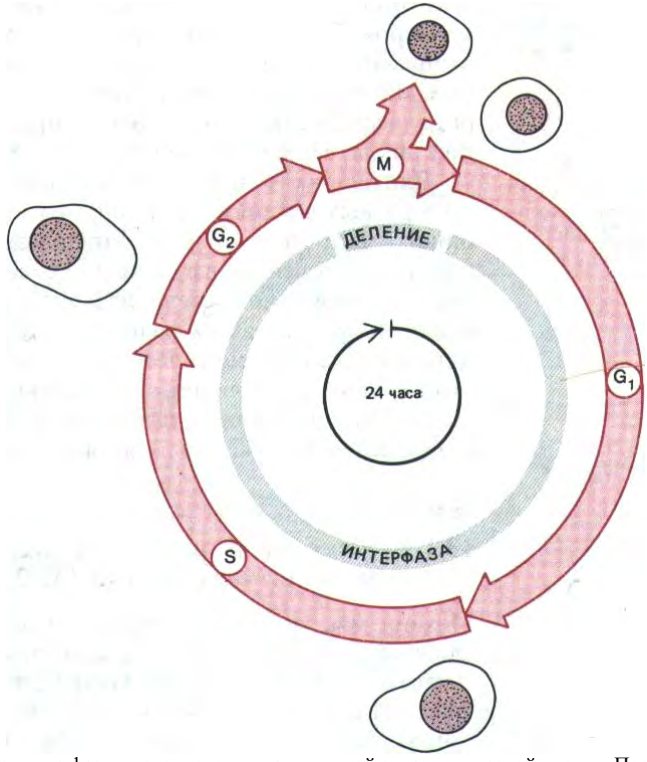


Рис. 13-1. Четыре последовательные фазы клеточного цикла типичной эукариотической клетки. После *фазы М,* которая состоит в делении ядра *(митоз)* и цитоплазмы *(цитокинез),* дочерние клетки вступают в интерфазу нового цикла. Интерфаза начинается с *фазы* G_1, в которой возобновляются интенсивные биосинтетические процессы, резко замедленные во время митоза. *Фаза* S-это период синтеза ДНК; она заканчивается, когда содержание ДНК в ядре удвоится и хромосомы полностью реплицируются (теперь каждая хромосома состоит из двух идентичных «сестринских хроматид»). Затем клетка вступает в *фазу* C_2, которая продолжается до начала митоза, т.е. фазы М. В фазе М удвоившиеся хромосомы конденсируются и становятся хорошо видимыми в световой микроскоп. Ядерная оболочка разрушается (исключение составляют одноклеточные эукариоты, например дрожжи, - у них она остается интактной); сестринские хроматиды расходятся и формируют два новых ядра, а цитоплазма делится с образованием двух дочерних клеток, имеющих по одному ядру. Процесс цитокинеза завершает фазу М, и начинается интерфаза следующего клеточного цикла. На рисунке представлен типичный 24-часовой цикл, однако длительность клеточного цикла у высших эукариот сильно варьирует: она может быть короче 8 часов, а у взрослых животных - больше года, причем различия в основном зависят от продолжительности фазы G_1.

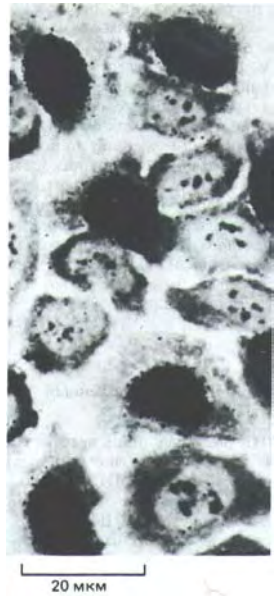


Рис. 13-2. Радиоавтограф, полученный после кратковременной инкубации клеток с ^{3}H-тимидином. Эта методика описана в разд. 4.5.2. Наличие зерен серебра в фотоэмульсии над ядрами (черные участки) свидетельствует о том, что клетки включали ^{3}H-тимидин в ДНК и, следовательно, в период экспозиции какое-то время находились в фазе S. (С любезного разрешения James Cleaver.)

высших эукариот М-фаза обычно повторяется раз в каждые 16-24 ч, а сама длится только от 1 до 2 ч. Типичный клеточный цикл с его четырьмя последовательными фазами показан на рис. 13-1; некоторые подробности приведены в подписи к этому рисунку.

Время синтеза ДНК в клеточном цикле было впервые выявлено в начале 1950-х гг. с помощью метода радиоавтографии. В стандартном методе применяют ^{3}H-тимидин - радиоактивный предшественник соединения, которое клетка использует исключительно для синтеза ДНК, ^{3}H-тимидин можно либо инъецировать животному для изучения циклов клеточного деления в тканях, либо добавлять в культуральную среду in vitro (рис. 13-2). В первом случае через определенное время после введения ^{3}H-тимидина у животного берут ткань и приготовляют из нее радиоавтографы. Те клетки, которые в прошедший период синтезировали ДНК (и, следовательно, находились в S-фазе), могут быть выявлены по зернам серебра над их ядрами. Подсчитывая долю клеток, находившихся в М-фазе, при различной длительности включения ^{3}H-ти-мидина, можно показать, что в клеточном цикле имеются четыре фазы, описанные выше, и измерить продолжительность каждой из них.

Предположим, что делают одну инъекцию и через короткое время, скажем через полчаса, ткань фиксируют для радиоавтографии. В типичной клеточной популяции, где все клетки делятся быстро, но не синхронно, около 30% клеток получат радиоактивную метку. Это будут те клетки, которые синтезировали ДНК в короткий период экспозиции в присутствии ^{3}H-тимидина, и их доля в клеточной популяции отражает долю клеточного цикла, занятую S-фазой (рис. 13-3). Только около 5% клеток в момент фиксации окажутся в стадии митоза (малая величина этого *митотического индекса* означает, что митоз занимает лишь небольшую часть клеточного цикла), но ни в одной из них не будет радиоактивной метки. Это указывает на то, что фазы М и S-обособленные части клеточного цикла. Однако, с другой стороны, если препараты фиксировать через несколько часов после введения ^{3}H-тимидина, то некоторые клетки, находящиеся в митозе, получат радиоактивную метку; вероятно, эти клетки еще синтезировали ДНК в момент инъекции. Минимальный интервал между инъекцией и временем появления меченых митотических клеток будет равен длительности фазы G_2. Такого рода исследования позволяют определить длительность всех четырех фаз цикла. Пример использования этого метода приведен на рис. 13-4.

Длительность клеточных циклов в разных тканях, у разных видов и на разных стадиях очень широко варьирует - она может быть меньше одного часа (например, в раннем эмбрионе лягушки) и больше года (например, в печени взрослого человека). Хотя различаться по длительности в известной степени могут все фазы клеточного цикла, это в особенности касается фазы G_1, длительность которой может варьировать в пределах практически от нуля (в раннем зародыше лягушки) до столь больших величин, что клетки кажутся вообще прекратившими деление (в зрелой печени человека). Часто говорят, что клетки в такой покоящейся фазе G_1 находятся в *состоянии* G_0 (см. разд. 13.3.8).

13-5

13.1.2. Клеточный цикл легче всего изучать на культурах in vitro [1, 2]

Механизмы, лежащие в основе клеточного цикла, трудно изучать в сложных и недоступных тканях интактного животного. Легче работать с клеточными культурами. Например, с помощью цейтраферной съемки (разд. 4.1.5) можно наблюдать, как отдельная клетка претерпевает митоз, растет, затем опять входит в стадию митоза; это делает воз-

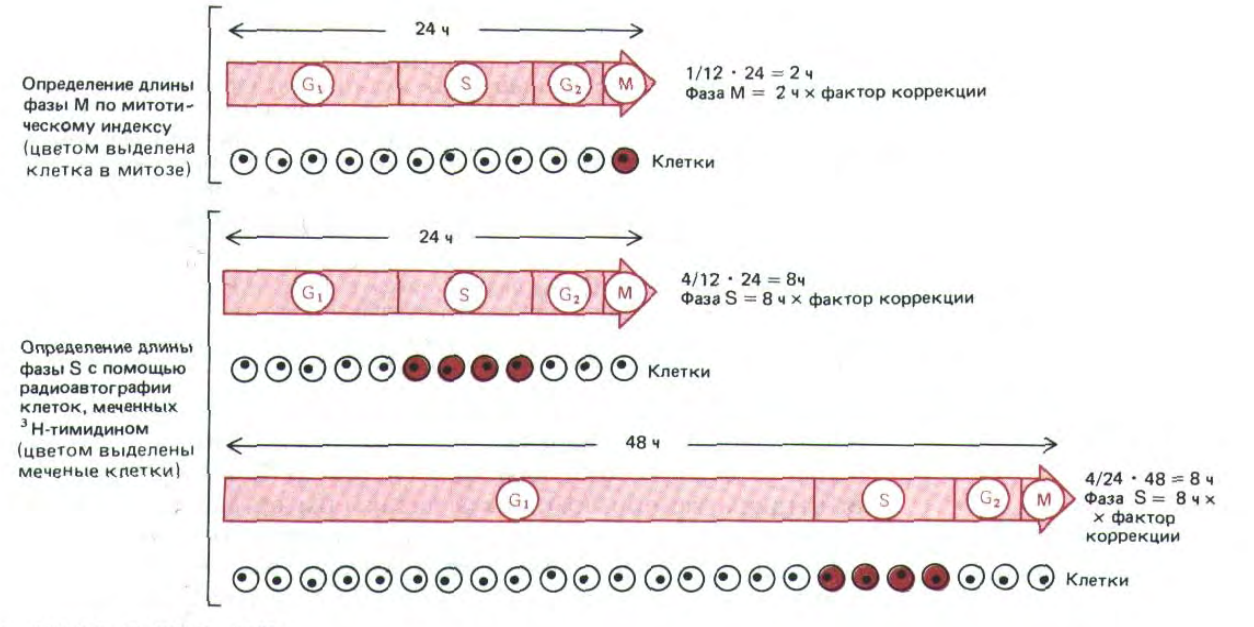


Рис. 13-3. Длина каждой фазы клеточного цикла примерно равна доле клеток, находящихся в этой фазе в каждый данный момент, умноженной на общую продолжительность цикла (если популяция клеток растет равномерно и все клетки делятся с одной и той же скоростью). Однако для точного расчета длительности каждой фазы нужен «фактор коррекции», который изменяется в пределах от 0,7 для клеток ранней фазы G_1 до 1,4 для митотических клеток. Этот коэффициент необходим потому, что в равномерно растущей популяции всегда больше молодых (недавно поделившихся) клеток, чем старых.

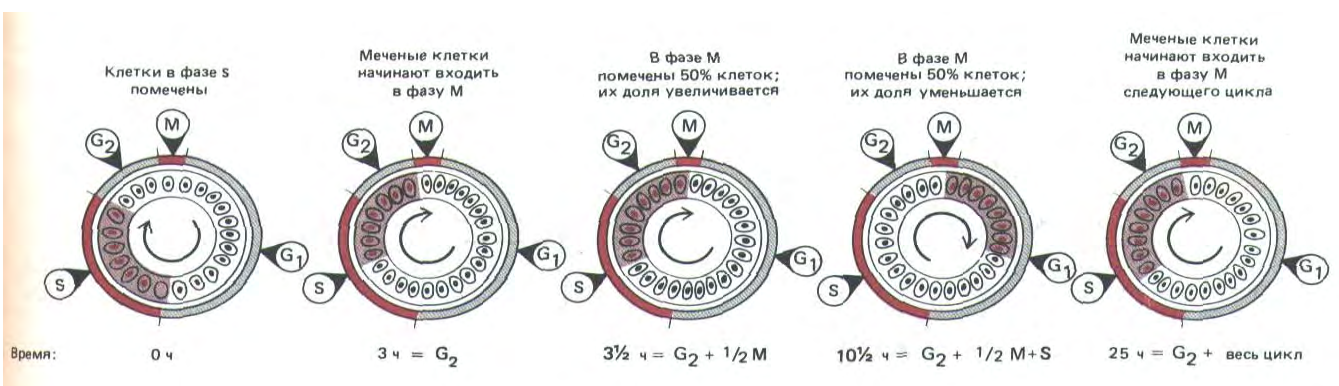


Рис. 13-4. Метод, используемый обычно для измерения продолжительности фаз клеточного цикла. Несинхронно пролиферирующую клеточную популяцию короткое время выдерживают в среде с ^{3}Н-тимидином, а затем отмывают; при этом клетки продолжают проходить свой цикл. Через разное время после экспозиции берут пробы клеток и получают радиоавтографы. Для интерпретации результатов полезно изобразить клетки так, как будто они распределены на равномерно вращающемся круге, причем положение каждой клетки соответствует стадии цикла, на которой она находится. Вначале клетки в фазе S получают радиоактивную метку (окрашенный участок), а клетки в фазах G_2, М и G_1 ее не получают. Через промежуток времени, равный длительности G_2, меченые клетки начинают вступать в фазу М; когда пройдет время, равное G_2 + М, получают метку все клетки, находящиеся в фазе М, и т.д. Отмечая время вступления меченых клеток в фазу М и последующие фазы вплоть до возвращения в М, в принципе можно определить среднюю длительность фаз G_2, М и S и общую продолжительность цикла, а отсюда (путем вычитания) и длительность G_1. В приведенном примере эти величины равны 3, 7, 22 и 11 ч соответственно.

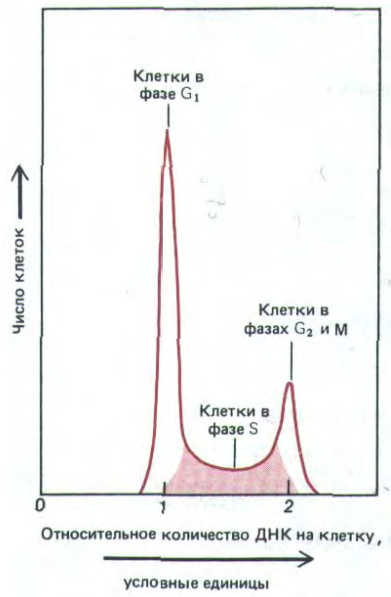


Рис. 13-5. Типичные данные, полученные при анализе содержания ДНК в отдельных клетках растущей популяции с помощью флуоресцентного клеточного анализатора - электронного прибора, основанного на том же принципе, что и сортировка флуоресцентно-окрашенных клеток (см. разд. 4.3.1). Клетки окрашивают красителем, приобретающим способность флуоресцировать при связывании с ДНК. Поэтому уровень флуоресценции прямо пропорционален содержанию ДНК в каждой клетке. Клетки подразделяются на три категории: с нереплицированной ДНК (1 условная единица), т.е. находящиеся в фазе G_1, с полностью реплицированной ДНК (2 условные единицы), т. е. находящиеся в фазе G_2 или M, и с промежуточным содержанием ДНК, находящиеся в фазе S. Распределение клеток в представленном примере показывает, что число клеток в фазе G_1 больше, чем в G_2 и M, взятых вместе. Это означает, что в данной популяции фаза G_1 длиннее, чем G_2 + M.

можным прямое измерение длительности M-фазы и всего клеточного цикла. Клетки, осуществляющие синтез ДНК в культуре, можно выявлять таким же образом, как в интактном организме, - методом радиоавтографии с использованием ^{3}H-тимидина. Можно также прослеживать ход клеточного цикла путем прямого измерения содержания ДНК в клетке; эту задачу сильно облегчает применение *флуоресцентного анализатора клеток* (рис. 13-5).

Дальнейшее упрощение анализа клеточного цикла состоит в использовании большой популяции культивируемых клеток, одновременно проходящих одни и те же фазы клеточного цикла. Такие *синхронные клеточные популяции* можно получать разными способами. Самый ранний метод состоял в выдерживании клеток в растворе вещества, нарушающего определенную стадию клеточного цикла; длительное пребывание культуры в таком растворе приводит к тому, что все клетки останавливаются на этой стадии, а после снятия блокады возобновляют цикл и проходят его синхронно. Однако в ходе клеточного цикла параллельно осуществляется много различных процессов, и вряд ли все они будут блокироваться одновременно. Поэтому было бы лучше по возможности применять такие методы получения синхронных популяций, которые не нарушают нормальное прохождение клеточного цикла. Для большинства клеток млекопитающих самый простой и лучший

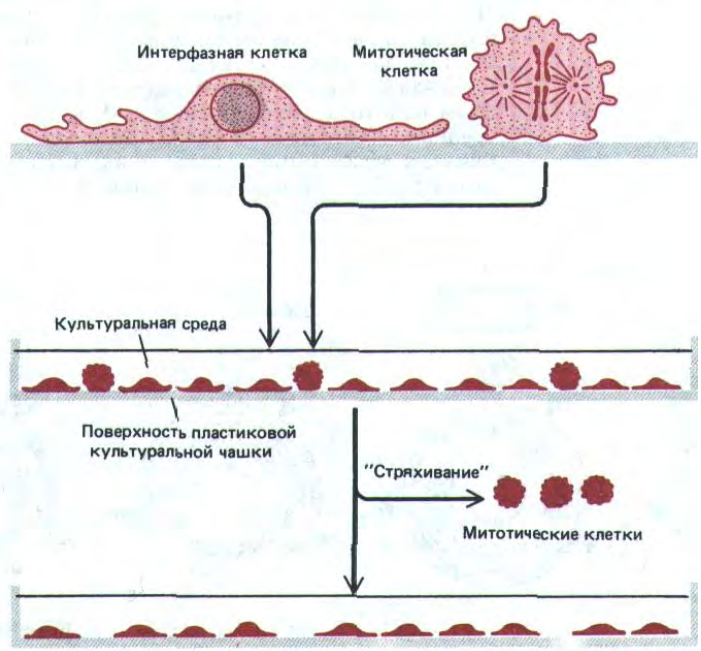


Рис. 13-6. Обычный метод получения синхронной популяции животных клеток в культуре. Митотические клетки отбирают, стряхивая их с поверхности чашки, в которой они растут. После перенесения в новую чашку эти клетки проходят дальнейшие циклы синхронно. Из-за случайных различий в скорости деления индивидуальных клеток синхронность после нескольких циклов деления теряется.

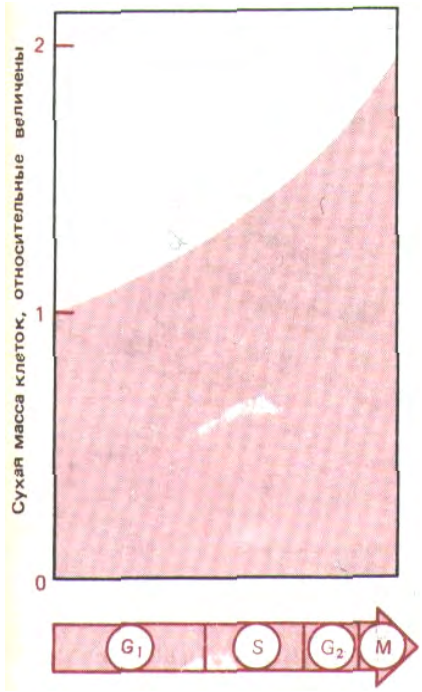


Рис. 13-7. График увеличения массы клеток за время клеточного цикла. Большая часть клеточных компонентов синтезируется более или менее равномерно на протяжении всей интерфазы, причем скорость их образования обычно возрастает по мере того, как размеры клетки и ее биосинтетическая активность увеличиваются (с коротким перерывом в фазе М). Чтобы в пролиферирующей популяции средняя величина клетки оставалась постоянной, количество каждого компонента за время цикла должно в точности удваиваться.

метод состоит в том, что используют изменения цитоскелета в М-фазе, приводящие к «округлению» клеток. Округлившиеся в М-фазе клетки так слабо прикрепляются к дну культуральной чашки, что их можно отделить легким встряхиванием (рис. 13-6). Митотические клетки, отобранные таким способом, составляют синхронную популяцию, в которой почти сразу же наступает фаза G_1 клеточного цикла. Применяют и другой метод: поскольку клетки по мере прохождения цикла увеличиваются в размерах, можно использовать центрифугирование, чтобы выделить субпопуляции клеток, находящихся на разных стадиях цикла.

13.1.3. Критические события клеточного цикла наступают внезапно на фоне непрерывного роста клеток [3]

На синхронной популяции делящихся клеток можно более детально изучать химические изменения, происходящие в ходе клеточного цикла. При благоприятных для роста условиях общее содержание белка в типичной клетке на протяжении всего цикла увеличивается более или менее непрерывно (рис. 13-7). Синтез РНК тоже происходит с постоянной скоростью, за исключением М-фазы, когда конденсация хромосом, видимо, препятствует транскрипции, так что синтез РНК почти не идет, а образование белка снижается. Анализ синтеза индивидуальных белков (рис. 13-8) показывает, что подавляющее большинство их синтезируется в течение всего цикла. Таким образом, в процессе роста клетки большая часть ее компонентов образуется постепенно и непрерывно - их синтез ненадолго прекращается лишь во время разделения клетки на две.

На фоне этого непрерывного роста происходит ряд резких изменений, связанных с критическими моментами клеточного цикла. Некоторые из них, такие как начало синтеза ДНК, легко выявляются, тогда как другие обнаружить труднее. Оказалось, например, что для большинства клеток существует критическая точка в фазе G_1, когда в их клеточном цикле наступает пауза, если условия среды неблагоприятны для роста. При прохождении этой точки, называемой точкой рестрикции, в клетке происходят внутренние изменения, после которых она должна уже пройти все последующие этапы клеточного цикла в соответствии с жестким временным «расписанием».

Как и следовало ожидать при наличии в цикле ряда критических точек, можно выделить определенные белки (хотя их очень немного), синтез которых резко ускоряется на специфических стадиях цикла (см. рис. 13-8). Например, гистоны, необходимые для построения нового хроматина, синтезируются с высокой скоростью только в S-фазе; это, видимо, относится и к некоторым белкам аппарата репликации ДНК.

Но чем определяется время наступления такого рода критических событий и как они координируются между собой и с непрерывным процессом клеточного роста? Чтобы ответить на эти вопросы, мы вначале посмотрим, что служит пусковым сигналом для синтеза ДНК, т. е. для перехода к S-фазе клеточного цикла.

13.1.4. Синтез ДНК запускается изменением в цитоплазме-появлением активатора S-фазы [4]

Путем добавления надлежащего агента к культуральной среде (разд. 4.3.5) можно вызвать слияние клеток двух синхронизированных клеточных популяций, находящихся в разных фазах клеточного цикла. Результаты такого опыта чрезвычайно информативны.

Когда клетка в S-фазе сливается с клеткой, находящейся на более ранней стадии G_1 , ядро клетки в фазе G_1 немедленно приступает к синтезу ДНК (рис. 13-9, *А*). Очевидно, что это ядро уже готово

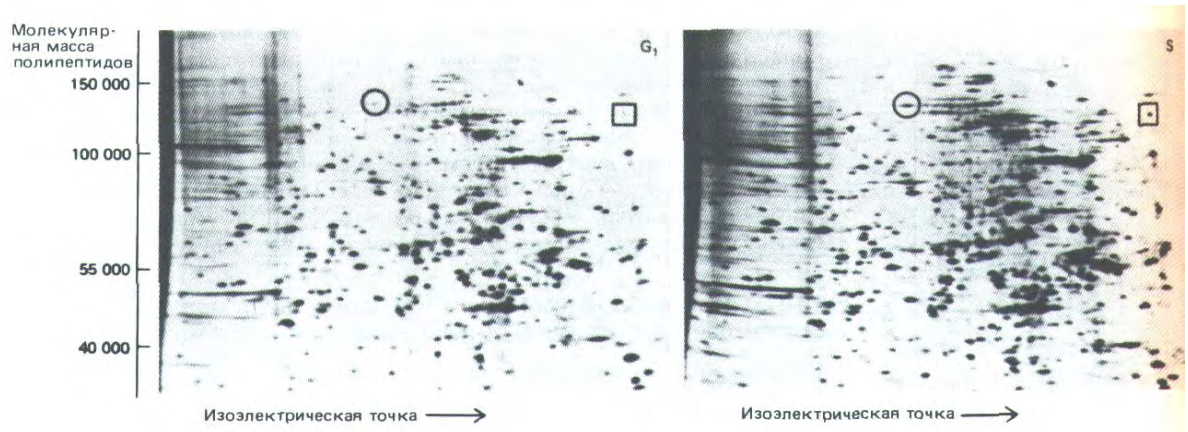


Рис. 13-8. Анализ белков, синтезируемых в фазах G_1 и S, с помощью двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Синхронизированные клетки мышиной лимфомы в течение короткого времени в ранней фазе G_1 или в поздней S-фазе метили смесью радиоактивных аминокислот. На представленных радиоавтографах можно выявить около 1000 вновь синтезированных белков, но только два из них (отмечены кружком и квадратом) образуются в этих двух фазах с существенно разными скоростями. Поскольку гистоны имеют сильный положительный заряд, они мигрируют за пределы геля и здесь не видны. (P. Coffino, V. E. Groppi, Adv. Cyclic Nucleotide Res. 14: 399-410, 1981.)

к репликации ДНК, но в нормальных клетках G_1 еще отсутствует какой-то сигнал (или ряд сигналов), необходимый для активации механизма синтеза ДНК. По-видимому, в цитоплазме клеток, находящихся в S-фазе, такой сигнальный фактор содержится в большом количестве. Появление такого *активатора S-фазы,* очевидно, и отмечает границу между фазами G_1 и S в нормальной клетке.

Исчезает ли активатор S-фазы после завершения синтеза ДНК и перехода клетки в фазу G_2? Ответ можно опять-таки получить в опытах со слиянием клеток. Когда клетка в фазе G_2 сливается с клеткой в фазе G_1 (рис. 13-9,Б), ядро клетки G_1 не начинает преждевременно синтезировать ДНК; но если такая же клетка G_2 сливается с клеткой в S-фазе, то в ядре этой последней репликация ДНК продолжается (рис. 13-9, *А).* Очевидно, что активатор S-фазы (или какой-то его важный компонент) вскоре после окончания этой фазы исчезает и цитоплазма клеток в фазе G_2 уже не содержит ни диффундирующего активатора, ни диффундирующего ингибитора синтеза ДНК.

13.1.5. В каждом цикле весь геном реплицируется только один раз [4, 5]

Как уже говорилось в гл. 9 (разд. 9.3.6), разные части генома реплицируются в разные моменты S-фазы и после этого не могут реплицироваться повторно, так как этому препятствует какое-то химическое

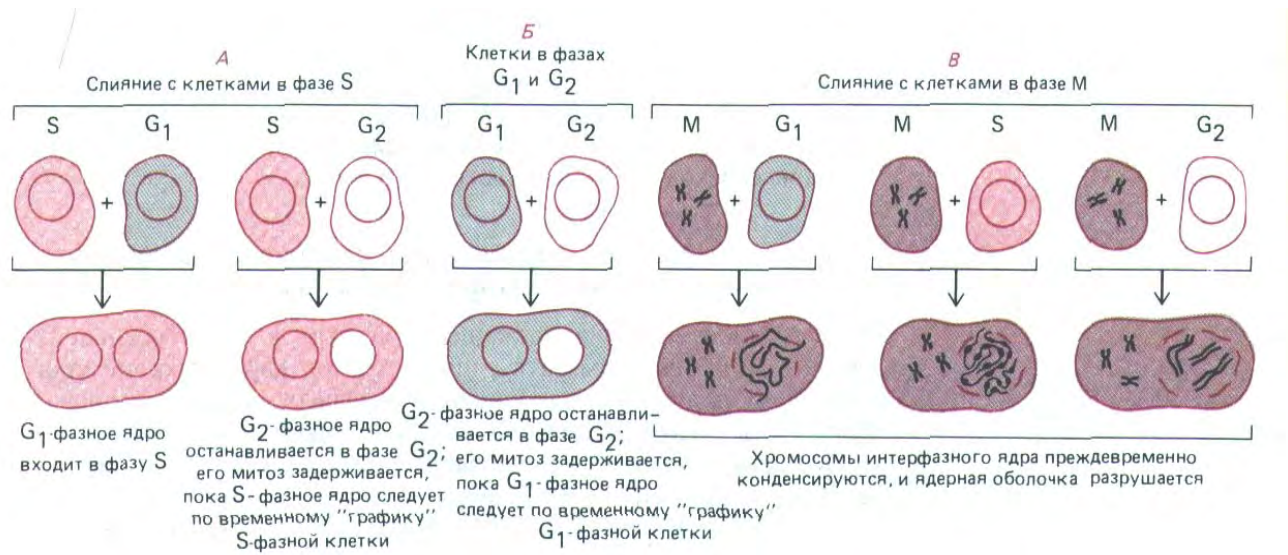


Рис. 13-9. Сводная схема различных результатов слияния двух клеток млекопитающих, находящихся на разных фазах клеточного цикла.

изменение, происходящее в каждом участке каждой хромосомы после его репликации. Благодаря такой *блокаде повторной репликации* при слиянии клетки в фазе G_2 с клеткой в S-фазе (рис. 13-9, *А)* ядро клетки в G_2 оказывается нечувствительным к активатору S-фазы и не приступает вновь к синтезу ДНК. Блокада снимается, когда клетки проходят через митоз к началу новой фазы G_1.

Однако нужен еще какой-то механизм, который бы гарантировал, что активатор S-фазы будет присутствовать до тех пор, пока не завершится репликация всей ДНК. Как мы видели, опыты со слиянием клеток показывают, что цитоплазматический сигнал, активирующий механизм репликации ДНК в начале S-фазы (активатор S-фазы), исчезает к ее концу. Однако если клетку искусственно блокировать в S-фазе ингибиторами синтеза ДНК, механизм репликации ДНК остается дееспособным и после нормального срока окончания S-фазы, так что в случае удаления ингибитора репликация ДНК возобновляется и доводится до конца. По-видимому, хромосома, не завершившая репликацию, каким-то образом сохраняет механизм репликации в активном состоянии.

Возможно, что за этот эффект ответственны сами репликационные вилки. Как мы видели в гл. 9 (разд. 9.3.1), эти вилки существуют парами: две вилки одной пары движутся в противоположных направлениях от общей начальной точки, и каждая из них прекращает свое существование только тогда, когда она доходит до конца хромосомы или сталкивается с вилкой, движущейся ей навстречу. Таким образом, если хромосома начала репликацию, то будет существовать по крайней мере одна репликационная вилка до тех пор, пока вся хромосома не удвоится полностью. Возможно, что каким-то непонятным образом такая вилка обеспечивает дополнительную выработку активатора S-фазы, эффективно катализирующего образование новых вилок в других участках ДНК. В самом деле, инициация первой пары репликационных вилок могла бы служить пусковым механизмом для начала S-фазы, действующим по принципу «всё или ничего». Такое одиночное событие инициации зависело бы от редкого случайного столкновения между стартовой последовательностью ДНК и молекулой инициатора, присутствующего в низкой концентрации. Действительно, разброс моментов перехода $G_1 \rightarrow S$ во времени носит случайный характер, что согласуется с этим предположением (разд. 13.3.3).

13-6

13.1.6. Какой-то цитоплазматический сигнал задерживает подготовку к митозу, пока не завершена репликация ДНК [4, 6]

Ядро, завершившее S-фазу и вступающее в G_2, в нормальных условиях конденсирует свои хромосомы и через определенное время после этого вступает в митоз. Однако если синтез ДНК искусственно блокировать, то митоз задержится до тех пор, пока блокада не будет снята и не завершится синтез ДНК. Точно так же после слияния клетки в фазе S с клеткой в фазе G_2 ядро последней задерживается на этой стадии, пока другое ядро не «догонит» его, и в конце концов оба ядра вместе вступают в митоз. Проще всего предположить, что задержку митоза вызывает какой-то цитоплазматический сигнал, генерируемый при неполной репликации ДНК. Этот сигнал мог бы быть или не быть идентичным активатору S-фазы; в любом случае некоторое указание на возможный механизм его появления содержится в том факте, что в случае повреждения клетки в фазе G_2 (например, рентгеновским облучением) митоз задерживается до его репарации. Как при репарации, так и при репликации ДНК в клетке должна быть одноцепочечная ДНК;

между тем известно, что избыток такой ДНК у бактерий запускает выработку цитоплазматического сигнала, задерживающего клеточное деление (реакция SOS-см. разд. 5.2.9). Возможно, что и в эукариотической клетке одноцепочечная ДНК тоже порождает сигнал задержки М-фазы. Это еще не приближает нас к пониманию природы такого сигнала, если не считать одного очень интересного наблюдения: если в культивируемых клетках млекопитающих искусственно блокировать синтез ДНК (ингибиторами или путем повреждения ДНК), то после добавления в среду *кофеина* они могут преждевременно приступить к митозу, когда их ДНК еще не реплицировались полностью. На что именно воздействует при этом кофеин, пока не известно.

13-7

13.1.7. Митоз запускается «М-стимулирующим фактором» (MPF) [4,7]

Исчезновение сигналов, задерживающих М-фазу, само по себе еще не достаточно для запуска митоза - для этого нужен еще один цитоплазматический фактор. Нормальную фазу G_2 можно рассматривать как период подготовки к выработке этого решающего фактора, включающего механизм митоза после исчезновения факторов задержки. Данные об этом тоже получены в экспериментах со слиянием клеток.

Когда клетка в М-фазе сливается с клеткой в любой из стадий интерфазы (C_1, S или G_2), интерфазное ядро быстро вступает в М-фазу, осуществляя конденсацию хромосом и готовясь к делению, даже если это грозит (как в случае ядер в фазе G_1 или S) нарушить весь дальнейший ход деления (рис. 13-9, й и 13-10). По-видимому, цитоплазма в М-фазе содержит сильный *М-стимулирующий фактор* (M-phase-promoting factor, MPF), на который ядро реагирует в любой фазе клеточного цикла. Вероятно, только что упоминавшиеся факторы, задерживающие митоз, тормозят выработку MPF, но не могут блокировать его действия, если он уже образовался.

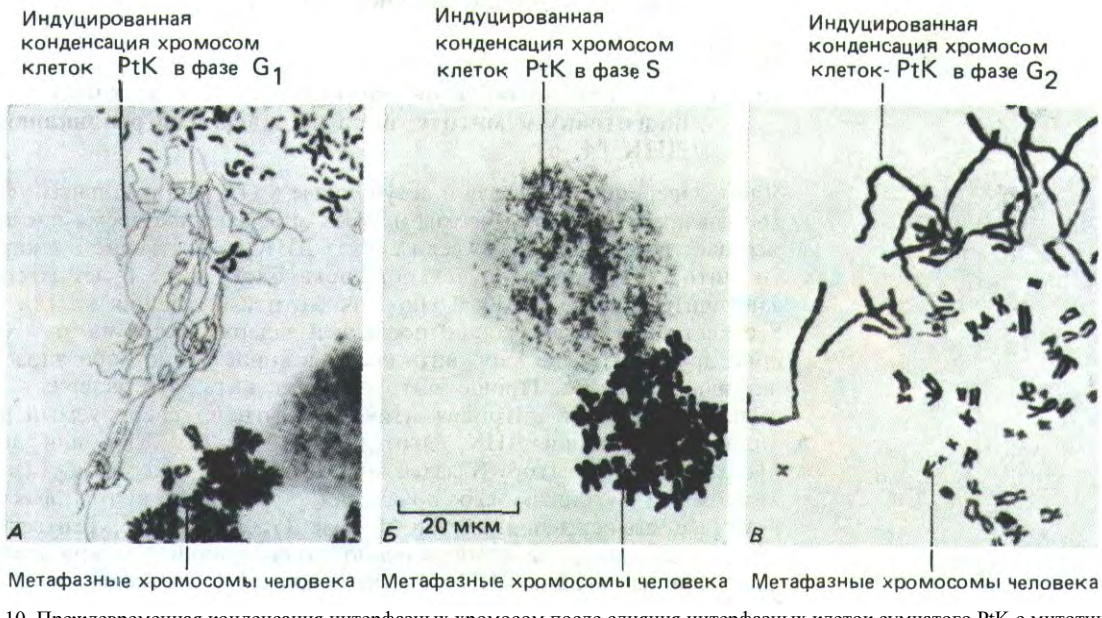


Рис. 13-10. Преждевременная конденсация интерфазных хромосом после слияния интерфазных клеток сумчатого PtK с митотическими клетками человека. *А.* Клетка PtK была в фазе C_1, поэтому ее преждевременно конденсированные хромосомы представлены одиночными хроматидами. *Б.* Клетка PtK была в фазе S, и теперь ее хроматин приобретает «распыленный» вид. *В.* Клетка PtK находилась в фазе G_2, и теперь хроматиды, хотя и очень длинные по сравнению с нормальными метафазными хромосомами человека, удвоены. (K. Sperling, P. Rao, Humangenetik 23: 235-258, 1974.)

13.1.8. События хромосомного цикла - связанные между собой звенья одной цепи [8]

Описанные выше эксперименты могут служить основой для функциональной классификации некоторых молекул, видимо, управляющих событиями хромосомного цикла. Были описаны три контролирующих фактора, способных к диффузии; для краткости удобно будет считать, что каждый из них представляет собой одну молекулу, хотя на самом деле они могут быть более сложными. Это 1) *активатор S-фазы,* который в норме присутствует в цитоплазме клеток только в S-фазе и включает синтез ДНК; 2) *М-стимулирующий фактор (MPF),* который содержится в цитоплазме только в М-фазе и вызывает конденсацию хромосом; 3) ДНК-зависимый *М-задерживающий фактор* (M-phase-delaying factor, возможно, идентичный активатору S-фазы), который присутствует в цитоплазме в S-фазе и ингибирует процессы, ведущие к выработке MPF.

Моменты быстрого появления и исчезновения этих диффундирующих факторов в цитоплазме разграничивают ряд событий клеточного цикла, и промежутки времени между ними определяют протяженность всего цикла.

Причинные зависимости между тремя факторами (а возможно, и другими, еще не известными) гарантируют, что события хромосомного цикла всегда будут проходить в определенной последовательности, предотвращая такие гибельные неувязки, как конденсацию хромосом посреди фазы синтеза ДНК. Каждый последующий шаг зависит от предыдущего. Поэтому клетка не может вступить в митоз, пока не появится М-стимулирующий фактор; а он не может появиться, пока не исчезнет М-задерживающий фактор; М-задерживающий фактор и активатор S-фазы не смогут исчезнуть до окончания синтеза ДНК; синтез ДНК не прекратится до репликации всей ДНК; следующая репликация ДНК не может начаться до снятия блокады повторной репликации при переходе в G_1. Позже мы встретим еще один пример: клетка не может перейти из митоза в G_1 , пока хромосомы не распределятся с помощью митотического веретена (разд. 13.5.7). Все эти наблюдения, а также те, которые будут рассматриваться позже (разд. 18.2.1, 19.8.2), указывают на то, что большинство событий и процессов хромосомного цикла взаимосвязаны, образуя зависимую последовательность.

13.1.9. Во время ранних делений дробления, когда клетки не растут, клеточный цикл бывает укорочен [9]

Для изучения молекул, управляющих хромосомным циклом, особенно полезными оказались эксперименты с яйцами и ранними зародышами шпорцевой лягушки *Xenopus.* Яйцо *Xenopus,* как и у многих других видов, представляет собой необычайно крупную сферическую клетку. Ее диаметр составляет чуть больше миллиметра, и она содержит запас практически всех веществ (за исключением ДНК), необходимых для построения раннего эмбриона. Все эти вещества запасаются в течение долгого периода роста незрелого яйца, называемого *ооцитом.* Эту длительную стадию лучше всего определить как фазу G_2 первого цикла мейотического деления (хотя обычно ее называют профазой первого деления мейоза, она во многих отношениях напоминает обычную фазу G_2-см. разд. 15.2.7). Во время овуляции воздействие гормонов приводит к созреванию яйца, так что к моменту откладки оно успевает уже пройти последующие стадии мейоза и останавливается в М-фазе второго мейотического деления (разд. 15.3.3). Затем оплодотворение запускает чрезвычайно быструю последовательность клеточных делений:

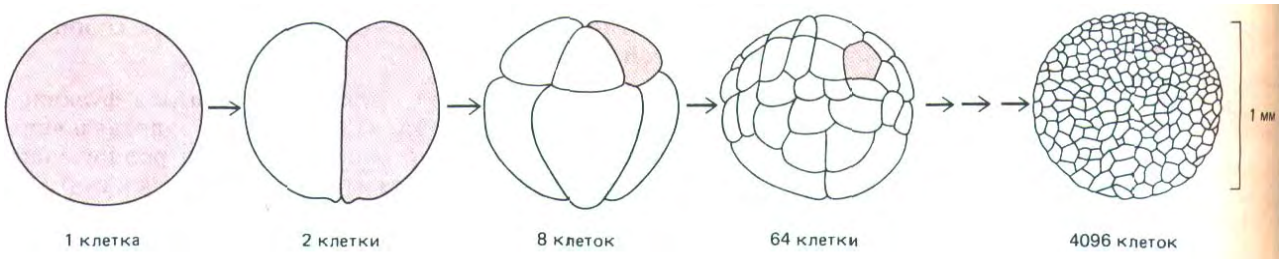


Рис. 13-11. Примерно за 7 ч в яйце *Xenopus* проходит 12 очень быстрых синхронных циклов деления, состоящих из чередующихся фаз S и M без заметных фаз G_1 и G_2. Эти деления дробят яйцо на 4096 (2^{12}) более мелких клеток. На каждой стадии цветом выделена одна клетка.

одна гигантская клетка *дробится,* образуя зародыш, состоящий из тысяч мелких клеток (рис. 13-11). При этом роста практически не происходит - из макромолекул синтезируется только ДНК, необходимая для образования нужного числа ядер, и немного белка. После первого деления, длящегося около 90 мин, последующие 11 делений проходят более или менее синхронно с 30-минутными интервалами, и в результате примерно за 7 ч образуется 4096 (2^{12}) клеток. Предварительное накопление веществ в яйце делает возможными столь быстрые клеточные циклы благодаря тому, что исключается время, необходимое для роста клеток во время каждого цикла. Циклы репликации ДНК и деления укорачиваются за счет того, что фазы S и M ускоряются, а G_1 и G_2 становятся такими короткими, что практически неразличимы.

13.1.10. M-стимулирующий фактор (MPF) вызывает митоз у самых разнообразных клеток [10]

Поскольку ооциты и яйца шпорцевой лягушки очень крупны, в их цитоплазму легко инъецировать различные вещества. Кроме того, ооцит, яйцо и ранний зародыш служат обильными источниками цитоплазмы строго определенных стадий клеточного цикла. Это особенно важно при изучении M-стимулирующего фактора (MPF, или МСФ), о котором говорилось выше. Этот фактор был впервые открыт в зрелых неоплодотворенных яйцах *Xenopus,* которые находятся в M-фазе. Если цитоплазму из такого яйца инъецировать в ооцит, она выводит его из стадии G_2 и заставляет перейти в M-фазу. Тем самым начинается созревание ооцита (первоначально сокращение MPF означало mutaration promoting factor- «фактор, способствующий созреванию»; см. разд. 15.3.6). Активный MPF появляется также в дробящемся яйце (зародыше) во время каждой M-фазы (рис. 13-12). Таким образом, яйцо и ооцит *Xenopus* могут служить как источником материала при попытках получить очищенный MPF, так и объектом для определения его активности (рис. 13-13).



Рис. 13-12. Уровни активности M-стимулирующего фактора (MPF, или МСФ) в ооците, яйце и раннем зародыше *Xenopus.* Ооцит останавливается в фазе G_2 мейоза при низком уровне MPF; зрелое отложенное яйцо останавливается в фазе M мейоза при высоком уровне MPF; после оплодотворения ранний эмбрион проходит чередующиеся фазы S и M при соответственно меняющихся уровнях активности MPF.

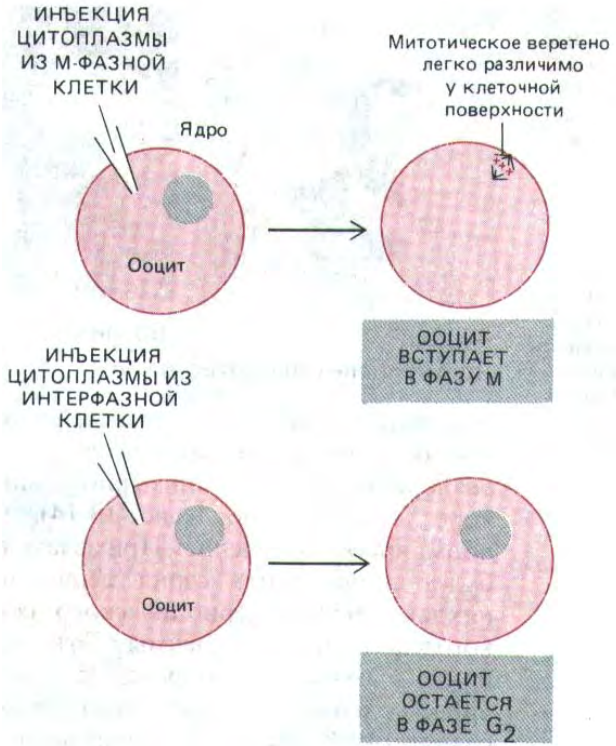


Рис. 13-13. Пробы на MPF путем инъекции в оопит *Xenopus*. Присутствие MPF выявляется благодаря его способности переводить ооцит в фазу М. Крупное ядро («зародышевый пузырек») ооцита разрушается во время образования митотического веретена.

MPF имеет универсальное значение для эукариотических клеток и в эволюции высококонсервативен: экстракты, приготовленные из митотических клеток весьма разнообразных организмов, таких как млекопитающие, морские ежи, моллюски и дрожжи, при введении в ооциты *Xenopus* переводят их в М-фазу. Из зрелых яиц *Xenopus* был получен очищенный препарат с активностью MPF. Он ведет себя как крупный белок, состоящий из субъединиц двух типов; одна из таких субъединиц - протеинкиназа, и она, по-видимому, способна фосфорилировать другую. Поэтому MPF, вероятно, может активировать сам себя: если небольшое количество препарата с активностью MPF инъецировать в ооцит *Xenopus,* клетка отвечает образованием намного большего количества MPF из своих собственных неактивных резервов (разд. 15.3.6). Эти и другие данные позволяют предполагать, что появление и исчезновение активности MPF на протяжении нормального клеточного цикла зависит от модификации белка - от его фосфорилирования и дефосфорилирования, а не от синтеза и распада. Однако для нормального «запуска» активности MPF требуется синтез другого белка, называемого *циклином* (см. ниже); поэтому клетки всех типов неспособны перейти от интерфазы к М-фазе, когда белковый синтез у них блокирован.

По-видимому, многие из молекулярных изменений, происходящих в митозе, осуществляются путем фосфорилирования; MPF-киназа прямо фосфорилирует некоторые субстраты, в частности такие, как гистон H1, что, возможно, способствует конденсации хромосом (разд. 9.2.2); может быть, весь комплекс событий, связанных с митозом, MPF запускает с помощью каскада реакций фосфорилирования.

13.1.11. MPF генерируется цитоплазматическим осциллятором [8, 10, 11]

Резкое увеличение количества MPF, происходящее каждые 30 мин в зародыше *Хеноpш* во время дробления, вызывается цитоплазматичес-

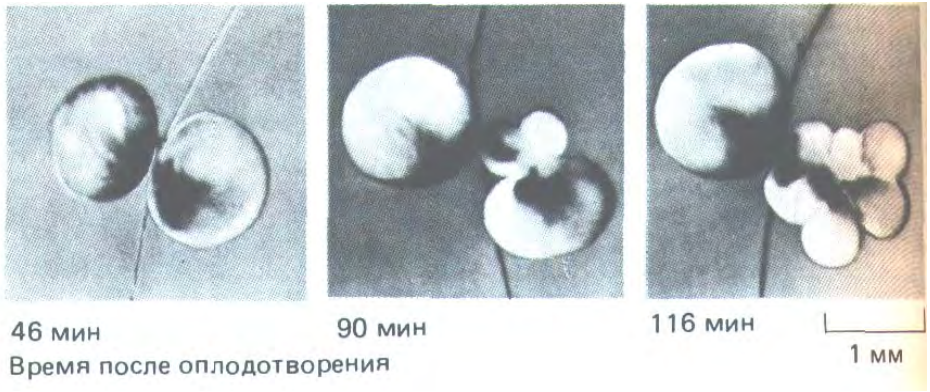


Рис. 13-14. Метод выявления колебательного процесса в цитоплазме, связанного с циклом клеточного деления в дробящемся яйце *Xenopus*. Только что оплодотворенное яйцо перетягивают на две части петлей из тонкого человеческого волоса; одна половина содержит ядро и продолжает делиться, а другая, лишенная ядра, не делится. Результаты фотосъемки показывают, что безъядерная половина периодически изменяет свои размеры за счет изменений жесткости клеточного кортекса. Эти колебания происходят строго синхронно с делениями в другой половине. (K. Hara, P. Tydeman, M. Kirschner, Proc. Natl. Acad. Sci USA 77: 462-466, 1980.)

ким осциллятором, который действует даже в отсутствие ядра. Перетянув активированное яйцо тонким волосом до первого деления, можно разделить его на две примерно равные части, одна из которых содержит ядро, а другая - нет (рис. 13-14). Часть с ядром будет продолжать нормальное дробление. Примечательно то, что и в безъядерной части будет происходить серия осцилляции, выражающихся в повторных циклах легкого периодического сокращения и увеличения жесткости кортикальной цитоплазмы. Эти периодические «спазмы» происходят почти в точности синхронно с делениями дробления другой половины яйца, содержащей ядра. Беря пробы цитоплазмы из осциллирующей безъядерной клетки и испытывая их активность путем инъекции в ооциты, можно показать, что видимые осцилляции сопровождаются (и возможно, вызываются) колебаниями концентрации активного MPF.

Эти и другие эксперименты позволяют предположить, что деления дробления в раннем эмбрионе *Xenopus* включают два параллельных циклических процесса - цикл репликации хромосом и цитоплазматический цикл MPF, которые в норме координированы между собой, так как каждый новый хромосомный цикл может начаться только тогда, когда блокада репликации ДНК будет снята очередным импульсом MPF в М-фазе. Такое взаимодействие между двумя циклами предотвращает возможность того, что хромосомный цикл «забежит вперед»; и оно будет поддерживать согласованное протекание обоих циклов до тех пор, пока нет опасности, что слишком медленный хромосомный цикл не обеспечит полную репликацию ДНК до подъема уровня MPF. В яице *Xenopus c* его необычайно быстрыми S-фазами и регулярными циклами деления такая опасность, по-видимому, мала и простое взаимодействие между циклами кажется достаточным. Однако в клетках млекопитающих, о которых говорилось ранее (и, возможно, в большинстве эукариотических клеток, исключая дробящиеся яйца), есть еще дополнительный механизм: как мы видели, нереплицированная ДНК порождает сигнал задержки М-фазы, который не позволяет цитоплазматическому циклу MPF совершаться быстрее хромосомного цикла. Эксперименты с блокадой репликации ДНК ингибиторами показывают, что в клеточных циклах раннего зародыша *Xenopus* этот дополнительный контроль не работает. Кроме того, судя по редукции фазы G_1, акгиватор S-фазы, по-видимому, присутствует здесь все время. Таким образом, в раннем зародыше *Xenopus* клеточный цикл упрощен и сжат во времени.

Только что описанные явления означают, что цитоплазматический осциллятор, возможно, имеется во всех клетках, но они ничего не говорят о его механизме. Разгадка могла бы быть связана с другим белком - циклином, который был обнаружен в дробящихся яйцах *Xenopus,* морских ежей и двустворчатых моллюсков. Циклин, подобно MPF, принадлежит к небольшой трупе белков, активность которых существенно зависит от фазы клеточного цикла. Хотя циклин синтезируется

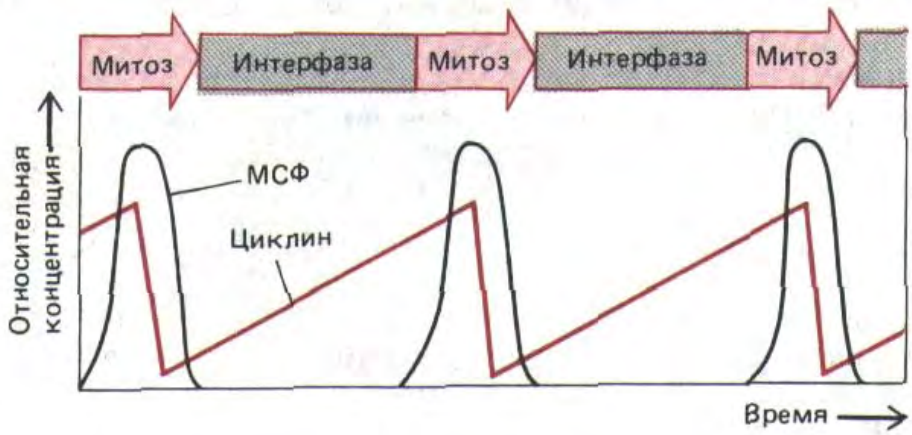


Рис. 13-15. Согласованные подъемы и спады уровней MPF и циклина, связанные с клеточными циклами. Измерения концентрации циклина проводились в основном на яйцах морских беспозвоночных, где циклин составляет 5% белков, синтезируемых во время короткой инкубации с радиоактивными аминокислотами.

с большой постоянной скоростью на протяжении всего цикла, он внезапно распадается в середине М-фазы. Поэтому в каждом цикле его концентрация постепенно возрастает от нуля, а затем резко падает опять до нуля. Гены циклина были клонированы, что позволило приготовить чистую мРНК для этого белка. Когда такую РНК вводят в ооцит *Xenopus,* это оказывает такое же действие, как и инъекция MPF, переводящее ооцит из G_2 в фазу М. Такого рода данные привели к предположению, что подъем MPF в М-фазе вызывается повышением концентрации циклина до некоторого порогового уровня, а разрушение циклина связано с каким-то событием в М-фазе; последующее исчезновение MPF может быть следствием разрушения циклина (рис. 13-15). В таком случае интервал между двумя митозами определялся бы главным образом временем, необходимым для того, чтобы концентрация циклина поднялась от нуля до пороговой величины; при этом клеточный цикл должен был бы останавливаться в интерфазе под действием ингибиторов белкового синтеза, что фактически и наблюдается.

Заключение

Репродуктивный цикл типичной эукариотической клетки можно подразделить на четыре фазы, обозначаемые G_1 (от конца митоза до начала синтеза ДНК), S (синтез ДНК), G_2 (от конца синтеза ДНК до начала митоза) и М (митоз). Каждая S- и М-фаза инициируется растворимым цитоплазматическим фактором [активатором S-фазы и М-стимулирующим фактором (MPF) соответственно]. Активатор S-фазы образуется на протяжении всей S-фазы и может также действовать как фактор, задерживающий подготовку к М-фазе до тех пор, пока не завершится репликация ДНК. М-стимулирующий фактор может быть обнаружен в М-фазных клетках многих организмов - от дрожжей до млекопитающих, и его активность, возможно, регулируется фосфорилированием. В яйцах, быстро подвергающихся дроблению, таких как у Xenopus, клеточный цикл укорочен и упрощен. В этом случае цикл, по-видимому, регулируется взаимосвязанными колебаниями активности MPF и концентрации циклина.

13.2. Дрожжи как модельная система [12]

Дрожжи являются одноклеточными грибами и составляют большую группу довольно разнородных организмов. Поскольку они размножаются почти так же быстро, как бактерии, и размеры их генома меньше 1/1000 генома млекопитающих, они оказались чрезвычайно полезными для генетического анализа клеточной биологии эукариот. Хотя яйца *Xenopus*-исключительно ценный объект для изучения биохимических и цитофизиологических аспектов регуляции клеточного цикла, для генетических исследований этот объект неудобен. Напротив, работа с дрож-

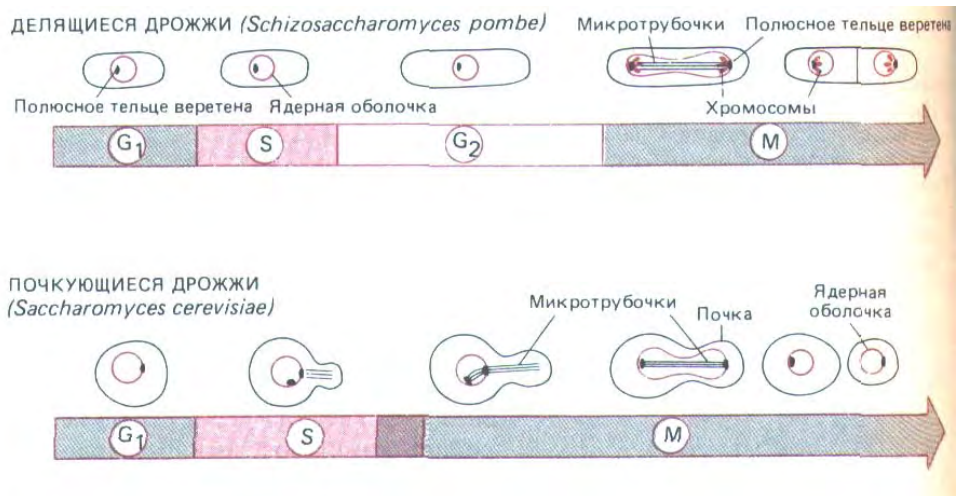


Рис. 13-16. Сравнение клеточных циклов делящихся и почкующихся дрожжей. У *делящихся* дрожжей *(вверху)* типичный цикл эукариотической клетки с фазами G_1, S, G_2 и M. Ядерная оболочка, однако, не разрушается: микротрубочки митотического веретена образуются внутри ядра и прикреплены к *полюсным тельцам веретена* на его периферии. Клетка делится надвое путем образования перегородки (называемой клеточной пластинкой). У *почкующихся* дрожжей цикл включает нормальные фазы G_1 и S, однако состоящее из микротрубочек веретено начинает формироваться очень рано, во время фазы S, и поэтому нормальная фаза G_2 отсутствует. В отличие от цикла делящихся дрожжей здесь во время митоза не происходит видимой конденсации хромосом и клетка делится путем почкования. Как и у делящихся дрожжей (но в отличие от клеток высших эукариот), ядерная оболочка во время митоза сохраняется.

жами открывает широкие возможности для идентификации, клонирования и описания генов, участвующих в контроле клеточного цикла. Мы будем здесь говорить о двух видах: о почкующихся дрожжах *Saccharomyces cerevisiae,* используемых пекарями и пивоварами, и делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe.* Клетки этих последних делятся симметрично на две одинаковые дочерние клетки, а у почкующихся дрожжей они делятся менее распространенным несимметричным образом: материнская клетка производит маленькую почку, которая растет и проходит оставшиеся фазы цикла, прежде чем окончательно отделиться от родительской клетки (рис. 13-16).

Как полагают, эволюционные ветви, приведшие к почкующимся и к делящимся дрожжам, дивергировали сотни миллионов лет назад. Тем не менее жизненные циклы у тех и других сходны. Обе формы могут размножаться либо в диплоидном, либо в гаплоидном состоянии. Диплоидные клетки помимо деления обычным путем способны проходить через мейоз, образуя гаплоидные клетки (см. гл. 15); а гаплоидные клетки наряду с обычным делением могут попарно сливаться между

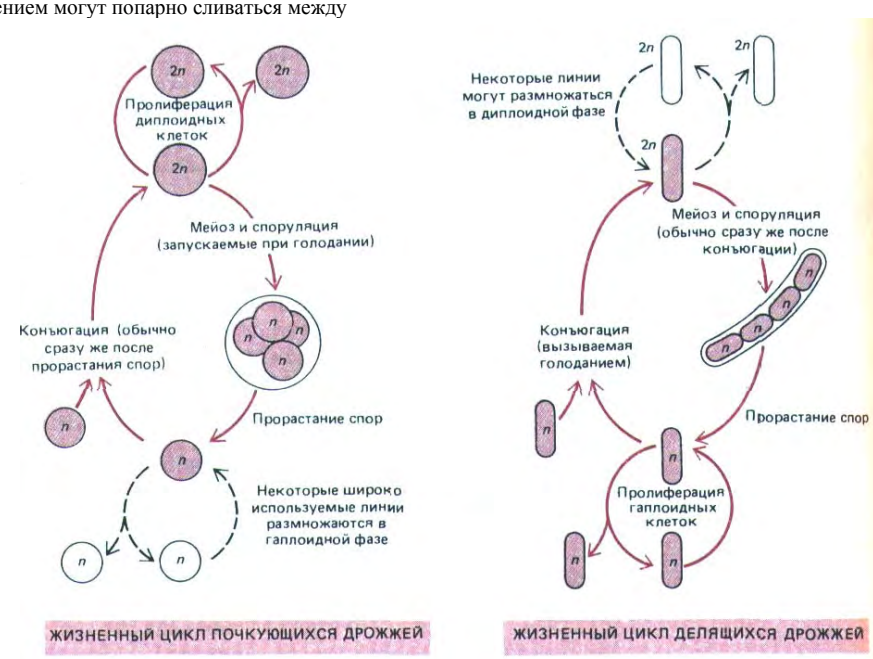


Рис. 13-17. Жизненные циклы почкующихся дрожжей *(Saccharomyces cerevisiae)* и делящихся дрожжей *(Schizosaccharomyces pombe).* Доли жизненного цикла, проводимые в гаплоидной и в диплоидной фазе, меняются от вида к виду и в зависимости от условий среды. При обилии пищи нормальные разновидности дикого типа почкующихся дрожжей размножаются как диплоидные клетки с продолжительностью жизненного цикла около двух часов. При голодании же они претерпевают мейоз с образованием гаплоидных спор, которые в благоприятных условиях прорастают, превращаясь в гаплоидные клетки. Эти клетки в зависимости от условий среды и генотипа либо делятся, либо сливаются (конъюгируют) в фазе G_1, вновь образуя диплоидные клетки. Наоборот, делящиеся дрожжи обычно размножаются в гаплоидном состоянии; при недостатке пищи гаплоидные клетки сливаются с образованием диплоидных клеток, которые быстро проходят мейоз и споруляцию с восстановлением гаплоидной фазы. Наиболее широко используемые лабораторные штаммы почкующихся дрожжей - это мутанты, которые, подобно делящимся дрожжам, размножаются главным образом в гаплоидной фазе.

собой с образованием диплоидных клеток (рис. 13-17; см. также разд. 10.3.2). Наличие гаплоидной фазы облегчает генетический анализ и позволяет выделять мутантов с утраченными функциями; у диплоидного организма такие мутации находились бы в рецессивном состоянии (как это имеет место у культивируемых клеток млекопитающих) и поэтому их было бы труднее выявлять и учитывать. У обоих видов дрожжей в контроле клеточного цикла важную роль играют питание и половой процесс; в связи с этим дрожжи послужат хорошим объектом для рассмотрения общего вопроса о том, как цикл деления регулируется факторами внеклеточной среды.

13-10

13.2.1. Каждая мутация, затрагивающая цикл деления дрожжевой клетки, останавливает или нарушает ход этого цикла в определенной его фазе [12, 13]

Чтобы идентифицировать гены, участвующие в контроле клеточного цикла, нужны соответствующие мутанты и способы получения от них потомства. Однако клетки с нарушенным механизмом клеточного цикла

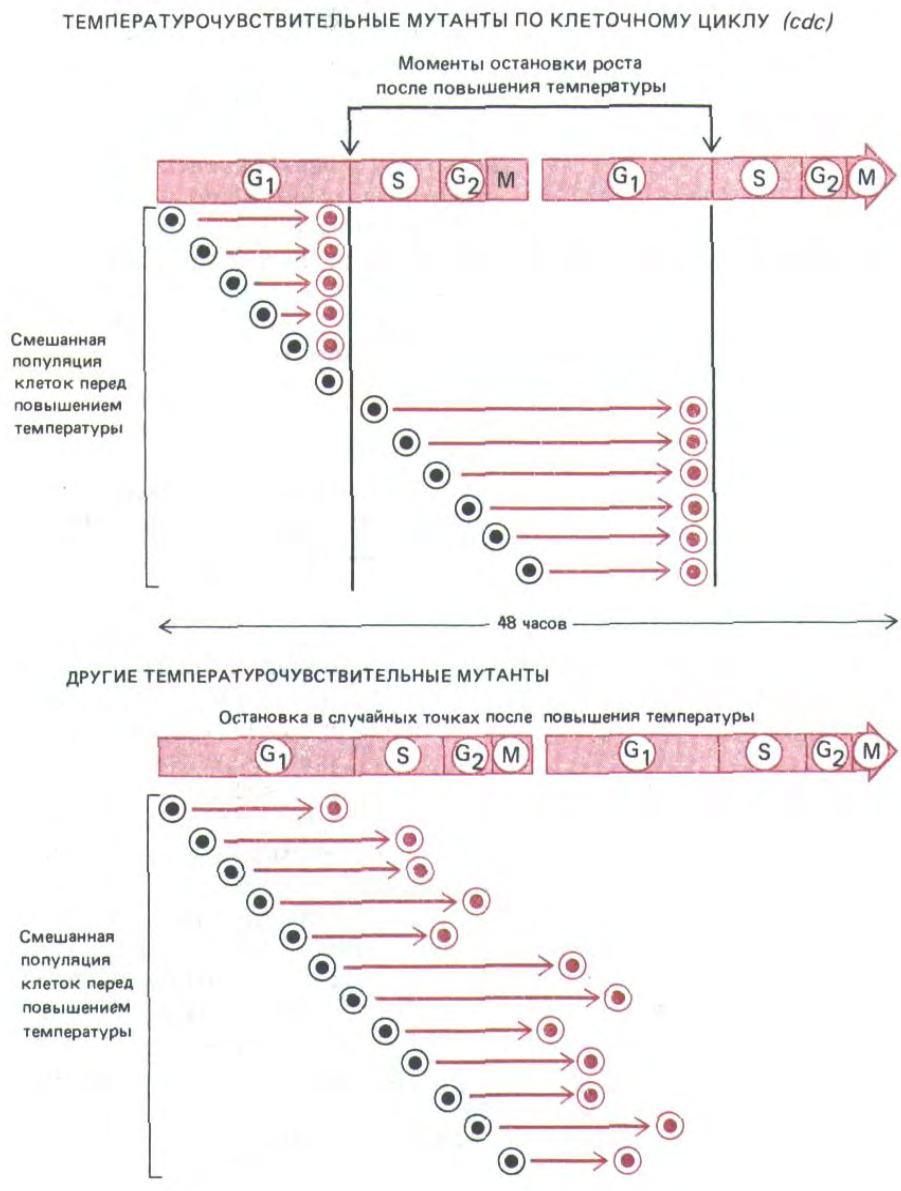


Рис. 13-18. Эти схемы показывают, как можно отличить термочувствительного мутанта с измененным механизмом клеточного цикла *(cdc)* от других термочувствительных мутантов. При повышении температуры до рестриктивного уровня, когда продукт мутантного гена не может функционировать нормально, мутант будет продолжать свой клеточный цикл до тех пор, пока не дойдет до этапа, который он не в состоянии пройти (в данном случае это инициация фазы S). Поскольку, несмотря на блокаду цикла, клетка продолжает расти, мутанты *cdc* становятся ненормально большими (на схеме не показано). Между тем при других мутациях, вызывающих нарушение процессов, необходимых для роста на протяжении всего цикла (таких, как синтез АТР), клетка будет останавливаться в любой стадии цикла, как только она израсходует свои биохимические резервы.

не способны размножаться. Выход из положения состоит в поиске *условных мутантов,* у которых дефект проявляется в фенотипе только при определенных условиях. Обычно ищут генный продукт, молекулярная структура которого слегка изменена так, что он утрачивает свою функцию в одном *(рестриктивном)* диапазоне температур, но сохраняет ее в другом *(пермиссивном)* диапазоне. Для таких *термочувствительных* мутаций низкие температуры обычно бывают пермиссивными, а высокие-рестриктивными. Таким образом, можно получить мутанта при низкой температуре, а затем, подняв ее, выключить измененный ген и исследовать мутантный фенотип.

Мутации, специфически влияющие на отдельные компоненты механизма клеточного цикла, нельзя обнаружить по одной лишь утрате способности мутантных клеток к делению, так как к этому будет приводить любой летальный дефект. Мутации **цикла клеточного деления** *(cdc*-cell-division-cycle) более достоверно выявляются по тому, как они блокируют или нарушают специфическую фазу клеточного цикла при пермиссивной температуре (рис. 13-18). У почкующихся дрожжей наличие и размеры почки служат простым визуальным индикатором, показывающим, какой этап клеточного цикла блокирован у данного мутанта *cdc;* в случае делящихся дрожжей нужны более сложные подходы с использованием методов анализа клеточного цикла, о которых говорилось выше.

У каждого из двух упомянутых видов дрожжей было идентифицировано от 40 до 50 генов *cdc.* В ряде случаев биохимический анализ позволил точно определить функцию генного продукта. Например, некоторые мутанты *cdc,* у которых цикл блокирован в S-фазе, оказались дефектными по генам, кодирующим ДНК-лигазу или ферменты, необходимые для синтеза предшественников ДНК. Как будет описано ниже, общим подходом для характеристики всех белков, кодируемых генами *cdc,* может служить метод рекомбинантной ДНК. Однако некоторые важные моменты можно выяснить даже без этой информации.

13-11

13.2.2. Дрожжевые мутанты *cdc* могут быть использованы для анализа сопряжения между событиями клеточного цикла

Если повысить температуру до рестриктивного уровня, у большинства мутантов *cdc* клеточный цикл останавливается на той стадии, на которой действует продукт гена *cdc.* Как правило, клетка теряет способность переходить к следующей стадии цикла, и это означает, что начало каждого процесса находится в зависимости от завершения предыдущего процесса. Таким образом, у дрожжей, как и у млекопитающих, большинство этапов клеточного цикла, по-видимому, связаны между собой как звенья единой цепи. Эта связь была более тщательно проанализирована в экспериментах с клетками, содержащими разные комбинации различных мутаций *cdc.* Как показали результаты, события хромосомного цикла образуют ряд зависимых друг от друга этапов, который не связан жестко с событиями цитоплазматического цикла (рис. 13-19). Например, хотя цитокинеза не произойдет, если предотвратить деление ядра, тем не менее мутанты *cdc,* не способные пройти цитокинез из-за дефектов в механизме формирования почки, все же осуществляют повторные циклы синтеза ДНК и деления ядра. По-видимому, общим правилом не только для дрожжей, но и для клеток млекопитающих, насекомых и многих других организмов является то, что хромосомный цикл может продолжаться, даже если цитокинез предотвращен. В самом

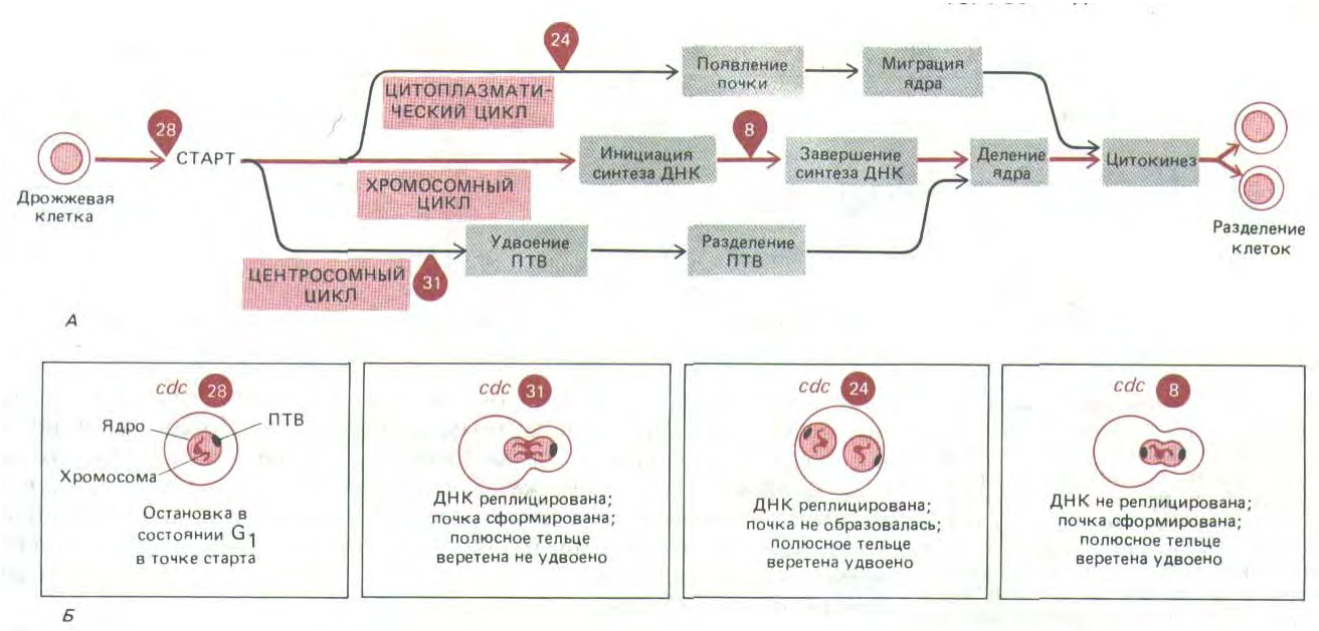


Рис. 13-19. Причинные связи между некоторыми событиями клеточного цикла и их отношение к генам *cdc* у почкующихся дрожжей. Полюсное тельце веретена (ПТВ) у дрожжей является эквивалентом центросомы. «Старт» означает точку бесповоротного вступления клетки в цикл деления и потерю возможности половой конъюгации (конъюгация может осуществляться только в фазе G_1). А.. Общая схема цикла; стрелка, идущая от события *а* (или от событий *а* к *б)* к событию *в,* означает, что событие *е* не может произойти раньше события *а* (или *а* и *б* вместе). Цифрами обозначены специфические мутации *cdc,* которые при рестриктивной температуре приводят к остановке клеток в данной точке цикла. Например, клетки с мутацией *cdc8* останавливаются во время синтеза ДНК. Обратите внимание на то, что *хромосомный цикл* (цикл ДНК), *цитоплазматический цикл* (цикл формирования почки) и *центросомный цикл* (цикл ПТВ) частично независимы. *Б.* Блокированные состояния четырех мутантов *cdc,* указанных на схеме *А,* при высокой температуре. [По данным L. H. Hartwell, J. Cell Biol. 77: 627-637, 1978; J. R. Prmgle, L.H. Hartwell. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces* (J. N. Stern et al., eds.), pp. 97-142. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.]

деле, и в ходе нормального развития таким способом часто возникают многоядерные клетки (разд. 16.5.2).

13.2.3. Регуляция размеров клетки зависит от факторов контроля клеточного цикла, действующих в точке старта

Скорость роста простых свободноживущих организмов, таких как дрожжи, зависит главным образом от поступления питательных веществ. В условиях нехватки пищи дочерние клетки при быстрых циклах клеточного деления становились бы чрезвычайно мелкими; поэтому клеткам необходим механизм, регулирующий скорость прохождения клеточного цикла и, в частности, хромосомного цикла в соответствии со скоростью роста клетки (рис. 13-20). Как осуществляется такая регуляция?

И синтез ДНК, и митоз - это сложные динамические процессы, которые трудно замедлить или прервать в условиях нехватки питательных веществ. У дрожжей, как и у большинства других эукариотических организмов, продолжительность этих фаз цикла остается более или менее постоянной, несмотря на большую изменчивость внешних условий. Вместо этого во время голодания обычно удлиняется фаза G., хотя у делящихся дрожжей имеется также важный регулирующий механизм, называемый *митотическим контролем,* который действует в фазе G_2.

Если продолжительность фазы G_1 может меняться под влиянием внешних факторов, а S-фаза не изменяется, то в G_1 должна существовать критическая точка, где начинается последовательность событий S-фазы, и внешние факторы уже не действуют на дальнейший ход клеточного цикла. Такую критическую точку называют **точкой старта** (Start). Для большинства эукариотических клеток точка старта (или эквивалентная ей *точка рестрикции* у клеток млекопитающих) отмечает момент перехода к безостановочному завершению цикла клеточного деления.

13.2.4. Клетки проходят через точку старта только после достижения критических размеров [14]

Для клетки почкующихся дрожжей в среде, бедной питательными веществами, фаза G_1 является периодом медленного роста, когда хромосомный цикл, видимо, приостановлен; выход из G_1 т. е. прохож-



Рис. 13-20. Зависимость между скоростью роста, размерами клетки и циклом деления у свободноживущего организма, такого как дрожжи. *А.* Если при недостатке пищи клетки продолжают делиться с прежней скоростью, то дочерние клетки после каждого деления будут становиться все мельче до тех пор, пока масса каждой из дочерних клеток не сравняется с тем малым количеством вещества, которое синтезируется за время одного цикла. *Б.* Обычно при нехватке питательных веществ дрожжевые клетки замедляют темп деления: поскольку клетка не может пройти определенную точку цикла, не достигнув некоторых «стандартных» размеров, деление замедляется и величина клеток остается более или менее постоянной. (За единицу времени выбрана наблюдаемая длительность цикла при избытке питательных веществ.)

дение через точку старта, происходит лишь после того, как клетка достигнет некоторых стандартных размеров (рис. 13-20, Б). В более богатой среде G_1 короче, но величина клетки при прохождении точки старта практически такая же; и если подобрать условия роста, при которых дочерние клетки после деления будут ненормально крупными или ненормально мелкими, то они соответственно сократят или продлят время своего пребывания в фазе G_1 так, чтобы пройти через точку старта, имея стандартные размеры.

О том, как клетки «чувствуют» свою величину, мало что известно, хотя многие данные указывают на то, что какой-то механизм для этого существует. Например, если у растущей гигантской амебы *Amoeba proteus* многократно отрезать часть цитоплазмы, не позволяя таким клеткам достичь нормальных размеров, то она не будет делиться даже на протяжении нескольких недель, несмотря на энергичный рост, тогда как контрольная клетка делится примерно раз в сутки. Возможный намек на то, как клетка «ощущает» свои размеры, содержится в том факте, что величина эукариотической клетки обычно пропорциональна ее плоидности: диплоидная клетка в два раза больше гаплоидной, а тетраплоидная в два раза больше диплоидной (см. рис. 13-40 и 13-41). Можно предположить, что решающую роль играет отношение клеточного объема к числу копий какого-то гена (или набора генов) или к общему количеству **ДНК** (а не отношение, скажем, объема клетки к ее поверхности). Например, некая растворимая молекула М (допустим, какая-то **РНК)** могла бы непрерывно синтезироваться **ДНК-зависимым** способом; если М нестабильна с постоянным периодом полужизни, то общее количество М в каждой клетке будет постоянным и будет находиться в определенном соотношении с количеством ДНК. По мере увеличения объема клетки *концентрация* М будет снижаться; падение концентрации ниже некоторого критического уровня могло бы быть сигналом к прохождению точки старта.

Каков бы ни был этот механизм, прохождение через точку старта должно соответствовать скачку в состоянии какого-то молекулярного переключателя. Четыре гена *cdc* у почкующихся дрожжей и два гена у делящихся дрожжей действуют в точке старта или около нее, и они, возможно, кодируют компоненты такого регуляторного механизма. Клетки с термочувствительными мутациями этих генов не смогут вступить в хромосомный цикл и вырастут ненормально крупными, если повысить температуру до рестриктивного уровня, пока они еще не достигли критических размеров, чтобы пройти точку старта. Ниже мы расскажем подробнее об одном из старт-контролирующих генов *(cdc28)* у почкующихся дрожжей и соответствующем ему гене *(cdc2) у* делящихся дрожжей. Эти два гена примечательны одной своей дополнительной функцией, особенно выраженной у делящихся дрожжей: их продукты необходимы не только для прохождения точки старта, но и для второй контрольной точки цикла-начала митоза.

Далее мы увидим, что у клеток высших эукариот в фазе G_1 имеется контрольная точка, аналогичная точке старта, хотя правила прохождения через эту точку сложнее, чем у дрожжей. При нарушении этих правил возникают раковые опухоли. По одной только этой причине гены, участвующие в механизме точки старта, представляют особый интерес.

13.2.5. Прохождение через точку старта зависит от протеинкиназы, родственной М-стимулирующему фактору (MPF) [15]

Дрожжи с их быстрым размножением и простой одноклеточной организацией - привлекательный объект для генной инженерии, и их легко использовать для включения ДНК, добавляемой в питательную среду. В принципе это позволяет клонировать нормальную («дикого типа») форму любого из генов *cdc.* Как показано на рис. 13-21, интересующий нас клон может быть без труда выделен благодаря его способности избавлять соответствующего мутанта *cdc* от его аномалий.

Такой подход был использован для клонирования гена *cdc28* почкующихся дрожжей и гена *cdc2* делящихся дрожжей; при этом было обнаружено несколько удивительных соответствий между этими двумя типами дрожжей и между дрожжами и позвоночными в отношении контроля точки старта и митоза. Гены *cdc2* и *cdc28* у дрожжей гомологичны и по последовательности нуклеотидов, и по функции: у делящихся дрожжей с мутацией гена *cdc2* функциональный дефект можно устранить путем введения гена *cdc28* от почкующихся дрожжей. Более того, у тех же мутантов по *cdc2* сходного результата можно достичь, вводя им клонированный фрагмент ДНК человека, в которой, оказывается, тоже имеется последовательность, гомологичная *cdc2/28.* По-видимому, этот компонент механизма, управляющего клеточным циклом, является общим для дрожжей, млекопитающих и, вероятно, всех других эукариот.

Имея клонированный ген *cdc2/28,* сравнительно легко выделить белок, кодируемый этим геном. Он представляет собой протеинкиназу и, судя по всему спектру структурных и функциональных критериев, видимо, является дрожжевым гомологом киназной субъединицы MPF позвоночных. Кроме того, клонирование гена показало, что другой ген *cdc* делящихся *дрожжей-cdc 13,* продукт которого взаимодействует с продуктом гена *cdc2,* в высокой степени гомологичен гену циклина (разд. 13.1.11). Эти данные показывают, что MPF и циклин, вероятно, имеют универсальное значение в клеточном цикле эукариот; а двойственная роль *cdc2/28* у дрожжей - в начале М-фазы и в точке старта - позволяет предположить, что у позвоночных соответствующая субъединица MPF или близкая к ней молекула тоже может каким-то образом участвовать в контроле инициации цикла деления во время фазы G_1.

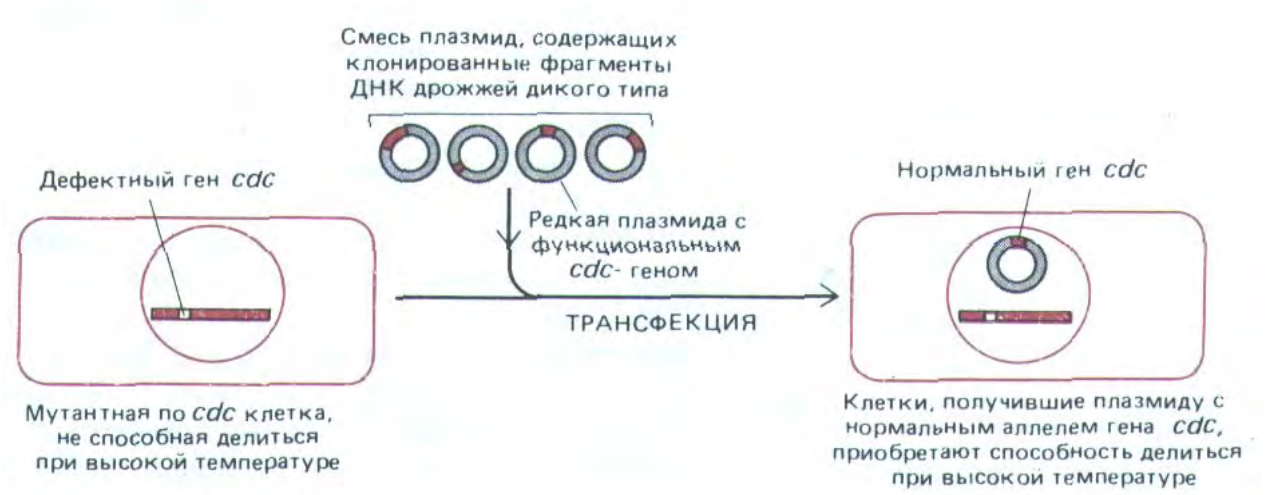


Рис. 13-21. Метод выделения генов *cdc* из библиотеки ДНК. Клон редкой ДНК, содержащей нормальную копию дикого типа определенного гена *cdc,* легко отобрать, так как содержащая его плазмида делает соответствующую мутантную клетку неспособной расти при высокой температуре. И ген *cdc2* делящихся дрожжей, и ген *cdc28* почкующихся дрожжей первоначально были выделены таким способом. Повторяя эту процедуру с клонами кДНК из библиотеки ДНК человека в подходящей плазмиде, удалось выделить гены человека, способные заменять некоторые гены *cdc* дрожжей.

В самом деле, исследования на делящихся дрожжах показывают, что изменения в состоянии фосфорилирования этой регуляторной молекулы могут быть тем механизмом, с помощью которого клетки координируют свою готовность к началу цикла деления с условиями среды.

Заключение

Дрожжи - одноклеточные эукариотические организмы, очень подходящие для генетического анализа. И у почкующихся, и у делящихся дрожжей было идентифицировано множество мутаций, затрагивающих цикл клеточного деления (cdc), и клонированы соответствующие гены дикого типа. У дрожжевых и многих других эукариотических клеток, несмотря на изменчивые условия питания, поддерживаются стандартные размеры клетки с помощью механизма, который препятствует прохождению клетками критической точки (называемой точкой старта) и запускает цикл деления, когда они достигают пороговых размеров. У дрожжей некоторые из ключевых генов cdc, участвующих в этом контроле, были идентифицированы и их нуклеотидные последовательности определены. Один из них (обозначаемый cdc2 у делящихся дрожжей и cdc28-у почкующихся дрожжей) кодирует протеинкиназу, гомологичную MPF; другой ген (cdc!3) кодирует дрожжевой гомолог циклина.

13.3. Регуляция клеточного деления у многоклеточных организмов

У одноклеточных организмов, таких как дрожжи, бактерии или простейшие, отбор благоприятствует тому, чтобы каждая отдельная клетка росла и делилась как можно быстрее. Поэтому скорость деления клеток обычно лимитируется только скоростью поглощения питательных веществ из окружающей среды и переработки их в вещество самой клетки. В отличие от этого у многоклеточного животного клетки специализированы и образуют сложное сообщество, так что главная задача здесь - выживание организма, а не выживание или размножение отдельных его клеток. Для того чтобы многоклеточный организм выжил, некоторые его клетки должны воздержаться от деления, даже если нет недостатка в питательных веществах. Но когда возникает надобность в новых клетках, например при репарации повреждения, ранее не делившиеся клетки должны быстро переключаться на цикл деления; а в случаях непрерывного «износа» ткани скорости новообразования и отмирания клеток всегда должны быть сбалансированы. Поэтому здесь должны существовать сложные регуляторные механизмы более высокого уровня, чем тот, который действует у таких простых организмов, как дрожжи. Этот раздел и посвящен такому «социальному контролю» на уровне отдельной клетки. В гл. 17 и 21 мы познакомимся с тем, как он функционирует в многоклеточной системе для поддержания и обновления тканей тела и какие его нарушения происходят при раке, а в гл. 16 увидим, как еще более сложная система управляет клеточным делением в процессах индивидуального развития.

13.3.1. Различия в частоте деления клеток обусловлены разной длительностью паузы после митоза [16]

Клетки человеческого тела, число которых достигает 10^{13}, делятся с весьма разными скоростями. Нейроны или клетки скелетной мышцы не делятся совсем; другие, например клетки печени, обычно делятся только раз в один или два года, а некоторые эпителиальные клетки кишечника,

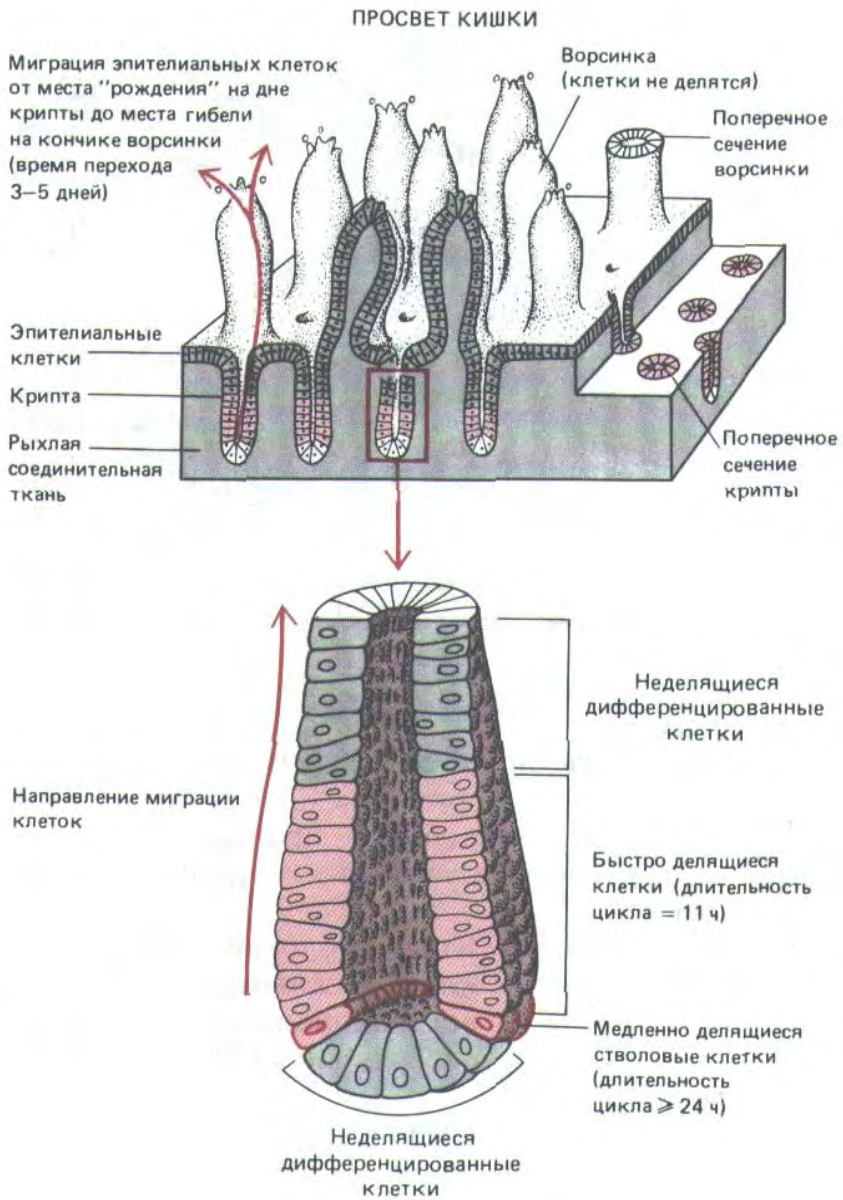


Рис. 13-22. Деление и миграция клеток в эпителиальной выстилке тонкой кишки мыши. Все клеточные деления происходят только в нижней части трубчатых впячиваний эпителия, называемых *криптами.* Новообразованные клетки перемешаются вверх и образуют эпителий кишечных ворсинок, где они осуществляют переваривание и всасывание питательных веществ из просвета кишки. Большая часть эпителиальных клеток имеет короткий период жизни и слущивается с кончика ворсинки не позднее чем через пять дней после выхода из крипты. Однако кольцо примерно из 20 медленно делящихся «бессмертных» клеток (их ядра выделены более темным цветом) остаются связанными с основанием крипты. Эти так называемые стволовые клетки дают при делении две дочерние клетки: в среднем одна из них остается на месте и далее снова функционирует как недифференцированная стволовая клетка, а другая мигрирует наверх, где дифференцируется и входит в состав эпителия ворсинки. (С изменениями из C. S. Pptten, R. Schofield, L G. Lajtha, Biochim. Biophys. Acta 560: 281-299, 1979.)

чтобы обеспечить постоянное обновление внутренней выстилки кишки, делятся чаще чем два раза в сутки (рис. 13-22). Большинство клеток позвоночных располагается где-то в этих временных пределах: они могут делиться, но обычно делают это не так часто. Почти все различия в частоте деления клеток обусловлены разницей в длине промежутка между митозом и S-фазой; медленно делящиеся клетки останавливаются после митоза на недели и даже годы. Наоборот, время, за которое клетка проходит ряд стадий от начала S-фазы до окончания митоза, очень коротко (у млекопитающих обычно от 12 до 24 ч) и удивительно постоянно, каким бы ни был интервал между последовательными делениями.

Время нахождения клеток в непролиферирующем состоянии (так называемой фазе G_0) меняется в зависимости не только от их типа, но и от обстоятельств. Половые гормоны побуждают клетки в стенке матки быстро делиться на протяжении нескольких дней в каждом менструальном цикле, чтобы замещать ткань, утраченную при менструации; потеря крови стимулирует пролиферацию предшественников кровяных клеток; повреждение печени заставляет выжившие клетки этого органа делиться раз или два в сутки, пока не будет возмещена потеря. Точно так же эпителиальные клетки, окружающие рану, приступают к усиленному делению для восстановления поврежденного эпителия (рис. 13-23).

Для регулирования пролиферации клеток каждого типа в соответствии с потребностью существуют тщательно отлаженные и высокоспецифичные механизмы. Однако, хотя важность такой регуляции

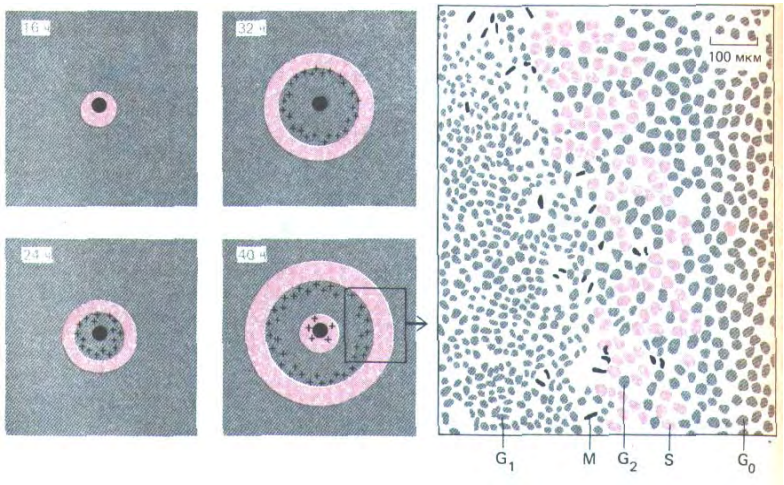


Рис. 13-23. Пролиферация клеток эпителия в ответ на ранение. Эпителий хрусталика повреждали с помощью иглы и спустя определенное время добавляли ^{3}H-тимидин для мечения клеток в фазе S (выделены цветом); затем вновь фиксировали и приготовляли препараты для рідиоавтографии. На схемах слева участки с клетками в фазе S выделены цветом, а с клетками в фазе M - отмечены крестиками; черное пятно в центре - место нанесения раны. Стимуляция клеточного деления постепенно распространяется от раны, вовлекая в деление покоящиеся клетки в фазе G_0, я это приводит к необычно сильной реакции на относительно малое повреждение. На 40-часовом препарате клетки, далеко отстоящие от раны, вступают в фазу S первого цикла деления, тогда как клетки около самой раны вступают в S-фазу второго цикла деления. Рисунок справа соответствует участку, заключенному на схеме слева в прямоугольник; он сделан по фотографии 36-часового препарата, окрашенного для выявления клеточных ядер. (По C. Harding, J. R. Reddan, N.J. Unakar, M. Bagchi, Int. Rev. Cytol. 31: 215-300, 1971.)

очевидна, ее механизмы трудно анализировать в сложном контексте целого организма. Поэтому детальное изучение регуляции клеточного деления обычно проводят на культуре клеток, где легко изменять внешние условия и длительное время наблюдать за клетками.

13.3.2. Когда условия для роста становятся неблагоприятными, клетки животных, так же как и дрожжевые клетки, останавливаются в критической точке в G_1 - в точке рестрикции [17]

При изучении клеточного цикла in vitro в большинстве случаев используются стабильные клеточные линии (разд. 4.3.4), способные размножаться неопределенно долго. Это линии, специально отобранные *для* поддержания в культуре; многие из них - так называемые *нетрансформированные* клеточные линии - широко используются в качестве моделей пролиферации нормальных соматических клеток.

Фибробласты (такие, как различные типы мышиных клеток 3Т3) обычно делятся быстрее, если расположить их в культуральной чашке не слишком плотно и использовать культуральную среду, богатую питательными веществами и содержащую *сыворотку* - жидкость, получаемую при свертывании крови и очищенную от нерастворимых сгустков и кровяных клеток. При нехватке каких-либо важных питательных веществ, например аминокислот, или при добавлении в среду ингибитора белкового синтеза клетки начинают вести себя примерно так же, как описанные выше дрожжевые клетки при недостатке питания: средняя продолжительность фазы G_t возрастает, но на остальной части клеточного цикла все это почти не сказывается. Как только клетка прошла через G_1, она уже неизбежно и без задержки проходит фазы S, G_2 и M независимо от условий среды. Эту точку перехода в поздней фазе G_1 часто называют **точкой рестрикции** (R), потому что именно здесь клеточный цикл еще может приостановиться, если внешние условия препятствуют его продолжению. Точка рестрикции соответствует точке старта в клеточном цикле дрожжей; так же как и у дрожжей, она может отчасти служить механизмом, регулирующим размеры клетки. Однако у высших эукариот ее функция более сложна, чем у дрожжей, и в фазе G_1 может быть несколько слегка различающихся точек рестрикции, связанных с различными механизмами контроля клеточной пролиферации.



Рис. 13-24. Разброс величин длительности клеточного цикла, наблюдаемый обычно *в* гомогенной популяции клеток in vitro. Такие данные получают, наблюдая отдельные клетки под микроскопом и прямо отмечая время между последовательными делениями.

13.3.3. Длительность цикла пролиферирующих клеток, по-видимому, имеет вероятностный характер [18]

Индивидуальные клетки, делящиеся в культуре, можно непрерывно наблюдать с помощью цейтраферной киносъемки. Такие наблюдения показывают, что даже у генетически идентичных клеток длительность цикла весьма изменчива (рис. 13-24). Количественный анализ показывает, что время от одного деления до следующего содержит случайно меняющуюся компоненту, причем изменяется она главным образом за счет фазы G_1. По-видимому, по мере того как клетки приближаются к точке рестрикции в GJ (рис. 13-25), они должны некоторое время «выждать», прежде чем перейти к оставшейся части цикла, причем для всех клеток вероятность в единицу времени пройти точку R примерно одинакова. Таким образом, клетки ведут себя подобно атомам при радиоактивном распаде; если в первые три часа через точку R прошла половина клеток, в следующие три часа через нее пройдет половина оставшихся клеток, еще через три часа - половина тех, что останутся, и т. д. Возможный механизм, объясняющий такое поведение, был предложен ранее, когда речь шла об образовании активатора S-фазы (разд. 13.1.5). Однако случайные изменения длительности клеточного цикла означают, что первоначально синхронная клеточная популяция через несколько циклов утратит свою синхронность. Это неудобно для исследователей, но может быть выгодно для многоклеточного организма: в противном случае большие клоны клеток могли бы проходить митоз одновременно, а поскольку клетки во время митоза обычно округляются и утрачивают прочную связь друг с другом, это серьезно нарушало бы целостность ткани, состоящей из таких клеток.

13-15
13-16

13.3.4. Для пролиферации клеток разного типа требуются разные факторы роста [19, 20]

Условия, при которых клетка будет расти и делиться, для животной клетки значительно сложнее, чем для дрожжевой. Если клетки позвоночных в стандартной искусственной культуральной среде полностью лишить кровяной сыворотки, то они в большинстве случаев не смогут проходить точку рестрикции, даже если в среде имеются все необходимые питательные вещества; при этом они перестанут также и расти. Анализы показывают, что незаменимыми компонентами сыворотки являются высокоспецифичные белки, присутствующие в очень малых концентрациях (порядка 10^{-9} - 10^{-11} М). Клеткам разного типа необходимы разные наборы таких белков. Некоторые из белков сыворотки прямо и специфически участвуют в стимуляции клеточного деления, и их называют **факторами роста.** Таков, например, **тромбоцитарный фактор роста,** или **PDGF** (plateled-derived growth factor). Способ его выделения был подсказан тем фактом, что культивируемые фибробласты делятся при наличии в среде сыворотки, но не делятся в присутствии плазмы-

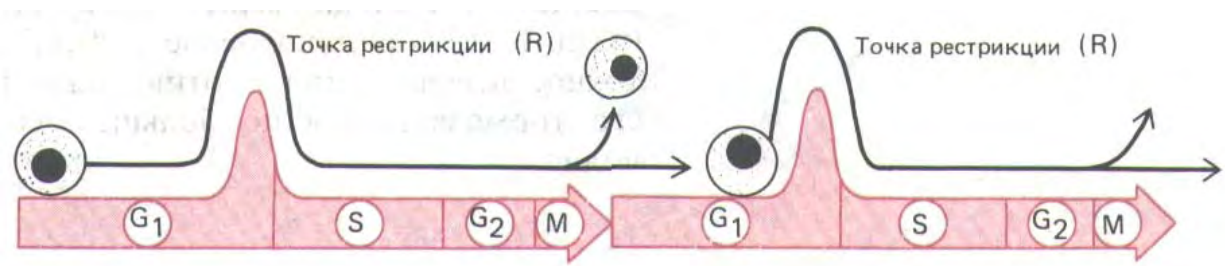


Рис. 13-25. Эта схема показывает, что быстро делящиеся клетки млекопитающих в культуре задерживаются на какое-то время в поздней фазе G_1 в точке, которая, возможно, соответствует точке рестрикции (R). Если белковый синтез блокирован, то они могут оставаться в этой точке неопределенно долгое время. Непрерывное наблюдение над клетками под микроскопом показывает, что генетически идентичные клетки, в том числе и две дочерние клетки - продукты одного деления - часто задерживаются на разное время перед прохождением точки R. Это позволяет думать, что задержка обусловлена каким-то случайным процессом (см. текст).

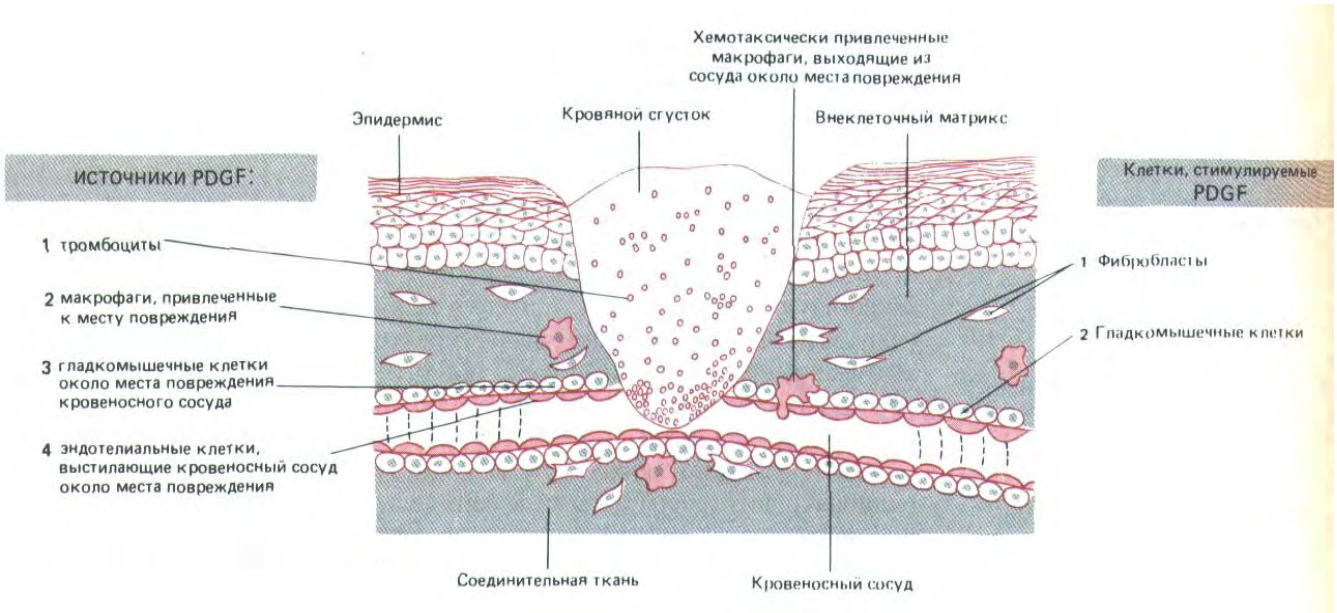


Рис. 13-26. Предполагаемая роль тромбоцитарного фактора роста (PDGF) в заживлении ран. PDGF секретируется в поврежденном участке кровяными пластинками и макрофагами, а также, возможно, эндотелиальными и гладкомышечными клетками пораненных кровеносных сосудов. Он вызывает пролиферацию фибробластов и клеток гладкой мускулатуры, стимулирует фибробласты к дополнительной выработке внеклеточного матрикса и хемотаксически привлекает фибробласты и макрофаги. Заживление - сложный процесс, в котором наряду с PDGF участвуют и многие другие факторы.

жидкого компонента крови, который получают, удаляя кровяные клетки, но не позволяя крови свертываться. При свертывании крови тромбоциты (разд. 17.5) начинают высвобождать содержимое своих секреторных пузырьков, и среди высвобождаемых веществ (наряду с факторами, вызывающими свертывание) оказывается PDGF. В основном именно он делает возможным деление фибробластов в культуре. По-видимому, PDGF обладает таким же действием и в организме, где он стимулирует клетки соединительной ткани и гладкой мускулатуры к делению при заживлении ран (рис. 13-26). Клетки, реагирующие на PDGF, имеют на своей плазматической мембране специальные рецепторы для него (и для некоторых других факторов роста). У клеток иных типов имеются другие наборы рецепторов, взаимодействующие с другими факторами роста (табл. 13-1); некоторые из этих факторов тоже содержатся в сыворотке.

Поскольку факторы роста секретируются в малых количествах, их трудно выделять. Эта трудность усугубляется сложностью их действия, так как большинство типов клеток, видимо, реагирует на специфическую *комбинацию* факторов роста, а не на какой-то один специфический фактор. Хотя до сих пор было охарактеризовано сравнительно немного различных факторов роста (меньше 30), многие из них повторно находили в других условиях и давали им другие названия - только позднее выяснялось, что это были уже известные молекулы. Из этого, возможно, следует, что имеется лишь небольшое число факторов роста, которые, действуя в разных комбинациях, избирательно регулируют пролиферацию каждого из многочисленных типов клеток высших животных; и становится ясно, что те же самые факторы действуют в определенных условиях как регуляторы других процессов, в особенности процессов клеточной дифференцировки. Некоторые факторы роста циркулируют в крови, но большинство действует как локальные химические медиаторы. Класс локальных химических медиаторов, возможно, включает и большое число еще плохо изученных факторов, помогающих регулировать деление и дифференцировку клеток в процессе развития организма (разд. 16.2.3). В дополнение к факторам роста, стимулирующим клеточное деление, есть и противоположно действующие факторы, которые его тормозят, хотя по большей части они охарактеризованы менее полно.

Таблица 13.1. Некоторые факторы роста и их действие

Фактор	Состав	**Типичные эффекты**
Тромбоцитарный фактор роста (PDGF)	AA, AB или BB Цепь А 125 аминокислот Цепь В- 160 аминокислот	Стимулирует деление соединительнотканных клеток (разд. 13.3.4) и клеток нейроглии (разд. 16.3.7)
Фактор роста эпидермиса (ФРЭ, EGF)	53 аминокислоты	Стимулирует деление клеток многих типов (разд. 12.3.13)
Инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I и IGF-II)	70 и 73 аминокислоты соответственно	Действует совместно с PDGF и ФРЭ, стимулируют деление жировых и соединительнотканных клеток
Трансформирующий фактор роста Р (TGF-P)	Две цепи по 112 аминокислот в каждой	Усиливает или подавляет (в зависимости от типа клетки) реакцию большинства клеток на другие ростовые факторы, регулирует дифференциров-ку некоторых клеток (разд. 16.2.3 и 17.7.1)
Фактор роста фибробластов (ФРФ, FGF)	У кислого ФРФ 140 аминокислот, у основного- 146	Стимулирует деление клеток многих типов, включая фибробласты, эндотелиальные клетки (разд. 17.3.7) и миобласты (разд. 17.6.1), индуцирует образование мезодермы у эмбриона *Xenopus* (разд. 16.2.3)
Интерлейкин-2 (IL-2)	153 аминокислоты	Стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов (разд. 18.6.11)
Фактор роста нервов (ФРН, NEG)	Две цепи по 1 1 8 аминокислот в каждой	Способствует росту аксонов и выживанию симпатических нейронов и некоторых сенсорных и центральных нейронов (разд. 19.7.10)
Факторы роста клеток системы кроветворения (IL-3; GM-CSF, M-CSF; G-CSF, эритропоэтин)	См. табл. 17-2 в разд. 17.5.8	

13.3.5. Соседние клетки конкурируют за факторы роста [20, 21]

С помощью таких факторов роста, как PDGF, клетки одного типа могут контролировать пролиферацию клеток другого типа. Но важно и то, что клетки одного и того же типа в ткани взаимодействуют друг с другом и согласовывают скорость деления, чтобы поддерживать надлежащую плотность популяции. «Социальный» контроль такого рода четко проявляется при реакциях на повреждение. Например, когда поврежден эпителий, клетки по краям раны стимулируются к делению (см. рис. 13-23) и наползанию на обнаженную поверхность до тех пор, пока она вновь не будет закрыта; в этот момент быстрая пролиферация и движение клеток прекращаются. Сходное явление можно наблюдать на диссоциированных клетках в культуре. Эпителиальные клетки или фибробласты, помещенные в чашку, в присутствии сыворотки будут «приклеиваться» к поверхности, распластываться и делиться до тех пор, пока не образуется *сплошной монослой,* в котором соседние клетки соприкасаются. После этого нормальные клетки перестают делиться-явление, известное как *торможение пролиферации, зависимое от плотности.* Если такой монослой «поранить» иглой таким образом, чтобы на



Рис. 13-27. Клетки, разбросанные по поверхности культуральной чашки, нормально пролиферируют до тех пор, пока не сольются в непрерывный монослой. На рисунке показана последовательность событий после соскабливания полоски клеток. Клетки по краям «раны» распластываются и возобновляют рост и деление, продолжающиеся до заполнения разрыва между ними. Когда монослой вновь становится непрерывным, клеточная пролиферация почти полностью прекращается.

чашке образовалась свободная от клеток полоска, клетки с краев этой полоски начинают продвигаться на свободное место и делиться (рис. 13-27).

Вначале такие явления объясняли «контактным торможением» клеточного деления, но это, видимо, не отражает сути дела. Плотность клеточной популяции, при которой клетки в сплошном монослое перестают делиться, увеличивается с повышением концентрации факторов роста в среде. Кроме того, оказалось, что если культуральная жидкость будет протекать по поверхности чашки с островками клеток, то клетки, омываемые средой, только что прошедшей над другими клетками, будут делиться медленнее, чем те, которые омываются средой, прошедшей над свободными от клеток участками. Создается впечатление, что в среде, протекавшей над клетками, недостает каких-то важных питательных веществ или факторов роста. Кстати, это можно было бы предсказать. В самом деле, PDGF обычно присутствует в среде в концентрации около 10^{-10} М (примерно одна молекула в объеме сферы диаметром 3 мкм). Один фибробласт имеет около 10^5 рецепторов PDGF, каждый из которых обладает очень высоким сродством к фактору роста. Таким образом, у каждой клетки достаточно рецепторов, чтобы связать все молекулы PDGF в объеме сферы диаметром около 150 мкм. Кроме того, полагают, что значительная часть PDGF, связанного рецепторами клеточной поверхности, быстро поглощается путем эндоцитоза и разрушается (разд. 6.5.12). Из этого ясно, что соседние клетки конкурируют между собой за малейшие количества факторов роста. Такого рода конкуренция была бы важна как для клеток в ткани, так и для культивируемых клеток, - она предотвращала бы рост популяции выше некоторого уровня ее плотности.

13-14

13.3.6. Нормальные животные клетки в культуре перестают делиться при откреплении от субстрата [22]

Конкуренция за факторы роста и питательные вещества - не единственный фактор, влияющий на скорость деления в клеточной культуре. Форма клеток во время их распластывания и движения по поверхности субстрата на свободные места тоже сильно влияет на их способность делиться. При культивировании нормальных клеток в суспензии, когда они не прикреплены к твердой поверхности и поэтому имеют округлую форму, они почти никогда не делятся *(зависимость деления от прикрепления)*. Влияние распластывания клеток на пролиферацию можно продемонстрировать при выращивании клеток на субстратах с различной адгезивностью поверхности или на таких субстратах, где имеются лишь крошечные адгезивные участки, на которых клетка может прикрепиться, но не может распластаться. Частота деления клеток возрастает с увеличением степени их распластывания. Возможно, что сильно распластанные клетки могут улавливать больше молекул фактора роста и поглощать больше питательных веществ благодаря своей большей поверхности. Однако некоторые типы клеток (например, клетки ЗТ3), почти не способные к пролиферации в суспензии, охотно делятся, как только им удается вступить в контакт с участком субстрата, даже если этот участок настолько мал, что клетка не может на нем распластаться (рис. 13-28). Такие «фокальные» контакты являются местами соединения (хотя и непрямого) внутриклеточных актиновых филаментов с молекулами внеклеточного матрикса (разд. 11.2.8). Эти и другие наблюдения определенно наводят на мысль, что контроль клеточного деления каким-то образом связан с организацией цито-

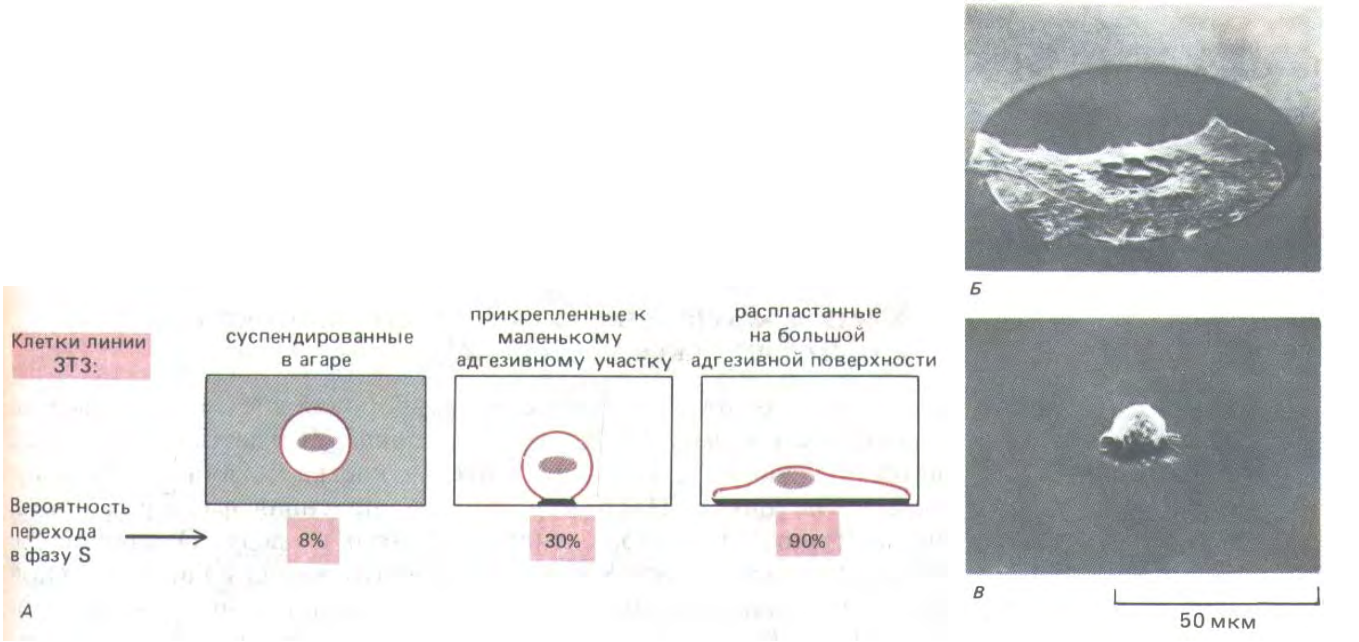


Рис. 13-28. Зависимость клеточного деления от размеров клеток и от их прикрепления. В представленном на этом рисунке опыте клетки растут либо в суспензии, либо прикрепленными к участкам адгезивного материала (палладия) на неадгезивной поверхности; от величины этих участков зависит степень распластывания клеток и возможность их деления. В культуральную среду добавляли ^{3}H-тимидин и спустя 1-2 дня фиксировали культуру и получали радиоавтографы для определения процента клеток, перешедших в фазу S. *А.* Округленные клетки линии 3Т3 в суспензии делятся очень редко, но прикрепление к очень малому участку - такому, что он не позволяет клетке распластаться, дает им возможность делиться значительно чаще. *Б и В.* Снимки, сделанные с помощью сканирующего электронного микроскопа, позволяют сравнить клетку, распластанную на большом адгезивном участке, с клеткой, прикрепленной к маленькому участку. (Фотографии из C. O'Neill, P. Jordan, G. Ireland, Cell 44: 489-496, 1986. Copyright Cell Press.)

скелета. Хотя механизм и функции этой связи не ясны, можно думать, что зависимость деления клеток от их прикрепления, вероятно, позволяет ткани сохранять целостность и предотвращает пролиферацию клеток, обособившихся от нормального окружения.

13.3.7. Деление клеток сопровождается изменениями в межклеточных соединениях

Зависимость между прикреплением клетки и ее делением имеет несколько аспектов. С одной стороны, для большинства нормальных клеток позвоночных необходимо прикрепление, чтобы перейти точку рестрикции; с другой стороны, для клеток, уже прошедших эту точку, для окончания цикла деления прикрепление необязательно - обычно они при этом теряют контакты и округляются, переходя в М-фазу. Этот цикл прикрепления и открепления, вероятно, позволяет перегруппировать адгезивные кантакты как между клетками, так и между клетками и матриксом, чтобы встроить вновь возникшие дочерние клетки в ткань, перед тем как они смогут начать следующий цикл деления.

Ослабление контактов, видимо, составляет важную особенность пролиферативного поведения большинства типов клеток. Например, в ранней стадии реакции фибробластов на PDGF отмечается разрушение их фокальных контактов (разд. 13.4.6). Поразительно то, что потеря управляемости роста у раковых клеток почти всегда связана с необратимым уменьшением клеточной адгезивности, которое проявляется также в потере фокальных контактов при выращивании таких клеток в культуре. Связь между клеточным делением и прикреплением - весьма запутанная проблема, о чем мы будем говорить позднее; этим обусловлен и существенный пробел в нашем понимании трансформации, превращающей нормальную клетку в раковую (разд. 13.4.7).

13.3.8. Клетки, которые не должны делиться, переходят в состояние покоя - G_0 [17, 23]

Когда еще нет предпосылок для деления, здоровая клетка почти всегда будет находиться в фазе G_1 клеточного цикла. Когда обстоятельства становятся благоприятными для митоза, клетка возобновляет свое продвижение по циклу. Например, клетка, лишенная факторов роста, возобновляет цикл при добавлении сыворотки в среду. Однако после добавления сыворотки фаза S начинается почти всегда со значительной задержкой, которая обычно на несколько часов больше общей длительности фазы G_1 у нормально пролиферирующих клеток. Лишение фактора роста переводит клетку в непролиферирующее и сильно измененное состояние, в котором она не может пройти точку рестрикции. Выход из этого состояния представляет собой сложный процесс, требующий много времени и состоящий из ряда стадий, различающихся по чувствительности к факторам роста.

Связь между отсутствием сыворотки и циклом клеточного деления была выяснена при изучении клеток ЗТЗ в культуре. Точку рестрикции в клеточном цикле можно выявить через 3,5 ч после завершения митоза. Отсутствие сыворотки (или воздействие ингибитора белкового синтеза) в течение всего лишь часа в период до этой точки останавливает клетку в фазе G_1 и приводит к тому, что после добавления сыворотки возможна 8-часовая задержка (по принципу «всё или ничего») перед возобновлением цикла. Такое же отсутствие сыворотки после точки рестрикции не приводит к задержке в текущем цикле деления, но такая задержка возникает при прохождении фазы G_1 следующего цикла. Эти наблюдения можно интерпретировать довольно просто. В пролиферативном состоянии клетка содержит набор молекул, которые позволяют ей проходить точку рестрикции; когда точка пройдена, эти молекулы, хотя они обычно остаются, уже не нужны для прохождения фаз S, G_2 и M, которые следуют автоматически. Эти «разрешающие деление» молекулы быстро разрушаются в период отсутствия сыворотки и уже значительно дольше синтезируются заново после ее добавления. Разрушение может происходить в любой фазе цикла, но его последствия никак не проявятся, пока клетка не дойдет до точки рестрикции. Если всё это так, то состояние клетки определяется двумя независимыми параметрами: 1) фазой хромосомного цикла и 2) наличием или отсутствием молекул, разрешающих деление, т.е. определяющих пролиферативное состояние клетки. Клетка, не имеющая «разрешения» делиться, будет неспособна пройти точку рестрикции и остановится в этой точке; говорят, что она остановлена в **состоянии покоя, или в состоянии G_0.**

Исследования на клеточных культурах выявляют роль внешних факторов, обратимо управляющих выбором между пролиферацией и покоем. Однако у многоклеточных организмов клетки многих типов переходят в состояние G_0 в результате окончательной дифференцировки и теряют способность делиться независимо от внешних стимулов. Образование таких клеток обычно регулируется специальными механизмами с участием *стволовых клеток,* о которых пойдет речь в гл. 17.

13.3.9. Хромосомный цикл может становиться независимым от роста клеток [24]

Клетка в состоянии G_0, находясь в покое в отношении хромосомного цикла, в то же время обычно отличается от пролиферирующей клетки также и балансом между синтезом и распадом белков; если делящаяся клетка в фазе G_1 растет, то клетка в состоянии G_0 поддерживает постоянные размеры. Клетки G_0 обычно содержат меньше рибосом



Рис. 13-29. Сравнение размеров нейрона из сетчатки млекопитающего и лимфоцита; обе клетки содержат одинаковое количество ДНК. В процессе развития нейрон растет непрерывно, оставаясь в состоянии G_0. За это время отношение цитоплазмы к ДНК чрезвычайно сильно возрастает (для некоторых нейронов с коэффициентом 10^5). [B. B. Boycott. In: Essay on the Nervous System (B. Bellairs and E. G. Gray eds.). Oxford, U. K. Clarendon Press, 1974]

и меньшее количество РНК, чем соответствующие клетки GJ, и синтез белка у них идет более чем в два раза медленнее. Когда факторы роста стимулируют клетку G_0 к пролиферации, изменение скорости белкового синтеза у нее обычно коррелирует с воздействием на хромосомный цикл: так же как и у дрожжей, рост и деление клетки координируются так, чтобы поддерживались нормальные размеры клеток.

Однако связь между синтезом белка и хромосомным циклом не жесткая. При подходящей комбинации ингибиторов белкового синтеза и факторов роста у культивируемых клеток можно подавить белковый синтез без задержки в прохождении хромосомного цикла или, наоборот, стимулировать синтез белков без стимуляции клеточного деления. Кроме того, специализированные клетки разных типов очень сильно различаются по ядерно-плазменному отношению, и некоторые клетки в состоянии G_0, такие как нейроны, могут почти неограниченно расти без репликации ДНК (рис. 13-29).

13-17

13.3.10. Вероятность перехода в G_0 обычно увеличивается с числом клеточных делений: старение клетки [25]

У млекопитающих и птиц большинство нормальных клеток проявляет поразительную несклонность делиться неопределенно долго. Это отличает их от стабильных культивируемых клеточных линий, таких как ЗТЗ, в которых, видимо, произошли какие-то генетические изменения, делающие их «бессмертными». Например, фибробласты, взятые от человеческого плода, при выращивании в стандартной среде осуществляют только около 50 удвоений популяции; к концу этого периода пролиферация замедляется и затем останавливается, и все клетки, пробыв некоторое время в состоянии покоя, погибают. Такие же клетки, взятые от 40-летнего человека, перестают делиться примерно после 40 удвоений, а от 80-летнего - примерно после 30 удвоений. Фибробласты от животных с более короткой продолжительностью жизни прекращают деление в культуре после меньшего числа циклов. По аналогии со старением организма в целом это было названо клеточным старением. Клеточное старение представляет собой загадочный феномен. Короткие запрограммированные серии клеточных делений, которые заканчиваются дифференцировкой, - характерная особенность эмбрионального развития {разд. 16.3.4), однако трудно представить себе, как клетки могли бы в течение долгого времени отсчитывать свои митотические циклы и останавливаться, пройдя, скажем, 50 делений. Согласно одной из теорий, клеточное старение - это результат катастрофического накопления самовоспроизводящихся ошибок биосинтетических механизмов клетки; эти ошибки несущественны в природных условиях, где большинство животных гибнет от других причин задолго до того, как у них подвергнется старению значительное число клеток. С этой точки зрения клеточное старение просто отражает черты несовершенства в физиологии клетки, которые вполне естественны при очень слабом давлении отбора, направленного на их элиминацию. Однако в этом случае необходимо было бы объяснить, каким же образом клетки зародышевого пути, «бессмертные» клетки культивируемых линий и даже обычные соматические клетки при некоторых специальных условиях (описанных ниже) способны к бесконечной пролиферации. Другая гипотеза состоит в том, что клеточное старение-это результат механизма, который выработался для защиты от рака путем ограничения роста опухолей. Однако подобная защита представлялась бы неэффективной, так как пятидесяти циклов деления вполне достаточно

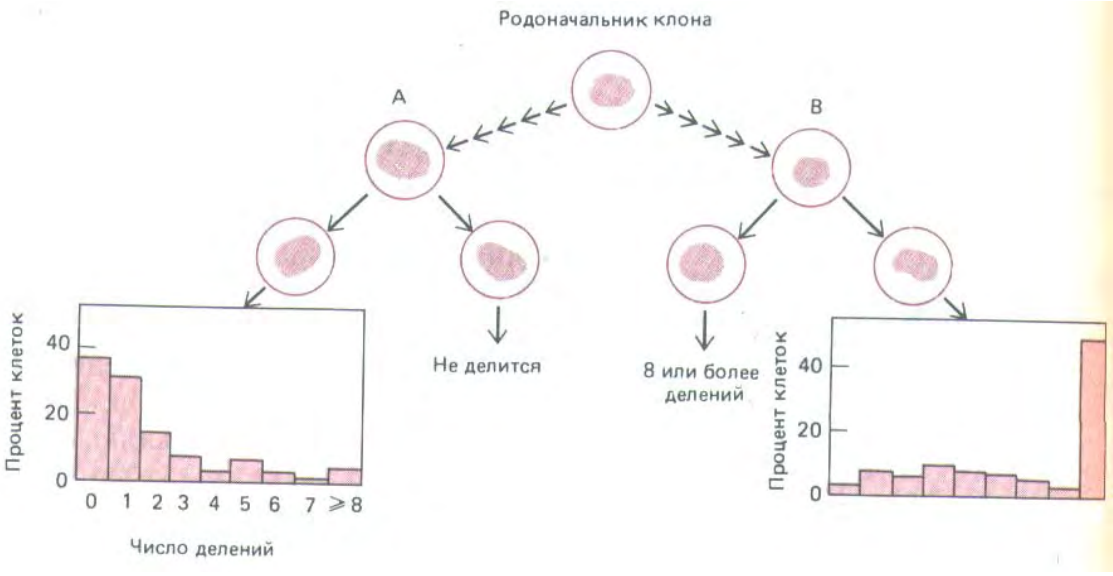


Рис. 13-30. Демонстрация различий в наследуемой способности клеток к делению. Отдельные клетки в клоне, даже будучи генетически идентичными, различаются по числу циклов деления, которые они могут осуществить. Здесь представлены разные пары сестринских клеток из одного исследованного клона, а также гистограммы, показывающие число клеток, проходящих то или иное число делений. Если одна из сестринских клеток не делится совсем, то другая обычно либо тоже не делится, либо проходит мало делений *(слева);* но если одна из сестринских клеток делится 8 и более раз, то другая обычно тоже претерпевает 8 и более делений *(справа)*. Этот пример выявляет наследуемые различия между генетически идентичными клетками по числу циклов деления, которые они способны осуществить. Однако эти различные наследуемые состояния не вполне стабильны, так что иногда сестринские клетки ведут себя по-разному. Дальнейшие исследования показали, что по мере старения популяции в клетках происходят случайные переходы к пониженной способности делиться. (По данным J. R. Smith, R.G. Whitney, Science 207: 82-84, 1980.)

для развития опухоли внушительных размеров. Еще одно предположение состоит в том, что старение клеток в весьма искусственных условиях клеточной культуры отражает тенденцию клеточной пролиферации в организме к постепенному замедлению с возрастом и что такое поведение клеток выработалось как способ стабилизации размеров взрослого организма.

Какова бы ни была функция клеточного старения, есть много данных о том, что на этот процесс сильно влияют факторы внеклеточной среды. Например, эпидермальные клетки из кожи ребенка стареют примерно после 50 циклов деления, если в среде отсутствует фактор роста эпидермиса, и после 150 циклов, если этот фактор имеется. «Бессмертные» клетки ЗТЗ проявляют признаки старения при недостатке факторов роста. Клетки от нормальных мышиных эмбрионов могут продолжать делиться бесконечно без малейших признаков старения, если их поместить в химическую среду определенного состава, содержащую вместо сыворотки набор очищенных факторов роста; добавление же сыворотки приводит к остановке пролиферации. Это позволяет предположить, что старение частично обусловлено какими-то компонентами сыворотки, которые тормозят пролиферацию клеток, перевешивая действие факторов роста.

Некоторые наследственные аномалии у человека, такие как синдром Вернера, приводят к преждевременному старению. Фибробласты, взятые от больных, обычно умирающих раньше 50 лет, в культуре перестают делиться после необычно малого числа митотических циклов. Интересно то, что эти фибробласты нечувствительны к PDGF и фактору роста фибробластов, но могут энергично делиться под действием других факторов роста.

Хотя в клеточной популяции при определенных условиях старение наступает в предсказуемое время, на уровне отдельной клетки оно не является жестко запрограммированным. В клоне по видимости идентичных нормальных фибробластов, растущих в стандартных условиях, одни клетки делятся многократно, тогда как другие - всего несколько раз. Индивидуальные клетки, по-видимому, перестают делиться в результате случайного перехода в иное состояние, вероятность которого возрастает в каждом последующем поколении клеток, пока не наступит момент, когда в популяции совсем не останется делящихся клеток (рис. 13-30).

Исследования на клеточных клонах показывают, что клетки, которые во всех других отношениях идентичны, различаются по способности к делению. Видимо, переход стареющей клетки в непролиферирующее состояние - это просто конечный результат ряда случайно распреде-

ленных во времени этапов ухудшения экспрессии генов, регулирующих готовность клеток проходить точку рестрикции. Молекулярная природа таких событий начинает проясняться благодаря исследованию раковых клеток, которые, помимо прочего, «бессмертны» и не подвержены старению.

Заключение

Клеточное деление у многоклеточных животных зависит от сложных «социальных» регуляторных механизмов, и пролиферация различных типов клеток контролируется различными сочетаниями белковых факторов роста. Они действуют в очень малых концентрациях, и многие из них служат локальными химическими медиаторами, позволяющими регулировать плотность клеточной популяции. Кроме того, большинство нормальных клеток неспособно делиться без прикрепления к внеклеточному матриксу. При недостатке факторов роста или при невозможности прикрепиться к матриксу клетки останавливаются после митоза, переходя в особое состояние покоя —G_0 из которого после добавления факторов роста они могут выйти лишь через несколько часов. Когда клетка вышла из состояния G_0 и прошла точку рестрикции в G_1, она быстро проходит фазы S, G_2 и M независимо от прикрепления или факторов роста. В пролиферирующей клеточной популяции переход через точку рестрикции представляет собой событие типа «всё или ничего», которое, подобно радиоактивному распаду, характеризуется определенной вероятностью осуществления. В дополнение к непосредственному контролю клеточной пролиферации существуют еще долговременные механизмы, приводящие к старению и прекращению деления нормальных соматических клеток млекопитающих в культуре после ограниченного числа циклов деления.

13.4. Гены «социального контроля» клеточного деления [26]

Как мы видели на примере дрожжей, генетика располагает большими возможностями для выяснения молекулярных основ регуляции клеточного деления, если имеются способы отбора мутаций соответствующих генов. У многоклеточных животных мутации генов, непосредственно участвующих в «социальном контроле» клеточного деления (мы будем называть их **генами социального контроля),** выделять нетрудно. Клетка, содержащая одну или несколько таких мутаций, будет продолжать делиться, игнорируя нужды организма как целого, и ее потомство образует макроскопически видимую опухоль.

Раковые опухоли - по определению *злокачественные,* т. е. их клетки не только делятся неконтролируемым образом, но и проникают в другие ткани, где появляются многочисленные вторичные опухоли, или *метастазы.* Для возникновения рака необходимо, чтобы в клетке сначала произошел ряд мутаций, освобождающих ее от воздействия различных регуляторов клеточного деления, а затем накопились дальнейшие изменения, делающие ее способной к инвазии и метастазированию. Эти аспекты рака будут обсуждаться в гл. 21. Здесь же мы не будем пытаться объяснить природу рака, а посмотрим, что можно узнать при изучении раковых клеток относительно тех генов, которые в норме контролируют клеточное деление.

13.4.1. Трансформация клетки в культуре позволяет выявлять гены, участвующие в социальном контроле клеточного деления

Как можно выявить мутантный ген (или гены), если имеется клон опухолевых клеток, возникший предположительно в результате мутации? Классические методы картирования генов здесь неприменимы, так как клетки не размножаются половым путем. Более прямой подход состоит в выделении генетического материала из опухолевых клеток и поиске таких его фрагментов, которые при введении в нормальные клетки вызвали бы у них поведение, сходное с поведением опухолевых клеток. Методы решения столь сложной задачи были впервые разработаны только в конце 1970-х гг., но основой для этого послужили более ранние исследования, касавшиеся очень сходных естественных явлений.

Некоторые виды опухолей вызываются вирусами. Выделенные из них вирусы инфицируют нормальные клетки и, внося в них свою РНК или. ДНК, *трансформируют* эти клетки в опухолевые. Первым из таких **опухолеродных (онкогенных)** вирусов был *вирус саркомы Рауса,* вызывающий соединительнотканные опухоли *(саркомы}* у птиц. Он стал важным объектом исследований, так же как и ряд других онкогенных вирусов, открытых позже.

Природу опухолевой трансформации легче всего изучать на клеточных культурах. Через несколько дней после добавления онкогенного вируса в культуре появляются небольшие колонии аномально пролиферирующих клеток. Каждая такая колония является клоном, происшедшим от одной клетки, инфицированной вирусом и включившей в свой геном вирусный генетический материал. Будучи избавлены от социального контроля клеточного деления, трансформированные клетки растут в культуральной чашке, как и в организме, быстрее нормальных клеток, и поэтому их легко выделить. У трансформированных клеток

Таблица 13-2. Некоторые изменения, часто наблюдаемые при трансформации нормальных клеток в культуре онкогенным вирусом

1. Аномалии, связанные с плазматической мембраной
А. Усиленный транспорт метаболитов
Б. Избыточное образование пузыревидных выступов
В. Повышенная подвижность белков мембраны
2. Изменения в механизмах адгезии
А. Ослабленное прилипание к поверхностям; в результате клетки могут оставаться округленными
Б. Актиновые филаменты не организуются в стрессовые волокна
В. Уменьшение наружной каймы из фибронектина
Г. Повышенная выработка активатора плазминогена, приводящая к усиленному внеклеточному протеолизу
3. Аномалии роста и деления
А. Рост до необычной плотности клеточной популяции
Б. Пониженная потребность в факторах роста
В. Меньшая зависимость от прикрепления (клетки могут расти, даже не прикрепившись к твердой поверхности)
Г. «Бессмертие» (клетки способны делиться неопределенно долго)
Д. Клетки могут вызывать образование опухолей при введении восприимчивым животным

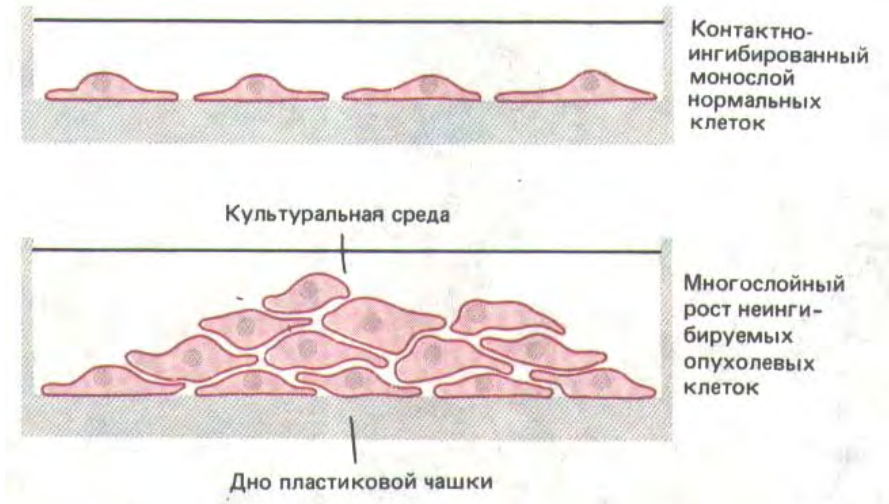


Рис. 13-31. Раковые клетки в отличие от большинства нормальных клеток продолжают **расти и** наползают **друг** на друга, **после** того как образуют **непрерывный монослой.**

нередко обнаруживается целый комплекс аномалий (табл. 13-2): у них отсутствует контактное торможение клеточного деления (разд. 13.3.5) - вместо этого они наслаиваются друг на друга по мере роста культуры (рис. 13-31); для роста им часто не требуется прикрепление, и они способны делиться даже в суспензии; им свойственна более округленная форма, напоминающая форму нормальных клеток в митозе, и слабая адгезия к субстрату и друг к другу; они способны делиться даже в отсутствие факторов роста; они бессмертны и не подвержены старению в культуре; и наконец, если их инъецировать в организм подходящего хозяина, они могут давать начало опухолям.

13-20

13.4.2. Опухолеродные вирусы служат источником легко клонируемых онкогенов [28]

Опухолевый вирус разрушает нормальный контроль клеточного деления, необратимо изменяя генетическую конституцию клетки-хозяина; в результате этого клетка начинает вырабатывать белок, не подверженный воздействию нормальных регуляторных механизмов. Поэтому такие вирусы дают возможность выявлять механизмы, ответственные в норме за контроль клеточного деления. До сих пор наиболее важные результаты были получены при изучении РНК-содержащих опухолевых вирусов, называемых также **ретровирусами.** После заражения клетки ретровирусом на его РНК путем обратной транскрипции синтезируется ДНК, которая затем включается в геном клетки-хозяина. Жизненный цикл ретровируса представлен на рис. 5-75.

Когда ретровирус трансформирует нормальную клетку в опухолевую, аномальное поведение часто бывает обусловлено геном, который (привнесен вирусом, но для выживания и репродукции самого вируса фактически не нужен. Впервые это выяснилось, когда были открыты ' мутанты вируса саркомы Рауса, способные нормально размножаться, но не трансформирующие клетку. Оказалось, что некоторые из этих нетрансформирующих мутантов не имеют гена (или части гена), кодирующего белок с мол. массой 60000. В результате других мутаций этого гена трансформирующее действие вируса может становиться термочувствительным: зараженные клетки проявляют трансформированный фенотип при 34°С, но после повышения температуры до 39°С они быстро (через несколько часов) возвращаются к нормальному фенотипу (рис. 13-32). По-видимому, этот специфический ген в онкогенном вирусе ответствен за клеточную трансформацию (и этим привлекает наше внимание), но является ненужным балластом с точки зрения репродукции самого вируса.

Трансформирующий ген вируса саркомы Рауса, выявленный в этих

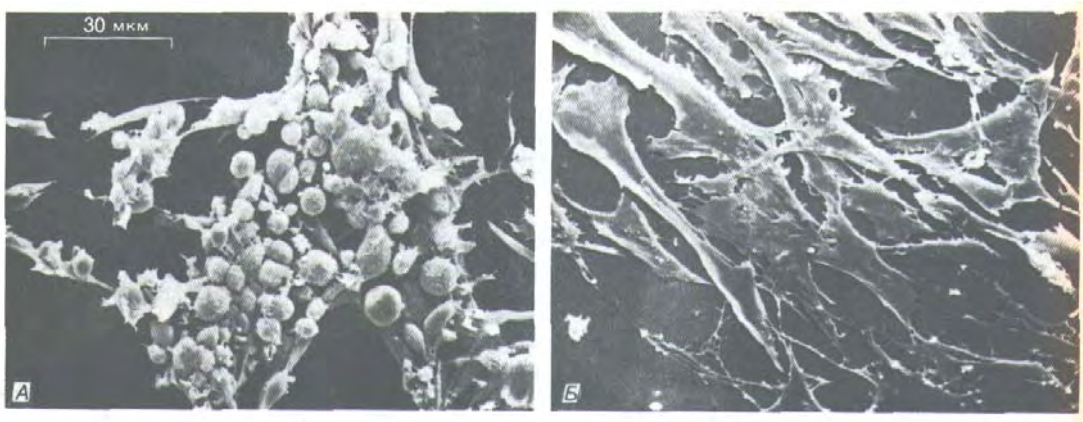


Рис. 13-32. Клетки, инфицированные вирусом саркомы Рауса, несущего термочувствительную мутацию гена, ответственного за трансформацию (онкогена *v-src)* (микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа). *А.* Клетки трансформированы и приобрели аномальную округлую форму при низкой температуре (34 °С), при которой продукт онкогена активен. *Б.* Те же клетки, прочно прикрепленные к культуральной чашке и восстановившие свою нормальную уплощенную форму, после того как продукт онкогена инактивирован повышением температуры (до 39 °С). (С любезного разрешения G. Steven Martin.)

экспериментах, был назван геном **v-src.** Он был отнесен к **онкогенам** (от греч. onkos-масса, опухоль), так как при введении в нормальную клетку он превращает ее в опухолевую. Каково происхождение этого гена и какова его нормальная функция? Когда радиоактивная ДНК-копия вирусного гена *src* была использована как зонд для поиска родственных последовательностей методом ДНК-ДНК-гибридизации (разд. 4.6.7), оказалось, что геномы нормальных клеток позвоночных содержат очень сходную, но не идентичную последовательность. Этот гомолог вирусного гена *src* в нормальной клетке обозначают **c-src** и относят к **протоонкогенам.** По-видимому, вирусный онкоген был когда-то захвачен из генома клетки-хозяина и подвергся мутации. Можно предполагать, что протоонкоген - это один из нормальных генов социального конгроля, а ретровирус, по существу, клонировал его для нас. В настоящее время таким же способом выявлено и проанализировано много других онкогенов, и в каждом случае это привело к открытию соответствующего протоонкогена.

13-21

13.4.3. Опухоли, возникающие разными способами, содержат мутации одних и тех же протоонкогенов [26, 29]

Опухоли часто возникают не от вирусной инфекции, а в результате мутаций, происходящих случайно или же под действием химических канцерогенов или облучения. Из таких опухолевых клеток можно получить очищенную ДНК и проверить ее на наличие онкогенов путем введения в нетрансформированные клетки в культуре in vitro. Для такого теста часто используют клетки ЗТ3, поскольку они неопределенно долго делятся в культуре и содержат мутации, благодаря которым их легко трансформировать добавлением всего лишь одного онкогена. Онкоген, ответственный за такую трансформацию, может быть выделен, клонирован и секвенирован с помощью метода рекомбинантной ДНК (рис. 13-33). Примечательно, что в большинстве случаев, когда это было сделано, онкоген оказывался мутантной формой одного из тех самых протоонкогенов, которые были выделены с использованием ретровируса, хотя при этом было открыто и несколько новых онкогенов.

При помощи сходных методов было установлено, что трансформация может также происходить в результате перепроизводства некоторых нормальных генных продуктов. Часто опухоли содержат неизмененный протоонкоген, избыточная экспрессия которого обуслов-



Рис. 13-33. Метод, позволяющий идентифицировать и клонировать онкогены человека. Онкогены, содержащиеся в образце ДНК, взятом из опухоли человека, выявляются по их способности трансформировать мышиные клетки ЗТ3. Трансформированные клетки ЗТ3 безудержно делятся и распознаются по колониям, которые они образуют в культуральной чашке. Повторяющиеся последовательности семейства *Alu* (разд. 10.5.11) разбросаны по всему геному человека и служат удобным маркером, который можно использовать для идентификации ДНК человека в клетке другого организма. Используемые в качестве ДНК-зонда последовательности *Alu* позволяют клонировать онкоген человека, трансформирующий клетки ЗТ3. При повторном тестировании этим же методом клонированная ДНК, содержащая онкоген, будет очень эффективно трансформировать клетки ЗТ3.

лена либо тем, что он представлен слишком большим числом копий, либо тем, что хромосомная перестройка поставила его под контроль несоответствующего промотора. Эти вопросы будут обсуждаться в гл. 21.

До сих пор идентифицировано более 50 протоонкогенов (разд. 21.2.3, 21.2.4). Они, видимо, составляют значительную часть протоонкогенов нормальной клетки. Однако многие гены социального контроля, вероятно, еще не обнаружены. Фибробластоподобные клетки ЗТ3, обычно используемые в тестах на трансформацию, могут не поддаваться действию того онкогена, который трансформировал какие-то другие виды дифференцированных клеток. Кроме того, тест на клеточную трансформацию позволяет выделять только *доминантные* мутации генов социального контроля, т. е. такие мутации, которые нарушают регуляцию клеточного деления даже при наличии в клетке копий нормального аллеля. Возможно, что в раковых клетках чаще встречаются рецессивные мутации генов социального контроля, обусловленные утратой генной функции, но их нельзя выявить в таком тесте. Поэтому гены, продукты которых в норме помогают стимулировать деление клеток, легче идентифицировать с помощью современных методов, чем те, продукты которых в норме тормозят деление. Тем не менее уже есть данные о том, что гены с тормозящим действием существуют и что их рецессивные мутации нередко бывают причиной клеточной трансформации и рака. Например, после слияния трансформированных клеток с нетрансформированными полученные гибридные клетки очень часто ведут себя как нормальные; по-видимому, контроль клеточного деления у них восстанавливается благодаря появлению белка, которого не было у трансформированной клетки. Поэтому, помня о том, что многие важные гены социального контроля еще не открыты, мы теперь рассмотрим функции уже известных генов.

13-16
13-22

13.4.4. Некоторые протоонкогены кодируют факторы роста или рецепторы факторов роста [26, 30]

Если онкоген клонирован и секвенирован, то указания на вероятную функцию соответствующего гена социального контроля (протоонкогена) часто можно найти, сравнивая последовательности нуклеотидов данного онкогена и уже известных генов. Именно таким путем было открыто,

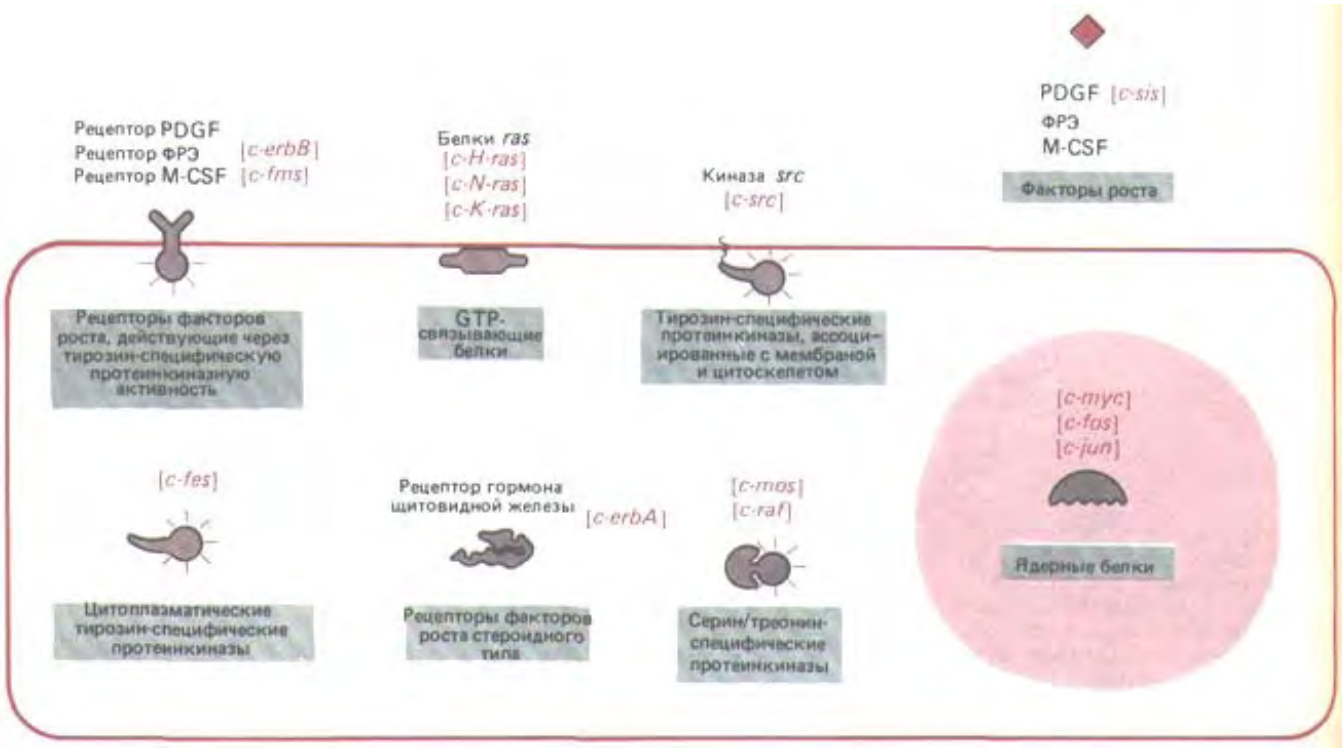


Рис. 13-34. Активность и локализация в клетке основных классов известных протоонкогенов. Названия некоторых типичных протоонкогенов каждого класса выделены цветом. См. также рис. 21-27.

что один из протоонкогенов, *c-sis,* кодирует функционально активную субъединицу фактора роста PDGF. Клетка, содержащая соответствующий онкоген *v-sis,* непрерывно и без надобности вырабатывает эту субъединицу, и она, связываясь с клеточным рецептором для PDGF, все время побуждает клетку к пролиферации. По крайней мере три других протоонкогена - *c-erbB, c-fms* и *c-erbA* - тоже кодируют рецепторы для факторов роста или гормонов: *c-erbB* кодирует рецептор для фактора роста эпидермиса (разд. 12.3.13), *c-fins*-рецептор фактора, стимулирующего рост колоний макрофагов (M-CSF) (этот фактор способствует пролиферации предшественников макрофагов, разд. 17.5.8), а *c-erbA*-рецептор гормона щитовидной железы (разд. 12.2). Превратившись в результате мутаций в онкогены, эти гены будут кодировать измененные рецепторы, которые ведут себя так, как будто присоединили лиганд (даже если его нет), и поэтому стимулируют клетку, когда это не нужно (разд. 12.3.14).

Хотя функции большинства других протоонкогенов еще в точности не известны, можно предполагать, что большинство из них кодирует белки внутриклеточной сигнальной сети, дающей возможность факторам роста стимулировать клеточную пролиферацию. Теперь мы должны рассмотреть, насколько широкий диапазон функций могут осуществлять уже известные группы протоонкогенов, представленные на рис. 13-34.

13.4.5. Некоторые протоонкогены кодируют внутриклеточные медиаторы, участвующие в стимуляции деления клеток

Как уже говорилось в гл. 12, рецепторы для большинства факторов роста, в том числе и PDGF, - это тирозин-специфические протеинкиназы, которые при их активации фосфорилируют сами себя и различные другие белки. Одна группа онкогенов кодирует аномальные формы таких рецепторов, включая только что описанные измененные рецеп-



Рис. 13-35. Эта электронная микрофотография показывает, что протеинкиназа, кодируемая онкогеном *v-src* вируса саркомы Рауса, прикреплена к внутренней поверхности плазматической мембраны; как полагают, белок src, образующийся под действием белка c-src, по-видимому, находится там же, но его труднее обнаружить, так как он обычно присутствует в очень малых количествах. Локализация белка src была определена на этом препарате по его реакции со специфическими антителами, к которым были присоединены электроноплотные частицы ферритина. {С любезного разрешения Ira Pastan; M. C. Willingham, G. Jay, I. Pastan, Cell 18: 125-134, 1979. Copyright Cell Press.)

торы для EGF и M-CSF (рис. 13-34). Другое небольшое семейство сходных протоонкогенов, гены *c-ras,* кодирует белки, которые связывают и гидролизуют GTP и, возможно, отдаленно родственны G-белкам, участвующим в передаче многих типов сигналов (разд. 12.3.11). Действие мутантных генов *ras,* обусловливающих трансформацию клеток, связано с повышенными концентрациями или повышенной эффективностью внутриклеточных медиаторов инозитолтрифосфата и диацилглицерола, и они делают клетку сверхчувствительной к некоторым факторам роста; эти факторы, как полагают, индуцируют выработку упомянутых медиаторов. Гены, гомологичные *ras,* имеются у почкующихся дрожжей, где они участвуют в регуляции цикла клеточного деления в зависимости от количества питательных веществ в среде.

Нормальный ответ животной клетки на стимуляцию факторами роста включает и многие другие внутриклеточные эффекты, в том числе изменения в pH, в концентрациях Ca^{2+} и циклического AMP, в фосфорилировании белков, в транскрипции генов, в процессинге и распаде мРНК, в белковом синтезе и в цитоскелете. Многие из этих изменений происходят за несколько секунд, для других требуются часы. Большинство белковых продуктов протоонкогенов, участвующих в этой сложной сети управляющих систем, пока еще плохо поддаются классификации. Некоторые из них, например упоминавшиеся выше рецепторы для фактора роста, являются тирозин-специфическими протеин-киназами, связанными с мембраной. Другие, например продукт гена *cdc/28* у дрожжей, - это серин/треонин-специфические протеинкиназы, содержащиеся в цитоплазме. Третью категорию составляют белки, находящиеся главным образом в ядре (см, рис. 13-34); один из них, белок c-*jun,* был идентифицирован как регулятор транскрипции AP-1 (разд. 10.2.8, табл. ЮЛ); он может комбинироваться с другим членом того же семейства - белком *c-fos,* образуя с ним комплекс, связывающийся с ДНК.

Другой белок ядерной группы, соответствующий протоонкогену *c-myc,* видимо, может служить показателем того, находится ли клетка в пролиферативном состоянии: в быстро делящихся клетках белок *c-myc* присутствует в постоянной низкой концентрации на протяжении всего цикла, но как только клетка переходит в состояние покоя G_0, он исчезает. Когда в среду с покоящимися клетками добавляют факторы роста, концентрация белка *c-myc* резко возрастает, достигая пика за несколько часов, а затем падает до более низкого ненулевого уровня. В отличие от *c-myc* подавляющее большинство других белков в клетке почти не изменяют своей концентрации при переходе из пролиферативного состояния в стадию покоя или обратно.

13.4.6. Влияние онкогенов на регуляцию клеточного деления тесно связано с воздействием на адгезию клеток [32, 33]

Одним из наиболее интенсивно изучаемых протоонкогенов является *c-src,* соответствующий онкогену *v-src* вируса саркомы Рауса. Он принадлежит к небольшому семейству гомологичных протоонкогенов и кодирует белок *src* - тирозин-специфическую протеинкиназу с мол. массой 60000 (поэтому иначе ее называют $P60^{src}$), которая содержит ковалентно связанную жирную кислоту, прикрепляющую ее к внутренней стороне плазматической мембраны (разд. 8.2.3). В своей онкогенной форме эта киназа сверхактивна, и для того, чтобы она могла вызывать трансформацию клетки, необходимо ее прикрепление к мембране (рис. 13-35). Эксперименты с антителами показывают, что

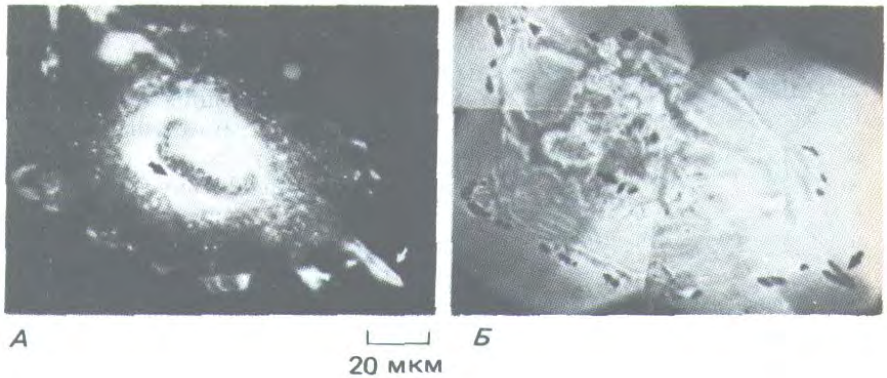


Рис. 13-36. Белок src присутствует во многих участках клетки, но особенно концентрируется, видимо. в фокальных контактах и других местах прикрепления клетки к внеклеточному матриксу. *А.* Иммуно-флуоресцентная фотография, выявляющая распределение белка src по связыванию src-специфических антител. *Б.* Вид той же клетки при использовании метода оптической интерференции, выявляющего места плотного прикрепления клетки к субстрату (темные участки). Распределение светлых пятен белка src на фото *А* соответствует распределению темных пятен прикрепления на фото *Б* (указано стрелками). Эти фотографии показывают распределение вирусного белка src в клетке, трансформированной вирусом саркомы Рауса. По-видимому, белок src, синтезируемый в нормальной клетке, распределяется сходным образом, но его труднее выявить, так как он присутствует в меньших количествах. (L. R. Rohrschneider, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 3514-3518, 1980.)

белок *src* концентрируется в *фокальных контактах,* т. е. в местах, где клетка прикреплена к субстрату при помощи соединений с матриксом, в которых участвуют внутриклеточные актиновые филаменты (рис. 13-36). По-видимому, белок *src* играет роль в прикреплении актина к мембране, поскольку активация термочувствительной разновидности белка *v-src* (путем понижения температуры) сразу же приводит к увеличению складчатости мембраны (в результате движения ламеллоподий при участии актина; см. разд. 11.2.11), а также к ослаблению клеточной адгезии, включающему разрушение фокальных контактов, так что клетка округляется (см. рис. 13-30). Наблюдаемое изменение адгезии объясняют по меньшей мере двумя независимыми воздействиями белка *src.* Первое из них состоит в том, что активная киназа *v-src* фосфорилирует остаток тирозина в находящемся внутри клетки «хвосте» рецептора фибронектина (разд. 11.2.8). Исследования in vitro позволяют предполагать, что это фосфорилирование уменьшает сродство рецептора как к талину (внутри клетки), так и к фибронектину (вне клетки). Кроме того, клетки, трансформированные *v-src,* выделяют большое количество протеолитического фермента, называемого *активатором плазминогена.* Это название связано с его способностью активировать другой протеолитический фермент, *плазмин,* путем расщепления предшественника - плазминогена; однако активатор плазминогена способен и непосредственно разрушать другие белки. Очевидно, и при прямом, и при косвенном воздействии он помогает клетке ослаблять ее прикрепление и мигрировать во внеклеточном матриксе. Когда в культуральную среду добавляют моноклональное антитело к активатору плазминогена, клетки становятся более адгезивными и проявляют тенденцию распластываться на субстрате. Таким образом, чрезмерная активность тирозинкиназы *v-src*$_t$ видимо, ослабляет клеточную адгезию двумя способами: она фосфорилирует рецепторы фибронектина (и другие трансмембранные молекулы из группы интегринов, участвующие в прикреплении клеток к матриксу - см. разд. 14.1.3) и вызывает секрецию протеинкиназы, которая разрушает фибронектин (и другие молекулы матрикса).

Какое отношение могут иметь эти факты к регуляции роста клеток? Если покоящийся фибробласт обработать PDGF, это сразу же вызовет складчатую деформацию и фокальные контакты клеток изменят свою структуру за несколько минут: из этих контактов ненадолго исчезнет винкулин, и прикреплявшиеся здесь пучки актиновых филаментов будут временно разрушены. Таким образом, в стимулируемой к делению покоящейся клетке PDGF вызывает много изменений того же типа, что возникают и под действием *v-src.* В самом деле, среди немедленных изменений, вызываемых PDGF, отмечается и усиленное фосфорилирование белка *c-src,* которое, повышая киназную активность *src,* могло

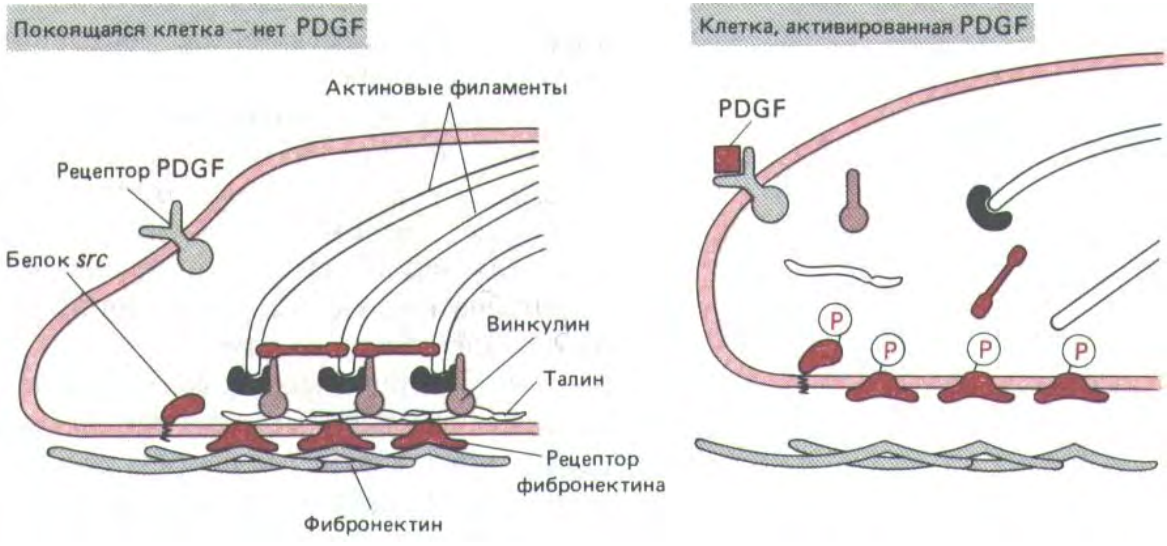


Рис. 13-37. Умозрительная модель, поясняющая, как могли бы происходить быстрые изменения клеточной адгезии при стимуляции клеток к делению фактором **PDGF.** Связывание **PDGF** с его рецептором приводит (пока не известным путем) к фосфорилированию белка c-src. В результате эта протеинкиназа, связанная с плазматической мембраной, активируется и в свою очередь фосфорилирует тирозиновые остатки соседних трансмембранных белков клеточной адгезии, в том числе рецептор фибронектина. Это приводит к тому, что фокальные контакты и другие участки клеточной адгезии частично разрушаются и связанные с ними актиновые филаменты теряют связь с мембраной. Частично эта модель основана на наблюдениях над клетками, трансформированными вирусом саркомы Рауса, которые содержат постоянно активный модифицированный белок src (v-src). Тирозин-протеинкиназы, кодируемые двумя другими протоонкогенами семейства *src - c-abl* и c-yes,- могли бы действовать таким же образом, как белок c-src в описанном выше механизме. Однако такими ферментами обычно фосфорилируется много белков, и не ясно, какие из них играют решающую роль в контроле клеточного деления. Некоторые важные мишени могут быть представлены в клетке одной или несколькими копиями (этого слишком мало для определения их обычными биохимическими методами), и у разных клеток мишени могут быть различными. Кроме того, трудно установить причинные взаимосвязи в сложной сети взаимодействующих компонентов, где многие факторы могут действовать параллельно и один и тот же эффект может достигаться разными способами.

бы прямо объяснить это сходство эффектов (рис. 13-37). С этой точки зрения трансформация клеток онкогеном *v-src* (и многими другими онкогенами с подобным же действием) - это как бы преувеличенный эффект нормального механизма стимуляции роста, который включает и ослабление клеточной адгезии. Опасность онкогенов для организма заключается в том, что в отличие от PDGF, стимулирующего клетку лишь кратковременно, белки, подобные *v-src,* стремятся необратимо вывести клетку из состояния G_0 и таким образом удерживать ее в пролиферативном состоянии.

13.4.7. Связь между клеточной пролиферацией и клеточной адгезией пока еще непонятна [33]

Наше обсуждение контроля нормальной пролиферации клеток позвоночных приводит к парадоксу. С одной стороны, ясно: чтобы выйти из состояния G_0 и начать делиться, нормальные клетки должны формировать адгезивные контакты с субстратом (адгезия между клетками и матриксом). Это наводит на мысль, что трансмембранные белки, связывающие клетки с внеклеточным матриксом (включая рецептор фибронектина и другие белки группы интегринов), создают некий

внутриклеточный сигнал, который облегчает деление клеток, находящихся в соответствующем состоянии. С другой же стороны, адгезия сама по себе еще не достаточна для запуска деления - необходимы еще факторы роста. Парадокс здесь в том, что факторы роста, по-видимому, частично действуют так, что временно ослабляют адгезию, от которой зависит пролиферация нормальных клеток (рис. 13-37). Такое действие заставляет вспомнить о втором наблюдении: во многих случаях недолгая обработка остановленных в росте нормальных клеток протеолитическим ферментом (например, трипсином), приводящая к потере прикрепленными клетками контакта с субстратом и к их округлению, дает еще побочный эффект - запуск одного цикла деления. Видимо, пролиферация клеток кратковременно стимулируется как внеклеточными протеазами, непосредственно ослабляющими адгезию между клетками и матриксом в результате переваривания адгезионных внеклеточных белков, так и факторами роста, которые нарушают эту адгезию косвенно, воздействуя на фокальные контакты через внутриклеточные медиаторы.

Исследования на раковых клетках усиливают этот парадокс. Большинство таких клеток, в том числе и трансформированные хорошо изученными онкогенами, представленными на рис. 13-34, отличаются от их нормальных двойников тем, что для деления им не нужно прикрепляться к субстрату. Поскольку такая независимость от прикрепления дает возможность трансформированным клеткам расти в новых условиях, где нормальные контакты клеток между собой и с матриксом установить нельзя (разд. 13.3.6), можно предполагать, что она явилась результатом естественного отбора клеток, формирующих опухоли. Но почему многие раковые клетки не просто делятся независимо от прикрепления, но не прикрепляются прочно к внеклеточному матриксу даже тогда, когда такая возможность существует? Намек на ответ следует из наблюдений над трансформированными клетками, которые искусственно заставляют прикрепиться к культуральной чашке. Как отмечалось выше, фибробласты куриного эмбриона, трансформированные с помощью *v-src,* выделяют в больших количествах активатор плазминогена, который ослабляет их прикрепление к чашке. Если такие клетки растут в присутствии антитела, блокирующего активность этой протеазы, то они более прочно прикрепляются к чашке и в то же время становятся более подверженными нормальному социальному контролю клеточного деления: вместо образования многослойной структуры они проявляют тенденцию прекращать деление при взаимном контакте. Таким образом, прочное сцепление с внеклеточным матриксом, видимо, тормозит рост этих трансформированных клеток.

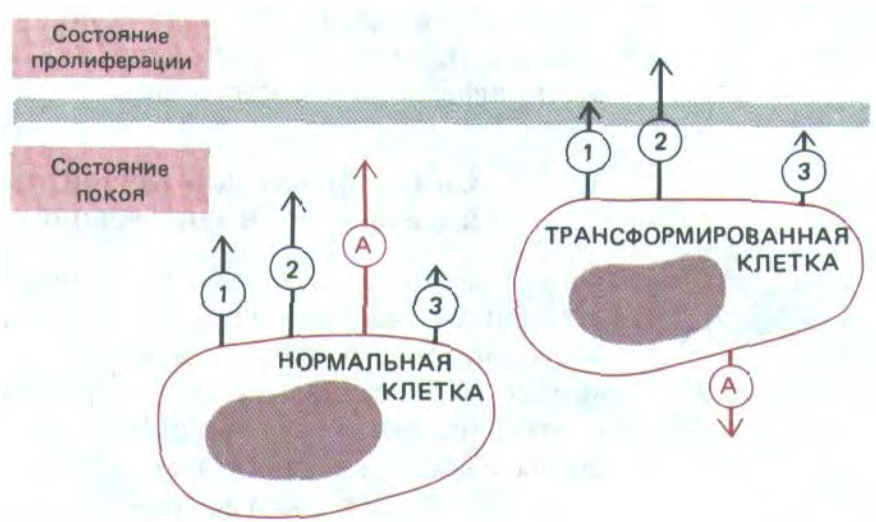


Рис. 13-38. Общая природа сигналов социального контроля, воздействующих на нормальные и трансформированные клетки. В обоих случаях различные факторы роста (обозначенные здесь цифрами 1, 2 и 3) действуют совместно, «поднимая» клетку из G_0 в пролиферативное состояние. Поскольку трансформированная клетка поддерживается в положении, близком к границе перехода (цветная линия), она может часто стимулироваться к пролиферации только одним фактором роста (или очень низкой концентрацией смеси факторов роста). Однако, как отмечалось в тексте, есть существенная разница в эффекте прикрепления (обозначенном как *A)* между этими двумя типами клеток: для пролиферации нормальных клеток прикрепление необходимо, тогда как у трансформированных клеток оно скорее тормозит пролиферацию.

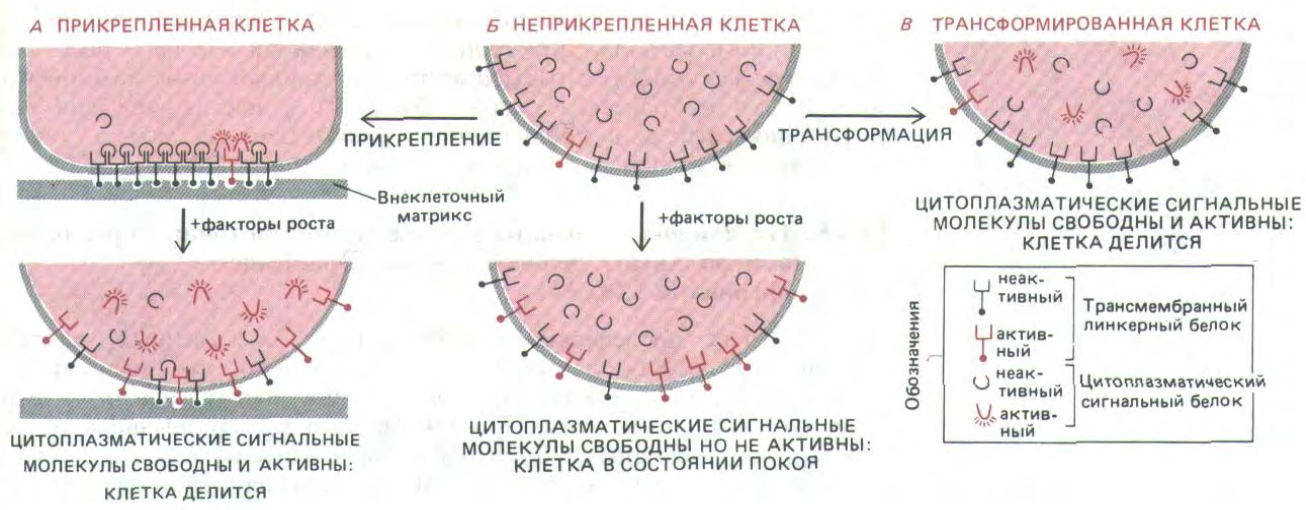


Рис. 13-39. Гипотетическая схема, объясняющая наблюдаемую зависимость пролиферации нормальных и трансформированных клеток от адгезии между клетками и матриксом. Главное внимание уделяется двум типам молекул: 1) цитоплазматическому белку, который служит внутриклеточным сигналом к делению, и 2) трансмембранному линкерному белку, который может связываться как с цитоплазматической сигнальной молекулой по одну сторону клеточной мембраны, так и с внеклеточным матриксом по другую сторону. Это связывание - кооперативный процесс, так что сигнальные молекулы, связавшиеся с линкерным белком внутри клетки, стабилизируют трансмембранную структуру и способствуют ее связыванию с внеклеточным матриксом; и наоборот, связывание с внеклеточным матриксом способствует связыванию сигнальных молекул с линкерным белком внутри клетки. Чтобы клетка получила сигнал к делению, сигнальные молекулы должны быть несвязанными в цитоплазме и находиться в активной конформации, в которой они менее прочно связываются с линкерным белком. Предполагается, что сигнальные молекулы активируются при их фосфорилировании, которое происходит благодаря киназной активности линкерного белка.

Когда прикрепленную клетку стимулируют факторы роста *(А),* включается киназная активность; сигнальные молекулы фосфорилируются и отсоединяются от линкерных белков, что служит для клетки сигналом к делению и ослаблению адгезии. Нормальные клетки в суспензии *(Б)* не делятся при воздействии факторов роста потому, что очень мало сигнальных молекул внутри клетки связывается с линкерными белками, которые могли бы их фосфорилировать. Трансформированные клетки *(В)* отличаются пониженной адгезивностью и могут делиться даже в суспензии, так как в их регуляторной системе имеется «шунт», благодаря которому сигнальные молекулы всегда находятся в фосфорилировашюм состоянии.

Различные условия, необходимые для роста нормальных и трансформированных клеток, и противоположное влияние на них адгезии к клеточному матриксу (рис. 13-38) могут иметь логическое объяснение. Сложная структура, формирующаяся в фокальном контакте между клеткой и субстратом, в каком-то отношении, вероятно, играет очень важную роль в возникновении внутриклеточных сигналов, регулирующих деление клеток. Наблюдаемые явления можно было бы объяснить, предположив, что для нормального запуска деления необходимы три шага: 1) прикрепление клетки к матриксу при участии упорядоченного комплекса цитоскелетных белков, образующегося внутри клетки (разд. 11.2.8); 2) активация этого комплекса, как правило, одним или несколькими факторами роста для создания сигнала к делению; и 3) частичное

разрушение контактов клетки с матриксом, как этап, необходимый для подачи такого сигнала. Для трансформированной клетки первый шаг становится ненужным, и разъединенные внутриклеточные компоненты контактов с матриксом будут необходимы и достаточны для возникновения сигнала к пролиферации. Гипотетическая модель такого механизма регуляции роста представлена на рис. 13-39.

13.4.8. Позиционные сигналы и автономные клеточные программы контролируют деление клеток в растущем организме [20, 34]

Эксперименты, проведенные в упрощенных искусственных условиях клеточной культуры, дают нам многое из того, что мы знаем о молекулярных механизмах, контролирующих рост и деление клеток у многоклеточных животных. Пока эта работа, однако, выявила только некоторые из основных «болтов и гаек» значительно более сложной системы социального контроля, которая должна действовать в интактном организме для регулирования пролиферации каждой группы клеток в соответствии с ее пространственным положением и предшествующим ходом развития.

Обсуждая проблему клеточного старения, мы высказали мысль, что клетками часто управляют долговременные внутриклеточные программы, поэтому текущее пролиферативное поведение клетки зависит от предыстории воздействия определенных факторов за много клеточных поколений до этого (разд. 13.3.10). Хотя взаимоотношения между долговременными и кратковременными механизмами контроля все еще остаются загадкой, по-видимому, в тех и других участвует много одинаковых молекул, в том числе факторов роста и продуктов протоонкогенов. В процессе эмбрионального развития программы деления клеток могут быть удивительно сложными и четкими. Это ярко продемонстрировано, например, на нематоде *Caenorhabditis elegans,* оплодотворенное яйцо которой делится так, что производит в точности 959 ядер соматических клеток взрослого животного; уже начато изучение некоторых генных продуктов, участвующих в реализации этой программы (разд. 16.3.3).

Однако не следует предполагать, что рост зародыша регулируется простым подсчетом клеточных делений. Это стало ясно, например, при сравнении тритонов разной плоидности. Клетки пентаплоидного тритона примерно в пять раз крупнее клеток гаплоидного, но благодаря тому, что их в каждой ткани в пять раз меньше, чем у гаплоида, размеры

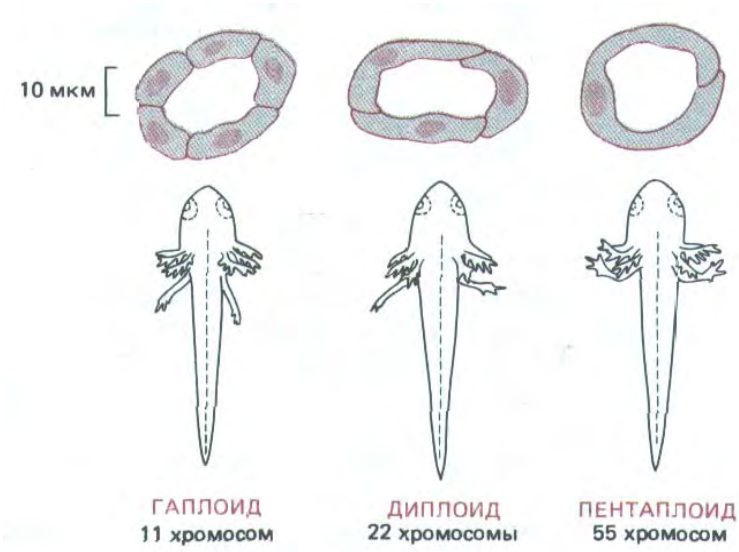


Рис. 13-40. Вверху изображены типичные срезы почечных канальцев аксолотлей разной плоидности. У пентаплоидных аксолотлей клетки крупнее, чем у гаплоидных, однако сами животные и их органы имеют одинаковые размеры, так как каждая ткань пентаплоидного животного состоит из меньшего числа клеток. Это указывает на то, что размеры клеток регулируются каким-то механизмом, в основе которого лежит учет размеров и расстояний, а не числа делений или числа клеток. [G. Frankhauser, In: Analysis of Development (B. H. Willier, P. A. Weiss, V. Hamburger, eds.), pp. 126-150. Philadelphia, Saunders, 1955.]

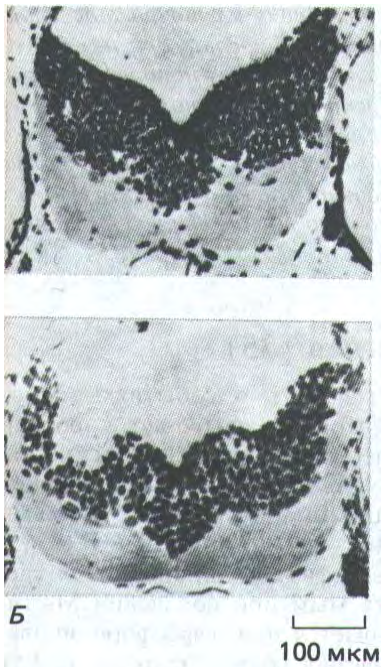


Рис. 13-41. Микрофотографии срезов мозга гаплоидного и тетраплоидного аксолотлей (см. также рис. 13-40). *А.* Поперечный срез заднего мозга гаплоидного аксолотля. *Б.* Соответствующий срез мозга тетраплоидного аксолотля; видно, что уменьшенное число клеток компенсируется увеличением их размеров. (G. Frankhauser, Int. Rev. Cytol. 1: 165-193, 1952.)

тела и органов у обоих животных практически одинаковы (рис. 13-40 и 13-41). Очевидно, у позвоночных механизмы контроля клеточного деления, регулирующие размеры тела, основаны на измерении длин, а не на простом подсчете числа клеток или циклов деления. Такие механизмы нуждаются в сложном позиционном контроле, в котором важную роль могли бы играть диффундирующие факторы роста.

Позиционный контроль клеточного деления может работать с удивительной специфичностью. Когда часть эпителия ножки одного таракана пересаживают на гомологичный участок другому, она «вживляется» без заметного деления клеток. Однако если ее трансплантировать в негомологичное место, то и клетки трансплантата, и соседние клетки хозяина начинают делиться, а затем дифференцируются с образованием таких клеток, которые в норме лежали бы между участком, откуда был взят трансплантат, и участком, куда он был пересажен (разд. 16.4.9). Молекулярная основа такого поведения совершенно не известна.

Вообще деление клеток в процессе эмбрионального развития регулируется при совместном участии как автономных клеточных программ, так и межклеточных взаимодействий, но важность каждого из этих факторов меняется от вида к виду и от одной части тела к другой. В зрелых тканях клеточное деление тоже регулируется сложной сетью различных механизмов: при заживлении глубокой кожной раны у позвоночных, чтобы возместить потерю ткани, должны регенерировать в надлежащих количествах около 12 типов клеток, начиная с фибробластов и кончая шванновскими клетками. Кроме того, в системе социального контроля существует избыточность с многочисленными ограничителями, действующими параллельно так, чтобы утрата одного контролирующего компонента в одной клетке (обычно это результат соматической мутации) не повредила целому организму вследствие появления огромного клона интенсивно делящихся клеток. Исследования в области рака показывают, что в данной клеточной линии должно произойти от четырех до шести мутаций, прежде чем она даст начало злокачественной опухоли (разд. 21.1.4).

Изучение молекулярных деталей тщательно отлаженных механизмов социального контроля, позволяющих развиться и существовать во взрослом организме такому органу, как почка, видимо, потребует работы нескольких поколений клеточных биологов. Теперь, однако, стали доступными такие мощные средства, как антитела, блокирующие специфические факторы роста или рецепторы, и получение трансгенных животных, у которых вырабатываются сигнальные молекулы, несвойственные определенным типам клеток (разд. 5.6.10). Благодаря таким новым подходам задача, хотя и труднейшая, уже не кажется неразрешимой.

Заключение

Аномальные клетки, не повинующиеся социальным сдерживающим факторам, пролиферируют с образованием опухолей в организме; они также появляются при трансформации в культуре клеток. Хотя это часто приводит к гибели всего организма, как индивидуальные клетки они получают селективное преимущество, и поэтому их легко выделять. Трансформация клетки часто сопровождается мутацией или сверхэкспрессией специфических онкогенов, во многих случаях выявленных благодаря их наличию в РНК опухолевых вирусов (ретровирусов). Нормальные гомологи таких вирусных онкогенов в здоровых клетках, называемые протоонкогенами, по-видимому, кодируют ключевые ком-

поненты нормальной системы социального контроля клеточного деления. Некоторые протоонкогены кодируют факторы роста, другие - рецепторы для этих факторов или внутриклеточные регуляторные белки, участвующие и клеточной адгезии, а третьи — белки, помогающие передавать сигналы клеточного деления в ядро клетки. Чтобы клетка превратилась в раковую, в ней должны подвергнуться изменению многие гены социального контроля, что указывает на избыточность сложных регуляторных систем, влияющих на клеточную пролиферацию в тканях.

13-29

13.5. Механика клеточного деления [35]

В этом последнем разделе мы будем говорить о событиях в фазе М - кульминации клеточного цикла. В этот сравнительно короткий период хромосомы конденсируются, а содержимое родительской клетки, удвоившееся благодаря синтетической активности в предшествующей интерфазе, распределяется между двумя дочерними клетками (рис. 13-42).

По-видимому, на молекулярном уровне фаза М инициируется каскадом фосфорилирования белков, запускаемым при появлении М-стимулирующего фактора (MPF), и заканчивается при дефосфорилировании, которое возвращает белки в их интерфазное состояние (разд. 13.2.5). В свою очередь фосфорилирование белков в течение М-фазы, вероятно, ответственно за многие морфологические изменения, сопровождающие митоз, в том числе и за конденсацию хромосом, разрушение ядерной оболочки и изменения цитоскелета, описанные ниже. Первое хорошо видимое проявление наступающей фазы М состоит в постепенном уплотнении дисперсного интерфазного хроматина в нитевидные хромосомы. Эта конденсация хромосом необходима для их последующего упорядоченного расхождения в дочерние клетки и сопровождается фосфорилированием многочисленных молекул гистона H1, имеющихся в клетке (до шести фосфатных групп на одну молекулу HI). Поскольку гистон HI присутствует в количестве примерно одной молекулы на нуклеосому и известно, что он участвует в упаковке нуклеосом (разд. 13.2.5), то его фосфорилирование киназой MPF (разд. 9.1.12) в начале фазы М должно быть главной причиной конденсации хромосом. Такое молекулярное объяснение, пока еще гипотетическое, показывает, на каком уровне в конечном счете должен описываться весь клеточный цикл.

Кто-то сказал, что хромосомы в митозе напоминают покойника на похоронах: они дают повод для действий, но не принимают в них активного участия. Активная роль принадлежит двум особым цитоскелетным структурам, которые временно образуются в М-фазе. Первым появляется двухполюсное **митотическое веретено,** состоящее из микротрубочек и связанных с ними белков. Сначала оно выстраивает реплицированные хромосомы в плоскости деления клетки; затем каждая хромосома разделяется на две дочерние, которые разводятся нитями веретена к противоположным сторонам клетки. Вторая цитоскелетная структура, необходимая в М-фазе животных клеток, - это **сократимое кольцо** из актиновых и миозиновых филаментов, появляющееся чуть позже под плазматической мембраной. Это кольцо втягивает мембрану внутрь, разделяя клетку на две, и тем самым обеспечивает, что каждая дочерняя клетка получит не только один полный набор хромосом, но и половину содержимого цитоплазмы и органелл родительской клетки. Эти две цитоскелетные структуры содержат разные наборы белков и в некоторых специализированных клетках могут формироваться независимо друг от друга. Однако их образование обычно тесно скоординировано,

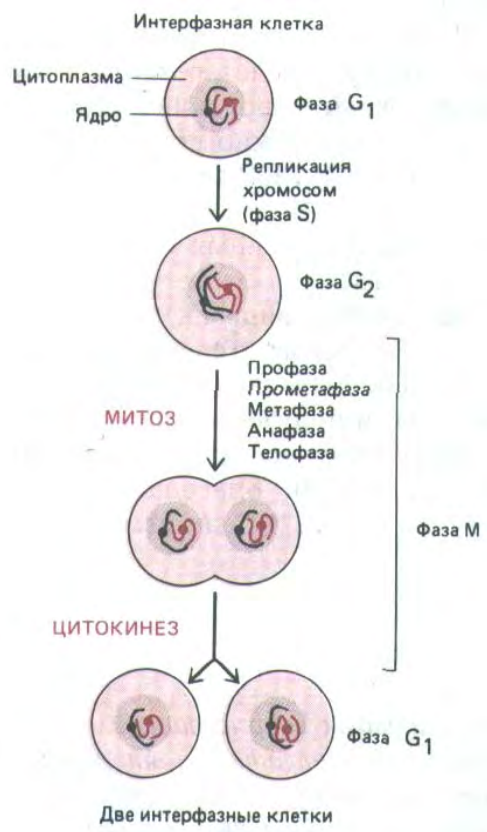


Рис. 13-42. М-фаза клеточного цикла начинается после фазы G_2 и заканчивается к началу фазы G_1 следующего цикла. Она состоит из пяти стадий деления ядра (митоза) и деления цитоплазмы (цитокинеза).

так что разделение цитоплазмы *(цитокинез)* происходит сразу же после окончания деления ядра *(митоза)',* последнее относится и к растительным клеткам, хотя, как мы увидим, их жесткие стенки требуют иного механизма цитокинеза.

В сделанном только что описании речь шла об зукариотических клетках. Клетки бактерий не содержат ни актиновых филаментов, ни микротрубочек; в них обычно имеется только одна хромосома, и после ее репликации две копии распределяются между дочерними клетками с помощью механизма, который связан с прикреплением хромосомы к плазматической мембране бактерии (см. разд. 13.5.18). Сложный митотический аппарат, вероятно, стал необходим лишь с появлением клеток, содержавших гораздо большее количество ДНК в нескольких отдельных хромосомах. Главное назначение этого аппарата - точно распределять реплицированные хромосомы между двумя дочерними клетками. Точность такого распределения была исследована на дрожжевых клетках, и оказалось, что одна ошибка приходится примерно на 10^5 клеточных делений.

13.5.1. М-фазу традиционно подразделяют на шесть стадий [35]

Основная стратегия деления клеток у зукариотических организмов удивительно постоянна. Первые пять стадий фазы М составляет митоз, шестой является цитокинез. Эти шесть стадий образуют динамическую последовательность, сложность и красоту которой трудно оценить по описаниям или по серии статических изображений. Описание митоза основано на наблюдениях двоякого рода: на результатах световой микроскопии живой клетки (нередко в сочетании с микрокиносъемкой) и на данных световой и электронной микроскопии фиксированных и окрашенных клеток. Различные стадии клеточного деления кратко описаны на схеме 13-1. Пять стадий митоза - *профаза, прометафаза, метафаза, анафаза* и *телофаза* - осуществляются в строго определенном порядке; цитокинез начинается во время анафазы и продолжается до конца митотического цикла (рис. 13-43). Световые микрофотографии деления типичной животной и типичной растительной клеток приведены на рис. 13-44 и 13-45 соответственно.

В животном и растительном царствах встречаются бесчисленные вариации всех стадий деления, обобщенно представленных на схеме 13-1. Мы будем упоминать некоторые из этих вариаций при более близком ознакомлении с механизмами деления клетки, так как они могут помочь нам понять действие разных частей митотического аппарата млекопитающих.

13.5.2. Образование митотического веретена в М-фазе клетки сопровождается разительными изменениями динамических свойств микротрубочек [36]

Из гл. 11 мы знаем, что главным *центром организации микротрубочек* у большинства животных клеток служит центросома - скопление аморфного материала, окружающее пару центриолей (разд. 11.4.4). Во время интерфазы материал центросомы инициирует рост микротрубочек, который направлен к периметру клетки, в то время как их начальные участки (минус-концы) остаются связанными с центросомой. Это *интерфазное скопление микротрубочек,* расходящихся от центросомы, представляет собой динамичную, непрерывно меняющуюся структуру, в которой отдельные микротрубочки все время возникают и распадаются. Новые микротрубочки растут путем пристраивания молекул тубулина к плюс-концам; спорадически и, по-видимому, случайно индивидуальные микротрубочки становятся нестабильными и подвергаются быст-

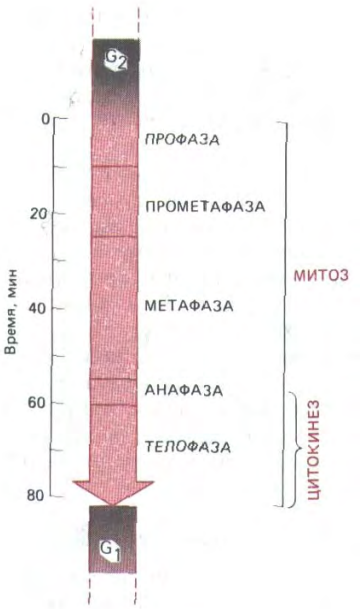


Рис. 13-43. Временной ход митоза и цитокинеза, типичный для клетки млекопитающего. Точные цифры для разных клеток различны. Обратите внимание, что цитокинез начинается еще до окончания митоза. Началом профазы (и, следовательно, фазы М в целом) считают тот момент клеточного цикла, когда впервые становятся видимыми конденсированные хромосомы; это несколько произвольный критерий, так как степень конденсации хромосом постепенно увеличивается уже в поздней фазе G_2.

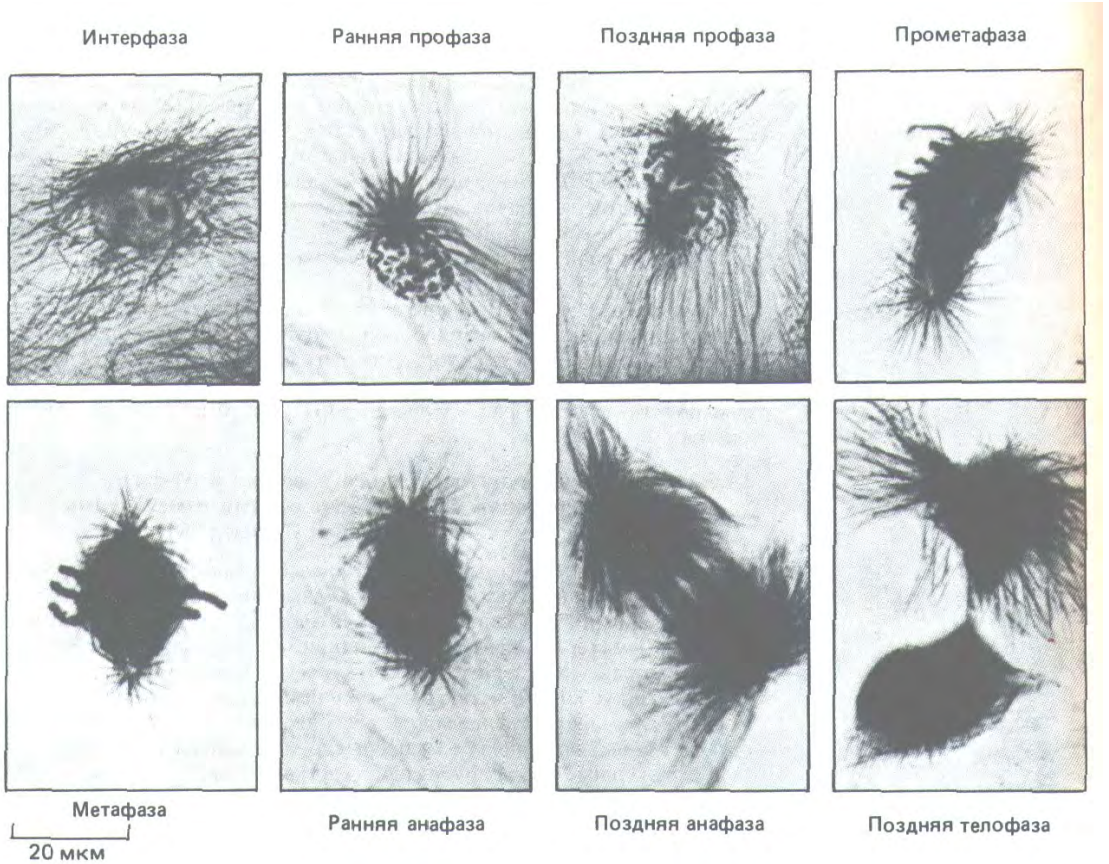


Рис. 13-44. На этих световых микрофотографиях культивируемых клеток сумчатого (клеток PIK) показан ход митоза в животной клетке. Микротрубочки видны благодаря окрашиванию антителами с золотом; хроматин окрашен толуидиновым синим. Главные события митоза на уровне световой микроскопии известны уже более 100 лет. В *интерфазе* центросома, содержащая пару центриолей, служит центром интерфазного скопления микротрубочек. В *ранней профазе* единственная центросома содержит две пары центриолей (на снимке не видны); в *поздней профазе* центросома делится, в результате чего образовавшиеся звезды отходят друг от друга. В *прометафазе* разрушается ядерная оболочка, и это позволяет микротрубочкам веретена взаимодействовать с хромосомами. В *метафазе* уже ясно видна двухполюсная структура веретена и все хромосомы выстраиваются в его экваториальной области. В *ранней анафазе* все хроматиды одновременно разделяются и под действием нитей веретена начинают двигаться к полюсам. В течение *поздней анафазы* полюса веретена все дальше отходят друг от друга, еще более раздвигая две группы хроматид. В телофазе формируются дочерние ядра, и в *поздней телофазе* почти полностью завершается цитокинез; между дочерними клетками сохраняется остаточное тельце. (Фотографии любезно предоставлены M. de Brabander.)

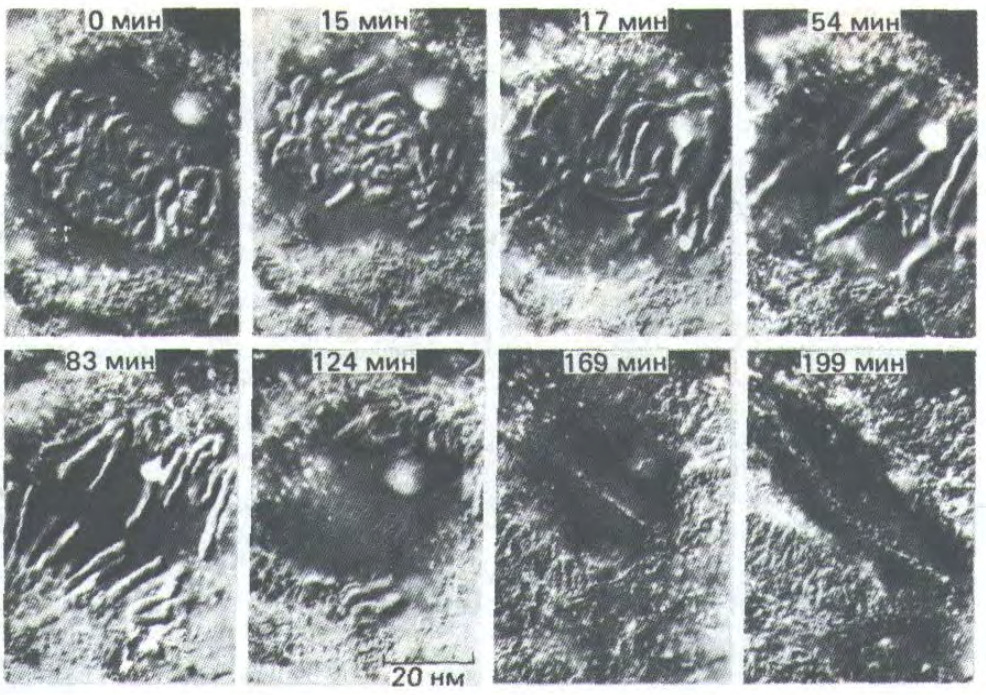


Рис. 13-45. Ход митоза в типичной растительной клетке. Микрофотографии живой клетки *Haemanthus* (лилейные), полученные с помощью метода дифференциального интерференционного контраста (разд. 4.1.5). Необычно крупные хромосомы в этой клетке легко наблюдать. *А. Профаза:* хромосомы сконденсировались и ясно видны в ядре клетки (N). *Б и В. Прометафаза:* ядерная оболочка разрушена и хромосомы взаимодействуют с микротрубочками, отходящими от двух полюсов веретена *(Р)*. Обратите внимание на то, что между представленными здесь стадиями *(Б* и *В)* прошло только две минуты. *Г. Метафаза:* хромосомы расположились в виде метафазной пластинки, а их кинетохоры находятся посередине между обоими полюсами веретена. *Д. Анафаза:* хромосомы разделились на сестринские хроматиды, которые теперь движутся к противоположным полюсам. *Е. Телофаза:* хромосомы деконденсируются, образуя два ядра, которые будут видны позже. *Ж* и *3. Цитокинез:* показаны две последовательные стадии формирования клеточной пластинки; она видна как линия, направления роста которой указаны стрелками *(3)*. (С любезного разрешения Andrew Bajer.)

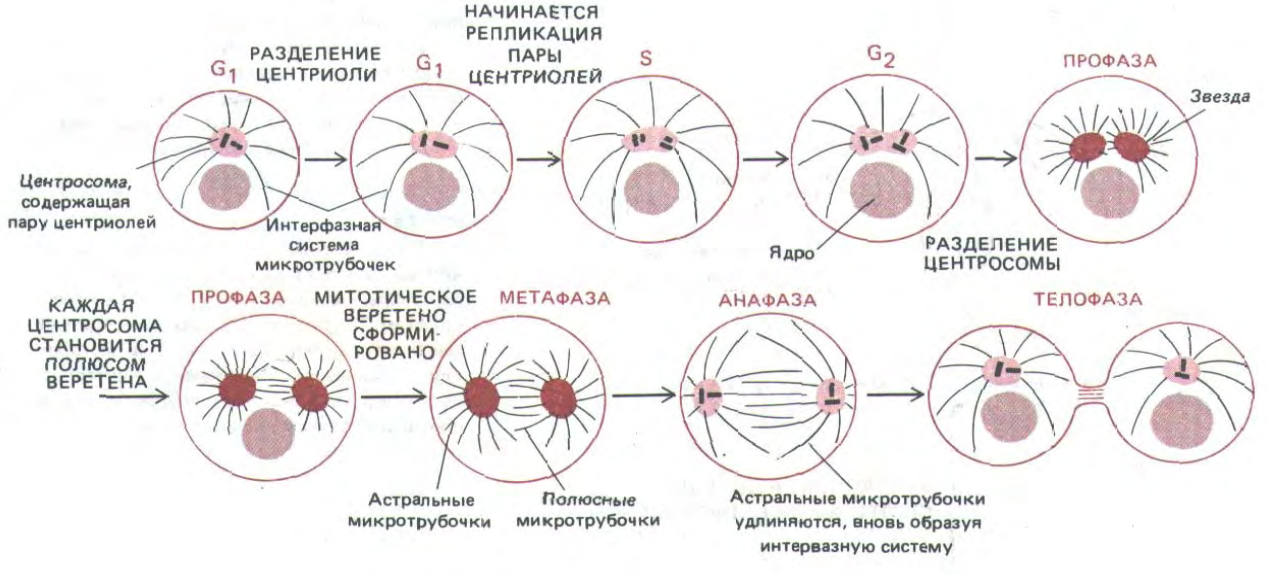
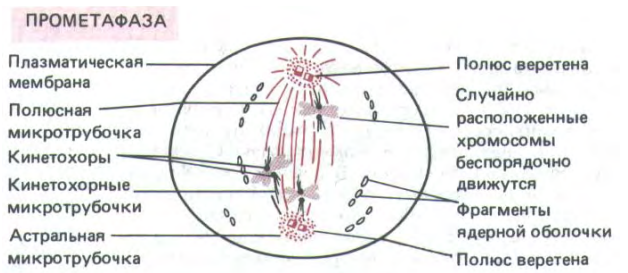


Рис. 13-46. Центросомный цикл. В интерфазной клетке центросома удваивается с образованием двух полюсов митотического веретена. В большинстве животных (но не растительных) клеток пара центриолей (показанных как пара коротких черных отрезков) погружена в материал центросомы (выделен цветом), от которого растут микротрубочки. В определенный момент фазы G_1 две центриоли расходятся на несколько микрон. В течение фазы S возле каждой старой центриоли под прямым углом к ней начинает формироваться дочерняя центриоль. Рост дочерних центриолей обычно завершается в фазе G_2. Вначале обе пары центриолей остаются погруженными в единую массу центросомного материала, образующего одну центросому. В ранней фазе М каждая пара центриолей становится частью отдельного центра организации микротрубочек, от которого отходит радиальный пучок микротрубочек - *звезда.* Две звезды, первоначально лежавшие бок о бок около ядерной оболочки, теперь отходят друг от друга. В поздней профазе пучки *полюсных микротрубочек,* принадлежащие двум звездам и взаимодействующие между собой, избирательно удлиняются, по мере того как два центра расходятся по двум сторонам ядра. Таким способом быстро формируется митотическое веретено.



ПРОФАЗА

Переход из фазы G_2 в фазу М, как это видно в микроскоп, совершается постепенно. Хроматин, который в интерфазе выглядит диффузным, конденсируется в отчетливо видимые хромосомы. Для каждого вида характерно совершенно определенное число хромосом. Каждая хромосома во время предшествующей фазы S радуплицировалась и состоит теперь из двух сестринских *хроматид.* В каждой из хроматид имеется специфический участок ДНК, называемый *центромерой,* который необходим для их правильного расхождения. В конце профазы цитоплазматические микротрубочки, составляющие часть интерфазного цитоскелета, распадаются и начинается образование *веретена* — главного компонента митотического аппарата. Веретено представляет собой двухполюсную структуру, состоящую из микротрубочек и связанных с ними белков. Сборка веретена происходит вначале вне ядра.



ПРОМЕТАФАЗА

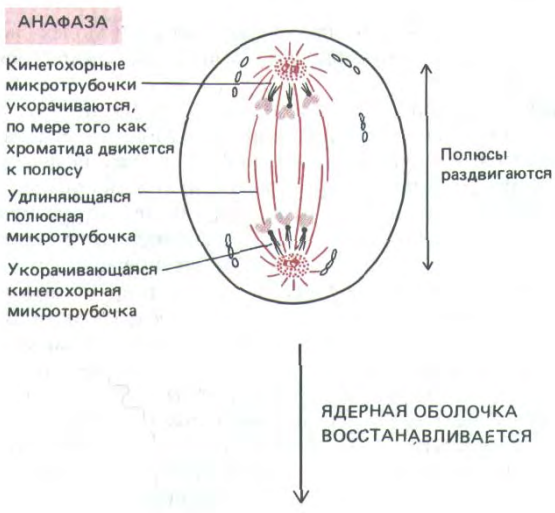
Про метафаза начинается с быстрого распада ядерной оболочки на мелкие мембранные пузырьки, неотличимые от фрагментов эндоплазматического ретикулума. Эти пузырьки остаются видимыми около веретена во время митоза. Микротрубочки веретена, которые находились вне ядра, могут теперь проникнуть в ядерную область. У хромосом на каждой центромере образуются особые белковые комплексы, называемые *кинетохорами;* они прикрепляются к некоторым из микротрубочек веретена, получающим теперь название *кинетохорных микротрубочек.* Остальные микротрубочки веретена называют *полюсными,* а те, которые лежат вне веретена, — *астральными.* Кинетохорные микротрубочки идут в противоположных направлениях от двух сестринских хроматид каждой хромосомы и тянут их в разные стороны, что приводит к интенсивному движению хромосом.



МЕТАФАЗА

Кинетохорные микротрубочки в конце концов приводят каждую хромосому в экваториальную плоскость на полпути между полюсами веретена. Хромосомы образуют здесь *метафазную пластинку,* в которой они удерживаются натяжением кинетохорных микротрубочек, отходящих от них к противоположным полюсам веретена.

Схема 13-1. Шесть стадий клеточного деления.



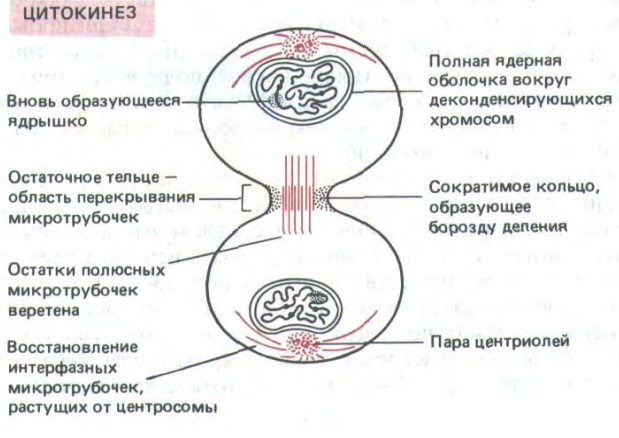
АНАФАЗА

Запускаемая специфическим сигналом, анафаза начинается с внезапного разделения парных кинетохоров каждой хромосомы, после чего ее две хроматиды начинают медленно расходиться к соответствующим полюсам. Все хроматиды движутся с одинаковой скоростью около 1 мкм/мин. Здесь можно различать движение двоякого рода. Во время *анафазы А* кинетохорные микротрубочки укорачиваются, по мере того как хромосомы приближаются к полюсам. Во время *анафазы В* происходит удлинение полярных микротрубочек и полюсы веретена еще дальше отодвигаются друг от друга. Анафаза обычно длится всего лишь несколько минут.



ТЕЛОФАЗА

В телофазе (от греч. telos — конец) разделившиеся дочерние хроматиды подходят к полюсам и кинетохорные микротрубочки исчезают. Полярные микротрубочки продолжают удлиняться, после чего вокруг каждой группы дочерних хроматид образуется новая ядерная оболочка. Конденсированный хроматин начинает разрыхляться, появляются вновь ядрышки (исчезнувшие в профазе), и митоз заканчивается.



ЦИТОКИНЕЗ

Это процесс разделения цитоплазмы, он обычно начинается где-то в анафазе. На схеме показано, как он протекает в животных клетках. Мембрана в экваториальной области (между двумя дочерними ядрами) начинает втягиваться внутрь по направлению к оси веретена; в результате образуется *борозда деления,* которая постепенно углубляется, пока не дойдет до остатков веретена, расположенного между ядрами. Этот мостик, называемый *остаточным тельцем,* может некоторое время сохраняться, а затем разрушается, что ведет к полному разделению дочерних клеток.

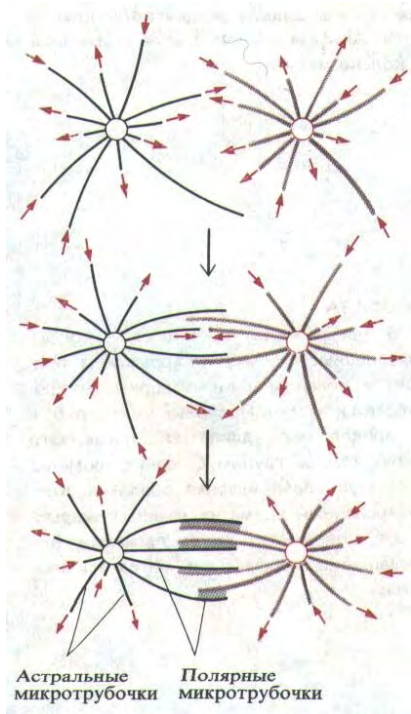


Рис. 13-47. Модель образования двухполюсного) митотического веретена путем селективной стабилизации взаимодействующих микротрубочек. Новые микротрубочки отрастают в случайных направлениях от двух центросом (представленных кружками), к которым они прикреплены своими минус-концами. Их плюс-концы «динамически нестабильны» и резко переходят от равномерного роста к быстрому укорочению, при котором часто деполимеризуется вся микротрубочка (разд. 11.4.3). Когда две микротрубочки от противоположных центросом взаимодействуют в зоне их перекрывания, белки, связанные с микротрубочками, сшивают их друг с другом (показано серым цветом), прикрывая и стабилизируя таким образом их плюс-концы и уменьшая вероятность деполимеризации.

рому, «катастрофическому» распаду, добавляя свои молекулы-субъединицы к пулу неполимеризованного тубулина, содержащегося в цитоплазме (см. схему 11-2). I

Как показано на рис, 13-46, в центросоме на протяжении всего[1] клеточного цикла происходят изменения. Где-то в фазе S пара центриолей реплицируется, оставаясь внутри одного скопления центросомного материала. В **профазе** центросома расщепляется и каждая дочерняя центросома становится центром отдельной *звезды* - структуры из микротрубочек, концы которых погружены в материал центросоми. Микротрубочки обеих звезд удлиняются до соприкосновения друг с другом, после чего две центросомы расходятся. Затем, в **прометафазе,** ядерная оболочка разрушается, и это позволяет микротрубочкам от каждой центросомы проникать в ядро и взаимодействовать с хромосомами. Две дочерние центросомы называют теперь двумя **полюсами веретена.**

Как полагают, только что описанные события обусловлены происходящими в профазе существенными изменениями стабильности микротрубочек и свойств центросомы. Мы уже упоминали о том, что, судя по имеющимся данным, фактор MPF вызывает переход в фазу M, инициируя каскад фосфорилирования целого ряда белков (разд. 13.2.5).

При этом фосфорилируются некоторые молекулы, взаимодействующие с микротрубочками, поскольку при переходе клетки в профазу время полужизни средней микротрубочки уменьшается примерно в 20 раз (от примерно 5 мин до 15 с, см. рис. 13-48). Это, видимо, связано с резким повышением вероятности того, что типичная растущая микротрубочка начнет укорачиваться в результате какого-то изменения на ее плюс-конце (разд. 11.4.3, схема 11-2), а также происходящего в профазе изменения центросомы, сильно увеличивающего ее способность к образованию новых микротрубочек (это можно наблюдать in vitro). Этих двух изменений достаточно для того, чтобы объяснить, почему в начале фазы M отмечается быстрый переход от сравнительно малого числа длинных микротрубочек, отходящих от центросомы к периферии клетки (интерфазное скопление микротрубочек), к большому числу коротких микротрубочек, окружающих каждую центросому (см. профазу на рис. 13-46).

Полагают, что в ходе митоза удлиняющиеся концы микротрубочек, отходящих от полюсов веретена, наталкиваются на структуры, которые связываются с ними и стабилизируют их против катастрофического разрушения. Поскольку каждый полюс испускает микротрубочки в разных направлениях, такая избирательная стабилизация и создает характерную двухполюсную форму митотического веретена, в котором большинство микротрубочек отходит от двух полюсов к экваториальной пластинке, находящейся на полпути между ними. Те микротрубочки, которые пересекают экватор, могут селективно стабилизироваться присоединяющимися к ним белками - эти белки сшивают соседние параллельные микротрубочки противоположной полярности (рис. 13-47). В метафазе веретено в клетках высших животных и растений может содержать до нескольких тысяч микротрубочек, тогда как у некоторых грибов их всего лишь около 40.

Хотя некоторые микротрубочки в веретене частично стабилизированы против спонтанного разрушения, большинство из них продолжает обмениваться своими субъединицами с пулом растворенных молекул тубулина в цитозоле. Этот обмен может быть непосредственно измерен с помощью метода, представленного на рис. 13-48. Его можно также выявить, помещая митотические клетки в условия, обратимо сдвигающие равновесие между полимеризацией и деполимеризацией тубулина, и наблюдая двойное лучепреломление микротрубочек веретена в поляризованном свете (рис. 13-49). Если митотические клетки поместить

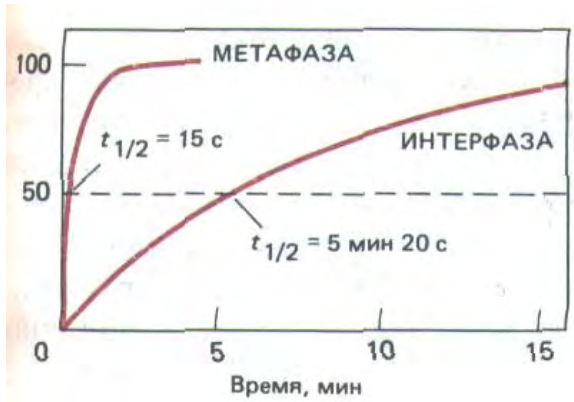


Рис. 13-48. Результаты исследования, показывающие, что микротрубочки в М-фазной клетке в среднем гораздо более динамичны, чем в интерфазе. В клетки млекопитающих в культуре инъецировали тубулин с ковалентне присоединенным флуоресцентным красителем. По прошествии времени, необходимото для включения флуоресцентного тубулина в микротрубочки, в небольшом участке весь тубулин обесцвечивали интенсивным лазерным лучом. Восстановление флуоресценции в облученном участке микротрубочек, вызванное заменой их обесцвеченных субъединиц необесцвеченным флуоресцентным тубулином из пула субъединиц в растворе, было затем представлено в виде функции времени. Время 50%-ного восстановления флуоресценции, *ti,₂,* как полагают, равно времени, необходимому для того, чтобы половина микротрубочек в этом участке деполимеризовалась и восстановилась. (По данным W. M. Saxon et al., J. Cell Biol. 99: 2175-2187, 1984, by copyright permission of the Rockefeller Univ. Press.)

в тяжелую воду (D_2O) или обработать таксолом (эти воздействия подавляют разборку микротрубочек), то нити веретена будут удлиняться. Такое стабилизированное веретено не может тянуть хромосомы, и митоз останавливается. Но митоз блокируется и при прямо противоположном воздействии, если нити веретена обратимо разрушить с помощью одного из трех агентов, подавляющих сборку тубулина в микротрубочки, - колхицина, низкой температуры или высокого гидростатического давления. Тот факт, что ни стабилизированные, ни деполимеризованные микротрубочки веретена не в состоянии перемещать хромосомы, указывает на то, что для правильного функционирования веретена необходимо тонкое равновесие между сборкой и разборкой. Прежде чем рассматривать механизм таких движении, мы опишем более подробно организацию веретена и расположение хромосом в митозе.

13-25

13.5.3. Во время митоза хромосомы прикрепляются к мнкротрубочкам своими кинетохорами [37]

Реплицированные хромосомы прикрепляются к митотическому веретену с помощью структур, называемых **кинетохорами,** В начале М-фазы каждая хромосома состоит из двух сестринских хроматид, спаренных по всей их длине, но соединенных главным образом возле их **центромер-**специализированных последовательностей ДНК, необходимых для расхождения хромосом. В поздней профазе на каждой центромере

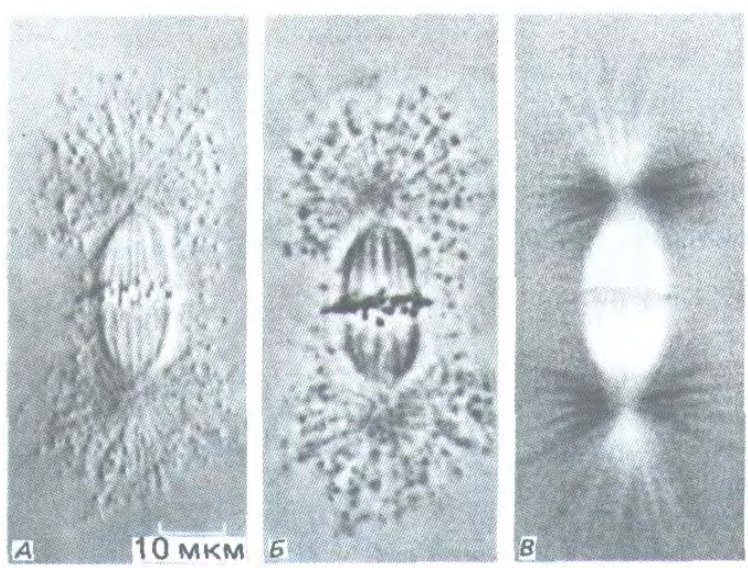


Рис. 13-49. Изолированное метафазное веретено. Использованы три различных метола световой микроскопии: дифференциальный интерференционный контраст (А), фазовый контраст *(Б)* и микроскопия в поляризованном свете *(В).* (С любезного разрешения E. D. Salmon, R.R. Segall, J. Cell Biol. 86: 355-365, 1980. Repr. by copyright permission of the Rockefeller Univ. Press.)

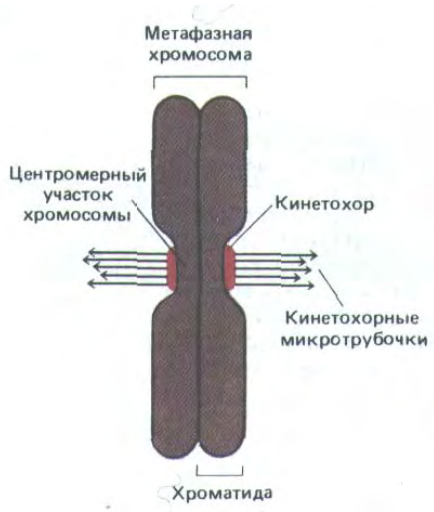


Рис. 13-50. Схематическое изображение метафазной хромосомы с ее двумя сестринскими хроматидамн, к которым прикреплены кинетохорные микротрубочки.

образуется по одному зрелому кинетохору, т. е. имеется теперь два кинетохора (на двух сестринских хроматидах), ориентированных в противоположных направлениях. В метафазе к каждому кинетохору уже прикреплены микротрубочки (рис. 13-50). У большинства организмов кинетохор представляет собой крупный, состоящий из многих белков комплекс, который на электронных микрофотографиях выглядит как пластинчатая трехслойная структура (рис. 13-51). Число микротрубочек, связанных с каждым кинетохором, у разных видов весьма различно: например, у человека их бывает от 20 до 40, а у дрожжей и некоторых других микроорганизмов -только одна, т.е. одной микротрубочки оказывается достаточно, чтобы тянуть хромосому.

Информация, определяющая специфическую конструкцию кинетохора в специфическом участке хромосомы, должна быть заключена в самой последовательности ДНК центромеры. У дрожжей центромер-ную ДНК можно выявить генетическим методом, благодаря ее способности обеспечивать регулярное наследование плазмид; без ее содействия плазмиды распределяются между дочерними клетками неравномерно и теряются. С помощью методов молекулярной генетики показано, что у дрожжей *Saccharomyces ccrevisiae* все 17 хромосом содержат разные центромерные последовательности длиной около 110 пар оснований (рис. 13-52); тем не менее во всех этих последовательностях имеются значительные гомологичные участки, которые могут инвертироваться или перемещаться из одной хромосомы в другую без потери функции. Центромерная последовательность дрожжей связывает специфические белки, которые, видимо, инициируют формирование многобелкового комплекса (кинетохора), а этот комплекс в свою очередь связывается с концом одной микротрубочки. Как полагают, у млекопитающих центромеры состоят из других, гораздо более длинных последовательностей ДНК и формируют более крупные кинегохоры, способные связывать много микротрубочек.

Неожиданная возможность изучать белки кинетохора у млекопитающих появилась, когда стало известно, что у больных некоторыми формами *склеродермы* (болезни неизвестной природы, связанной с прогрессирующим фиброзом соединительной ткани кожи и других органов), образуются антитела, специфически реагирующие с кинетохорами. Если такие антитела с флуоресцентной меткой использовать для окрашивания делящихся клеток, получается определенный рисунок флуоресцирующих пятен, каждое из которых отмечает положение кинетохора. Такой же пятнистый рисунок создается и в неделящихся клетках; при этом число пятен в клетке соответствует числу ее хромосом (рис. 13-53), и можно думать, что какой-то предшественник кинетохора связан с каждой центромерой даже в интерфазном ядре. Антитела склеродермы сделали также возможным клонирование генов, кодирующих некоторые из



Рис. 13-51. Кинетохоры. В метафазной хромосоме *(А),* окрашенной аутоантителами человека, реагирующими со специфическими белками кинетохора, выявляются два кинетохора, каждый из которых связан со своей хроматидой *(S).* На электронной микрофотографии В- анафазная хроматида с микротрубочками, прикрепленными к кинетохору. Хотя большинство кинетохоров трехслойные, тот, который показан здесь (из зеленой водоросли), имеет необычно сложную структуру с дополнительными слоями. *(А* и *Б с* любезного разрешения Bill Brinkley; С - из J.D. Pickett-Heaps, L. C. Fowke, Aust. J. Biol. Sci. 23: 71-92, 1970. Repr. by permission of CSIRO.)

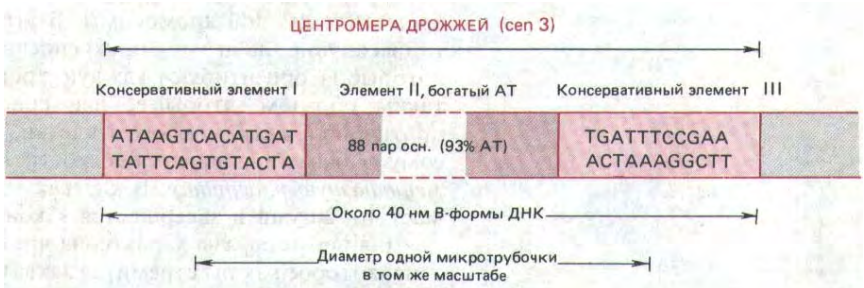


Рис. 13-52. Последовательность ДНК в типичной центромере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae.* Представленной здесь последовательности достаточно, чтобы обеспечить правильное расхождение хроматид; она служит для сборки белков кинетохора, к которым прикрепляется одна микротрубочка.

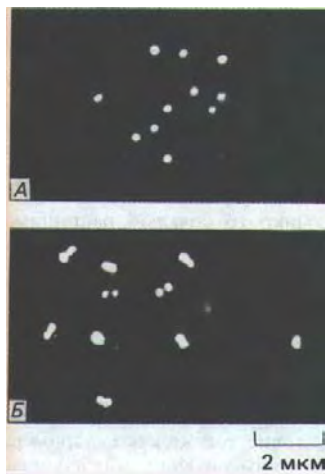


Рис. 13-53. Иммунофлуоресцентное окрашивание кинетохоров в интерфазных клетках с помощью антител, специфически связывающихся с белком кинетохора. В использованных клетках сумчатого относительно мало хромосом. *А.* В клетках, находящихся в фазе G_1, окрашивается один кинетохор на хромосому. *Б.* В фазе G_2 на одну хромосому окрашиваются два кинетохора. (S. L. Brenner, B. B. Brinkley, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 46: 241-254, 1982.)

многочисленных белков, ассоциированных с кинетохорами, так что теперь эти обычно редкие белки можно производить в больших количествах, используя метод рекомбинантной ДНК, а затем изучать их взаимодействие друг с другом, с ДНК и с микротрубочками.

Как микротрубочки и кинетохоры соединяются друг с другом? Их связывание имеет ряд уникальных особенностей. Если химически помеченный тубулин инъецировать в митотическую клетку в метафазе, он будет непрерывно включаться в микротрубочки около точки их прикрепления к кинетохору (рис. 13-54). Как мы увидим позже, в анафазе имеет место обратная реакция: молекулы тубулина отделяются от микротрубочки в участке вблизи кинетохора, так что последний перемещается по направлению к полюсу веретена. Здесь трудно понять то, что кинетохор, несмотря на присоединение и удаление молекул тубулина, сохраняет прочную механическую связь с микротрубочками - ведь именно за эту точку прикрепления они тянут хромосомы сквозь протоплазму. Таким образом, кинетохор, по-видимому, действует наподобие скользящего ошейника, поддерживая боковую связь с субъединицами полимеризованного тубулина около конца микротрубочки и позволяя в то же время добавлять или удалять на этом конце молекулы тубулина (см. ниже рис. 13-61).

13-28

13.5.4. По-видимому, кинетохоры захватывают плюс-концы микротрубочек, отходящих от полюса веретена [38]

Распад ядерной оболочки, знаменующий конец профазы и начало **прометафазы,** позволяет митотическому веретену взаимодействовать с хромосомами. Конечный результат этого взаимодействия состоит в том, что каждому дочернему ядру будет передано в точности по одной

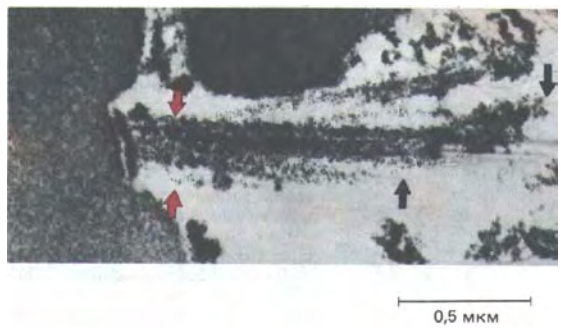


Рис. 13-54. Опыт, показывающий, что метафазные микротрубочки кинетохора растут с конца, прикрепленного к кинетохору (плюс-конца). В метафазную клетку млекопитающего in vitro инъецировали тубулин, ковалентно связанный с малой органической молекулой (биотипом). Спустя 1 мин клетку фиксировали и окрашивали антителами к биотину, связанными с золотыми шариками, а затем приготовляли срезы для электронной микроскопии. Участки микротрубочек, включавшие биотинилированный тубулин в течение минуты после инъекции, усыпаны темными точками золота (цветные стрелки), а участки, существовавшие ранее, не окрашены (черные стрелки). (Фотография любезно предоставлена Luise Evans.)

хроматиде каждой хромосомы. В этом процессе распределения хроматид важную роль играют прикрепленные к кинетохорам микротрубочки, которые 1) ориентируют каждую хромосому относительно оси веретена таким образом, чтобы ее два кинетохора были обращены к двум противоположным полюсам клетки, и 2) перемещают каждую хромосому в экваториальную плоскость клетки, где хромосомы образуют *метафазную пластинку*. В клетках млекопитающих этот процесс занимает 10-20 мин и завершается к концу прометафазы.

Для прометафазы характерна чрезвычайно высокая активность веретена, которое как бы стремится захватить все хромосомы и расположить их в виде метафазной пластинки. И действительно, хромосомы энергично вращаются и движутся туда и сюда между полюсами, так как их кинетохоры присоединены к микротрубочкам, растущим от одного и от другого полюса веретена, и эти микротрубочки тянут их в разные стороны. Первоначальное прикрепление хромосомы обычно происходит тогда, когда она находится у одного из полюсов, и в это время микротрубочки присоединяются только к одному кинетохору; в конце концов и второй кинетохор связывается с микротрубочками, растущими уже от другого полюса. Эти беспорядочные движения хромосом в прометафазе и их окончательная случайная ориентация обеспечивают случайное распределение хроматид между дочерними клетками, что очень важно для перекомбинирования генов во время аналогичного деления ядра в мейозе (разд. 15.2.7).

От полюса отходят только плюс-концы микротрубочек, и именно эти концы связываются с кинетохорами. Таким образом, кинетохор действует как «колпачок» («cap»), в какой-то мере предохраняющий плюс-конец микротрубочки от деполимеризации, точно так же как центромера у полюса веретена предохраняет от деполимеризации' минус-конец. Неудивительно поэтому, что прикрепленные к кинетохору микротрубочки, прикрытые с обоих концов, необычайно стабильны. Другие микротрубочки веретена (называемые *полюсными}* менее стабильны.

Хотя микротрубочки кинетохора стремятся *подтянуть* хромосому к соответствующему полюсу (см. ниже), какая-то другая сила, по-видимому, отталкивает те хромосомы, которые подходят к полюсу слишком близко. Если плечи хромосомы отделить с помощью лазерной микрохирургии от кинетохора, то у них будет заметна тенденция удаляться от ближайшего полюса веретена, даже если они не прикреплены к микротрубочкам или к какой-либо иной клеточной структуре. Одно из возможных объяснений-то, что быстрая полимеризация микротрубочек веретена в направлении от каждого полюса создает «общий поток», который увлекает всякую крупную незакрепленную структуру, такую как плечи хромосом, дальше от полюсов.

13.5.5. Сестринские хроматиды прикрепляются своими кинетохорами к противоположным полюсам веретена [39]

В ранней прометафазе оба кинетохора одной хромосомы могут прикрепиться к нитям от одного и того же полюса веретена. Однако такая или иная аномальная конфигурация, которая привела бы к ошибке в расхождении хромосом, почти всегда исправляется. По-видимому, сбалансированное расположение, при котором сестринские кинетохоры прикреплены к разным полюсам веретена, наиболее стабильно. На возможную причину этого указывают результаты экспериментов, в которых изучался механизм прикрепления хромосом к митотическому веретену.

Изящные опыты, в которых с помощью тончайших стеклянных игл можно было тянуть или толкать хромосомы в живой митотической клетке, показали, что определенный кинетохор не должен быть обяза-

тельно направлен к определенному полюсу, подобно концу магнитной стрелки: если хромосому перевернуть, тот же кинетохор может установить связь и с противоположным полюсом. Более того, в прометафазе можно путем микроманипуляции заставить оба кинетохора какой-либо хромосомы связаться с одним и тем же полюсом веретена. Если такая аномальная связь сохранится, то вся хромосома (как пара соединенных сестринских хроматид) будет двигаться к соответствующему полюсу. Как правило, однако, такая связь нестабильна - обычно к хромосоме присоединяются новые микротрубочки от другого полюса с тем, чтобы образовать правильную сбалансированную конфигурацию. С другой стороны, если движению неправильно связанной хромосомы препятствовать стеклянной иглой, то связь этой хромосомы только с одним полюсом становится стабильной: видимо, соединение микротрубочек с кинетохором укрепляется тянущей силой, направленной к полюсу. Поэтому только хромосомы, соединенные с обоими полюсами, будут сохранять связь с микротрубочками и, таким образом, стабильно взаимодействовать с веретеном.

Усилие, развиваемое микротрубочками от разных полюсов, не только стабилизирует взаимодействие этих микротрубочек с кинетохорами, но также в конечном счете приводит каждую хромосому в плоскость метафазной пластинки, о чем сейчас и пойдет речь.

13.5.6. Сбалансированные силы, направленные к противоположным полюсам, удерживают хромосомы в метафазной пластинке [40]

Почему хромосомы в **метафазе** выстраиваются на равном расстоянии от обоих полюсов веретена, образуя метафазную пластинку? Опыты по перемещению хромосом стеклянной иглой показывают, что сила, приложенная к кинетохору, пропорциональна длине прикрепленных к нему нитей, т. е. она уменьшается по мере приближения кинетохора к тому полюсу, с которым он соединен (рис. 13-55). Каждая хромосома соединена как бы «пружиной» с каждым из двух полюсов веретена, так что любое смещение к какому-то одному полюсу создает противодействующую силу в обратном направлении. Веретено, образующееся в результате такого взаимодействия в метафазе, показано на рис. 13-56.

Эти силы продолжают действовать на хромосомы и после того, как те расположились в виде метафазной пластинки. Поэтому и здесь хромосомы совершают колебательные движения в обоих направлениях, поддерживая равновесие этих сил. Если нити, прикрепленные к одному из пары метафазных кинетохоров, разрушить лучем лазера, то вся

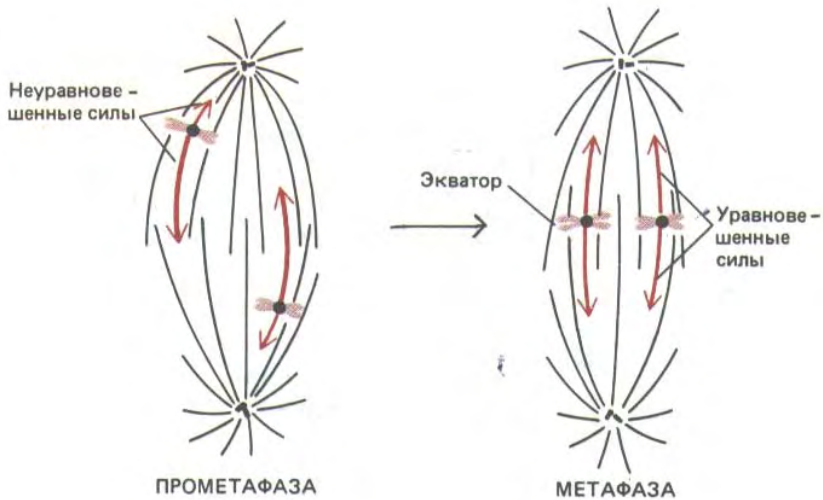


Рис. 13-55. Хромосомы случайным образом попадают в веретено во время прометафазы и в конце концов выстраиваются в экваториальной плоскости веретена, так как сила, действующая на каждый кинетохор, тем меньше, чем он ближе к полюсу. Поэтому хромосомы, оказавшиеся на экваторе, удерживаются там под действием уравновешенных сил притяжения к двум полюсам.

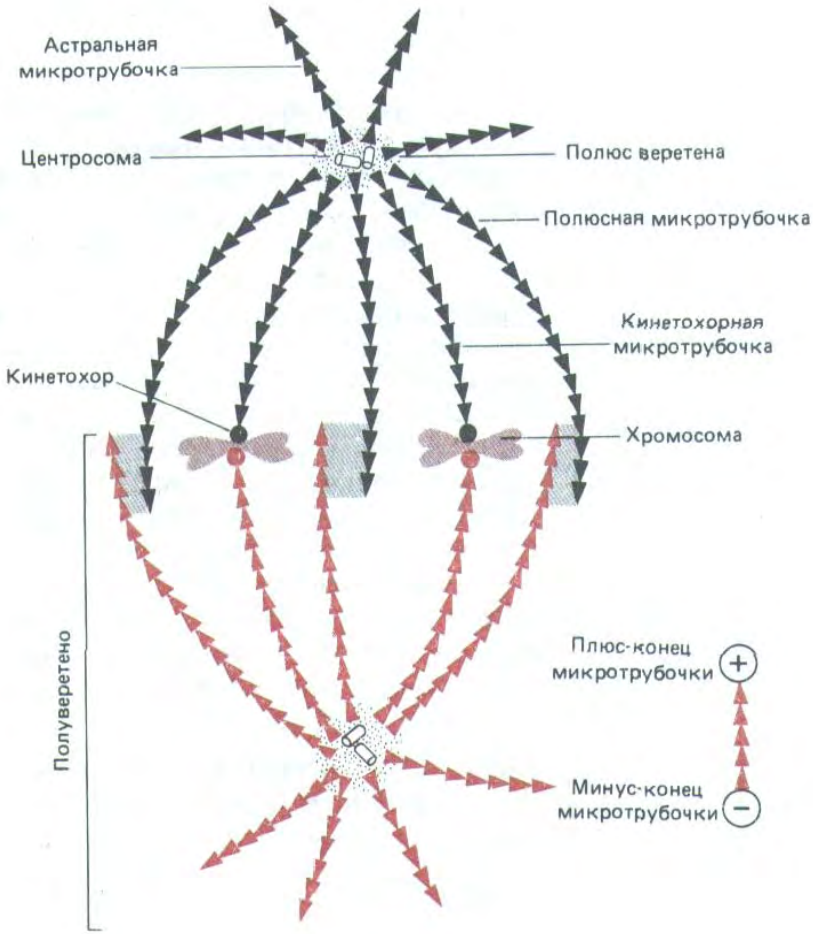


Рис. 13-56. Упрощенная схема мятотического веретена в метафазе. Веретено строится из двух полуверетен (показанных черным и красным цветом), каждое из которых включает кинетохоры, полюсные микротрубочки и микротрубочки звезды. Полярность микротрубочек показана направлением стрелок. Полюсные нити веретена, отходящие от его противоположных полюсов, имеют зону перекрывания (изображена серым цветом), где связанные с микротрубочками белки могут сшивать их. Обратите внимание, что в этой зоне микротрубочки антипараллельны.

хромосома тотчас начнет двигаться к тому полюсу, связь с которым не нарушена. Точно так же, если в метафазе две хроматиды разъединить, то они начнут двигаться к противоположным полюсам, как в анафазе. Судя по этим результатам, как только два кинетохора каждой хромосомы разделятся, хроматиды начинают расходиться к полюсам под действием тех же самых сил, которые раньше привели к образованию метафазной пластинки.

Метафаза занимает значительную часть периода митоза (см. рис. 13-43), как будто клетки выжидают, пока все их хромосомы не расположатся надлежащим образом в экваториальной плоскости. Некоторые эксперименты подкрепляют это представление. Многие клетки останавливаются в митозе на несколько часов или дней, если их обработать такими агентами, как колхицин или винбластин, деполимеризующими микротрубочки; в самом деле, этот способ остановки клеточного цикла широко используют, когда нужно получить большое количество митотических клеток для цитологического анализа их конденсированных хромосом (разд. 9.2.3). После удаления агента митотическое веретено быстро регенерирует, и нередко нормальный митоз возобновляется, как только хромосомы правильно расположатся в метафазной пластинке. Высказывалось предположение, что хромосома с неприсоединенным кинетохором служит источником диффундирующего фактора, который в норме задерживает переход к анафазе, предоставляя дополнительное время для правильного присоединения. Если такой фактор существует, то при воздействии агентов, разрушающих веретено, следует ожидать появления мощного сигнала, приводящего к продлению метафазы.

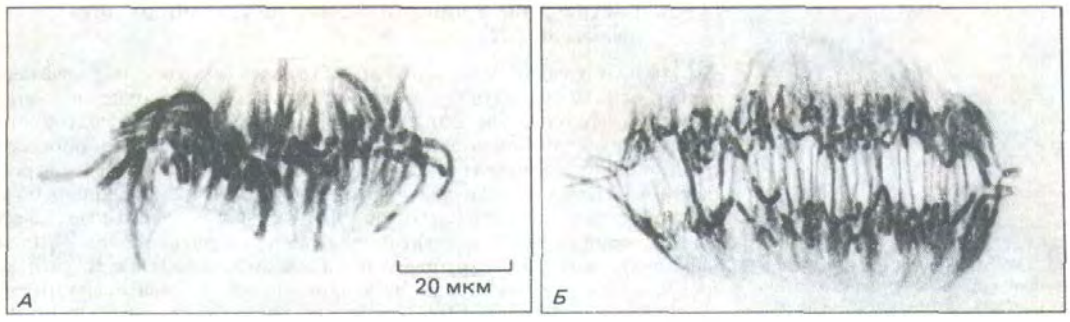


Рис. 13-57. Расхождение хромосом в анафазе клетки из эндосперма *Haemanthus.* При переходе от метафазы *(А) к* анафазе (Б) хромосомы растаскиваются полюсными микротрубочками. Клетки окрашены антителами к тубулину, меченными золотом. (С любезного разрешения Andrew Bajer.)

13.5.7. В анафазе сестринские хроматиды внезапно расходятся [41]

Как мы только что видели, метафаза - относительно стабильное состояние, и при обычных условиях многие клетки в течение часа и более пребывают в этой стадии, когда их хромосомы совершают лишь колебательные движения в метафазной пластинке. **Анафаза** начинается внезапным синхронным расщеплением всех хромосом на сестринские хроматиды, каждая из которых имеет свой кинетохор (рис. 13-57). Сигнал к началу анафазы исходит не от самого веретена, поскольку даже хромосомы, не прикрепленные к веретену, разделяются на хроматиды в то же самое время, что и прикрепленные. Судя по результатам некоторых экспериментов, этот сигнал должен быть связан с повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле. Во-первых, непрерывное наблюдение над клетками, содержащими флуоресцентный индикатор ионов кальция (разд. 4.2.3), показывает, что в некоторых клетках в анафазе происходит быстрое, но кратковременное десятикратное повышение внутриклеточного уровня Ca^{2+} . Во-вторых, микроинъекция небольших количеств кальция в культивируемые клетки на стадии метафазы может привести к преждевременному наступлению анафазы. В-третьих, у полюсов веретена обычно видны скопления мембранных пузырьков, и специальная электронно-микроскопическая техника позволяет установить, что эти пузырьки богаты кальцием. Таким образом, возможно, что пузырьки, связанные с веретеном, выделяют C^{2+} для инициации анафазы (рис. 13-58), подобно тому как саркоплазматический ретикулум высвобождает Ca^{2+} для инициации сокращения скелетной мышцы (разд. 11.1.14).

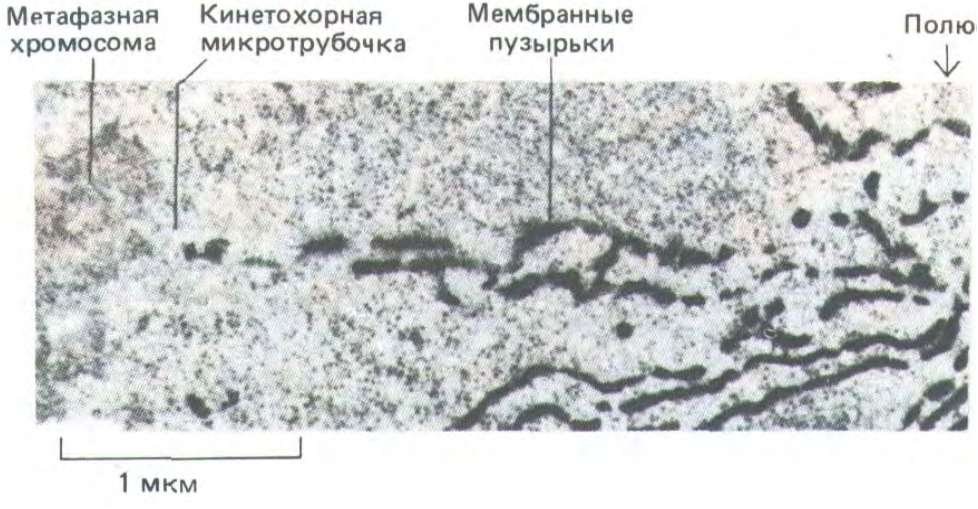


Рис. 13-58. На этой электронной микрофотографии видно скопление специально окрашенных мембранных пузырьков (напоминающих цитоплазматичсский ретикулум) около полюса веретена; пузырьки вытянуты вдоль микротрубочек веретена. (Метафазная клетка из листа ячменя; фото предоставлено Peter Hepler, из J. Cell Biol. 86: 490-499, 1980, by copyright permission of the Rockefeller Univ. Press.)

13.5.8. Расхождение хромосом в анафазе состоит из двух процессов [42]

Как только каждая хромосома расщепилась в ответ на анафазный сигнал, две ее хроматиды начинают двигаться к противоположным полюсам веретена, где они будут включены в ядра новых клеток, По-видимому, это движение - результат двух независимых процессов, происходящих в веретене (рис. 13-59). Первый из них состоит в перемещении хроматид к полюсам и связан с укорочением микротрубочек, прикрепленных к кинетохорам; обычно этот процесс называют **анафазой А.** Второй процесс - раздвигание самих полюсов, связанное с удлинением полярных микротрубочек и называемое **анафазой В.** Эти два процесса можно различить по их избирательной чувствительности к некоторым ядам. Например, низкая концентрация хлоралгидрата предотвращает раздвигание полюсов и удлинение полярных микротрубочек (анафаза В), но не действует ни на микротрубочки кинетохоров, ни на движение хроматид к полюсам (анафаза А). Относительный вклад каждого из этих процессов в окончательное расхождение хромосом существенно различен в зависимости от организма. Например, у клеток млекопитающих анафаза В начинается вскоре после начала движения хроматид к полюсам и заканчивается, когда веретено достигает длины в 1,5-2 раза больше метафазной. У некоторых других клеток, таких как дрожжи, анафаза В начинается только после того, как хроматиды доходят до места своего назначения, а у некоторых простейших анафаза В преобладает и веретено становится в 15 раз длиннее, чем в метафазе.

13.5.9. Во время анафазы А происходит распад микротрубочек, прикрепленных к кинетохорам [43]

При движении хромосом от области метафазной пластинки к полюсам веретена на них воздействуют удивительно большие силы. Измерения с помощью тонких стеклянных игл дают оценку около 10^{-5} дин на

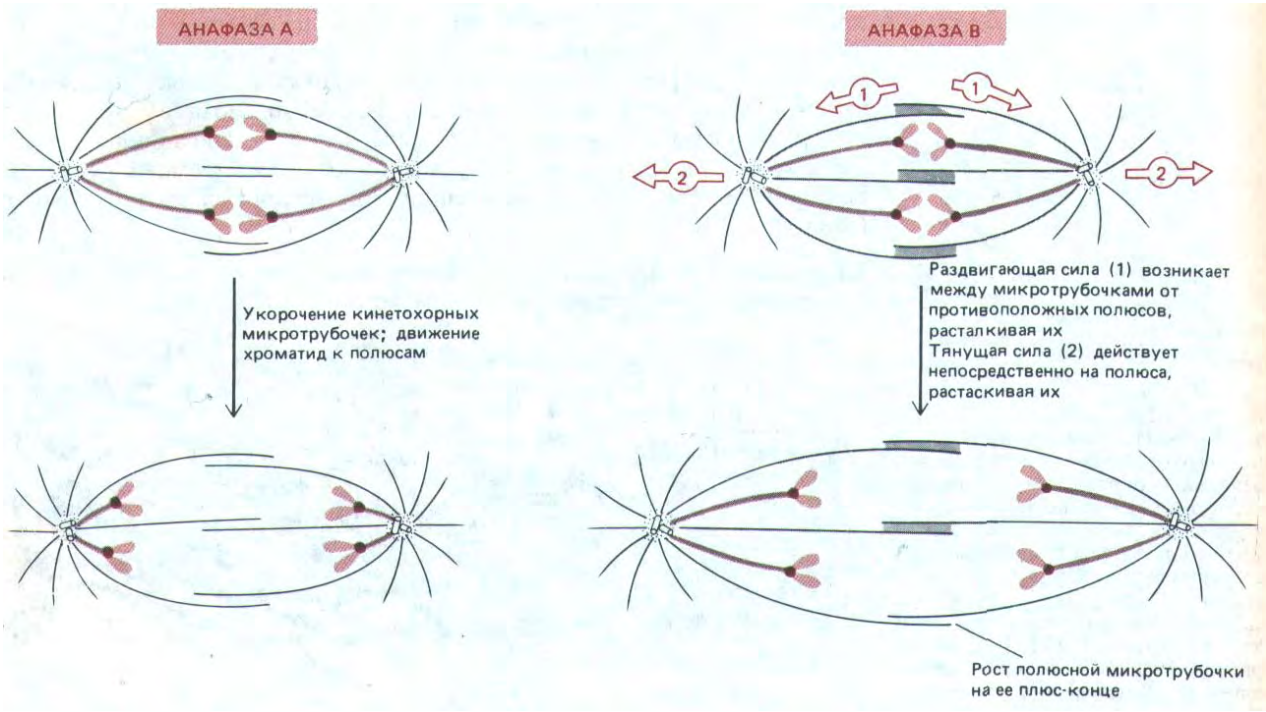


Рис. 13-59. Различные силы, действующие в анафазе при расхождении сестринских хроматид. *А.* Хроматиды оттягиваются к противоположным полюсам в результате укорочения кинетохорных микротрубочек (движение, называемое *анафазой А). Б.* В то же время оба полюса веретена отодвигаются дальше друг от друга (движение, называемое *анафазой В).* Возможно, что силы, обусловливающие анафазу В, подобны тем, которые приводят к расщеплению центросомы и расхождению дочерних центросом с образованием двух полюсов веретена в профазе (см. рис. 13-46). Есть данные о том, что за анафазу В ответственны две отдельные силы: 1} удлинение и скольжение полюсных микротрубочек *расталкивают* оба полюса, и в то же время 2) другие силы, воздействующие на звезды, тянут полюса в противоположные стороны.



Рис. 13-60. Поведение кинетохорных микротрубочек меняется при переходе от метафазы к анафазе. *А. В* метафазе на плюс-конце микротрубочки у кинетохора происходит добавление субъединиц тубулина, а на минус-конце у полюса-удаление. Таким образом, субъединицы непрерывно перемещаются в сторону полюса, так что микротрубочки сохраняют постоянную длину и остаются под натяжением. *Б.* В анафазе натяжение снимается и кинетохор начинает быстро передвигаться по микротрубочке, удаляя при этом субъединицы с ее плюс-конца *(слева);* в результате этого прикрепленная к нему хроматида перемещается к полюсу веретена. По крайней мере у некоторых организмов движение хроматид частично обусловлено одновременным укорочением микротрубочек также и у полюса *(справа)*.

хромосому, что в 10000 раз больше силы, необходимой для того, чтобы просто продвигать хромосому через цитоплазму с наблюдаемой скоростью. Очевидно, должен существовать какой-то мощный «мотор» для перемещения хромосом, однако скорость их движения должна лимитироваться не вязкостью среды, а чем-то другим. Как уже отмечалось, тот же «мотор» мог бы осуществлять стягивание хромосом в метафазную пластинку.

По мере того как хромосомы движутся к полюсам, микротрубочки, прикрепленные к их кинетохорам, распадаются, так что в телофазе их почти не видно. Участок, где происходит потеря ими субъединиц, можно определить, введя в клетку меченый тубулин во время метафазы. Было установлено, что меченые субъединицы сначала добавляются к тому концу микротрубочки, который связан с кинетохором, а затем теряются в ходе анафазы А. Это указывает на то, что кинетохор в анафазе как бы «проедает» свой путь к полюсам вдоль своих микротрубочек. В пользу такого вывода говорит и тот факт, что анафазные кинетохоры движутся в сторону стационарной метки, поставленной на микротрубочки. Распад микротрубочек у кинетохоров, полюсов или в обоих этих местах, вероятно, необходим для перемещения хромосом к полюсам (рис. 13-60), так как их движение прекращается, если деполимеризацию микротрубочек блокировать добавлением таксола или D_2O.

Механизм, с помощью которого кинетохор, а вместе с ним и хромосома движется по веретену во время анафазы А, остается неизвестным. Две его возможные модели схематически представлены на рис. 13-61. Согласно первой модели, кинегохор при движении вдоль прикрепленной к нему микротрубочки гидролизует АТР, а плюс-конец микротрубочки по мере его обнажения деполимеризуется. В другой модели деполимеризация микротрубочки сама по себе приводит к пассивному движению

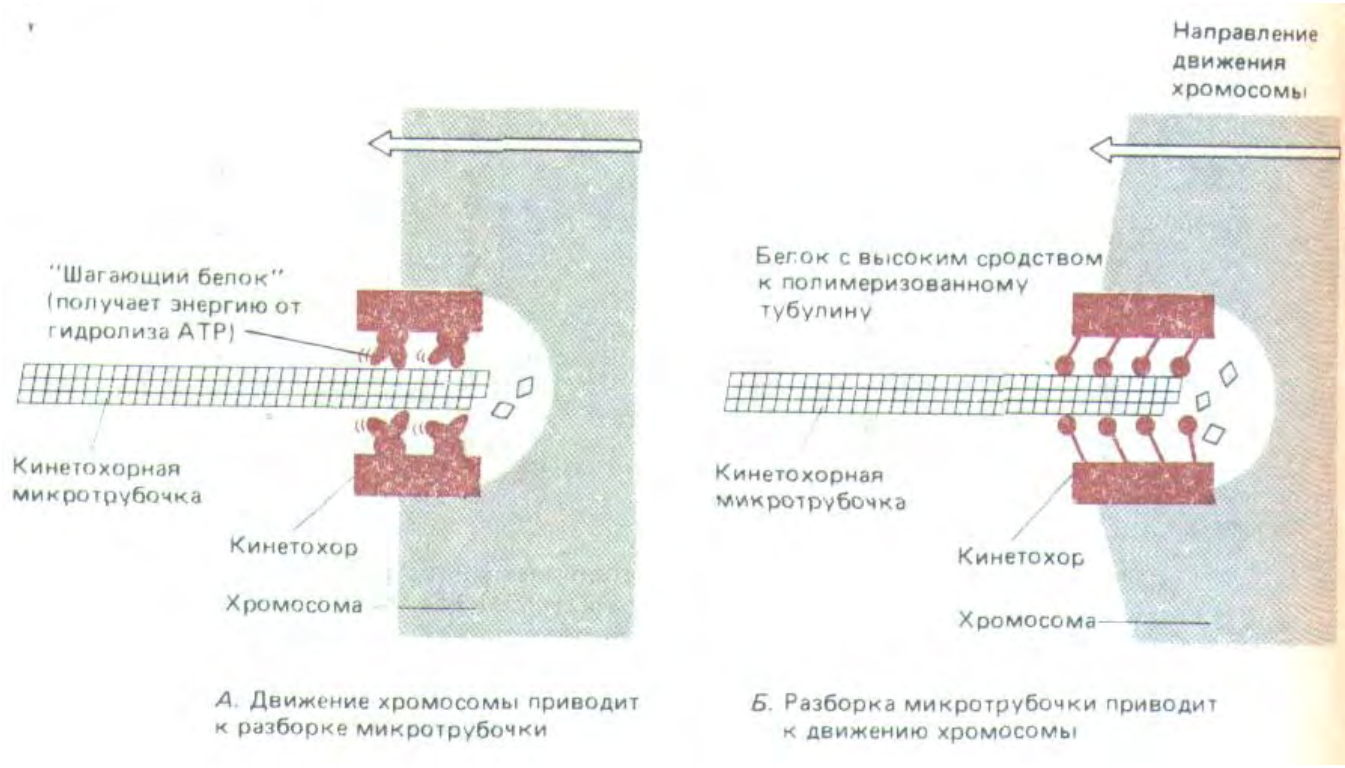


Рис. 13-61. Создание кинетохором силы, движущей хромосому к полюсу в анафазе: две альтернативные модели. *А.* В кинетохоре имеются «шагающие» белки, сходные с динеином или кинезином; они продвигаются по микротрубочке, используя для этого энергию гидролиза ATP (разд. 10.4.9). *Б.* Движение хромосом обусловлено распадом микротрубочек: по мере того как субъединицы тубулина диссоциируют, кинетохор, чтобы сохранить связь с микротрубочкой, должен скользить в направлении полюса. Те же механизмы могут использоваться у полюса веретена, который тоже, видимо, способен сохранять связь с микротрубочками, допуская в то же время их контролируемую деполимеризацию (см. рис. 13-60).

кинетохора. оптимизирующему энергию связывания его с микротрубочкой. Третья возможность, не показанная на рис. 13-61, состоит в том. что микротрубочки не ответственны прямо за возникновение силы, движущей кинетохор к полюсам, а просто регулируют движение, вызываемое какой-то другой структурой. Предполагали, например, что существует система эластичных белковых нитей (возможно, сходных с очень длинными эластичными филаментами поперечнополосатой мышцы - см. разд. 11.1.13), которые связывают кинетохор с полюсом и постепенно подтягивают к нему.

Независимо от природы механизма, создающего силу, нужно еще объяснить драматическое изменение в полимеризации микротрубочек у кинетохора при переходе от метафазы к анафазе (в метафазе преобладает полимеризация, в анафазе - распад, см. рис. 13-60). Возможно, что это связано просто с резким уменьшением тянущего усилия, приложенного к кинетохору, в анафазе; ослабление натяжения могло бы непосредственно изменять динамику полимеризации микротрубочек или же приводить к химическим изменениям в кинетохоре.

13.5.10. В анафазе В, возможно, действуют две различные силы [44]

В анафазе В увеличивается расстояние между двумя полюсами веретена, и в отличие от анафазы А это сопровождается *сборкой* микротрубочек. По мере расхождения полюсов полюсные микротрубочки между ними удлиняются, по-видимому путем сборки на своих дистальных плюс-концах.

И удаление полюсов веретена друг от друга в анафазе, и степень перекрывания полюсных микротрубочек в экваториальной зоне сильно варьируют от вида к виду. Зона перекрывания микротрубочек веретена особенно велика у многих диатомовых водорослей (рис. 13-62), у которых митоз происходит внутри ядерной оболочки (разд. 13.5.18), Как показала кропотливая реконструкция трехмерной структуры целых веретен диатомовых водорослей по сотням серийных срезов для электронной микроскопии, у этих водорослей полюсные микротрубочки обоих полуверетен перекрываются в центральной зоне, вблизи от экватора веретена. В анафазе эти две группы антинараллельных микротрубочек, по-видимому, скользят друг по другу, расходясь в противоположные стороны.

Анафазные движения можно также изучать на лизированных клетках

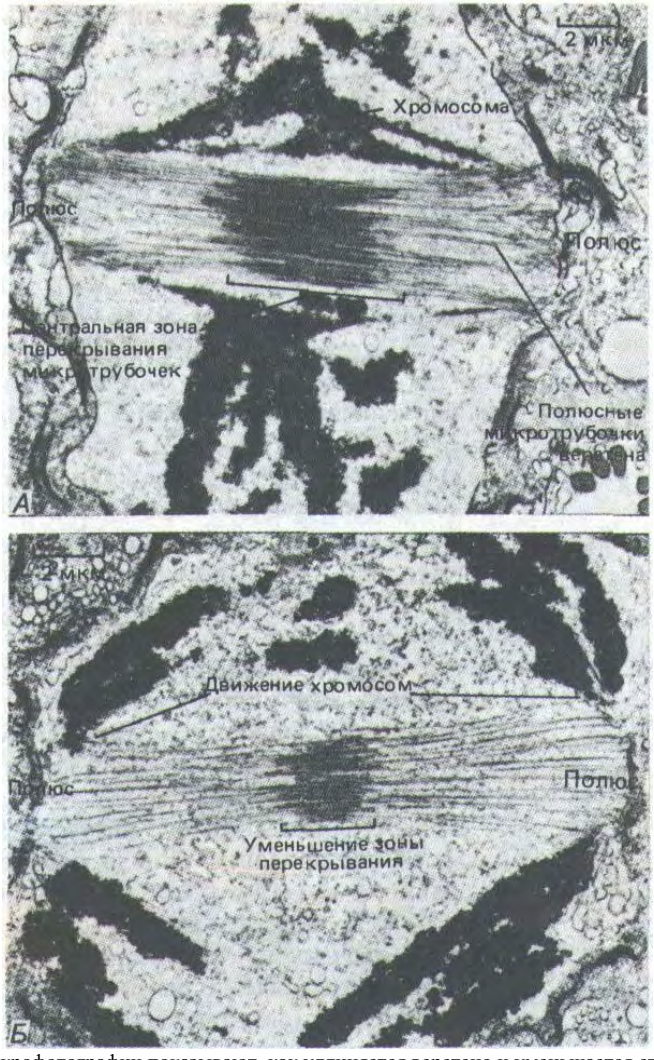


Рис. I3-62. Эти электронные микрофотографии показывают, как удлиняется веретено и уменьшается степень перекрывания полюсных микротрубочек при митозе у диатомовой водоросли. *А.* Метафаза. *Б.* Поздняя анафаза. (С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps.)

диатомей. В такой модельной системе митотическое веретено легко доступно для макромолекул, так что на ней можно испытывать действие различных макромолекулярных агентов, в том числе и специфических антител. Ингибиторы, присоединяющиеся к актину или миозину (в частности, антитела к миозину) не оказывают никакого влияния на движение анафазных хромосом, так что за это движение вряд ли ответственна актомиозиновая система вроде той, которая действует в мышцах. Вместо этого силу здесь могли бы создавать белки, подобные *динеину,* связанному с микротрубочками в ресничках и жгутиках (разд. 11.3.7), или *кинезину,* участвующему в быстром аксонном транспорте (разд. 10.4.9). Эти два белка присоединяются к микротрубочкам и вызывают направленное движение за счет гидролиза ATP. но пока не известно, играют ли они существенную роль в митозе.

В клетках высших организмов перед формированием веретена ядерная оболочка разрушается, и поэтому астральные микротрубочки (те, которые направлены от митотического веретена, см. рис. 13-56) могут играть более важную роль в анафазе В, чем у диатомовых. Например, в яйцах некоторых морских беспозвоночных можно разрушить микротрубочки веретена, не блокируя при этом анафазу В. Это позволяет думать, что полюса веретена раздвигаются под влиянием *тянущих* сил - вероятно, в результате притяжения между астральными микротрубочками и кортексом клетки. Сходные взаимодействия могли бы играть роль и в случаях асимметричного деления клетки (разд. 13.5.13).

13.5.11. В телофазе ядерная оболочка образуется сначала вокруг отдельных хромосом [45]

К концу анафазы хромосомы полностью разделяются на две идентичные группы, по одной у каждого полюса веретена. В последней стадии митоза-**телофазе**-вокруг каждой группы хромосом вновь образуется ядерная оболочка, так что получаются два дочерних интерфазных ядра. В связи с распадом и восстановлением ядерной оболочки нужно рассмотреть по меньшей мере три ее компонента:

1) *наружную и внутреннюю ядерные мембраны,* являющиеся продолжением мембран эндоплазматического ретикулума;

2) лежащую под ними *ядерную ламину* - тонкую двумерную сеть промежуточных филаментов, состоящих из ядерных ламиинов, которая взаимодействует с внутренней ядерной мембраной, хроматином и ядерными порами (разд. 11.5.5);

3) *ядерные поры,* образованные крупными комплексами из недостаточно охарактеризованных белков (разд. 8.3.1).

В профазе многие белки фосфорилируются. Если фосфорилирование молекул гистона H1, по-видимому, способствует конденсации хромосом (разд. 13.1.10), то фосфорилирование ядерных ламинов участвует в регуляции распада и восстановления ядерной оболочки. Фосфорилирование ламинов происходит во многих различных участках каждой полипептидной цепи и поэтому приводит к их распаду и, как следствие, к разрушению ядерной ламины. Затем - вероятно, в ответ на другой сигнал - сама ядерная оболочка распадается на, мелкие мембранные пузырьки.

Резкий переход от метафазы к анафазе, по-видимому, приводит к дефосфорилированию многих белков (в том числе молекул гистона H1 и ламинов), которые были фосфорилированы в профазе. Вскоре после этого, в телофазе, пузырьки ядерной мембраны связываются с поверхностью отдельных хромосом и сливаются, восстанавливая ядерные мембраны, которые лишь частично окружают группы хромосом перед полным восстановлением ядерной оболочки (рис. 13-63); одновременно восстанавливаются и ядерные поры, а дефосфорилированные ламины

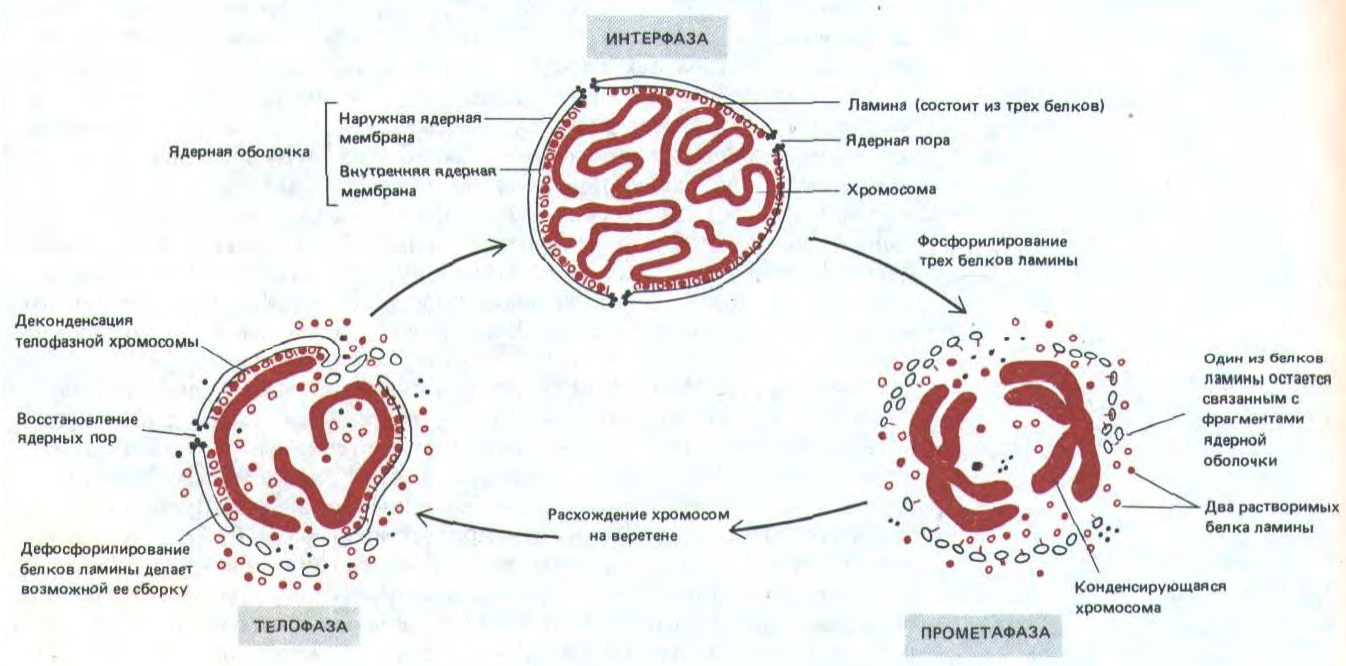


Рис. 13-63. Схема циклических изменений ядерной оболочки во время митоза. В прометафазе ядерные мембраны распадаются на мелкие пузырьки и вновь восстанавливаются в телофазе. Между этими двумя фазами, когда ядерная оболочка разрушена, а ядерные поры и ядерная ламина распались на субъединицы, осуществляются все процессы, в результате которых два набора хромосом расходятся к противоположным полюсам. Как показано на рисунке, новая ядерная оболочка каждой дочерней клетки образуется в результате слияния мембранных пузырьков вокруг группирующихся индивидуальных хромосом; при этом большая часть цитоплазматических компонентов не попадает в новое ядро.

вновь агрегируют, образуя ядерную ламину. Один из белков ламины (ламин В) на протяжении всего митоза остается связанным с фрагментами ядерной мембраны и, возможно, способствует их воссоединению в телофазе. После восстановления ядерной оболочки возобновляется синтез РНК, что ведет к появлению ядрышка (разд. 9.4.19), а хроматин деконденсируется и переходит в дисперсное состояние, характерное для интерфазы.

И распад, и восстановление ядерной структуры могут происходить в неочищенных экстрактах яиц *Xenopus,* разумеется, если эти экстракты приготовлены из клеток соответствующих стадий клеточного цикла (из мнтотических для распада и из интерфазных для восстановления). В таких экстрактах весь процесс, в котором участвуют ламина, ядерные поры и ядерные мембраны, протекает, по всей видимости, нормально в ответ на циклы фосфорилирования и дефосфорилирования. Таким образом, подобные системы in vitro могут служить тест-объектами при идентификации и очистке белков, катализирующих распад и восстановление ядерной оболочки в клетке, в том числе и белков (таких, как MPF), регулирующих эти процессы. Для восстановления ядра к таким экстрактам нужно добавлять ДНК, причем полное восстановление ядерной оболочки происходит вокруг очищенных молекул ДНК, взятой от любого организма, даже от бактериального вируса. Таким образом, хотя здесь и должны участвовать белки, связывающиеся с ДНК, маловероятно, чтобы при этом распознавались специфические последовательности нуклеотидов.

Интересно, что распад ядерной оболочки не является необходимым для митоза. Действительно, позднее мы увидим, что у низших эукариот ядерная оболочка во время митоза не разрушается; принято говорить, что эти организмы обладают не «открытым», а «закрытым» веретеном.

13,5.12. Метафазу и интерфазу можно рассматривать как альтернативные «устойчивые» состояния клетки [46]

На рис. 13-64 схематически представлена одна из современных гипотез относительно митотического цикла. В ней принята в некотором смысле точка зрения химика на митоз, где интерфаза и метафаза рассматриваются как два альтернативных «устойчивых» состояния клетки, а другие стадии митоза - просто как необходимые переходные состояния между ними. Предполагается, что в конце интерфазы происходит включение некоего механизма («М-фазного переключателя»), побуждающего клетку проходить через профазу и прометафазу до более устойчивого метафазного состояния. В конце метафазы этот механизм внезапно выключается, и клетка проходит через анафазу и телофазу, возвращаясь к интерфазе, которая при выключенном регуляторе наиболее устойчива.

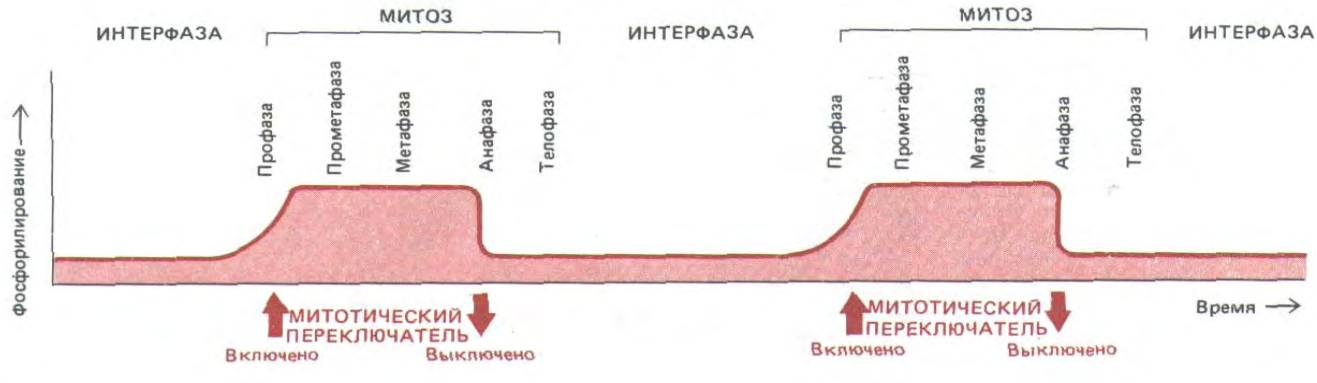


Рис. 13-64. За переход клеток в фазу М и выход из нее, возможно, ответствен некий митотический переключатель с двумя состояниями- «включено» и «выключено». Согласно этой гипотезе, включение приводит к фосфорилированию многих белков, происходящему только в митотической клетке. Серия структурных изменений, связанных со сборкой веретена, не требует специальных триггеров: скорее это ряд энергетически выгодных этапов на пути к стабильному метафазному состоянию. Это состояние продолжается до тех пор, лока анафазный триггер не поставит переключатель в положение «выключено», а дефосфорилирование белков не восстановит прежние глобальные параметры. Это запускает новую серию структурных изменений (включая расхождение хромосом), что опять приводит клетку к стабильному интерфазному состоянию.

Такую точку зрения на митоз подкрепляют данные об изменениях, происходящих с микротрубочками цитоскелета (см. рис. 13-48), а также о внезапных изменениях в активности и степени фосфорилирования некоторых белков, участвующих в митозе, на границах интерфаза/профаза (включение) и метафаза/анафаза (выключение) (см. разд. 13.1.10). Положение «переключателя» могло бы соответствовать уровню активности MPF в клетке (см. обсуждение цикла MPF в разд. 13.1.11 и рис. 13-15).

13-30

13.5.13. Митотическое веретено определяет место, где происходит разделение цитоплазмы при цитокинезе

Во время **цитокинеза** разделяется цитоплазма. Хотя деление ядра и разделение цитоплазмы, как правило, взаимосвязаны, эта связь не всегда неразрывна. Даже в норме за делением ядра может не следовать цитокинез. Например, в раннем зародыше *Drosophila* происходит В циклов ядерных делений без разделения цитоплазмы; в результате образуется одна большая клетка с 6000 ядер, расположенных в один слой около ее поверхности. Одноядерные клетки образуются позже при дроблении цитоплазмы вокруг всех этих ядер (разд. 16.5.2),

Хотя митозу не всегда непосредственно сопутствует цитокинез, митотическое веретено играет важную роль в определении того, когда и как он будет происходить. Цитокинез обычно начинается в анафазе, продолжается во время телофазы и захватывает часть последующего

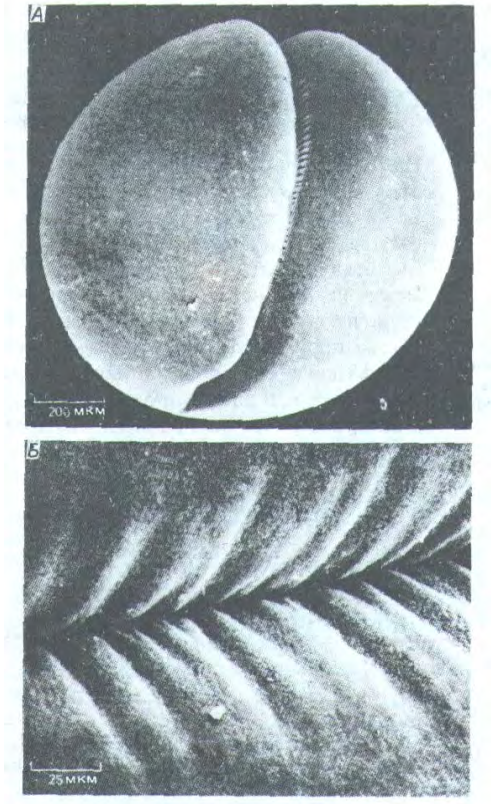


Рис. 13-65. Начало дробления яйца лягушки. Микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Образование борозды обусловлено активностью сократимого кольца, находящегося под мембраной. *А.* Вид клеточной поверхности при малом увеличении. *Б.* Участок борозды при большом увеличении. (H.W. Beams. R.G. Kessel, Am. Sci. 64: 279-290, 1976.)

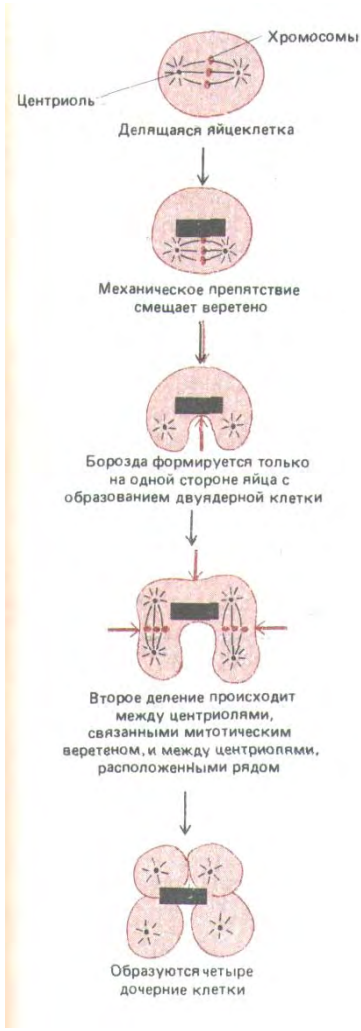


Рис. 13-66. Опыт, демонстрирующий влияние положения веретена на плоскость деления. Если митотическое веретено механически сместить на одну сторону клетки, то борозда дробления не дойдет до противоположной стороны клетки. Последующие деления будут происходить не только по экваторам двух митотических веретен (как это происходит в норме), но и между двумя соседними звездами, не связанными митотическим веретеном. Видимо, сократимый пучок из актиновых филаментов, создающий борозду дробления, всегда образуется в участке, лежащем посередине между двумя звездами. Это означает, что звезды каким-то образом изменяют окружающую область клеточного кортекса.

периода интерфазы. Первым видимым признаком цитокинеза у животных клеток бывает образование небольшой складки плазматической мембраны, появляющейся в анафазе и называемой **бороздой деления** (рис. 13-65). Эта борозда всегда образуется в плоскости метафазной пластинки, под прямым углом к длинной оси митотического веретена. Если в анафазе на достаточно раннем этапе веретено переместить с помощью микроманипулятора, то наметившаяся борозда исчезнет и появится новая в соответствии с новым положением веретена. Изящные опыты на яйцах морского ежа *Echinarachnius* показывают, что борозда дробления будет формироваться посередине между звездами, образовавшимися из двух центросом, даже если центросомы не связаны митотическим веретеном (рис. 13-66). Позднее, когда процесс зашел уже достаточно далеко, цитокинез будет продолжаться и в том случае, если веретено и его звезды удалить пипеткой или разрушить колхицином.

Большинство клеток делится симметрично. Борозда деления образуется по экватору родительской клетки, так что дочерние клетки будут одинаковой величины и с примерно одинаковыми свойствами. В период эмбрионального развития, однако, бывает много случаев, когда клетки делятся асимметрично: борозда разделяет две разные клетки, которые будут развиваться разными путями. Деления такого рода часто строго определены пространственно. Например, они могут происходить в определенных плоскостях по отношению к поверхности эпителиального пласта или приводить к обособлению участков цитоплазмы с разными наборами органелл. Независимо от того, будет ли деление симметричным или асимметричным, положение борозды, а значит, и плоскости деления всегда определяется положением митотического веретена. При надобности веретено может запрограммированным образом поворачиваться, занимая нужное положение в клетке и соответственно ориентируя плоскость деления (рис. 13-67). Кажется вероятным, что эти движения веретена определяются изменениями в отдельных участках клеточного кортекса, который сдвигает полюса веретена с помощью микротрубочек звезды. Видимо, сходный механизм определяет положение центросомы в поляризованной клетке (разд. 11.4.5). Структура кортекса, который богат актином, рассмотрена в гл. 11 (разд. 11.2).

Микротрубочки и пучки актиновых филаментов, находившиеся в интерфазной цитоплазме, во время митоза разрушаются. Однако цитоплазматические *промежуточные филаменты* во многих клетках сохраняются в целости. В таких клетках сеть промежуточных филаментов, окружающая интерфазное ядро, во время митоза растягивается, охватывая оба дочерних ядра, и в конце концов расчленяется на две части бороздой деления (рис. 13-68).

13.5.14. Актин и миозин создают силу, необходимую для цитокинеза

Разделение цитоплазмы происходит в результате сокращения кольца, состоящего главным образом из актиновых филаментов. Этот пучек

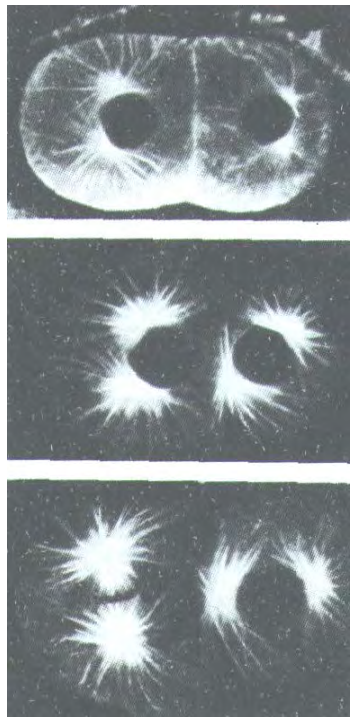


Рис. 13-67. Точно запрограммированный поворот митотического веретена на двуклеточной стадии зародыша нематоды *Caenorhabditis elegans* при подготовке к делению с образованием четырех определенным образом расположенных клеток. (С любезного разрешения John White.)

филаментов, называемый **сократимым кольцом** (рис. 13-69), прикрепляется к внутренней стороне плазматической мембраны с помощью неидентифицированных белков. Сократимое кольцо образуется в начале анафазы, и механизм его сборки неизвестен; сила, которую оно создает, достаточна, чтобы согнуть тонкую стеклянную иглу, введенную в клетку. Нет сомнения в том, что источником силы здесь, так же как и в мышцах, служит взаимное скольжение актиновых и миозиновых филаментов. Например, в лизированных митотических клетках добавление субфрагментов инактивированного миозина блокирует миозин-связывающие участки актина, останавливая таким образом разделение цитоплазмы. Точно так же введение антител к миозину в яйца морского ежа вызывает сглаживание борозды дробления, но на ядерный митоз не влияет. Тем не менее в точности не известно, как взаимодействие актина и миозина втягивает плазматическую мембрану в борозду дробления.

В процессе нормального деления клетки сократимое кольцо не становится толще по мере углубления борозды. Это позволяет предполагать, что оно постепенно уменьшается в объеме за счет потери части филаментов. После завершения цитокинеза сократимое кольцо полностью распадается, а плазматическая мембрана в области борозды стягивается, окружая так называемое остаточное тельце, которое еще связывает две дочерние клетки. Остаточное тельце содержит остатки двух групп полярных микротрубочек, тесно упакованных вместе с материалом плотного матрикса (рис. 13-70).

Цитокинез, при котором из одной клетки образуются две, сильно увеличивает общую площадь клеточной поверхности. Поэтому двум дочерним клеткам требуется больше материала плазматической мембраны, чем исходной клетке. В животных клетках биосинтез вещества мембраны непосредственно перед делением усиливается. Избыточная мембрана у готовящихся к делению клеток, по-видимому, хранится в виде выступов (blebs) на их поверхности.

13.5.15. У высших растений цитокинез осуществляется совершенно иным способом [49]

Большинство клеток высших растений окружено жесткой *клеточной стенкой,* и поэтому механизм цитокинеза существенно отличается от только что описанного для животных клеток. Вместо образования двух дочерних клеток путем их отшнуровки с помощью сократимого кольца, лежащего под поверхностью клетки, цитоплазма разделяется здесь в результате образования новой стенки на границе между дочерними клетками. Образующаяся перегородка точно определяет относительное положение двух новых клеток в растении. Из этого следует, что ориентация плоскостей клеточного деления и увеличение размеров клеток определяют форму растения (см. гл. 20).

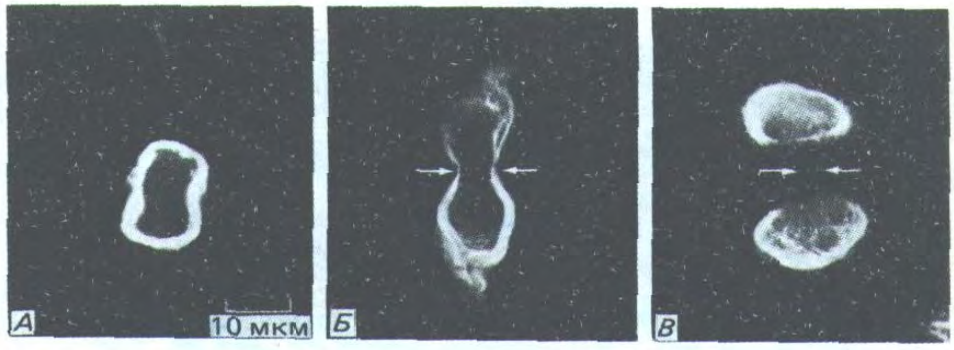


Рис. 13-68. Во время митоза зону ядра окружает пучок промежуточных филаментов. Микрофотографии получены после окрашивания пермеабилизиро ванных клеток флуоресцентными антителами, которые связываются с промежуточными филаментами. *А* -анафаза; Б-ранняя телофаза {стрелками указано положение сократимого кольца); В-поздняя телофаза. (S. H. Blose, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76: 3372-3376, 1979.)



Рис. 13-69. Электронная микрофотография дна борозды, образующейся при делении животной клетки. Сверху для ясности приведена схема борозды деления. (H. W. Beams, R. G. Kessel, Am. Sci. 64: 279-290, 1976.)

Новая поперечная перегородка, или **клеточная пластинка,** начинает строиться в плоскости между двумя дочерними ядрами в ассоциации с остаточными полюсными микротрубочками веретена, которые образуют цилиндрическую структуру, называемую **фрагмопластом.** Эта структура, соответствующая микротрубочкам остаточного тельца животных клеток, состоит из двух групп противоположно ориентированных микротрубочек, расположенных параллельно друг другу (см. рис. 20-42). Микротрубочки, вероятно, прикреплены к поверхности ядра, так что их плюс-концы погружены в электроноплотный диск в экваториальной плоскости. Как показано на рис. 13-71, мелкие ограниченные мембраной пузырьки, происходящие в основном из аппарата Гольджи и наполненные предшественниками клеточной стенки, приходят в контакт с микротрубочками по обе стороны фрагмопласта и транспортируются вдоль них к экваториальной области клетки. Здесь они сливаются, образуя дисковидную, окруженную мембраной структуру - *раннюю клеточную пластинку.* Молекулы полисахаридов, высвобождаемые этими пузырьками, связываются между собой в ранней клеточной пластинке, образуя пектин, гемицеллюлозу и другие компоненты первичной клеточной стенки. Теперь этот диск должен расширяться, пока его края не дойдут до стенки материнской клетки. Чтобы это стало возможным, микротрубочки раннего фрагмопласта претерпевают изменения по периферии ранней клеточной пластинки. Здесь с ними приходят в контакт новые пузырьки, которые затем сливаются на экваторе, расширяя пластинку. Этот процесс повторяется до тех пор, пока растущая клеточная пластинка не достигнет плазматической мембраны материнской клетки и мембраны не сольются, полностью разделяя две новые дочерние клетки (см. рис. 20-41 и 20-42). Затем в клеточной пластинке



Рис. 13-70. *А,* Животная клетка в культуре в конце: деления: остаточное тельце остается связанным с обеими дочерними клетками. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. *Б.* Электронная микрофотография остаточного тельца делящейся животной клетки. Деление практически полностью завершено, но дочерние клетки еще связаны тонким цитоплазматическим мостиком. [С любезного разрешения Guenter Albrecht-Buehler *(А)* и J.M. Millins (Б).]

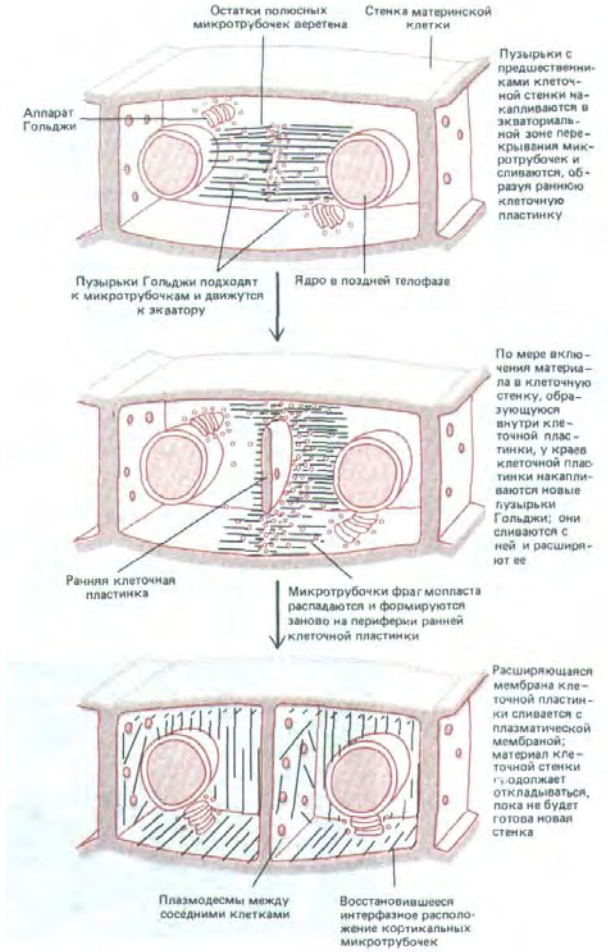


Рис. 13-71. Ход цитокинеза в клетках высших растений, имеющих жесткую клеточную стенку.

откладываются микрофибриллы целлюлозы, завершая построение новой клеточной стенки (рис. 13-71 и 13-72).

С пузырьками образующейся клеточной пластинки связаны элементы эндоплазматического ретикулума, которые часто оказываются включенными в эту пластинку. Впоследствии они превращаются в *плазмодесмы* - сложно устроенные поры, пронизывающие зрелую клеточную



Рис. 13-72. Цитокинез в растительной клетке. Клеточная пластинка (между двумя стрелками) формируется в плоскости, перпендикулярной плоскости рисунка. Одна клетка *(А)* сфотографирована с применением метода дифференциального интерференционного контраста; другая окрашена антителами со связанными частицами золота, которые метят два скопления микротрубочек, входящих в состав фрагмопласта. В обоих случаях стрелками указана плоскость клеточной пластинки. [С любезного разрешения Jeremy D. Pickett-Heaps *(А)* и Andrew Bajer (Б).]

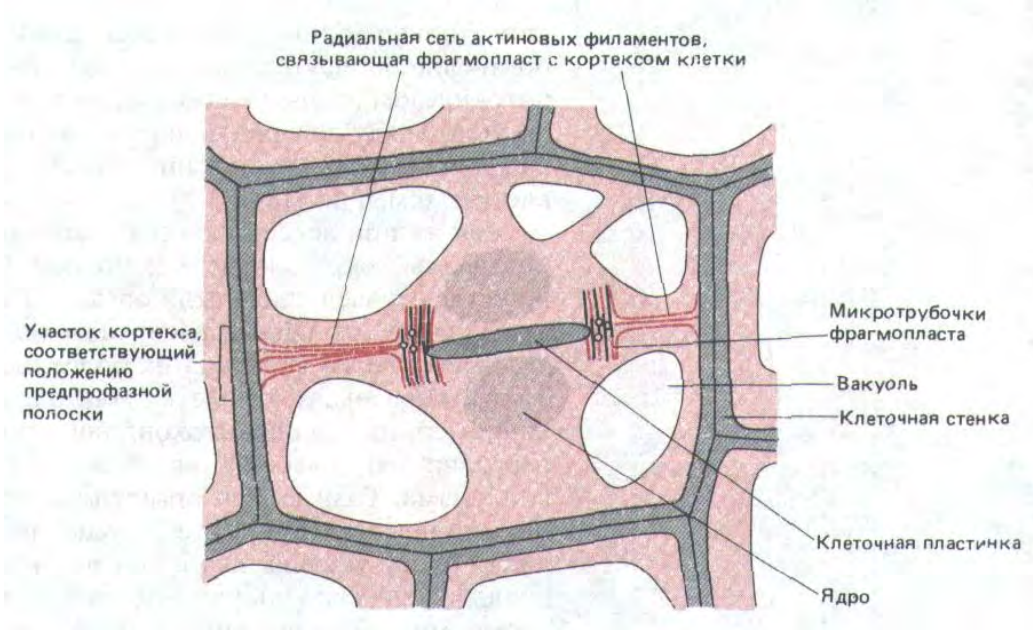


Рис. 13-73. Организация актиновых филаментов в растительной клетке во время цитокинеза. Актиновые филаменты (выделенные темно-красным цветом) формируют радиальную сеть, которая простирается от концов фрагмопласта до клеточного кортекса, образуя вокруг клетки кольцо. Эта сеть, по-видимому, определяет плоскость образования клеточной пластинки. Другая группа актиновых филаментов расположена параллельно микротрубочкам, участвующим в образовании новой клеточной пластинки в фрагмопласте. Еще одна группа актиновых филаментов (на рисунке не показана) подходит к кортексу из области двух дочерних ядер через большую центральную вакуоль, свойственную растительным клеткам (разд. 20.40.7); эти филаменты помогают поддерживать тонкие цитоплазматические мостики, пересекающие вакуоль.

стенку и соединяющие цитоплазму всех клеток растения (см. разд. 20.2.1 и рис. 20-20).

Так же как и у животных, митоз и цитокинез у растений могут быть разобщены. Так, например, в эндосперме семян митозы происходят без цитокинеза, что приводит к образованию гигантской многоядерной клетки. Значительно позднее, когда митотическое веретено уже давно распалось, между отдельными ядрами строятся новые клеточные стенки, так что образуются отдельные клетки.

Для определения точного положения и формы клеточной стенки одного митотического веретена обычно не достаточно. Место соединения будущей пластинки со стенкой материнской клетки, по-видимому, определяется очень рано, еще до начала митоза, узким пучком микротрубочек - *предпрофазным пояском,* расположенным непосредственно под плазматической мембраной (см. разд. 20.5.5 и рис. 20-64). Хотя эти микротрубочки в начале митоза исчезают, от них зависит, в каком участке кортекса будет прикрепляться радиальная сеть актиновых филаментов, которая сохраняется на протяжении всей фазы М и должна будет направлять растущий край клеточной пластинки к надлежащей зоне кортекса (рис. 13-73). Таким образом, актин играет важную роль и в делении клеток с жесткими стенками, где активное сокращение не играет, по-видимому, никакой роли. Поскольку актин участвует также в формировании клеточных септ у грибов, возможно, что он направляет цитокинез у всех эукариот.

13.5.16. Цитокинез должен обеспечить правильное распределение цитоплазматических органелл [50]

Ядро-это только одна из многих клеточных органелл, для удвоения которых необходима предшествующая органелла того же типа. Например, рибосомы могут спонтанно собираться из своих компонентов, но для их построения нужны другие рибосомы, чтобы синтезировать необходимые белки. С другой стороны, митохондрии и хлоропласта не способны к спонтанной самосборке и могут образовываться только путем роста и разделения предсуществующих органелл (разд. 7.5.1). Точно так же механизмы роста ряда других органелл, например аппарата Гольджи и эндоплазматического ретикулума, таковы, что трудно представить себе их новообразование в отсутствие хотя бы фрагментов соответствующих структур (см. гл. 8). У некоторых водорослей, имею-

щих только один хлоропласт или только один аппарат Гольджи, органелла, присутствующая в одном-единственном экземпляре, перед цитокинезом расщепляется на две половинки, которые затем и распределяются между дочерними клетками (см. рис. 7-67). Примером такого же явления служат дупликация и сегрегация центросомы в животных клетках (см. рис. 13-46).

Как же при делении клеток высших эукариот разделяются различные органеллы, окруженные мембраной (за исключением ядра)? В большинстве случаев число этих органелл достаточно велико (см. табл. 8-1), чтобы и при случайном распределении их в процессе цитокинеза каждая дочерняя клетка получала их более или менее представительный набор. Таким образом, хотя клетка млекопитающего не выживет, не получив, например, ни одной митохондрии, вполне возможно, что для надежной передачи их дочерним клеткам не требуется никакого специального механизма. Разумеется, органеллы, присутствующие в клетках в большом количестве, будут всегда успешно наследоваться, если в среднем их число будет удваиваться в каждом клеточном поколении. Другие органеллы, такие как аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум, во время митоза распадаются на более мелкие фрагменты и пузырьки. Такое раздробление, вероятно, способствует их равному распределению между дочерними клетками.

13-26

13.5.17. В особых случаях определенные клеточные компоненты могут передаваться только одной дочерней клетке

До сих пор мы рассматривали клеточное деление как механизм, предназначенный для получения двух одинаковых клеток из одной. Однако в процессе развития и поддержания тканей сложных многоклеточных организмов деление во многих случаях бывает явно неравным. В особенности это относится к ранним делениям дробления, когда большое оплодотворенное яйцо подразделяется на клетки меньшей величины, из которых должны будут развиться разные части организма (разд. 16.2.2). Мы уже говорили о том, что асимметричное положение веретена во время митоза может приводить к появлению двух клеток неодинаковых размеров (разд. 13.5.13), однако образование дочерних клеток, различающихся в биохимическом отношении, составляет особую проблему.

Поразительным примером такого процесса может служить поведение группы своеобразных гранул в яйце нематоды *Caenorhabditis elegans*. В цитоплазме неоплодотворенного яйца эти *«P-гранулы»* распределены равномерно, но непосредственно перед первым делением они перемещаются к заднему концу клетки и поэтому попадают только в один из двух бластомеров (рис. 13-74). Такое неравное распределение повторяется в ряде последующих клеточных делений, так что в конце концов гранулы оказываются только в тех клетках, которые будут формировать зародышевую линию (т. е. в предшественниках яиц и сперматозоидов). Возможно, что P-гранулы играют какую-то роль в дальнейшей дифференцировке этих клеток.

P-гранулы будут передвигаться к заднему концу клетки даже у мутантов, у которых митотическое веретено повернуто под прямым углом к нормальному положению. Кроме того, результаты экспериментов с ингибиторами цитоскелета позволяют предполагать, что направленное движение P-гранул зависит не от микротрубочек, а от актиновых филаментов (оно блокируется цитохалазином D). Хотя неравномерное распределение гранул, по-видимому, определяется каким-то асимметричным свойством актинового цитоскелета, молекулярный механизм их направленного перемещения остается неизвестным. Заманчивой кажется



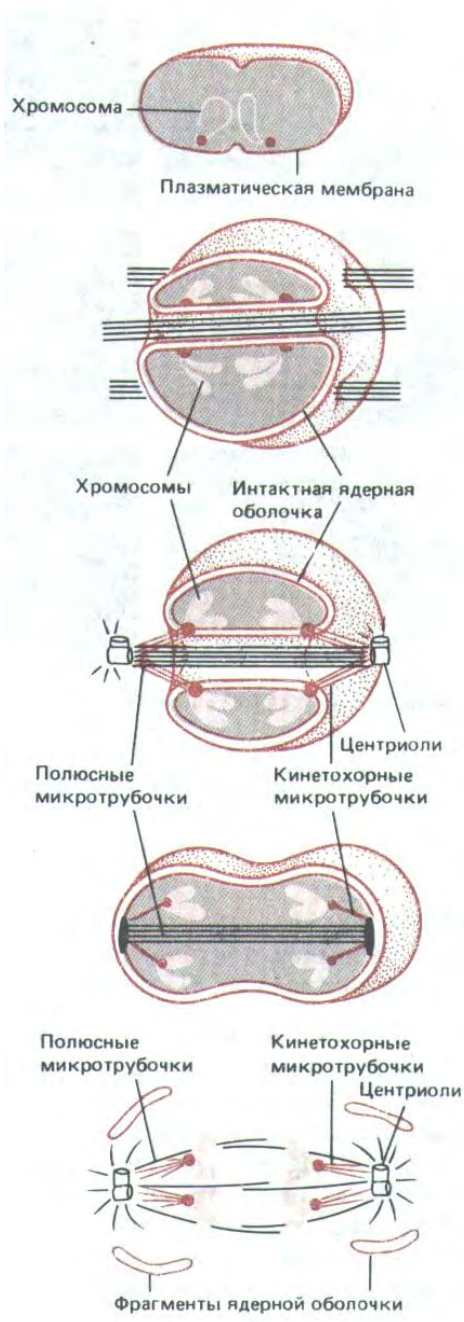
Рис. 13-74. Запрограммированная асимметричная передача цитоплазматического компонента одной из дочерних клеток в двух первых делениях оплодотворенного яйца нематоды *Caenorhabditis elegans*. Слева представлены живые клетки, сфотографированные с применением метода дифференциального интерференционного контраста; справа - те же клетки, окрашенные антителами к Р-гранулам. Эти мелкие гранулы с неизвестной функцией (0,5-1 мкм в диаметре) распределены в цитоплазме неоплодотворенного яйца случайным образом. (С любезного разрешения Susan Strome.)

мысль, что подобные механизмы могли бы определять передвижение многих обычно невидимых компонентов клетки и что получающиеся в результате этого неравные дочерние клетки программировались бы таким образом для дальнейшей дифференцировки (разд. 16.4.1).

13.5.18. Сложный митотический процесс высших организмов развился постепенно из механизмов деления прокариот [52]

В прокариотических клетках разделение ДНК и цитоплазмы представляет собой единый процесс. Во время репликации ДНК две копии хромосомы прикреплены к особым участкам клеточной мембраны, которые постепенно раздвигаются в результате роста мембраны между ними. Деление цитоплазмы происходит между двумя точками прикрепления ДНК таким образом, что каждая дочерняя клетка получает по одной хромосоме (рис. 13-75). С появлением эукариот геном усложнился, увеличились размеры и число хромосом. Возникла необходимость в создании более сложного механизма распределения хромосом между дочерними клетками.

Ясно, что митотический аппарат не мог выработаться сразу. У многих примитивных эукариот, например у динофлагелляты *Crypthecodinium cohnii,* митоз остался процессом, связанным с мембраной, а ядерная мембрана взяла на себя роль плазматической мембраны прокариот. Промежуточное положение этой крупной одноклеточной водоросли отражено также в биохимии ее хромосом, содержащих, подобно прокариотическим хромосомам, сравнительно мало ассоциированных белков. Ядерная мембрана у *C. cohnii* сохраняется на протяжении всего митоза, а микротрубочки веретена целиком располагаются вне ядра. Там, где микротрубочки давят на ядерную оболочку, она впячивается внутрь, образуя ряд параллельных сквозных каналов (рис. 13-75). Хромосомы прикрепляются к внутренней мембране ядерной оболочки в области этих каналов, и разделение хромосом полностью происходит на внутренней поверхности этой мембраны. Таким образом, внеядерное «веретено» (представляющее собой жесткий стержень без каких-либо динамических



БАКТЕРИИ

Дочерние хромосомы, прикрепленные к плазматической мембране, разделяются в результате роста мембраны между ними

ТИПИЧНЫЕ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТЫ

Несколько пучков микротрубочек проходят через каналы в интактной ядерной оболочке и устанавливают полярность деления; хромосомы расходятся, сохраняя связь с внутренней ядерной мембраной, но не прикрепляясь к пучкам микротрубочек

ГИПЕРМАСТИГОТЫ И НЕКОТОРЫЕ НЕОБЫЧНЫЕ ДИНОФЛАГЕЛЛЯТЫ

Единое центральное веретено образуется между центриолями и проходит через канал в интактной ядерной оболочке; хромосомы прикреплены своими кинетохорами к ядерной оболочке и взаимодействуют с полюсами веретена через кинетохорные микроктрубочки

ДРОЖЖИ

Ядерная оболочка остается интактной; внутри ядра формируются непрерывные полюсные микротрубочки веретена; они проходят между двумя полюсными тельцами веретена, связанными с ядерной оболочкой; каждая хромосома соединена с полюсом одной кинетохорной микротрубочкой

ВЫСШИЕ ОРГАНИЗМЫ

Веретено начинает формироваться вне ядра; в прометафазе ядерная оболочка разрушается, что позволяет хромосомам прикрепляться к микротрубочкам веретена, которые становятся теперь кинетохорными микротрубочками

Рис. 13-75. У разных организмов используются разные механизмы расхождения хромосом. Некоторые из них могли быть переходными стадиями в эволюции митотического веретена высших организмов. Во всех примерах, за исключением бактерий, показан только центральный, ядерный участок клетки.

свойств) используется просто для придания ядерной мембране определенной формы, от которой будет зависеть плоскость деления.

Несколько более развитое, но все еще внеядерное веретено свойственно гипермастиготам, у которых ядерная оболочка в процессе митоза тоже сохраняется. Эти крупные простейшие из кишечника насекомых особенно четко иллюстрируют независимость удлинения веретена и движения хромосом, приводящего к разделению хроматид, поскольку сестринские кинетохоры еще до их связывания с веретеном расходятся в стороны в результате роста ядерной мембраны, к которой они прикреплены. Только тогда, когда кинетохоры оказываются вблизи полюсов веретена, у них появляется возможность с помощью кинетохорных нитей прикрепиться к веретену. Поскольку нити веретена остаются отделенными от хромосом ядерной оболочкой, Кинетохорные нити, образующиеся вне ядра, должны каким-то образом прикрепиться

к хромосомам через ядерную мембрану. После этого прикрепления кинетохоры подтягиваются к полюсам обычным способом (13-75).

Следующий этап в эволюции механизмов митоза представлен группой организмов с веретеном внутри интактного ядра. У дрожжей веретено состоит из непрерывного внутриядерного пучка микротрубочек, который тянется от одного полюса до другого и удлиняется в процессе митоза (см. рис. 13-75 и 13-16). У других видов, таких как диатомовые водоросли, непрерывное веретено заменяется двумя обычными полуверетенами, у которых концы микротрубочек переплетаются, образуя зону перекрывания. И у дрожжей, и у диатомовых водорослей хромосомы соединены с веретеном своими кинетохорами и расхождение хромосом происходит примерно так же, как в клетках млекопитающих, если не считать того, что весь этот процесс обычно происходит внутри ядерной оболочки. Пока еще не удалось убедительно объяснить, почему у высших растений и животных вместо этого выработался митогический аппарат, требующий контролируемого и обратимого разрушения ядерной оболочки.

Заключение

Процесс клеточного деления состоит из деления ядра (митоз) и следующего за ним деления цитоплазмы (цитокинез). Митоз начинается с профазы - переходного периода, когда расщепление центросомы приводит к образованию двух полюсов веретена, организующего в дальнейшем распределение ядерного материала. В это же время начало фазы М сопровождается заметным усилением фосфорилирования определенных белков. Видимо, в результате этого в митотической клетке создается необычайно динамичная система микротрубочек. После разрушения ядерной оболочки в прометафазе кинетохоры конденсированных хромосом могут захватываться и стабилизироваться группами микротрубочек, в большом числе отходящих от обоих полюсов веретена. Эти микротрубочки тянут кинетохоры к противоположным полюсам, и в результате хромосомы располагаются во время метафазы по экватору веретена. В анафазе это натяжение внезапно ослабевает, когда сестринские хроматиды отделяются друг от друга и расходятся к разным полюсам. В добавление к этому часто раздвигаются и оба полюса. В конечной стадии митоза, телофазе, вокруг каждой группы разделившихся хромосом вновь формируется ядерная оболочка, когда белки, фосфорилированные в начале фазы М, вновь дефосфорилируются.

Клеточное деление заканчивается разделением цитоплазмы (цитокинезом); хромосомы деконденсируются, и на них возобновляется синтез РНК. По-видимому, цитокинез у столь различных эукариотических организмов, как животные, растения и грибы, направляется организованными пучками актиновых филаментов. Крупные органеллы, ограниченные мембранами, такие как аппарат Гольджи и эндоплазматический ретикулум, во время фазы М разделяются на более мелкие фрагменты и пузырьки, что обеспечивает их равномерное распределение между дочерними клетками. Однако при цитокинезе может происходить и запрограммированное асимметричное распределение материала. Например, клетка может делиться с образованием неравных по величине дочерних клеток, или же какой-то компонент цитоплазмы может перед цитокинезом скапливаться на одной стороне клетки и передаваться только одной из двух в остальном одинаковых дочерних клеток.

Литература

Общая

Baserya R. The Biology of Cell Reproduction. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1985.
Beach D., Basilica C., Newport J., eds. Cell Cycle Control in Eukaryotes. Cold Spring Harbor NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
John P.C.I., ed. The Cell Cycle. Cambridge U.K., Cambridge University Press, 1981.
Mitchison J. M. The Biology of the Cell Cycle. Cambridge U. K., Cambridge University Press, 1971.
Pollack R. Readings in Mammalian Cell Culture, 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981. (An anthology, including many important papers on cell growth and division.)
Prescott D.M. Reproduction of Eukaryotic Cells. New York, Academic Press, 1976.

Цитированная

1. *Baser òa R.* The Biology of Cell Reproduction. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1985.
Howard A., Pelc S. R. Nuclear incorporation of P^{32} as demonstrated by autoradiographs. Exp. Cell Res., 2, 178-187,1951.
Lloyd D., Poole R. K., Edwards S. W. The Cell Division Cycle. New York, Academic Press, 1982.
Mitchison J. M. The Biology of the Cell Cycle. Cambridge, U. K., CambridgeUniversity Press, 1971.
2. *Van Dilla M.A., Trujillo T. T., Mullaney P.P., Coulter J.R.* Cell microfluorometry: a method for rapid fluorescence measurement. Science, **163,** 1213-1214, 1969.
3. *Creanor J., Mitchison J. M.* Patterns of protein synthesis during the cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe.* J. Cell Sci., 58, 263-285, 1982.
Pardee A. B., Coppock D.L., Yang H.C. Regulation of cell proliferation at the onset of DNA synthesis. J. Cell Sci., Suppl. 4, 171-180, 1986.
4. *Rao P. N., Johnson R. T.* Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis. Nature, 225, 159 164, 1970.
5. Xeros N. Deoxyribonucleotide control and synchronization of mitosis. Nature, 194, 682-683, 1962.
6. *Mitchison J. M.* The Biology of the Cell Cycle, pp. 234-244. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1971.
Schlegel R., Pardee A. B. Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells. Science, 232, 1264-1266, 1986.
7. *Johnson R. T., Rao P. N.* Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei. Nature, 226, 717′-*122,* 1970.
8. *Blow J. J., Laskey R. A.* A role for the nuclear envelope in controlling DNA replication within the cell cycle. Nature, 332, 546 548, 1988.
9. *Kirschner M., Newport J., Gerhart J.* The timing of early developmental events in *Xenopus.* Trends Genet., 1, 41-47, 1985.
10. *Gerhart J., Wu M., Kirschner M.* Cell cycle dynamics of an M-phase-specific cytoplasmic factor in *Xenopus laevis* oocytes and eggs. J. Cell Biol., 98, 1247-1255, 1984.
Lohka M. J., Hayes M. K., Mailer J. L. Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 3009-3013, 1988.
Newport J., Kirschner M. Regulation of the cell cycle during early *Xenopus* development. Cell, 37, 731-742, 1984.
11. *Hara K., Tydeman P., Kirschner M.* A cytoplasmic clock with the same period as the division cycle in *Xenopus* eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 462-466, 1980.
Kimelman D., Kirschner M., Scherson T. The events of the midblastula transition in *Xenopus* are regulated by changes in the cell cycle. Cell, 48, 399-407, 1987.
Pines J., Hunt T. Molecular cloning and characterization of the mRNA for cyclin from sea urchin eggs. EMBO J., 6, 2987-2995, 1987.
Swenson K. I.. Farrell K. M., Ruderman J. V. The clam embryo protein cyclin A induced entry into M phase and the resumption of meiosis in *Xenopus* oocytes. Cell, 47, 861 870, 1986.
12. *Nurse P.* Cell cycle control genes in yeast. Trends Genet., 1, 51-55, 1985.
Pringle J. R., Hartwell L. H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces,* Life Cycle and Inheritance (J. N. Starthern, E. W. Jones, J. R. Broach, eds.), pp. 97-142. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1981.
Watson J. D., Hopkins N. H., Roberts J. W., Weiner A. M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed., pp. 550-592. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1987.
13. *Hartwell L.H.* Cell division from a genetic perspective. J. Cell Biol., 77, 627-637, 1978.

Nurse P. Genetic analysis of the cell cycle. Symp. Soc. Gen. Microbiol., 31, 291-315, 1981.

14. *Hayles J., Nurse P.* Cell cycle regulation in yeast. J. Cell Sci., Suppl. 4, 155-170, 1986.
Johnston G. C., Pringle J. R., Hartwell L. H. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* Exp. Cell Res., 105, 79-98, 1977.
Prescott D. M. Changes in nuclear volume and growth rate and prevention of cell division in *Amoeba proteus* resulting from cytoplasmic amputations. Exp. Cell Res., 11, 94-98, 1956.
15. *Dunphy W.G., Brizuela L., Beach D., Newport J.* The *Xenopus cdc2* protein is a component of MPF, a cytoplasmic regulator of mitosis. Cell, 54, 423-431, 1988.
Gautier J., Nor bur y C., Lohka M., Nurse P., Mailer J. Purified maturation-promoting factor contains the product of a *Xenopus* homolog of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2* $^{+}$. Cell, 54, 433-439, 1988.
Lee M. G., Nurse P. Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2.* Nature, 327, 31-35, 1987.
Murray A. W. A mitotic inducer matures. Nature, 335, 207-208, 1988.
Solomon M. et al. Cyclin in fission yeast. Cell, 54, 738-740, 1988.
16. *Cheng H, LeBlond C. P.* Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. Am. J. Anat., 141, 461-480, 1974. *Goss R.J.* The Physiology of Growth. New York, Academic Press, 1978.
17. *Pardee A. B.* A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71, 1286-1290, 1974.
18. *Brooks R. F.* The transition probability model: successes, limitations and deficiencies. In: Temporal Order (L. Rensing, N.I. Jaeger, eds.). Berlin, Springer, 1985. *Shields R.* Transition probability and the origin of variation in the cell cycle. Nature, 267, 704-707, 1977.
Smith J.A., Martin L. Do cells cycle? Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1263-1267, 1973.
19. *DeuelT.F.* Polypeptide growth factors: roles in normal and abnormal growth. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 443-492, 1987.
Evered D., Nugent J., Whelan J., eds. Growth Factors in Biology and Medicine. Ciba Foundation Symposium 116. London, Pitman, 1985.
Sato G., ed. Hormones and Cell Culture. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1979.
Wang J.L., Hsu Y.-M. Negative regulators of cell growth. Trends Biochem. Sci., 11, 24-27, 1986.
20. *Ross R., Raines E. W., Bowen-Pope D. F.* The biology of platelet-derived growth factor. Cell, 46, 155-169, 1986.
Stiles C.D. The molecular biology of platelet-derived growth factor. Cell, 33, 653-655, 1983.
21. *Dunn G.A., Ireland G. W.* New evidence that growth in 3T3 cell cultures is a diffusion-limited process. Nature, 312, 63-65, 1984.
Holley R. W., Kierman J. A. "Contact inhibition" of cell division in 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 300 304, 1968.
Stoker M. G. P. Role of diffusion boundary layer in contact inhibition of growth. Nature, 246, 200-203, 1973.
22. *Folkman J., Moscona R.* Role of cell shape in growth control. Nature, 273, 345-349, 1978.
O'Neill C., Jordan P., Ireland G. Evidence for two distinct mechanisms of anchorage simulation in freshly explanted and 3T3 mouse fibroblasts. Cell, 44, 489-496, 1986.
23. *Brooks R.F.* Regulation of the fibroblast cell cycle by serum. Nature, 260, 248-250, 1976.
Larsson O., Zetterberg A., Engstrom W. Consequences of parental exposure to serum-free medium for progeny cell division. J. Cell Sci., 75, 259-268, 1985.
Zetterberg A., Larsson O. Kinetic analysis of regulatory events in Gl leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 5365-5369, 1985.
24. *Baser òa R.* The Biology of Cell Reproduction, pp. 103-113. Cambridge, MA, Harvard University Press, 1985.
Larsson 0., Dafgard E., Engstrom W., Zetterberg A. Immediate effects of serum depletion on dissociation between growth in size and cell division in proliferating 3T3 cells. J. Cell. Physiol., 127, 267-273, 1986.
25. *Bauer E. et al.* Diminished response of Werner's syndrome fibroblasts to growth factors PDGF and FGF. Science, 234, 1240-1243, 1986.
Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res., 37, 614 636, 1965.
Holiday R., ed. Genes, Proteins, and Cellular Aging. New York, Van Nostrand, 1986. (An anthology of papers on cell senescence.)
Loo D. T., Fuquay J. L, Rawson C. L., Barnes D. W. Extended culture of mouse

embryo cells without sensecence: inhibition by serum. Science, 236, 200-202, 1987.
Rheinwald J.G., Green H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. Nature, 265, 421 424, 1977.
Smith J. R., Whitney R. G. Intraclonal variation in proliferative potential of human diploid fibroblasts: stochastic mechanism for cellular aging. Science, 207, 82-84, 1980.
26. *Kahn P., Grqf T., eds.* Oncogenes and Growth Control. Berlin, Springer, 1986.
Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J. W., Weiner A.M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed., pp. 961 1096. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1987.
27. *Feramisco J., Ozanne B., Stiles C., eds.* Cancer Cells 3: Growth Factors and Transformation. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985
Temin H. M., Rubin H. Characteristics of an assay for Rous Sarcoma virus and Rous sarcoma cells in tissue culture. Virology, 6, 669 688, 1958.
28. *Bishop J. M.* Viral oncogenes. Cell, 42, 23-38, 1985.
Martin G.S. Rous sarcoma virus: a function required for the maintenance of the transformed state. Nature, 227, 1021 1023, 1970.
Swanstrom R., Parker R. C, *Varmus H. E., Bishop J. M.* Transduction of a cellular oncogene the genesis of Rous sarcoma virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2519 2523, 1983.
Varmus H. Cellular and viral oncogenes. In: The Molecular Basis of Blood Diseases (G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, P. W. Majerus. eds.), pp. 271-345. Philadelphia, Saunders, 1987.
29. *Harris H.* The genetic analysis of malignancy. J. Cell Sci., Suppl. 4, 431 444, 1986 *Klein G.* The approaching era of the tumor suppressor genes. Science, 238 1539 1545, 1987.
Weinbercj R.A. A molecular basis of cancer. Sci. Am., 249(5), 126 142, 1983.
30. *Doolittle R. F. el al.* Simian sarcoma virus oncogene, \-*sis,* is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor. Science, 221, 275 277, 1983
Marshall C.J. Oncogenes. J. Cell Sci., Suppl. 4, 417 430, 1986.
Waterfield M. D. et al. Platelet-derived growth factor is structurally related to th putative transforming protein $p28^{sis}$ of simian sarcoma virus. Nature, 304, 35-39 1983.
31. *Almendral J. M. et al.* Complexity of the early genetic response to growth factors in mouse fibroblasts. Moï. Cell. Biol., 8, 2140 2148, 1988.
Hunter T. The proteins of oncogenes. Sci. Am., 251(2), 70-79, 1984.
Robertson M. Molecular associations and conceptual connections. Nature, 334, 100 102, 1988.
Yu *C. L., Tsai M. H., Stacey D. W.* Cellular *ras* activity and phospholipid metabolism. Cell, 52, 63-71, 1988.
32. *Herman B., Pledger W.J.* Platelet-derived growth factor-induced alterations in vinculin and actin distributions in BALB/c-3T3 cells. J. Cell Biol., 100, 1031 1040, 1985.
Hirst R., Horwitz A.. Buck C., Rohrschneider L. Phosphorylation of the fibronectin receptor complex in cells transformed by oncogenes that encode tyrosine kinases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 6470 6474, 1986.
Jove R., Hanafusa H. Cell transformation by the viral *src* oncogene. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 31 56, 1987.
33. *Burger M. M.* Proteolytic enzymes initiating cell division and escape from contact inhibition of growth. Nature, 227, 170-171, 1970.
Sulivan L. M., Quigley J. P. An anticatalytic monoclonal antobody to avian plas-minogen activator: its effect on behavior of RSV-transformed chick fibroblasts. Cell, 45, 905-915, 1986.
34. *Adamson E.D.* Oncogenes in development. Development, 99, 449 471, 1987.
Bryant P.J., Bryant S. V., French V. Biological regeneration and pattern formation. Sci. Am., 237(1), 67-81, 1977.
Fankhauser G. Nucleo-cytoplasmic relations in amphibian development. Int. Rev. Cytol., 1, 165-193, 1952.
35. *Bajer A.S., Mole-Bajer J.* Spindle Dynamics and Chromosome Movements. New York, Academic Press, 1972.
Mclntosh J.R. Mechanisms of mitosis. Trends Biochem. Sci., 9, 195-198, 1984.
Mazia C. Mitosis and the physiology of cell division. In: The Cell (J. Brachet, A. E. Mirsky, eds.), Vol. 3, pp. 77-412. London, Academic Pess, 1961.
Wilson E. B. The Cell in Development and Heredity, 3rd ed. with corrections. New York, Macmillan Company, 1928. (Reprinted, New York, Garland, 1987.)
36. *Inoue S., Sato H.* Cell motility by labile association of molecules: the nature of mitotic spindle fibers and their role in chromosome movement. J. Gen. Physiol., 50, 259-292, 1967.
Karsenti E., Maro B. Centrosomes and the spatial distribution of microtubules in animal cells. Trends Biochem. Sci., **11,** 460 463, 1986.

Kirschner M., Mitchison T. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. Cell, 45, 329-342, 1986.
Kuriyama R., Borisy G. G. Microtubule-nucleating activity of centrosomes in Chinese hamster ovary cells is independent of the centriole cycle but coupled to the mitotic cycle. J. Cell Biol., 91, 822 826, 1981.
Saxton W. M. et al. Tubulin dynamics in cultured mammalian cells. J. Cell Biol., 99, 2175-2186, 1984.
37. *Clarke L., Carbon J.* The structure and function of yeast centromeres. Annu. Rev. Genet., 19, 29-56, 1985.
Earnsham W. C. et al. Molecular cloning of cDNA for CENP-B, the major human centromere autoantigen. J. Cell Biol., 104, 817-829, 1987.
Mitchison T.J., Evans L., Schulze E., Kirschner M. Sites of microtubule assembly and disassembly in the mitotic spindle. Cell, 45, 515-527, 1986.
Peterson J. B., Ris H. Electron microscopic study of the spindle and chromosome movement in the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* J. Cell Sci., 22, 219-242, 1976.
Rieder C. L. The formation, structure and composition of the mammalian kinetochore fiber. Int. Rev. Cytol., 79, 1-58, 1982.
38. *Euteneuer U., Mclntosh J. R.* Structural polarity of kinetochore microtubules in PtKj cells. J. Cell Biol., 89, 338-345, 1981.
Mitchison T.J., Kirschner M. W. Properties of the kinetochore in vitro. II. Microtubule capture and ATP-dependent translocation. J. Cell Biol., 101, 766-777, 1985.
Rieder C. L., Davison E. A., Jensen C.W., Cassimeris L., Salmon E. D. Oscillatory monooriented movements of chromosomes and their position relative to the spindle pole result from the ejection properties of the aster and half-spindle. J. Cell Biol., 103, 581 591, 1986.
Roos U.-P. Light and electron microscopy of rat kangaroo cells in mitosis. III. Patterns of chromosome behavior during prometaphase. Chromosoma, 54, 363-385, 1976.
39. *Begg D.A., EllisG.W.* Micromanipulation studies of chromosome movement. J. Cell Biol., 82, 528-541, 1979.
Nicklas R. B. The forces that move chromosomes in mitosis. Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem., 17, 431-450, 1988.
Nicklas R. B., Kubai D. F. Microtubules, chromosome movement, and reorientation after chromosomes are detached from the spindle by micromanipulation. Chromosoma, 92, 313-324, 1985.
40. *Hays T.S., Wise D., Salmon E.D.* Traction force on a kinetochore at metaphase acts as a linear function of kinetochore fiber length. J. Cell Biol., 93, 374-382, 1982.
McNeill P. A., Berns M. W. Chromosome behavior after laser microirradiation of a single kinetochore in mitotic PtK2 cells. J. Cell Biol., 88, 543-553, 1981.
Ostergren G. The mechanism of coordination in bivalents and multivalents. The theory of orientation by pulling. Hereditas, 37, 85-156, 1951.
41. *Hepler P. K., Callaham D. A.* Free calcium increases during anaphase in stamen hair cells of *Tradescantia.* J. Cell Biol., 105, 2137-2143, 1987.
Murray A. W., Szostak J. W. Chromosome segregation in mitosis and meiosis. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 289-315, 1985.
Wolniak S. M. The regulation of mitotic spindle function. Biochem. Cell Biol., 66, 490-514, 1988.
42. *Ris H.* The anaphase movement of chromosomes in the spermatocytes of grasshoppers. Biol. Bull. (Woods Hole), 96, 90-106, 1949.
43. *Gorbsky G. J., Sammak P. J., Borisy G. G.* Microtubule dynamics and chromosome motion visualized in living anaphase cells. J. Cell Biol., 106, 1185-1192, 1988.
Mitchison T.J. Microtubule dynamics and kinetochore function in mitosis. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 527 549, 1988.
Nicklas R. B. Measurements of the force produced by the mitotic spindle in anaphase. J. Cell Biol., 97, 542-548, 1983.
Spurck T. P., Pickett-Heaps J. D. On the mechanism of anaphase A: Evidence that ATP is needed for microtubule disassembly and not generation of polewards force. J. Cell Biol., 105, 1691-1705, 1987.
44. *Aist J. R., Berns M. W.* Mechanics of chromosome separation during mitosis in *Fusarium* (Fungi imperfecti): new evidence from ultrastructural and laser micro-beam experiments. J. Cell Biol., 91, 446-458, 1981.
Masuda H., Cande W. Z. The role of tubulin polymerization during spindle elongation in vitro. Cell, 39, 193-202, 1987.
Pickett-Heaps J. D. Mitotic mechanisms: an alternative view. Trends Biochem. Sci., 11, 504-507, 1986.
45. *Gerace L., Blobel G.* The nuclear envelope lamina is reversibly depolymerized during mitosis. Cell, 19, 277 287, 1980.
Gerace L., Burke B. Functional organization of the nuclear envelope. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 335-374, 1988.

SwansonJ.A,, McNeil P.L. Nuclear reassembly excludes large macromolecules. Science, 238, 548-550, 1987.
46. *Kirschner M. W., Newport J., Gerhart J,* The timing of early developmental events in *Xenopus.* Trends Genet., 1, 41-47, 1985.
47. *Rappaport R.* Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. Int. Rev. Cytol., 105, 245-281, 1986.
Tolle H. G., Weber K., Osborn M. Keratin filament disruption in interphase and mitotic cells-how is it induced? Eur. J. Cell Biol., 43, 35-47, 1987.
White J. G., Borisy G. G. On the mechanism of cytokinesis in animal cells. J. Theor. Biol., 101, 289-316, 1983.
48. *DeLozanne A., Spudich J. A.* Disruption of the dictyostelium myosin heavy chain gene by homologous recombination. Science, 236, 1086-1091, 1987.
Knecht D.A., Loomis W.F. Antisense RNA inactivation of myosin heavy chain gene depression in *Dictyostelium discoideum.* Science, 236, 1081-1086, 1987.
Mabuchi I., Okuno M. The effect of myosin antibody on the division of starfish blastomeres. J. Cell Biol., 74, 251-263, 1977.
Schroeder T. E. Actin in dividing cells: contractile ring filaments bind heavy meromyosin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70, 1688 1692, 1973.
49. *Gunning B. E, S., Wick S. M.* Preprophase bands, phragmoplasts and spatial control of cytokinesis. J. Cell Sci. Suppl. 2, 157-179, 1985.
Huffaker T.C., Hoyt M.A., Botstein D. Genetic analysis of the yeast cytoskeleton. Annu. Rev. Genet., 21, 259-284, 1987.
Lloyd C. W. The plant cytoskeleton: the impact of fluorescence microscopy. Annu. Rev. Plant Physiol., 38, 119-139, 1987.
Pickett-Heaps J. D., Northcote D. H. Organization of microtubules and endoplasmic reticulum during mitosis and cytokinesis in wheat meristems. J. Cell Sci., 1, 109-120, 1966.
50. *Lucocq J. M., Warren G.* Fragmentation and partitioning of the Golgi apparatus during mitosis in HeLa cells. EMBO J., 6, 3239-3246, 1987.
51. *Hill D.P., Strome S.* An analysis of the role of microfilaments in the establishment and maintenance of asymmetry in *Caenorhabditis elegans.* Dev. Biol., 125, 75 84, 1988.
Kenyan C. Cell lineage and the control of *Caenorhabditis elegans* development. Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), 312, 21-38, 1985.
52. *Donachie W.D., Robinson A.C.* Cell division: parameter values and the process in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium.* Cellular and Molecular Biology (F.C. Neidhardt, et al., eds.), pp. 1578-1593. Washington, DC, American Society for Microbiology, 1987.
Heath I. B. Variant mitoses in lower eukaryotes: indicators of the evolution of mitosis? Int. Rev. Cytol., 64, 1-80, 1980.
Kubai D.F. The evolution of the mitotic spindle. Int. Rev. Cytol., 43, 167-227, 1975.
Wise D. The diversity of mitosis: the value of evolutionary experiments. Biochem. Cell Biol., 66, 515-529, 1988.

14 Клеточная адгезия, соединения между клетками и внеклеточный матрикс

Большинство клеток у многоклеточных животных кооперируется в организованные ансамбли, называемые *тканями,* которые в свою очередь в различных комбинациях объединяются в более крупные функциональные единицы - *органы* (рис. 14-1). Клетки в тканях, как правило, контактируют со сложной сетью макромолекул, образующих *внеклеточный матрикс.* Этот матрикс способствует поддержанию многоклеточных структур и создает упорядоченный каркас, внутри которого клетки могут мигрировать и взаимодействовать друг с другом. В некоторых случаях клетки прикрепляются к матриксу в специализированных участках плазматической мембраны; непосредственно контактирующие соседние клетки нередко бывают связаны между собой с помощью особых *межклеточных соединений.*

Полезно разделить животные ткани на две главные группы, в которых роль матрикса и межклеточных соединений существенно различна. В *соединительных тканях* (разд. 14.2) имеется обширный внеклеточный матрикс, в котором клетки располагаются весьма свободно (рис. 14-1). Матрикс богат волокнистыми полимерами, особенно коллагеном, и поэтому именно он, а не клетки, берет на себя большую часть нагрузок, которым подвергается ткань. Клетки прикреплены к компонентам матрикса, которым они могут передавать механические усилия, в то время как соединения между отдельными клетками относительно несущественны. Напротив, в *эпителиальных тканях* клетки плотно прилегают друг к другу, образуя пласты (называемые *эпителиями);* внеклеточного матрикса мало, и основной объем ткани занимают клетки. Здесь уже сами клетки, а не матрикс воспринимают большую часть нагрузок через посредство прочных *внутриклеточных* белковых волокон (компонентов цитоскелета), пересекающих в разных направлениях цитоплазму каждой эпителиальной клетки; эти волокна прикрепляются к внутренней поверхности плазматической мембраны, и в этих местах образуются специализированные соединения с поверхностью другой клетки или с подлежащим внеклеточным матриксом.

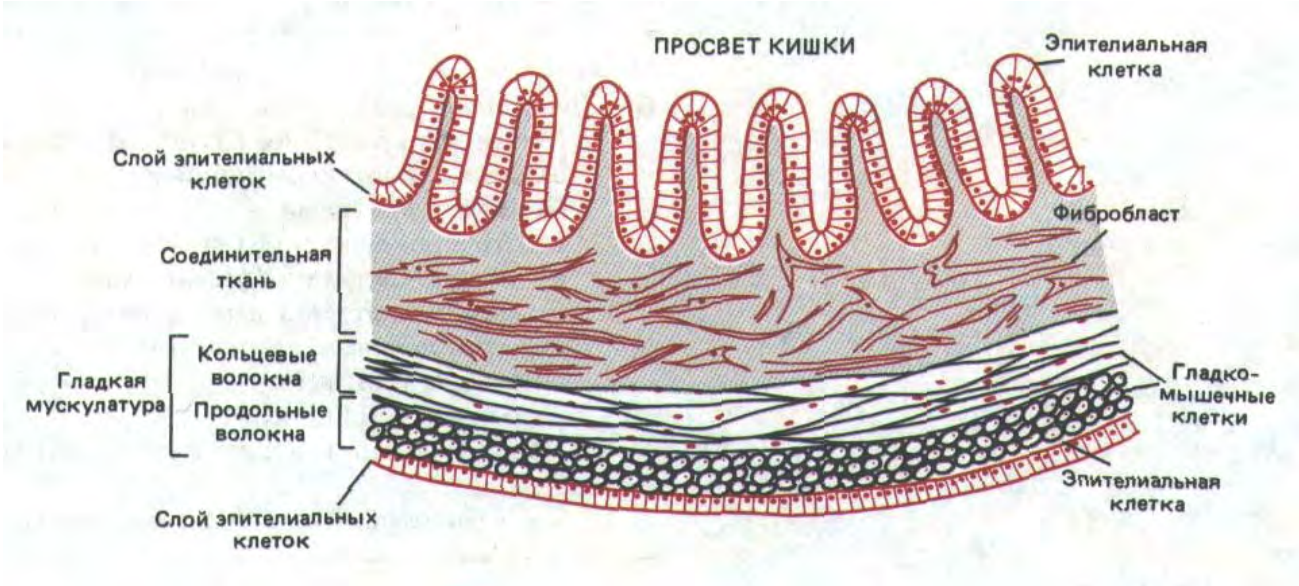


Рис. 14-1. Как видно из этого схематического поперечного разреза, кишечная стенка состоит из эпителиальной, соединительной и мышечной тканей. Каждая ткань представляет собой организованную систему клеток, объединенную межклеточными соединениями и (или) внеклеточным матриксом.

Каковы пространственные отношения эпителиальных и соединительных тканей в организме? Эпителиальные клеточные пласты выстилают все полости и свободные поверхности тела, и благодаря специализированным соединениям между клетками эти пласты могут служить барьерами для передвижения воды, растворов и клеток из одного компартмента организма в другой. Как показано на рис. 14-1, эпителии почти всегда располагаются на подложке из соединительной ткани, которая может связывать их с другими тканями (например, мышечной), не имеющими явно выраженной эпителиальной или соединительнотканной организации.

В этой главе мы сначала познакомимся со структурой и организацией соединений между клетками и матриксом, а затем рассмотрим, как клетки узнают друг друга в процессе объединения в ткани и органы.

14-8

14.1. Межклеточные соединения [1]

Специализированные *межклеточные соединения* особенно многочисленны и важны в эпителиях, но во многих местах контакта между клетками и между клетками и матриксом они встречаются во всех тканях. В большинстве своем они слишком малы для того, чтобы их можно было увидеть в световой микроскоп; однако их можно выявить с помощью электронной микроскопии в обычных препаратах или же в препаратах, полученных методом замораживания-скалывания. В обоих случаях видно, что взаимодействующие плазматические мембраны (а нередко и подстилающие их участки цитоплазмы и межклеточное пространство) имеют в этих местах высокоспециализированную структуру. Клеточные соединения могут быть разделены на три функциональные группы: 1) **запирающие** соединения, которые так тесно сцепляют клетки в эпителиальном пласте, что делают невозможным прохождение даже небольших молекул с одной стороны пласта на другую; 2) **прикрепительные** контакты, которые механически связывают клетки (и их цитоскелеты) с соседними клетками или внеклеточным матриксом; и 3) **коммуникационные** контакты, по которым передаются химические или электрические сигналы между взаимодействующими клетками.

Основные типы межклеточных соединений внутри каждой из этих групп перечислены в табл. 14-1. Основным типом замыкающих контактов являются *плотные соединения; адгезионные соединения* и *десмосомы* составляют основной тип прикрепительных контактов; а *щелевые кон-*

Таблица 14-1. Функциональная классификация клеточных соединений

I. *Замыкающие (плотные) соединения*
II. *Прикрепительные соединения*
1. Места прикрепления актиновых филаментов (адгезионные контакты)
   а) между клетками (например, адгезионные пояса)
   б) между клетками и матриксом (например, фокальные контакты)
2. Места прикрепления промежуточных филаментов
   а) между клетками (десмосомы)
   б) между клетками и матриксом (полудесмосомы)
III. *Коммуникационные соединения*
   1. Щелевые контакты
   2. Химические синапсы
   3. Плазмодесмы (только у растений)[1)]

[1)] Это единственный род соединений между растительными клетками.

такты, химические синапсы нервных клеток и, наконец, *плазмоде с мы,* образующиеся между растительными клетками, - это главные виды коммуникационных контактов. Так как химические синапсы и плазмодесми будут детально рассматриваться в гл. 19 и 20 соответственно, мы не будем обсуждать их в этой главе.

14-4
14-5

14.1.1. Плотные соединения создают в эпителиальных клеточных пластах барьер проницаемости [2]

Несмотря на существенные структурные и биохимические различия между разными типами эпителиев, эти ткани обладают по меньшей мере одной общей функцией: они служат барьерами с избирательной проницаемостью, разделяющими жидкости разного химического состава по обе стороны пласта. **Плотные соединения** играют вдвойне важную роль в поддержании такой барьерной функции. Это хорошо иллюстрируется на примере кишечного эпителия млекопитающих.

Эпителиальные клетки, выстилающие тонкий кишечник, удерживают большую часть содержимого кишки в ее внутренней полости (просвете). Однако в то же время они должны перекачивать определенные питательные вещества через клеточный пласт во внеклеточную жидкость соединительной ткани по другую сторону пласта (см. рис. 14-1), откуда эти вещества диффундируют в кровеносные сосуды. Такой *трансэпителиальный* перенос осуществляют две группы транспортных белков, связанных с мембраной. Одна группа расположена на *апикальной* поверх-

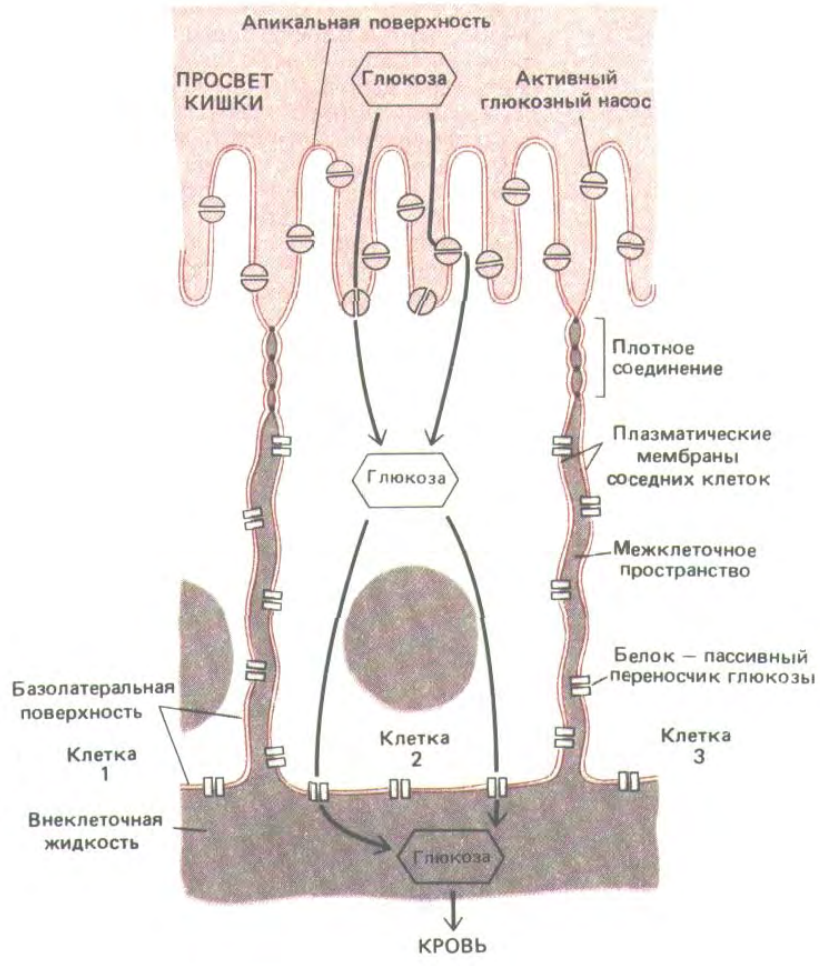


Рис. 14-2. Схема эпителиальной клетки из тонкой кишки: показано, как плотные контакты разграничивают области плазматической мембраны, в которых могут находиться различные транспортные белки. Такое разграничение обеспечивает перенос питательных веществ из просвета кишки через эпителиальный слой в кровь. В представленном здесь примере глюкоза активно транспортируется в клетку глюкозними насосами апикальной поверхности, а затем выходит из клетки путем облегченной диффузии при участии белков - пассивных переносчиков глюкозы, находящихся в базолатеральной области мембраны. Плотные соединения, по-видимому, ограничивают перемещение белков определенными участками плазматической мембраны, действуя как диффузионные барьеры внутри ее липидного бислоя; эти соединения блокируют также диффузию липидных молекул в наружном (но не во внутренном) листке липидного бислоя.

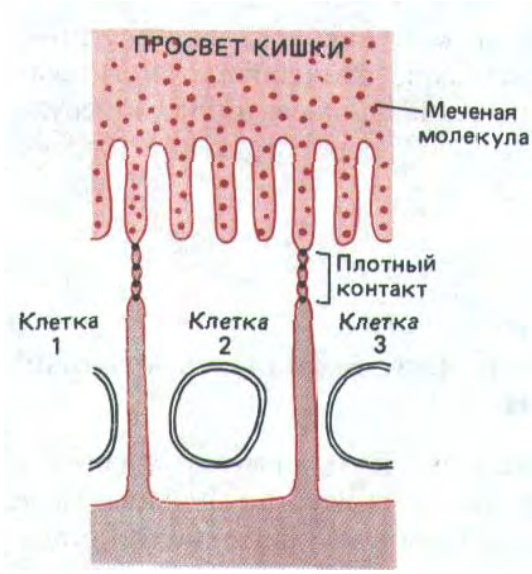


Рис. 14-3. Растворимая меченая молекула, введенная по одну сторону эпителиального слоя, не может пройти через плотные соединения, скрепляющие соседние клетки. Но это препятствие не абсолютно, и есть данные о том, что клетки могут изменять свойства своих плотных соединений для регулирования потока растворенных веществ и воды через эпителий.

ности (обращенной в просвет кишки) и активно переносит избранные молекулы из просвета в эпителиальные клетки; другая группа расположена на *базолатеральных* (базальных и латеральных) поверхностях клеток и позволяет тем же молекулам выходить из клеток, облегчая диффузию во внеклеточную жидкость по другую сторону эпителия (рис. 14-2). Для поддержания такого направленного транспорта нужно, чтобы апикальные транспортные белки не могли переходить на базолатеральную поверхность клетки, а базолатеральные - на апикальную поверхность. Кроме того, щели между эпителиальными клетками должны быть так закупорены, чтобы транспортируемые молекулы не могли диффундировать обратно в полость кишки через межклеточные пространства «вниз» по градиентам концентрации, создающимся в результате трансэпителиального переноса.

По-видимому, плотные соединения между эпителиальными клетками препятствуют обоим этим видам диффузии. Во-первых, они действуют как барьеры для диффузии мембранных белков между апикальной и базолатеральной поверхностями плазматической мембраны (рис. 14-2). Такая нежелательная диффузия компонентов мембраны происходит при разрушении плотных соединений, например при удалении внеклеточных ионов Ca^{2+}, необходимых для сохранения целостности плотного соединения. Во-вторых, соседние клетки оказываются так плотно сомкнутыми, что даже и водорастворимые молекулы не прохо-

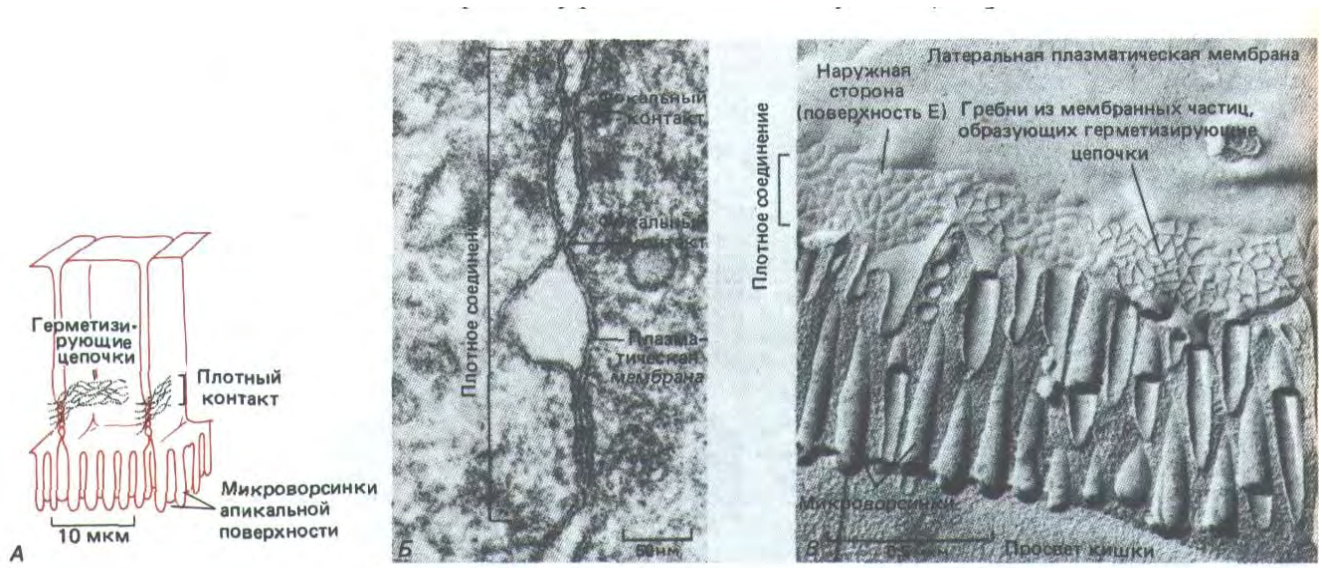


Рис. 14-4. Структура плотного соединения между эпителиальными клетками тонкой кишки. *А,* Схема. *Б.* Электронная микрофотография препарата, полученного методом замораживания-скалывания. *В.* Обычная электронная микрофотография. Обратите внимание, что клетки ориентированы апикальными концами вниз. На фото *Б* плоскость микрофотографии параллельна плоскости мембраны; видно, что плотное соединение образовано сетью из герметизирующих цепочек, опоясывающей каждую клетку в пласте. Эти герметизирующие цепочки видны как гребни из внутримембранных частиц на внутренней (цитоплазматической) поверхности скола (В) или как комплементарные им бороздки на наружной поверхности мембраны (Н). На обычном препарате *(В)* соединение выглядит как серия фокальных контактов между наружными липидными слоями двух смежных мембран; каждый такой контакт соответствует герметизирующей цепочке в поперечном разрезе. [Б и *В* из N. B. Giluda. Tn: Cell Communication (R.P, Cox, ed.), pp. 1-29. New York, Wiley, 1974. Reprinted by permission of John Wiley a. Sons, Inc.]

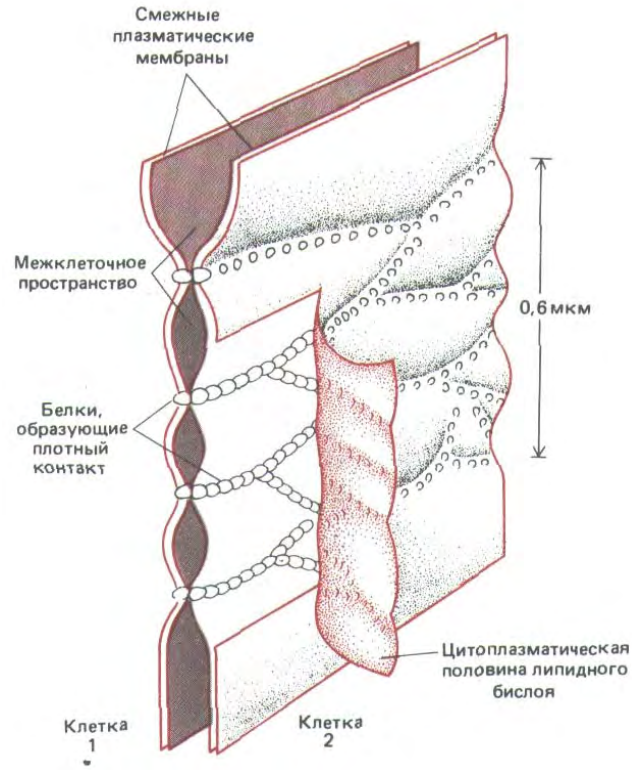


Рис. 14-5. Современная модель строения плотного соединения. Предполагается, что смежные плазматические мембраны скреплены непрерывными цепочками из особых трансмембранных белков, осуществляющих контакт через межклеточное пространство и образующих герметичное соединение. Чтобы показать эти белковые цепочки, внутренний липидный монослой одной из мембран на этой схеме отогнут. На препаратах, приготовленных методом замораживания -скалывания, белки плотного соединения остаются не на наружном монослое мембраны, как показано здесь, а на внутреннем, где создают узор внутримембранных частиц, показанный на рис. 14-4, *Б*.

дят между ними: если с одной сторони эпителиального клеточного пласта ввести электроноплотный маркер из малых молекул, то обычно он не проникает через плотное соединение (рис. 14-3).

Молекулярная структура плотного соединения еще не ясна, но электронная микроскопия с применением метода замораживания - скалывания показывает, что оно состоит из сети анастомозирующих волокон, которая оплетает апикальный конец каждой клетки по всей его окружности (рис. 14-4, *А* и *Б)*. На обычных электронных микрофотографиях они видны как серии локальных соединений между наружными поверхностями двух смежных плазматических мембран (рис. 14-4, *В)*. Хотя все плотные соединения непроницаемы для макромолекул, их проницаемость для малых молекул сильно различается у разных эпителиев. Например, в эпителии, выстилающем тонкий кишечник, плотные соединения в 10000 раз более проницаемы для ионов, чем в эпителии мочевого пузыря. Способность соединения препятствовать переходу ионов через межклеточные пространства увеличивается в логарифмической зависимости от числа волокон в сети, как если бы каждое волокно действовало как независимый барьер. Как полагают, волокна состоят из длинных рядов специфических трансмембранных белков каждой из двух контактирующих мембран, которые (белки) непосредственно соединяются друг с другом, замыкая межклеточное пространство (рис. 14-5).

14.1.2. Прикрепительные контакты связывают цитоскелет клетки с цитоскелетом соседней клетки или с внеклеточным матриксом

Прикрепительные контакты встречаются во многих тканях. Они позволяют группам клеток, например эпителиальных, функционировать в виде прочных структурных единиц, скрепляя цитоскелетные элементы разных клеток между собой или с внеклеточным матриксом (рис. 14-6). Их больше всего в тканях, подверженных большим механическим

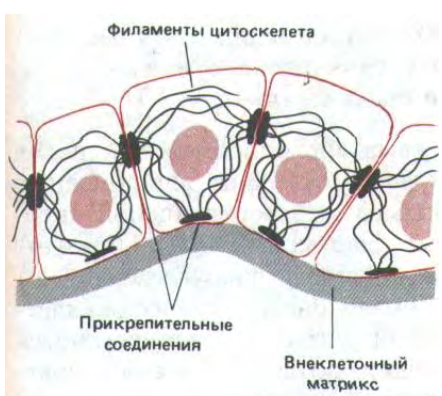


Рис. 14-6. На этой схеме показано, как соединены филаменты цитоскелета с такими же филаментами соседних клеток и с внеклеточным матриксом.

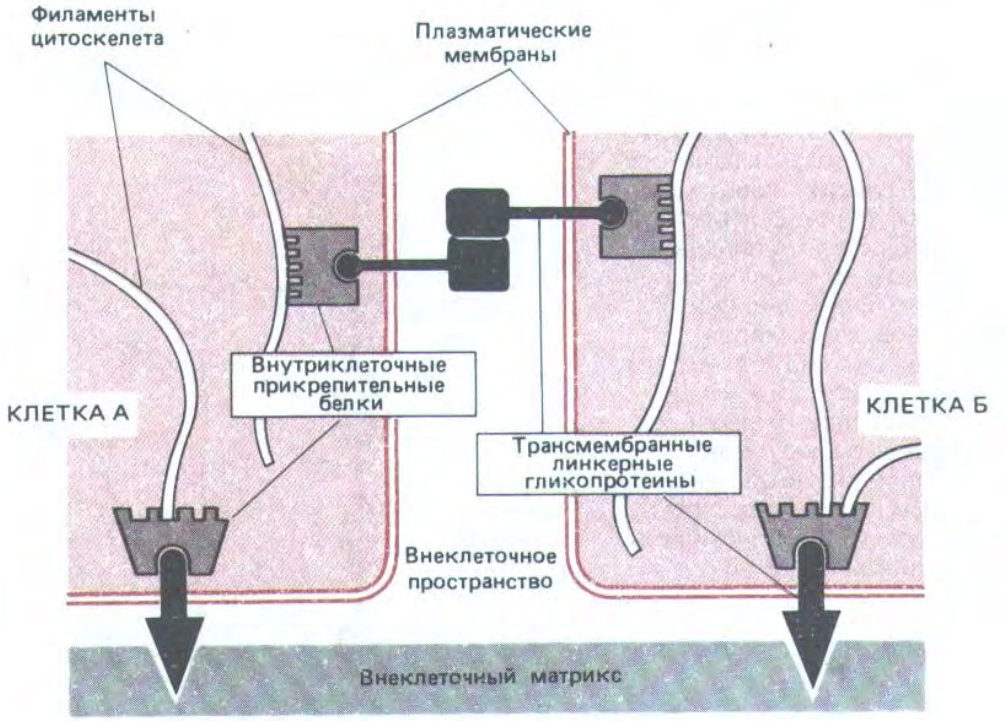


Рис. 14-7. Схема функциональной роли двух групп белков, образующих прикрепительные контакты: внутриклеточных прикрепительных белков и трансмембранных линкерных гликопротеинов. В данном примере внеклеточные домены трансмембранных линкерных гликопротеинов, скрепляющих клетки, взаимодействуют непосредственно. В других случаях они могут быть соединены дополнительными белками, находящимися во внеклеточном пространстве. Комплексы внутриклеточных прикрепительных белков связывают линкерные гликопротеины с цитоскелетом.

нагрузкам, таких как сердечная мышца, эпидермис или шейка матки. Они встречаются в двух структурно и функционально различных формах: 1) *адгезионные соединения* и 2) *десмосомы* и *полудесмосомы*. Адгезионные контакты служат местами соединения актиновых филаментов, а десмосомы и полудесмосомы - местами соединения промежуточных филаментов.

Прежде чем рассматривать различные классы прикрепительных контактов, следует вкратце охарактеризовать общие принципы их структуры. Как показано на рис. 14-7, все эти соединения состоят из белков двух типов: 1) *внутриклеточных прикрепительных белков,* которые связывают соединительный комплекс со специфическими элементами цитоскелета (актиновыми или промежуточными филаментами), и 2) *трансмембранных линкерных гликопротеинов,* внутриклеточные домены которых связаны с одним или несколькими внутриклеточными прикрепительными белками, а внеклеточные домены взаимодействуют либо с внеклеточным матриксом, либо с внеклеточными доменами трансмембранных линкерных гликопротеинов другой клетки.

14.1.3. Адгезионные соединения связывают внутриклеточные пучки актиновых филаментов с такими же пучками других клеток или с внеклеточным матриксом [3]

Межклеточные адгезионные соединения весьма многообразны. Во многих неэпителиальных тканях они принимают форму точечных или линейных контактов, связывающих актиновые филаменты в кортикальной цитоплазме смежных клеток. В эпителиальных пластах они часто образуют непрерывный **адгезионный пояс** (zonula adherens) вокруг каждой из контактирующих клеток, расположенных около апикального конца клетки чуть ниже плотного соединения. У соседних клеток адгезионные пояса находятся прямо друг против друга и удерживаются вместе с помощью Ca^{2+}-зависимого механизма. Трансмембранные линкерные гликопро-теины, участвующие в таком соединении, по-видимому, относятся к семейству Ca^{2+} -зависимых молекул межклеточной адгезии, называемых *кадгеринами* (cadherins) (разд. 14.3.7). Адгезионный пояс называют также *опоясывающей десмосомой,* однако следует учитывать, что он в хими-

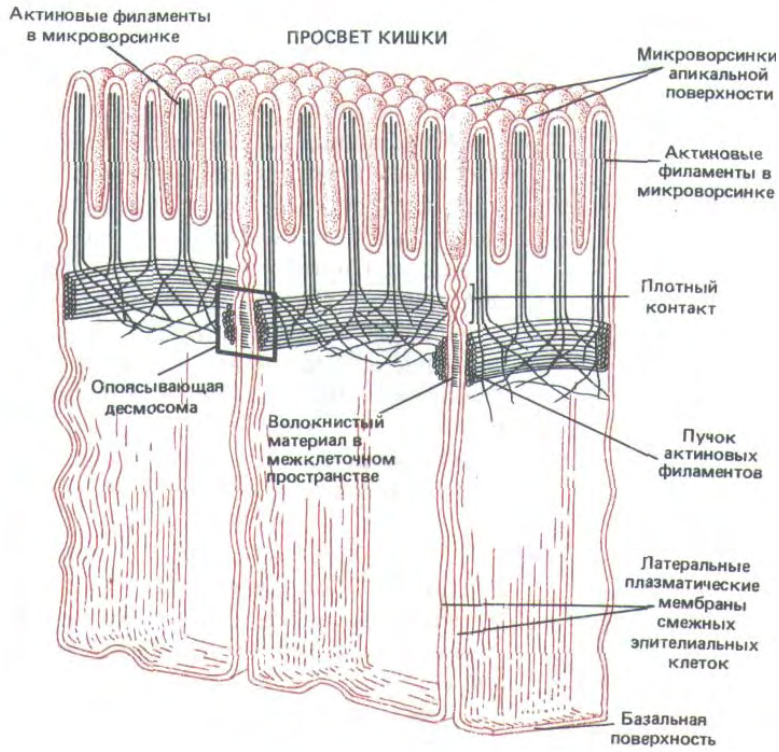


Рис. 14-8. Адгезионные пояса (опоясывающие десмосомы) между эпителиальными клетками тонкой кишки. Такое соединение опоясывает каждую из контактирующих клеток; его характерная особенность-наличие сократимого пучка актиновых филаментов, лежащих под цитоплазматической поверхностью мембраны в зоне соединения.

ческом отношении существенно отличается от настоящей десмосомы (см. ниже).

Внутри каждой клетки под адгезионным поясом лежит сократимый пучок актиновых филаментов, расположенных параллельно плазматической мембране; к адгезионному поясу этот пучок прикреплен с помощью комплекса внутриклеточных белков, содержащего *винкулин* (разд. 11.2.8). Таким образом, актиновые пучки посредством трансмембранных гликопротеинов организуются в плотную межклеточную сеть (рис. 14-8), которая, как полагают, участвует в одном из фундаментальных процессов морфогенеза животных-в сворачивании эпителиальных пластов в трубки и другие подобные структуры (рис. 14-9).

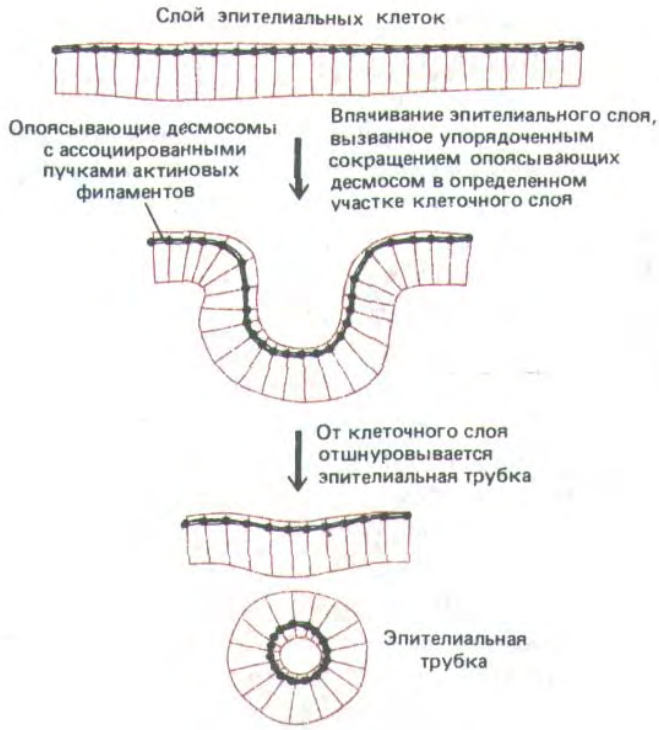


Рис. 14-9. Сворачиванис эпителиального слоя в трубку (например, при образовании нервной трубки). Как полагают, координированное сокращение пучков актиновых филаментов, лежащих вдоль опоясывающих десмосом, приводит к сужению апикальных концов клеток в определенных участках клеточного слоя, и в результате этот слой свертывается в трубку, которая затем отделяется от образовавшего ее эпителия.

Например, согласованное сокращение таких пучков в нервной пластинке приводит к сужению апикального конца каждой эпителиальной клетки, и в результате этого пластинка свертывается в нервную трубку на ранней стадии развития позвоночного (разд. 16.1.10).

Адгезионные соединения между клетками и матриксом связывают клетки и их актиновые филаменты с внеклеточным матриксом. Например, фибробласты при росте на искусственном субстрате, покрытом молекулами внеклеточного матрикса, плотно прикрепляются к нему в специализированных участках плазматической мембраны, называемых **локальными контактами** или *адгезионными пластинками,* как раз там, где кончаются пучки актиновых филаментов (разд. 11.2.8). Многие клетки в тканях устанавливают сходные локальные контакты с окружающим их внеклеточным матриксом. Крупный трансмембранный линкерный гликопротеин (который служит на клеточной поверхности рецептором для гликопротеина внеклеточного матрикса - *фибронектина,* см. разд. 14.2.13) в таких пластинках образует одно из связующих звеньев между матриксом и пучками актиновых филаментов. Внеклеточный домен такого *рецептора для фибронектина* связывается с молекулами фибронектина на поверхности культуральной чашки, а его внутриклеточный домен связывается с одним из прикрепительных белков -*талином,* который в свою очередь присоединяется к винкулину; винкулин же присоединен к одному или двум другим белкам, которые связываются с актином (см. рис. 11-38).

Рецептор фибронектина - это только один представитель обширного семейства трансмембранных линкерных гликопротеинов, называемых *интегринами* (разд. 14.2.17), которые, по-видимому, связывают пучки актиновых филаментов с внеклеточным матриксом. Некоторые интегрины хорошо изучены, и на их примере видно, как трансмембранные линкерные гликопротеины, участвующие в межклеточной адгезии (кадгерины и др.), могут соединять пучки кортикальных актиновых филаментов соседних эпителиальных клеток; однако в адгезионных поясах винкулин присутствует без талина.

14.1.4. Десмосомы связывают промежуточные филаменты соседних клеток; полудесмосомы связывают эти филаменты с базальной мембраной [4]

Десмосомы представляют собой «точечные» структуры межклеточного контакта, которые, подобно заклепкам, скрепляют клетки в различных тканях, главным образом в эпителиальных (рис. 14-10). Они служат также местами прикрепления промежуточных филаментов (разд. II.5), образующих структурный каркас цитоплазмы, который противодействует растяжению. Таким образом, промежуточные филаменты соседних клеток объединены при помощи десмосом в непрерывную сеть, пронизывающую всю ткань. Тип промежуточных филаментов, прикрепленных к десмосомам, зависит от типа клеток: в большинстве эпителиальных клеток это *кератиновые* филаменты, в волокнах сердечной мышцы-*десминовые,* а в некоторых клетках, покрывающих поверхность мозга-*виментиновые* (см. табл. 11-5).

Электронная микроскопия и биохимические исследования показывают, что десмосома состоит из (1) плотной цитоплазматической пластинки, образованной комплексом внутриклеточных белков, ответственных за прикрепления цитоскелета, и (2) трансмембранных линкерных гликопротеинов, которые связаны с пластинкой и взаимодействуют между собой своими внеклеточными доменами, удерживая вместе смежные плазматические мембраны (рис. 14-11). Роль десмосом в соединении клеток выявляется при некоторых формах потенциально смертельного

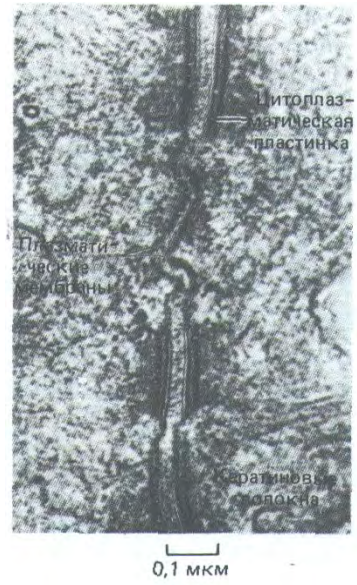


Рис. 14-10. Электронная микрофотография трех десмосом между двумя эпителиальными клетками в кишке крысы. [N. B. Gilula. In: Cell Communication (R.P. Cox, ed.), pp. 1-29. New York, Wiley, 1974. Reprinted by permission of John Wiley a. Sons, inc.]

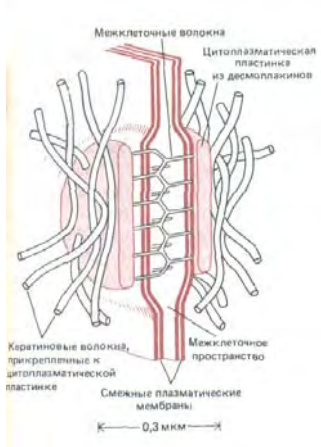


Рис. 14-11. Сильно схематизированное изображение десмосомы, С внутренней стороны каждой из смежных плазматических мембран находится электроноплотная пластинка, состоящая из смеси внутриклеточных прикрепительных белков, называемых *десмоплакинами.* Каждая пластинка связана с густой сетью кератиновых волокон, проходящих вдоль поверхности пластинки. Трансмембранные линкерные гликопротеины, называемые *десмоглеинами,* связываются с пластинками и своими внеклеточными доменами соединяют смежные мембраны при участии какого-то Ca^{2+}-зависимого механизма. Хотя десмосомы и адгезионные пояса различаются морфологически и химически, они содержат по меньшей мере один общий внутриклеточный белок, называемый плакоглобином.

кожного заболевания *пемфигуса,* при котором у больных образуются антитела к одному или нескольким десмосомным линкерным гликопротеинам собственного организма; это приводит к разрушению десмосом между клетками эпидермиса и появлению многочисленных волдырей в результате просачивания тканевых жидкостей в разрыхленный эпителий. Антитела разрушают десмосомы только в коже, из чего следует, что десмосомы в других тканях, возможно, имеют иную биохимическую природу.

Полудесмосомы морфологически сходны с десмосомами, но отличаются от них функциональными и химическими особенностями. Они скрепляют не плазматические мембраны соседних клеток между собой, а базальную поверхность этих клеток с подстилающей *базальной мембраной* - специализированной прослойкой внеклеточного матрикса на границе между эпителием и соединительной тканью (разд. 14.2.15). Кроме того, если кератиновые филаменты, связанные с десмосомами, прикрепляются к последним своей боковой поверхностью (рис. 14-11), то многие филаменты, прикрепленные к полудесмосомам, оканчиваются в десмосомных пластинках (рис. 14-12).

И десмосомы, и полудесмосомы действуют как заклепки, распределяя сжимающие и растягивающие усилия по эпителию и подлежащей соединительной ткани.

14-6

14.1.5. Щелевые контакты позволяют малым молекулам переходить непосредственно из клетки в клетку [5]

Вероятно, это самый удивительный тип межклеточных соединений. Щелевые контакты относятся к наиболее распространенным - они весьма многочисленны в большинстве тканей и имеются практически у всех животных. На электронных микрофотографиях они выглядят как участки, где мембраны двух смежных клеток разделены узкой щелью шириной около 3 мкм. Щелевые контакты участвуют в межклеточной коммуникации, позволяя неорганическим ионам и другим малым водорастворимым молекулам прямо переходить из цитоплазмы одной клетки в цитоплазму другой и обеспечивая таким образом электрическое и метаболическое *сопряжение* между клетками. Такое сопряжение имеет важный функциональный смысл, многие аспекты которого мы еще только начинаем понимать.

Межклеточные связи такого типа были впервые продемонстрированы в 1958 г. физиологическими методами, однако потребовалось больше 10 лет, чтобы показать, что это физиологическое сопряжение коррелирует с наличием щелевых контактов, видимых в электронный микроскоп. Первые данные о таком сопряжении были получены при электрофизиологическом исследовании определенных пар взаимодействующих нейронов в нервной цепочке речного рака. При подаче разности потен-



Рис. 14-12. Расположение десмосом и полудесмосом в эпителиальных клетках тонкого кишечника. Сети кератиновых волокон соседних клеток связаны друг с другом через десмосомы, а с базальной мембраной - через полудесмосомы. Если к плотным пластинкам десмосом кератиновые волокна прикрепляются своей боковой поверхностью, то в полудесмосомах они закреплены своими концами.

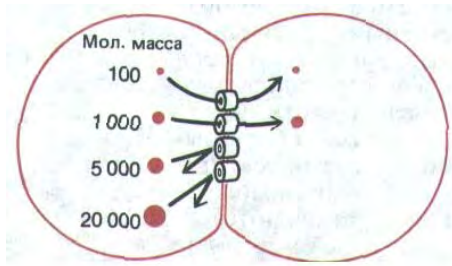


Рис. 14-13. Если в одну из двух клеток, соединенных щелевым контактом, ввести флуоресцирующие молекулы разной величины, то в другую клетку будут переходить лишь те из них, у которых мол. масса не превышает примерно 1000-1500 (в зависимости от типа клеток), а более крупные проходить не будут. Это соответствует эффективному диаметру межклеточного канала около 1,5 нм.



Рис. 14-14. Здесь схематически представлен радиоавтограф, демонстрирующий метаболическое сопряжение клеток, связанных щелевыми контактами, в культуре in vitro. Мутантные клетки лишены фермента тимидинкиназы и поэтому не могут включать в ДНК радиоактивный тимидин, добавленный в среду. Нормальные клетки способны включать тимидин в ДНК, и поэтому их ядра усеяны черными точками (зернами серебра в радиоавтографе). Как видно, в смешанной культуре нормальных и мутантных клеток радиоактивную метку включают также ядра тех мутантных клеток, которые соприкасаются с нормальными и устанавливают с ними щелевые контакты. Это обусловлено тем, что в нормальной клетке радиоактивный тимидин фосфорилируется тимидинкиназой с образованием тимидинтрифосфата; затем радиоактивный тимидинтрифосфат переходит через щелевые контакты в мутантную клетку и включается в ее ДНК.

циалов на два микроэлектрода, введенных в две взаимодействующие клетки, через мембрану в месте их соединения протекал ток неожиданно большой величины. Это указывало на то, что неорганические ионы (которые переносят электрические заряды в живых тканях) могут свободно переходить из одной клетки в другую. Последующие опыты показали, что небольшие флуоресцирующие молекулы, введенные в одну из клеток, тоже легко переходят в соседние клетки, не просачиваясь в межклеточное пространство, если только их молекулярная масса не превышала 1000-1500. Из этого следовало, что эффективный диаметр соединительных каналов должен составлять около 1,5 нм (рис. 14-13) и что клетки обмениваются малыми молекулами (неорганическими ионами, сахарами, аминокислотами, нуклеотидами, витаминами и др.), но не макромолекулами (белками, нуклеиновыми кислотами и полисахаридами).

Такой обмен малыми внутриклеточными метаболитами составляет основу *метаболической кооперации,* которая может быть продемонстрирована на клетках в культуре. Например, можно выращивать клетки мутантных линий, у которых нет фермента тимидинкиназы, вместе с нормальными (дикого типа) клетками, у которых этот фермент есть. Мутантные клетки сами по себе не способны включать тимидин в ДНК, так как они не могут осуществлять первый этап этого процесса-превращение тимидина в тимидинтрифосфат. Если, однако, выращивать такие клетки совместно с клетками дикого типа в присутствии радиоактивного тимидина, то метка будет включаться в ДНК мутантных клеток, находящихся в прямом контакте с клетками дикого типа. Это означает, что какой-то предшественник ДНК, содержащий радиоактивный тимидин (очевидно, это тимидинтрифосфат), прямо переходит из клеток дикого типа в контактирующие с ними мутантные клетки (рис. 14-14). Такой метаболической кооперации не наблюдается, когда подобный эксперимент проводят с клетками, не способными к образованию щелевых контактов.

Есть и другие данные в пользу того, что за электрическое и химическое сопряжение между соприкасающимися клетками ответственны щелевые контакты. Типичные для таких контактов структуры можно обнаружить почти везде, где удается выявить сопряжение по электрическим или химическим критериям. И наоборот, сопряжение не выявляется между теми клетками позвоночных, у которых нет щелевых контактов. Кроме того, прохождение тока и красителя можно блокировать, если в клетки, соединенные щелевыми контактами, путем микроинъекции ввести антитела к главному белку такого контакта (см. ниже). Наконец, если этот белок щелевого контакта включить в искусственный липидный бислой или же мРНК, кодирующую этот белок, инъецировать в ооциты лягушки, то электрофизиологически можно будет обнаружить в этих объектах каналы со многими свойствами, присущими каналам щелевых контактов.

14.1.6. Коннексоны щелевого контакта являются олигомерами трансмембранного белка, несколько раз пронизывающего мембрану [6]

Щелевые соединения построены из трансмембранных белков, формирующих структуры называемые *котексонами.* Когда коннексоны плазматической мембраны двух соседних клеток совмещаются, они образуют непрерывный водный канал, соединяющий внутренность двух клеток (рис. 14-15). Коннексоны соединены так, что между смежными плазматическими мембранами остается щель (отсюда и название «щелевой контакт»), и в этом состоит отличие от плотного соединения, где



Рис. 14-15. Модель щелевого контакта по данным биохимических исследований, электронной микроскопии и рентгеноструктурного анализа. Показаны соединенные таким контактом плазматические мембраны двух соседних клеток. Через оба липидных бислоя проходят белковые структуры, называемые *коннексонами;* как полагают, каждый коннексон состоит из шести идентичных белковых субъединиц. В результате соединения двух коннексонов образуется непрерывный водный канал, соединяющий одну клетку с другой.

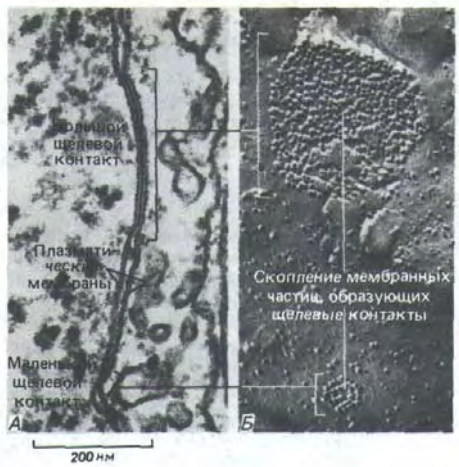


Рис. 14-16. Большой и маленький щелевые контакты между фибробластами в культуре. Электронные микрофотографии тонкого среза *(А)* и препарата, полученного методом замораживания -скалывания (Б). На сколе каждый щелевой контакт выглядит как скопление гомогенных межмембранных частиц, ассоциированных только с цитоплазматической стороной скола мембраны. Каждая межмембранная частица соответствует коннексону, показанному на рис. 14-15. [N.B. Gilula. In: Cell Communication (R.P. Cox, ed.), pp. 1-29. New York, Wiley, 1974. Reprinted by permission of John Wiley a. Sons, Inc.]



Рис. 14-17. Электронная микрофотография участка щелевого контакта, выделенного из печени крысы. Применен негативный контраст, чтобы показать коннексоны, организованные в гексагональную решетку. Электроноплотное центральное отверстие каждого коннексона имеет диаметр около 2 нм. [N. B. Gilula. In: Intercellular Junctions and Synapses (Receptors and Recognition, Series B, Vol. 2; J. Feldman, N.B. Gilula, and J.D. Pitts, eds.), pp. 3-22, London. Chapman a. Hall, 1978.]

мембраны сближены теснее (ср. рис. 14-5 и 14-15). На электронных микрофотографиях препаратов, полученных методом замораживания-скалывания, каждый коннексон виден как внутримембранная частица, и каждый щелевой контакт может содержать сотни сгруппированных вместе коннексонов (рис. 14-16).

Щелевые контакты благодаря их необычной устойчивости к протеолитическим ферментам и детергентам удается выделять из печени грызунов (рис. 14-17). Щелевой контакт состоит в основном из одного белка с мол. массой около 30000. Как показывает секвенирование ДНК, его полипептидная цепь (около 280 аминокислотных остатков) пересекает липидный бислой мембраны в виде четырех α-спиралей. Видимо, для образования каждого коннексона объединяются шесть таких белковых молекул, подобно тому как это, вероятно, происходит При построении канала рецептора ацетилхолина, где водную пору образуют шесть α -спиралей - по одной от каждой белковой субъединицы (см. рис. 6-64).

Антитела к белку с мол. массой 30000 реагируют со щелевыми контактами многих тканей и организмов; по-видимому, белки коннексона во всех случаях сходны (хотя биохимические и физиологические данные показывают, что они все же не идентичны). Это согласуется с тем фактом, что клетки различного типа в культуре обычно образуют щелевые контакты друг с другом, даже если они принадлежат разным видам.

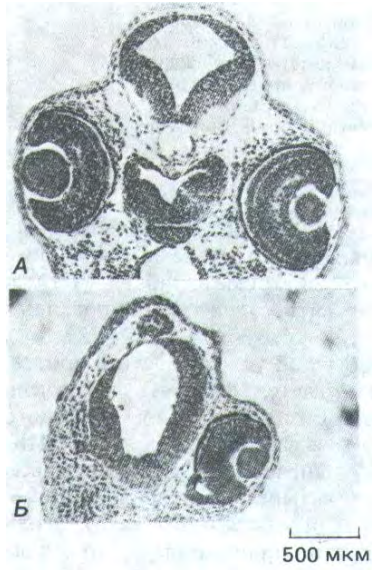


Рис. 14-18. Действие антител к главному белку щелевого контакта, инъецированных в одну из клеток раннего зародыша *Xenopus*. Поперечные срезы нормального эмбриона *(А)* и зародыша после инъекции антител на 8-клеточной стадии *(Б)*. Обратите внимание, что у второго из них на стороне инъекции отсутствует глаз и недоразвит мозг. (A. Warner, S. Guthrie, N. B. Gilula, Nature 331: 126-131, 1985. Copyright 1985 Macmillan Journals Limited.)

14-7

14.1.7. Большинство клеток в ранних эмбрионах сообщается через щелевые контакты [7]

В некоторых тканях роль сопряжения клеток через щелевые контакты очевидна. Например, электрическое сопряжение синхронизирует сокращения клеток сердечной мышцы и клеток гладкой мускулатуры, ответственных за перистальтику кишечника. Точно так же электрическое сопряжение между нервными клетками позволяет потенциалам действия быстро распространяться от клетки к клетке без задержки, происходящей в химических синапсах; это дает преимущество в случаях, когда решающее значение имеют быстрота и надежность ответа, например при некоторых реакциях бегства у рыб и насекомых. Труднее понять, зачем нужны щелевые контакты в тканях, не проявляющих электрической активности. В принципе обмен метаболитами и ионами мог бы обеспечить координацию активности отдельных клеток в этих тканях. Например, через щелевые контакты могла бы координироваться такая активность клеток эпителиального слоя, как биение ресничек; а поскольку внутриклеточные посредники типа циклического AMP способны проходить через щелевые контакты, ответ сопряженных клеток на внеклеточные сигнальные молекулы мог бы распространяться и координироваться именно этим путем.

По-видимому, сопряжение клеток через щелевые контакты играет важную роль в эмбриогенезе. В ранних зародышах позвоночных (у мышиного - начиная с поздней стадии восьми бластомеров) большинство клеток электрически связано друг с другом. Однако по мере того, "как специфические группы клеток приобретают явные различия и начинают дифференцироваться, они обычно утрачивают сопряжение с окружающими тканями. Например, при замыкании нервной трубки ее клетки теряют связь с покрывающей эктодермой (см. рис. 14-9). Тем временем клетки внутри каждой группы остаются сопряженными друг с другом и поэтому ведут себя как кооперативная система, согласованно следуя по определенному пути развития.

Одна из привлекательных гипотез состоит в том, что сопряжение эмбриональных клеток могло бы обеспечивать возможность дальнодействующей сигнализации в развивающемся эпителии. Например, малые молекулы могли бы переходить через щелевые контакты из тех участков ткани, где их концентрация поддерживается на высоком уровне, в участки, где она остается низкой, так что создавался бы плавный градиент. Локальный уровень концентрации мог бы доставлять клеткам «позиционную информацию» для управления их дифференцировкой в соответствии с их локализацией в зародыше. Но действительно ли щелевые контакты выполняют такую функцию, не известно.

На возможную роль межклеточной коммуникации через щелевые контакты в процессах развития указывают эксперименты, в которых в один из бластомеров 8-клеточного зародыша амфибии инъецировали антитела к главному белку щелевого контакта. Введенные антитела не только избирательно разрывали электрическое сопряжение и предотвращали перенос красителя между потомками обработанной клетки (что проверялось через два цикла деления - на 32-клеточной стадии), но и резко нарушали развитие зародыша (рис. 14-18). Остается неясным, каким образом разрыв клеточного сопряжения на ранней стадии приводит позже к дефектам в развитии, однако эксперименты такого рода - многообещающий первый шаг в изучении роли щелевых контактов в эмбриональном развитии.

14.1.8. Проницаемость щелевых контактов может регулироваться [8]

Экспериментальные воздействия, снижающие pH или повышающие концентрацию свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле, быстро (за несколько секунд) и обратимо уменьшают проницаемость щелевых контактов, а в некоторых тканях проницаемость их может регулироваться градиентом напряжения на контакте или внеклеточными химическими сигналами. Эти наблюдения показывают, что щелевые контакты - динамичные структуры, способные открываться или закрываться в ответ на изменения в клетках. Таким образом, в этом отношении они сходны с обычными ионными каналами (разд. 6.4.14), хотя переходы между открытым и закрытым состояниями происходят здесь значительно реже, чем у большинства ионных каналов.

Какую роль играет регуляция проницаемости щелевых контактов потенциалом или величиной pH в нормальном функционировании клеточных ансамблей, не известно. В одном случае однако, смысл контроля с участием ионов Ca^{2+} кажется понятным. При гибели или повреждении клетки ее мембрана утрачивает барьерную функцию. Такие ионы, как Ca^{2+} или Na^{+}, входят в клетку, а важные метаболиты выходят из нее. Если бы такая клетка оставалась связанной со своими здоровыми соседями, то их внутренняя среда тоже подвергалась бы опасности. Однако повышение концентрации Ca^{2+} в поврежденной клетке приводит к закрытию каналов щелевых контактов, что эффективно изолирует ее и таким образом предотвращает распространение повреждения.

Повышение проницаемости щелевых контактов под действием внеклеточных химических сигналов ведет к распространению реакции на соседние клетки, не находящиеся в прямом контакте с действующим агентом. Например, гормон *глюкагон,* побуждающий клетки печени к расщеплению гликогена и высвобождению глюкозы в кровяное русло, может также повышать проницаемость щелевых контактов между этими клетками у крысы. Это происходит за счет увеличения внутриклеточной концентрации циклического AMP (cAMP), который активирует cAMP-

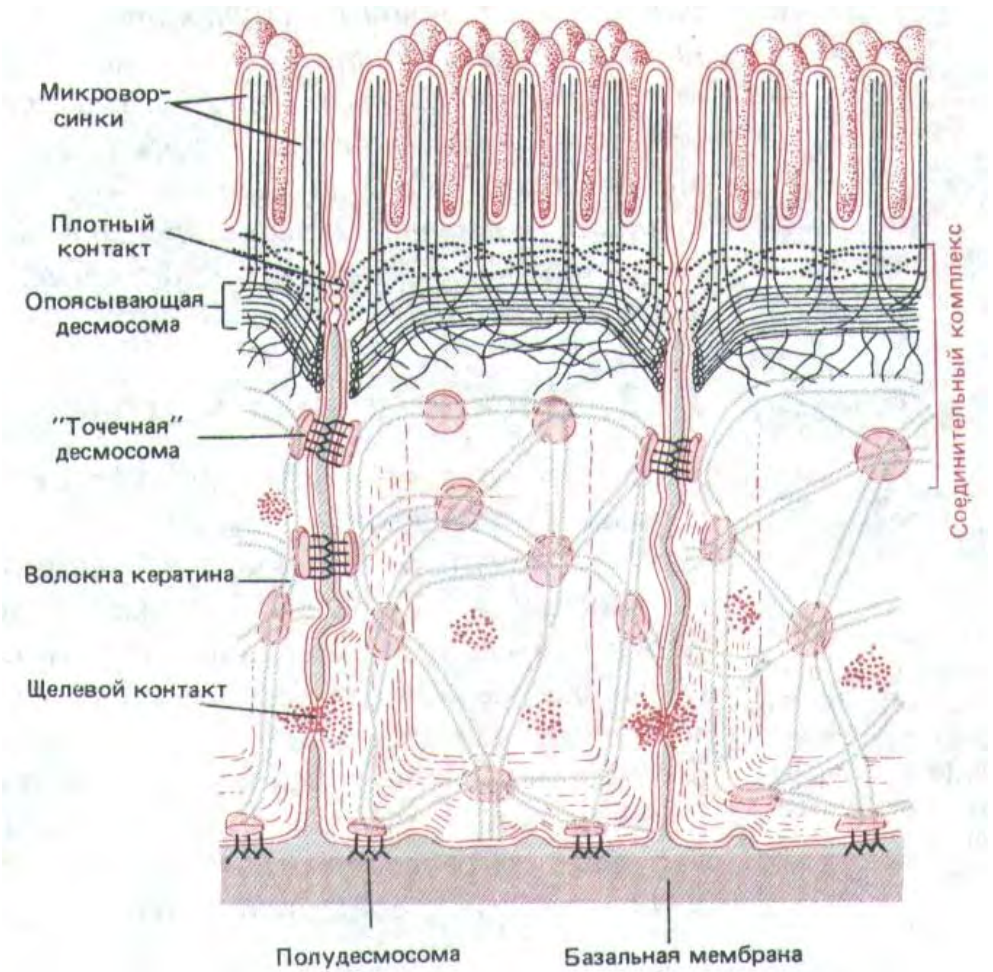


Рис. 14-19. Схема расположения различных соединений, образуемых эпителиальными клетками тонкой кишки.

зависимую протеинкиназу (разд. 12.4.1), а та в свою очередь, по-видимому, фосфорилирует главный белок щелевого контакта. Расщепление гликогена клетками печени тоже обусловлено повышением концентрации cAMP, так что одновременное увеличение проницаемости щелевых контактов, облегчая диффузию cAMP из клетки в клетку, способствует вовлечению соседних групп клеток в процесс расщепления гликогена. На рис. 14-19 суммированы различные типы соединений, образующихся между клетками в эпителии. В апикальном конце клетки относительное положение клеточных соединений одинаково почти во всех эпителиях: плотные соединения занимают наиболее апикальную область клетки, за ними идет адгезионный пояс, а дальше - специальные параллельные ряды десмосом; все вместе они образуют «соединительный комплекс». Менее регулярно располагаются щелевые контакты и дополнительные десмосомы.

Заключение

Большинство клеток в тканях связаны друг с другом и с внеклеточным матриксом в специализированных местах контакта, называемых клеточными соединениями. Клеточные соединения разделяют на три функциональных класса: запирающие, прикрепительные и коммуникационные. Плотные соединения составляют главную группу запирающих соединений и играют основную роль в поддержании разности концентраций малых гидрофильных молекул по разные стороны эпителиальных слоев; они, во-первых, плотно связывают мембраны соседних клеток и создают таким образом непрерывный барьер проницаемости между двумя сторонами эпителия и, во-вторых, образуют барьер в липидном бислое, предотвращающий диффузию мембранных транспортных белков между апикальной и базо латеральной областями плазматической мембраны каждой эпителиальной клетки.

Существуют два основных типа прикрепительных контактов: адгезионные соединения и десмосомы. Все они объединяют группы клеток в прочные структурные комплексы, связывая элементы их цитоскелетов. Адгезионные соединения связывают пучки актиновых филаментов, а десмосомы-промежуточные филаменты. Щелевые контакты служат для межклеточной коммуникации и состоят из групп канальных белков, позволяющих частицам с мол. массой менее 1500 непосредственно переходить из одной клетки в другую. Клетки, связанные такими контактами, обмениваются многими неорганическими ионами и другими малыми молекулами, т, е. они химически и электрически сопряжены. Щелевые контакты имеют большое значение для координации функций электрически активных клеток и, по-видимому, играют сходную роль также в других группах клеток.

14.2. Внеклеточный матрикс [9]

Ткани состоят не только из клеток. Значительную часть их объема занимает внеклеточное пространство, заполненное сложной сетью макромолекул, составляющих **внеклеточный матрикс** (рис. 14-20). Этот матрикс включает разнообразные полисахариды и белки, которые секретируются самими клетками и организуются в упорядоченную сеть. Описывая межклеточные соединения, мы рассматривали главным образом эпигелиальные ткани, при описании же внеклеточного матрикса мы будем иметь дело в основном с **соединительными тканями** (рис. 14-21). В таких тканях матрикс обычно занимает больший объем, чем клетки, окружает их со всех сторон и определяет механические свойства ткани. У позвоночных соединительные ткани образуют структурный каркас

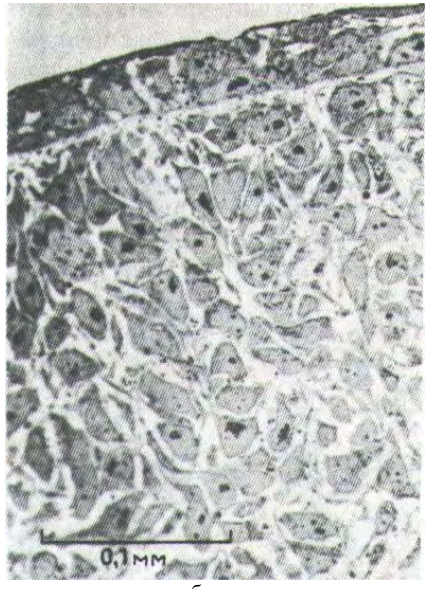


Рис. 14-20. Электронная микрофотография, показывающая при небольшом увеличении клетки, окруженные внеклеточным матриксом. В данном случае это еще не дифференцированные клетки конечности раннего куриного эмбриона. (С любезного разрешения Cheryll Tickle.)

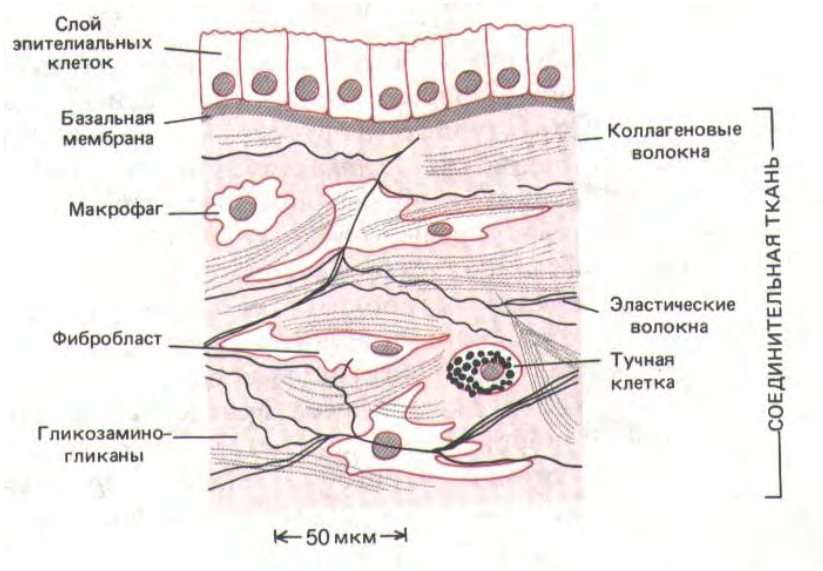


Рис. 14-21. Соединительная ткань, подстилающая слой эпителиальных клеток.

тела, но их доля в разных органах весьма различна: в коже и костях, например, они являются основным компонентом, а в головном и спинном мозгу составляют лишь незначительную часть.

Различия в соотношениях разных типов макромолекул и в способе их организации во внеклеточном матриксе порождают необычайное разнообразие форм, каждая из которых очень хорошо приспособлена к функциональным потребностям данной ткани. Матрикс может обызвествляться, образуя твердые, как камень, структуры кости или зуба, может формировать прозрачное вещество роговицы глаза или принимать форму каната, что придает сухожилиям огромную прочность на разрыв. На границе между эпителием и соединительной тканью матрикс образует *базальную мембрану* - чрезвычайно тонкую, но плотную прокладку, играющую важную роль в регуляции поведения клеток. Мы ограничимся описанием внеклеточного матрикса позвоночных, но интересные и своеобразные структуры того же рода встречаются и у многих других организмов; таковы, например, клеточные стенки бактерий и растений, кутикула червей и насекомых, раковины моллюсков. Стенки растительных клеток будут детально рассмотрены в гл. 20.

До недавнего времени внеклеточный матрикс позвоночных считали сравнительно инертным каркасом, стабилизирующим физическую структуру тканей. Но сейчас стало ясно, что он играет значительно более активную и сложную роль в регуляции поведения контактирующих с ним клеток - влияет на их развитие, миграцию, пролиферацию, форму и метаболизм. Молекулярный состав внеклеточного матрикса достаточно сложен, но, хотя наше понимание его организации пока еще фрагментарно, идет быстрый прогресс в изучении его главных компонентов.

14.2.1. Внеклеточный матрикс состоит в основном из фибриллярных белков, погруженных в гидратированный полисахаридный гель

Макромолекулы внеклеточного матрикса в основном секретируются in situ находящимися в нем клетками. В большинстве соединительных тканей в этом участвуют главным образом фибробласты (рис. 14-22). В некоторых специализированных соединительных тканях, таких как хрящ и кость, эту функцию выполняют особые фибробластоподобные клетки, имеющие собственные названия: например, хрящ образуют хондробласты, а кость-остеобласты. Два главных класса макромолекул, образующих матрикс, - это 1) полисахариды *гликозаминогликаны,*



Рис. 14-22. Фибробласты (указаны стрелками) в соединительной ткани роговицы куриного эмбриона. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Внеклеточный матрикс, окружающий фибробласты, состоит в основном из коллагеновых волокон (эластических волокон в роговице нет). Гликозаминогликаны, образующие гидратированный гель в пустотах волокнистой сети, при высушивании препарата осели на поверхности коллагеновых волокон. (С любезного разрешения Robert Trelsta.)

обычно ковалентне связанные с белком в форме *протеогликанов,* и 2) фибриллярные белки двух функциональных типов: преимущественно структурные (например, *коллаген* и *эластин)* и в основном адгезивные (например, *фибронектин* и *ламинин).* Молекулы гликозаминогликана и протеогликана образуют сильно гидратированное гелеподобное «основное вещество», в которое погружены фибриллярные белки. Водная фаза полисахаридного геля обеспечивает диффузию питательных веществ, метаболитов и гормонов между кровью и клетками ткани; коллагеновые волокна укрепляют и упорядочивают матрикс, а резино-подобные эластиновые волокна придают ему упругость. Адгезивные белки способствуют прикреплению клеток к внеклеточному матриксу: фибронектин участвует в прикреплении фибробластов и подобных им клеток к матриксу в соединительных тканях, а ламинин - в прикреплении эпителиальных клеток к базальной мембране.

14.2.2. Цепи гликозаминогликанов занимают большие объемы пространства и образуют гидратированные гели [10]

Гликозамнногликаны - это длинные неразветвленные полисахаридные цепи, состоящие из повторяющихся дисахаридных звеньев. Их называют гликозаминогликанами потому, что один из двух остатков в повторяющемся дисахариде - это всегда аминосахар (N-ацетилглюкозамин или N-ацетилгалактозамин). В большинстве случаев один из этих аминоса-харов сульфатирован, а второй представляет собой уроновую кислоту. Наличие у многих сахарных остатков сульфатных или карбоксильных групп придает гликозаминогликанам большой отрицательный заряд (рис. 14-23). По типу сахарных остатков, типу связей между ними, а также по числу и положению сульфатных групп различают четыре главные группы гликозаминогликанов; это 1) *гиалуроновая кислота,* 2) *хондроитинсулъфат* и *дерматансулъфат,* 3) *гепарансульфат* и *гепарин* и 4) *кератансулъфат* (табл. 14-2).

Полисахаридные цепи недостаточно гибки, чтобы, подобно многим полипептидным цепям, складываться в компактные глобулярные структуры. Кроме того, они в высокой степени гидрофильны. Поэтому гликозаминогликаны стремятся принять конформацию очень рыхлого, неупорядоченного клубка, который занимает огромный для своей массы объем (рис. 14-24), и образуют гели даже в очень низких концентрациях. Благодаря высокой плотности отрицательных зарядов их молекулы притягивают множество таких осмотически активных ионов, как Na^+, что ведет к присасыванию в матрикс большого количества воды. Это создает давление набухания (тургор), позволяющее матриксу противостоять сжимающим силам (в противоположность коллагеновым волок-

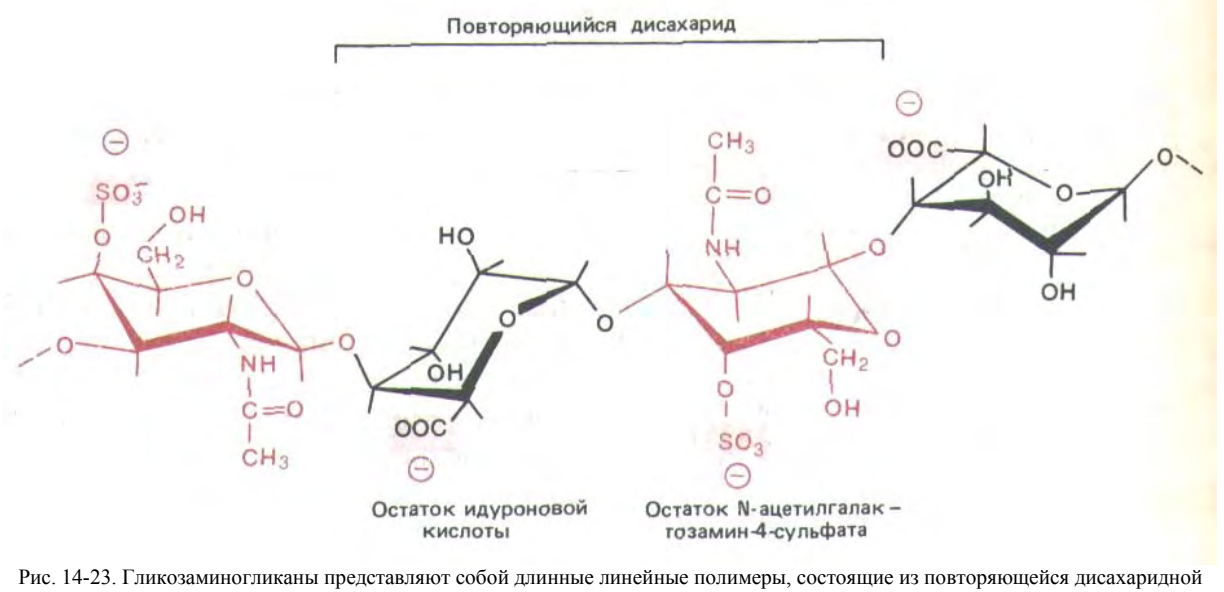


Рис. 14-23. Гликозаминогликаны представляют собой длинные линейные полимеры, состоящие из повторяющейся дисахаридной последовательности. Здесь представлена небольшая часть цепи дерматансульфата; обычно эти цепи содержат от 70 до 200 сахарных остатков. Очень высокая плотность отрицательных зарядов вдоль цепи обусловлена присутствием карбоксильных и сульфатных групп.

Таблица 14-2. Гликозаминогликаны

Группа	Гликозаминогликан	Мол. масса	Повторяющийся дисахарид $(A\text{-}B)_n$		Число сульфогрупп на дисахарид	Связь с белком	Другие сахара	Распределение в организме
			Остаток А	Остаток В				
1	Гиалуроновая кислота	$4000\text{-}8 \cdot 10^6$	D-глюкуроновая кислота	N-ацетил-D-глюкозамин	0		0	Различные соединительные ткани, кожа, стекловидное тело, хрящ, синовиальная жидкость
2	Хондроитин-сульфат	5000-50000	»	N-ацетил-B-галактоз-амин	0,2-2,3	+	D-галактоза, D-ксилоза	Хрящ, роговица, кости, кожа, артерии
	Дерматансульфат	15000-40000	D-глкжуроно-вая кислота или L-идуроновая кислота[1)]	»	1,0-2,0	+	»	Кожа, кровеносные сосуды, сердце, сердечные клапаны
3	Гепаран-сульфат	5000-12000	»	N-ацетил-D-глюкозамин	0,2-2,0	+	»	Легкие, артерии, поверхность клеток, базальные мембраны
	Гепарин	6000-25000	»	»	2,0-3,0	+	»	Легкие, печень, кожа, тучные клетки
4	Кератан-сульфат	4000-19000	D-галактоза	»	0,9-1,8	+	D-галактозамин, D-манноза, L-фруктоза, сиаловая кислота	Хряш, роговица, межпозвоночные диски

[1)] L-идуроновая кислота - продукт эпимеризации D-глюкуроновой кислоты по месту присоединения карбоксильной группы. Таким образом, дерматансульфат - это модифицированная форма хондроитинсульфата, и два типа повторяющихся дисахаридов обычно чередуются в одной и той же гликозаминогликановой цепи

нам, противодействующим растяжению). Именно таким образом сопротивляется сжатию, например, матрикс хряща.

Количество гликозаминогликанов в соединительной ткани обычно составляет менее 10% от содержания фибриллярных белков. Поскольку, однако, они образуют рыхлый гидратированный гель, цепи гликозами-ногликана заполняют большую часть межклеточного пространства, обеспечивая ткани механическую опору и в то же время не препятствуя быстрой диффузии водорастворимых молекул и миграции клеток.

14.2.3. Гиалуроновая кислота, по-видимому, облегчает миграцию клеток во время морфогенеза и регенерации тканей [11]

Гиалуроновая кислота (называемая также гиалуронатом или гиалуронаном), которая может содержать до нескольких тысяч сахарных остатков, - относительно простая молекула, она состоит из повторяющейся последовательности несульфагированных дисахаридных единиц (рис. 14-25). Это вещество встречается в различных количествах во всех тканях

и жидкостях тела взрослых животных, особенно много его у ранних зародышей. Гиалуроновую кислоту ввиду простоты ее структуры предположительно считают эволюционно самой ранней формой гликоза-миногликана, однако она не является типичной среди большинства гликозаминогликанов. Все другие гликозаминогликаны 1) содержат сульфатированные сахара, 2) чаще всего содержат несколько различных дисахаридных единиц, образующих более сложные последовательности, 3) имеют гораздо более короткие цепи, содержащие менее 300 сахарных остатков, и 4) ковалентно связаны с белками.

Появляется все больше данных о том, что гиалуроновая кислота выполняет особую функцию там, где происходит миграция клеток, например в процессах эмбрионального развития и при заживлении ран, В периоды клеточной миграции она образуется в больших количествах, а после прекращения миграции избыток ее разрушается ферментом *гиалуронидазой.* Такая последовательность событий была обнаружена в разнообразных тканях. Это позволяет предполагать, что локальное увеличение синтеза гиалуроновои кислоты, притягивающей воду и тем самым вызывающей набухание матрикса, служит общей стратегией облегчения миграции клеток при морфогенезе и регенерации. Гиалуроновая кислота является также важным компонентом синовиальной (суставной) жидкости, где она играет роль смазки.

14.2.4. Протеогликаны состоят из длинных цепей гликозаминогликана, ковалентно связанных с сердцевинным белком [12]

За исключением гиалуроновои кислоты, все гликозаминогликаны ковалентно связаны с белком в форме **протеогликанов.** Как и в случае гликопротеинов (разд. 8.6.6), полипептидная цепь *(сердцевинный белок]* протеогликана синтезируется на рибосомах, связанных с мембранами, и «протаскивается» через мембрану в просвет эндоплазматического ретикулума. Полисахаридные цепи добавляются к сердцевинному белку главным образом в аппарате Гольджи: первым к сериновому остатку этого белка присоединяется специальный *литерный трисахарид,* служащий «затравкой» для роста полисахарида; затем с помощью специфических гликозилтрансфераз один за другим добавляются сахарные остатки (рис. 14-26). По мере удлинения цепи в аппарате Гольджи многие из полимеризованных сахарных остатков ковалентно модифицируются в результате ряда последовательных и координированных реакций сульфатирования (разд. 8.7.4) и эпимеризации, которые изменяют конфигурацию функциональных групп вокруг одного из углеродных атомов в молекуле сахара. Сульфатирование сильно увеличивает отрицательный заряд протеогликанов.

Обычно Протеогликаны сильно отличаются от гликопротеинов при-

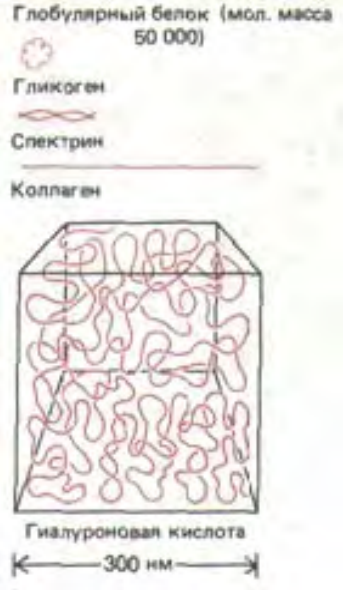


Рис. 14-24. Относительные объемы молекул различных белков, гликогеновой гранулы и одной гидратированной молекулы гиалуроновой кислоты с мол. массой около $8 \cdot 10^6$.

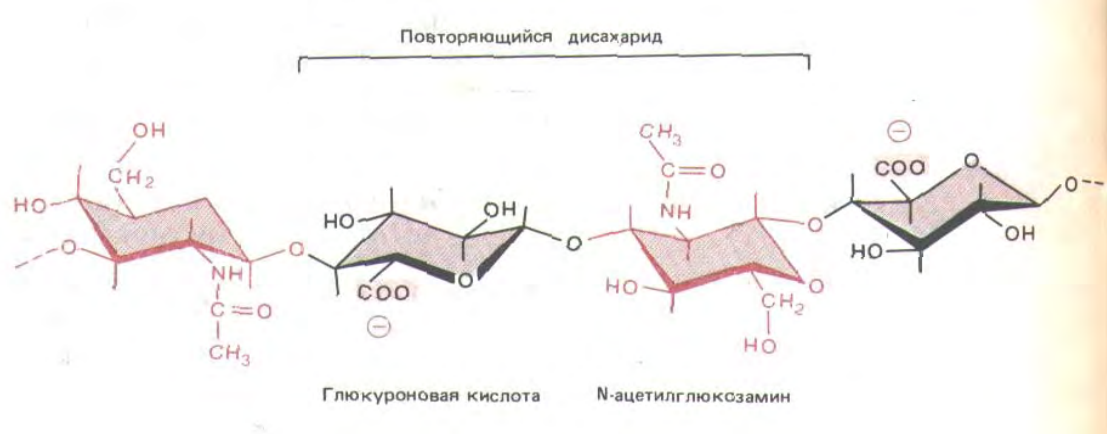


Рис. 14-25. Повторяющаяся дисахаридная последовательность гиалуроновои кислоты - относительно простого гликозаминогликана, состоящего из одной очень длинной цепи, в которой может быть до нескольких тысяч сахарных остатков. Обратите внимание на отсутствие сульфатных групп.

родой, числом и расположением сахарных боковых цепей. Гликопротеины обычно содержат от 1 до 60% углеводного компонента в виде многочисленных относительно коротких (как правило, менее 15 сахарных остатков) разветвленных олигосахаридных цепей, связанных с атомами кислорода и азота; эти цепи имеют переменный состав и часто оканчиваются сиаловой кислотой (разд. 8.7.1). Хотя сердцевинный белок протеогликана сам может быть гликопротеином, протеогликаны могут содержать по массе до 95% углевода, большая часть которого представлена различным числом (от одной до нескольких сотен) неразветвленных цепей гликозаминогликана, в типичных случаях каждая примерно из 80 сахарных остатков, обычно без сиаловой кислоты. Кроме того, если гликопротеины редко имеют мол. массу больше $3\text{-}10^5$, то протеогликаны могут быть значительно крупнее. Например, один из наиболее полно охарактеризованных протеогликанов - главный компонент хряща, - как правило, содержит около 100 цепей хондроитинсульфата и примерно 50 цепей кератансульфата, связанных с сердцевинным белком, который богат серином и состоит из более чем 2000 аминокислот. Его общая молекулярная масса составляет около $3 \cdot 10^6$, что соответствует примерно одной цепи гликозаминогликана на каждые 20 аминокислотных остатков (рис. 14-27). С другой стороны, многие протеогликаны значительно меньше и имеют только от 1 до 10 гликозаминогликановых цепей.

В принципе строение протеогликанов допускает почти неограниченное разнообразие. Они могут существенно различаться по содержанию белка, по величине молекул и по числу и типу гликозаминогликановых цепей в молекуле. Кроме того, хотя для них всегда характерны повторяющиеся последовательности дисахаридов, длина и состав цепей гликозаминогликанов могут сильно варьировать, так же как и пространственное расположение гидроксильных, сульфатных и карбоксильных групп вдоль цепи. Поэтому задача идентификации и классификации протеогликанов по содержащимся в них сахарам чрезвычайно сложна. К настоящему времени многие сердцевинные белки секвенированы с помощью метода рекомбинантной ДНК, и в будущем классификация протеогликанов, вероятно, станет более осмысленной, когда будет основана на структуре их сердцевинных белков, а не гликозаминогликанов.

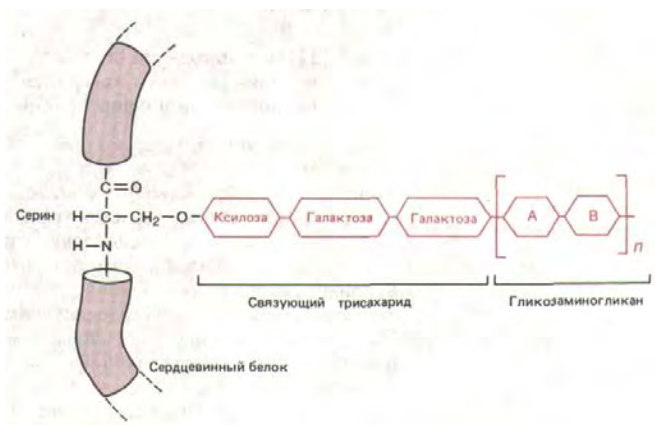


Рис. 14-26. Схема соединения гликозаминогликановой цепи с серином сердцевинного белка в молекуле протеогликана. К серину [который часто находится внутри последовательности Asp (или Glu)-Asp-(или Glu)-X-Ser-Gly-X-Giy, где X -любая аминокислота] присоединен специфический «линкерный трисахарид». Остальная часть цепи гликозаминогликана, построенная в основном из повторяющихся дисахаридных единиц (состоящих в свою очередь из двух моносахаридов A и B, приведенных в табл. 14-2), синтезируется позднее путем последовательного присоединения сахарных остатков.

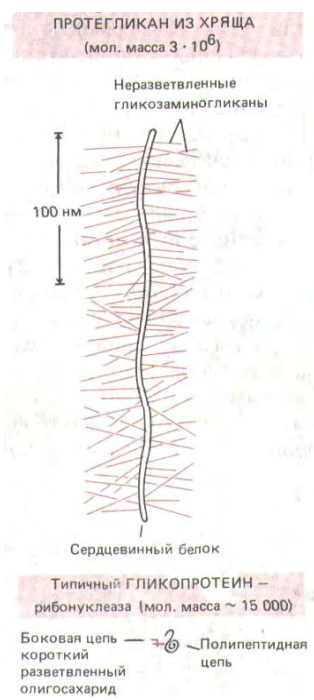


Рис. 14-27. Молекула главного протеогликана хряща. Она состоит из множества гликозаминогликановых цепей, ковалентно связанных с сердцевинным белком. В дополнение к гликозаминогликановым цепям сердцевинный белок содержит еще олигосахаридные цепи, присоединенные к атомам азота или кислорода (на рисунке не показаны). Большинство протеогликанов меньше того, который здесь изображен, и гликозаминогликановые цепи у них часто имеются лишь в определенных областях полипептидной цепи сердцевинного белка. Внизу для сравнения в том же масштабе изображена молекула типичного гликопротеина (панкреатической рибонуклеазы B).

14.2.5. Цепи гликозаминогликанов могут располагаться во внеклеточном матриксе высокоуноридоченным образом [13]

Ввиду структурной гетерогенности молекул протеогликанов кажется маловероятным, чтобы их роль сводилась лишь к созданию гидратированного пространства вокруг клеток и между ними. Было показано, что in vitro протеогликаны связывают различные секретируемые сигнальные молекулы, и можно предполагать, что они выполняют эту функцию и в тканях, локализуя таким образом действие сигнальных лигандов; например, фактор роста фибробластов (разд. 13.3.1, табл. 13-1) связывается с протеогликаном гепарансульфатом как in vitro, так и в тканях. Протеогликаны могут образовывать гели с разной величиной пор и разной плотностью зарядов и служить фильтрами, регулирующими движение молекул и клеток в соответствии с их размерами и/или зарядом. Судя по некоторым данным, протеогликаны выполняют подобную функцию в базальной мембране почечных клубочков, фильтрующей молекулы из кровотока в мочу (разд. 14.2.16).

Способ организации гликозаминогликанов и протеогликанов во внеклеточном матриксе еще плохо изучен. Биохимические исследования показывают, что в матриксе эти молекулы специфическим образом связаны друг с другом и с фибриллярными белками. Было бы странным, если бы такие взаимодействия не играли никакой роли в организации матрикса. Было установлено, что главный протеогликан хряща, содержащий кератансульфат и хондроитинсульфат (см. выше), организован во внеклеточном матриксе в крупные агрегаты, нековалентно связанные через свои сердцевинные белки с макромолекулой гиалуроновой кислоты. Примерно 100 мономеров протеогликана связаны с одной цепью гиалуроновой кислоты, образуя гигантский комплекс с мол. массой в 100 млн. или больше, занимающий объем, равный объему бактерии. Выделенный из ткани, этот комплекс хорошо виден в электронном микроскопе (рис. 14-28).

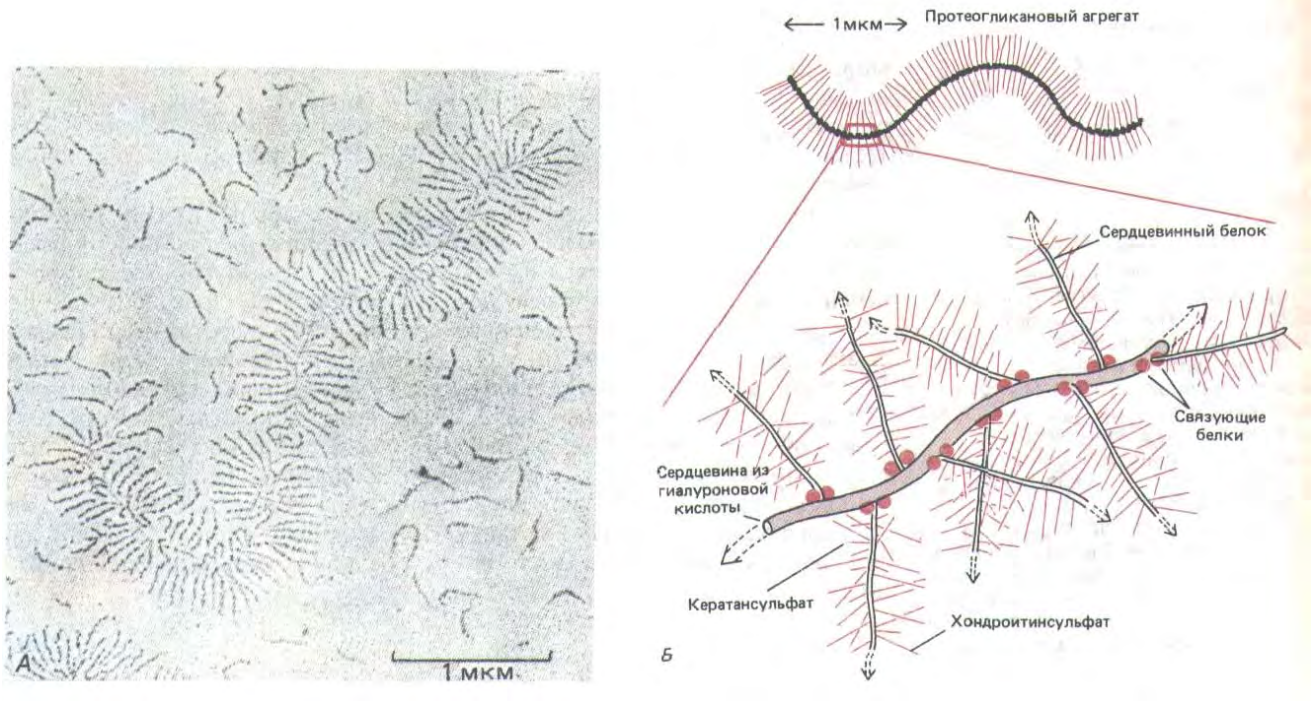


Рис. 14-28. *А.* Электронная микрофотография агрегата протеогликанов из эмбрионального хряща коровы (напыление платиной). Видно также много свободных молекул протеогликана. *Б.* Схема строения гигантского протеогликанового агрегата, показанного на фото *А*. Он состоит примерно из сотни протеогликановых мономеров (вроде изображенного на рис. 14-27), нековалентно присоединенных к одной молекуле гиалуроновой кислоты с помощью двух связующих белков, которые одновременно соединены как с сердцевинным белком протеогликана, так и с цепью гиалуроновой кислоты, и стабилизируют таким образом агрегат. Молекулярная масса такого комплекса может достигать 10^8 и более, а занимаемый им объем равен объему бактериальной клетки (около *2*- 10^{-12} $см^3$). *(А-с* любезного разрешения Lawrence Rosen-berg.)

Однако попытки определить с помощью электронной микроскопии пространственное расположение молекул протеогликана, когда они находятся в ткани, оказались безуспешными. Так как эти молекулы хорошо растворимы в воде, при фиксации они легко вымываются из внеклеточного матрикса во время обработки срезов в водных растворах. Недавно протеогликаны удалось увидеть в почти нативном состоянии в хряще, быстро замороженном при очень низкой температуре (— 196°С) и высоком давлении с последующей фиксацией и окраской в замороженном состоянии (рис. 14-29). Вместо этого можно использовать катионный краситель с относительно низкой плотностью заряда в сочетании с более традиционной фиксацией. При таком окрашивании протеогликаны сухожилия из хвоста крысы выглядят как нитевидные структуры, обвивающие коллагеновые фибриллы с регулярными интервалами около 65 нм (рис. 14-30). Такой интервал соответствует продольному смещению параллельных молекул коллагена относительно друг друга в этих фибриллах (разд. 14.2.8). Такого рода упорядоченное расположение молекул, вероятно, весьма обычно во внеклеточном матриксе, и при том разнообразии, которое свойственно молекулам коллагена и прогеогликанов, могут получаться сложные и многообразные структуры.

Известно, что из некоторых полисахаридных цепей создаются высокоупорядоченные спиральные или лентовидные образования. Например, у высших растений микрофибриллярный компонент клеточных стенок построен из цепей целлюлозы (полиглюкозы), плотно упакованных в лентовидную кристалл о подобную структуру (см. рис. 20-5). In vitro две *различные* полисахаридные цепи могут специфически взаимодействовать друг с другом, образуя участки с регулярной спиральной структурой (рис. 14-31); такое межполисахаридное взаимодействие могло бы проис-

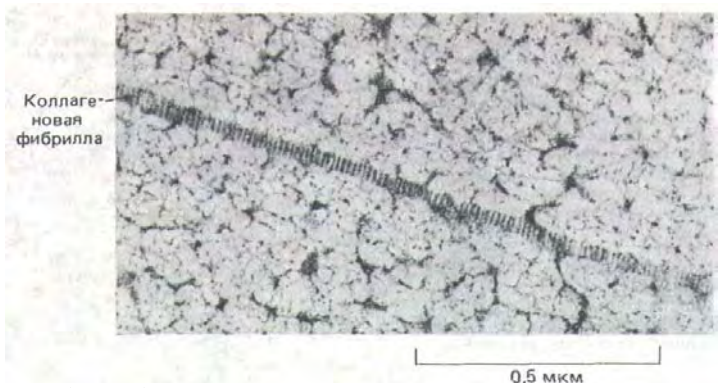


Рис. 14-29. Электронная микрофотография протсогликанов внеклеточною матрикса из хряща крысы. Ткань была быстро заморожена при —196 С, зафиксирована и окрашена в замороженном состоянии (процесс, называемый *замещением в замороженном состоянии),* чтобы предотвратить сжатие протеогликановых цепей. Видно, что молекулы протеогликанов образуют тонкую волокнистую сеть, в которую погружено одно поперечноисчерченное коллагеновое волокно. Более темные участки протео-гликановых молекул сердцевинные белки; более светлые нити--цепи гликозаминогликана. (E. B. Hunziker, R.K. Schcnk, J. cell Biol. 98: 277-282, 1985 by copyright permission of the Rockefeller Univ. Press.)



Рис. I 4-30. Электронная микрофотография продольного среза сухожилия из хвоста крысы. Препарат контрастирован медьсодержащим красителем для выявления молекул протеогликанов. Сухожилие состоит из плотно упакованных коллатеновых фибрилл; несколько таких фибрилл видны на фотографии. Молекулы протеогликана имеют вид тонких нитей, окружающих каждую коллагеновую фибриллу через равные интервалы примерно в 65 нм (например, указанные стрелками b*);* это указывает на специфическое взаимодействие молекул коллагена и протеогликанов. В тех местах, где не видно протеогликановых нитей, пересекающих коллагеновые фибриллы (как в участке, отмеченном двойной стрелкой *а),* плоскость среза, видимо, прошла прямо через фибриллу. (J. E. Scott, Biochem. J. 187: 887-891, 1980. Copyright 1980. Amer. Chem. Soc.)

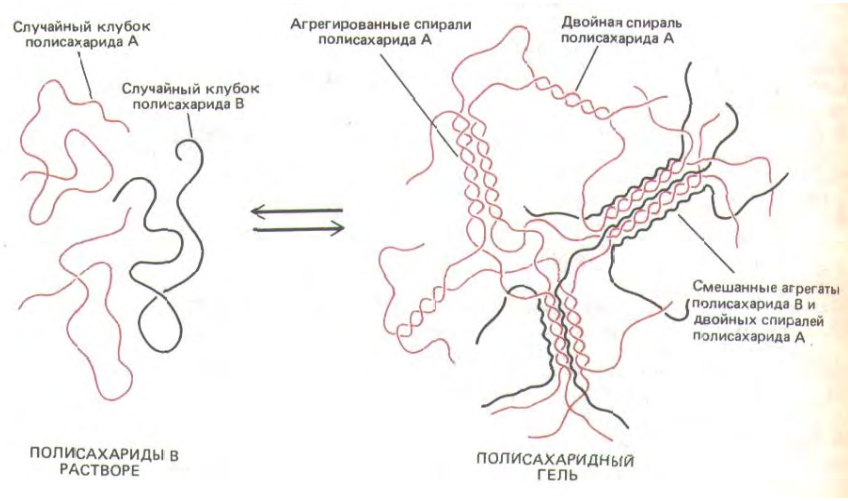


Рис. 14-31. Некоторые из упорядоченных конформаций, которые могут принимать две разные полисахаридные цепи, А и Б, при образовании геля in vitro. Поскольку взаимодействие между молекулами ограничено определенными участками их цепей (так называемыми соединительными участками) и не распространяется на всю молекулу, каждая цепь может объединиться более чем с одним партнером и таким путем образовать решетку геля. К гелеобразующим полисахаридам относятся, в частности, агары (из водорослей) и пектины (из высших растений).

ходить и во внеклеточном матриксе. Если конформаций молекул протеогликанов могут быть столь же разнообразными, как их химическое строение, то мы едва только начинаем понимать их организацию.

Не все протеогликаны являются секретируемыми компонентами внеклеточного матрикса. Некоторые из них входят в состав плазматической мембраны, и иногда такие протеогликаны содержат сердцевинный белок, ориентированный поперек липидного бислоя. Протеогликаны клеточных мембран обычно состоят лишь из небольшого числа гликозаминогликановых цепей и, по-видимому, играют какую-то роль в прикреплении клеток к внеклеточному матриксу и в организации макромолекул матрикса, секретируемых клетками.

14-12

14.2.6. Главный белок внеклеточного матрикса - коллаген

Коллагены - это семейство весьма своеобразных фибриллярных белков, имеющихся у всех многоклеточных животных. Они секретируются главным образом клетками соединительной ткани и у млекопитающих занимают среди белков первое место по количеству, составляя около 25% всего белка. Характерная особенность молекул коллагена - их жесткая трехцепочечная спиральная структура. Три полипептидные цепи, называемые α-цепями (каждая примерно из 1000 аминокислот), скручены в одну регулярную суперспираль наподобие каната и образуют молекулу коллагена длиной около 300 нм и толщиной 1,5 нм. Коллагены содержат очень много пролина и глицина, которые оба играют

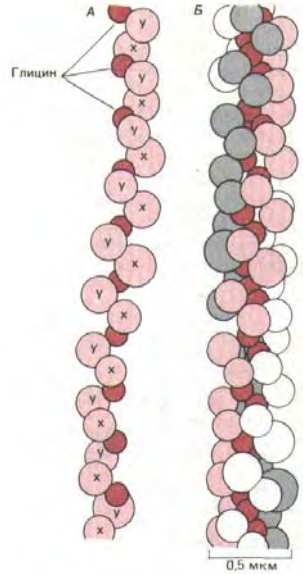


Рис. 14-32. *А.* Модель одной α-цепи коллагена, в которой каждая аминокислота представлена шариком. Цепь образует левозакрученную спираль с тремя аминокислотными остатками на один виток и с глицином (выделен темным цветом) в каждой третьей позиции. Таким образом, α-цепь состоит из длинной серии триплетов Gly-X-Y, где X и Y могут быть любой аминокислотой (хотя обычно одна из них - пролин). *Б.* Модель участка молекулы коллагена, в которой три α-цепи скручены в спиральный жгут. Одна α-спираль выделена светло-красным цветом, другая - серым, а третья - белым. Глицин - единственная аминокислота, которая достаточно мала, чтобы помещаться в тесном осевом пространстве тройной спирали. Показана только небольшая часть молекулы; вся молекула достигает в длину около 300 нм, а каждая цепь состоит примерно из 1000 аминокислотных остатков. (Зарисовки с модели B. L. Trus.)

495 Таблица 14-3. Четыре главных типа коллагена и их свойства

Тип	Формула[11]	Полимерная форма	Отличительные черты	Местонахождение в организме
I	$[al(I)]_2\alpha2(I)$	Фибрилла	Мало гидроксилизина, мало углевода, толстые фибриллы	Кожа, сухожилия, кость, связки, роговица, внутренние органы (составляет 90% всего коллагена в организме)
II	$[\alpha\ 1(II)]_3$	Фибрилла	Много гидроксилизина, много углевода, фибриллы тоньше, чем у типа I	Хрящ, межпозвоночные диски, хорда, стекловидное тело глаза
III	$[\alpha\ 1(III)]_3$	Фибрилла	Много гидроксипролина, мало гидроксилизина, мало углевода	Кожа, кровеносные сосуды, внутренние органы
IV	$[\alpha\ l(IV)]_2\alpha\ 2(IV)$	Базальная мембрана	Очень много гидроксилизина, много углевода; сохраняет концевые пептиды проколлагена	Назальные мембраны

[1)] Обратите внимание, что в коллагенах I и IV два типа α-цепей, а в коллагенах II и III-только один тип α-цепей. В таблице представлены только четыре главных типа коллагена, но сейчас известно более 10 типов коллагена и около 20 типов α-цепей.

важную роль в формировании трехцепочечной спирали. Пролин благодаря своей кольцевой структуре стабилизирует левозакрученную спиральную конформацию каждой а-цепи с тремя аминокислотными остатками на один виток. Глицин, наименьшая из аминокислот (вместо боковой цепи у нее только один атом водорода), повторяется на каждом третьем месте на протяжении всего центрального участка а-цепи; это дает возможность трем спиральным а-цепям плотно прилегать друг к другу с образованием законченной коллагеновой суперспирали (рис. 14-32).

До сих пор идентифицировано около 20 различных цепей коллагена, каждая из которых кодируется отдельным геном. В разных тканях экспрессируются различные комбинации этих генов. Хотя в принципе из таких двадцати а-цепей можно составить более 1000 видов трехцепочечных молекул коллагена, фактически было обнаружено только около 10 видов. Наиболее изучены типы I, II, III и IV (табл. 14-3). Типы I, II и III - фибриллярные коллагены. Это главные типы коллагенов, встречающихся в соединительных тканях, из них особенно широко распространен тип I. После того как молекулы этих трех типов коллагена переходят из клеток в межклеточное пространство, они организуются в упорядоченные полимеры, называемые **коллагеновыми фибриллами.** Это тонкие (толщиной 10-300 нм) канатовидные структуры длиной во много микрометров, ясно видимые на электронных микрофотографиях (рис. 14-33). Эти фибриллы часто группируются в более крупные пучки толщиной в несколько микрометров, которые видны уже в обычный микроскоп как *коллагеновые волокна.* Молекулы коллагена типа IV



Рис. 14-33. Электронная микрофотография части фибробласта, окруженного коллагеновыми фибриллами, в соединительной ткани. Сильно развитый гранулярный эндоплазматический ретикулум фибробласта отражает способность клетки к активному синтезу и секреции коллагена и других макромолекул внеклеточного матрикса. (С любезного разрешения Russell Ross.)

встречаются только в базальной мембране, вместо образования фибрилл они организуются в плоскую сеть, которая составляет значительную часть всей базальной мембраны (разд. 14.2.11). Как располагаются в тканях молекулы коллагена остальных типов, неясно.

Многие белки с повторяющимися последовательностями аминокислот возникли в результате дупликаций участков ДНК (разд. 10.5.4). Именно так, видимо, появились и фибриллярные коллагены. Действительно, гены, кодирующие α-цепи таких коллагенов, очень велики (30-40 тысяч п. н.) и содержат около 50 экзонов. Большинство экзонов состоит из 54 или кратного 54 числа нуклеотидов, поэтому можно предположить, что эти коллагены возникли в результате множественных дупликаций первоначального гена, содержавшего 54 нуклеотида; сказанное не относится к коллагену типа IV, который, очевидно, возник другим путем.

14-13

14.2.7. Секретируемые коллагены имеют на обоих концах неспиральные участки [14, 15]

Отдельные полипептидные цепи коллагена синтезируются на рибосомах, связанных с мембраной, и переходят в просвет эндоплазматического ретикулума в виде более длинных предшественников, называемых *про-α-цепями.* У этих предшественников имеется не только короткий «сигнальный пептид» на аминном конце, необходимый для того, чтобы «протащить» секретируемый белок через мембрану ретикулума (разд. 8.6.5), но и группы других дополнительных аминокислот, называемые *пропептидами,* на аминном и карбоксильном концах. В просвете эндоплазматического ретикулума остатки пролина и лизина гидроксилируются с образованием гидроксипролина и гидроксилизина соответственно. Затем каждая про-а-цепь с помощью водородных связей объединяется с двумя другими в трехцепочечную спиральную молекулу, известную как *проколлаген* (рис. 14-34). Секретируемые формы фибриллярных коллагенов (но не коллаген типа IV) во внеклеточном пространстве преобразуются в *молекулы коллагена* путем отщепления пропептидов (см. ниже).

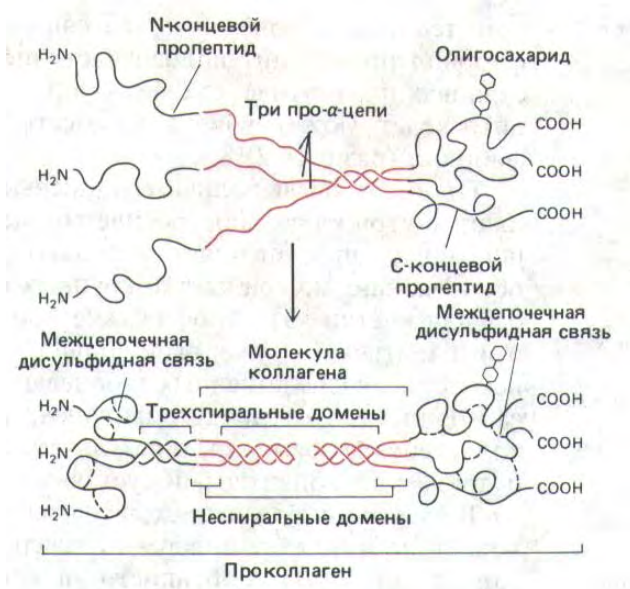


Рис. 14-34. В молекулах фибриллярного коллагена α-цепи вначале синтезируются в форме про-α-цепей, содержащих дополнительные пептиды на обоих концах (выделены черным цветом), которые позднее отщепляются. По-видимому, С-концевой пропептид способствует формированию тройной спирали при сборке молекулы *проколлагена.* Обратите внимание, что С-концевые пропептиды в молекуле проколлагена ковалентне соединены между собой дисульфидными связями и часто содержат олигосахаридную цепь. Аминоконцевые пропептиды образуют короткий трехцепочечный «миниколлагеновый» участок. Окончательная молекула коллагена содержит только часть молекулы проколлагена, выделенную красным цветом; остальные участки расщепляются.

В других белках остатки гидроксипролина и гидроксилизина {рис. 14-35) встречаются редко. Почему они присутствуют в коллагене? Есть косвенные указания на то, что гидроксильные группы остатков гидроксипролина образуют водородные мостики между цепями, стабилизирующие трехцепочечную спираль. В частности, условия, препятствующие гидроксилированию пролина (например, недостаток аскорбиновой кислоты - витамина С), ингибируют формирование спирали проколлагена. В нормальных условиях коллагены непрерывно (хотя и медленно) расщепляются специфическими внеклеточными ферментами - *коллагеназами.* При цинге - заболевании, развивающемся у человека при нехватке витамина С в пище,-негидроксилированные про-α-цепи не способны образовать тройную спираль и тотчас же разрушаются; поэтому в результате постепенной потери существовавшего ранее нормального коллагена в матриксе кровеносные сосуды становятся чрезвычайно хрупкими, а зубы начинают шататься. Это означает, что распад и замещение коллагена происходят здесь относительно быстро. Однако во многих других тканях взрослого организма обновление коллагена (и других макромолекул внеклеточного матрикса) в норме происходит очень медленно; крайним примером может служить кость, где молекулы коллагена существуют около 10 лет до распада и замещения. Для сравнения отметим, что у большинства клеточных белков время полужизни измеряется часами или днями.

Гидроксилирование остатков лизина играет иную роль: оно необходимо для осуществления необычной разновидности гликозилирования (функция которого неизвестна) и имеет решающее значение для поперечной сшивки молекул коллагена при его организации во внеклеточном пространстве (разд. 14.2.9).

14.2.8. Молекулы проколлагена типов I, II и III после их секреции расщепляются с образованием молекул коллагена, которые объединяются в фибриллы [16]

После секреции пропептиды молекул проколлагена типов 1, II и III разрушаются специфическими ферментами уже вне клетки, и проколлаген превращается в коллаген (называемый также *тропоколлагеном}.* Образовавшиеся молекулы коллагена толщиной 1,5 нм объединяются во внеклеточном пространстве в значительно более крупные коллагеновые фибриллы (толщиной 10-300 нм). Фибриллы образуются частично за



Рис. 14-35. Структура остатков гидроксипролина и гидроксилизина -двух измененных аминокислот, обычно содержащихся в коллагене.

счет тенденции молекул коллагена к самосборке. Однако образование фибрилл происходит вблизи клеточной поверхности, часто в глубоких складках плазматической мембраны, и лежащий под нею кортикальный цитоскелет может влиять на место, скорость и ориентацию сборки фибрилл (разд. 14.2.18).

Пропептиды выполняют по меньшей мере две функции: 1) направляют внутри клетки построение трехцепочечных молекул коллагена; и 2) поскольку они отщепляются только после секреции, они препятствуют образованию внутри клетки крупных коллагеновых фибрилл, что имело бы для клетки катастрофические последствия. Однако столь же важно и избавиться от уже выполнивших свою задачу пропептидов. При некоторых наследственных заболеваниях, например при синдроме Элерса-Дэнлоса, этот процесс нарушен, а потому нарушено и образование коллагеновых фибрилл; в результате больные обладают хрупкой кожей и чрезмерно подвижными суставами.

В электронном микроскопе фиксированные и окрашенные фибриллы коллагена выглядят поперечно исчерченными с периодом 67 нм. Такая картина отражает особенности упаковки отдельных молекул в фибриллу: как показано на рис. 14-36, они располагаются так, что соседние молекулы сдвинуты друг относительно друга почти на четверть своей длины (на 67 нм). Такое расположение, по-видимому, максимально повышает прочность агрегата на растяжение и создает исчерченность, видимую на негативно контрастированных фибриллах (рис. 14-37). Однако все еще не ясно, как при таких сдвигах молекулы упакованы в трехмерной цилиндрической фибрилле.

После того как коллагеновые фибриллы сформировались во внеклеточном пространстве, их прочность сильно возрастает благодаря созда-

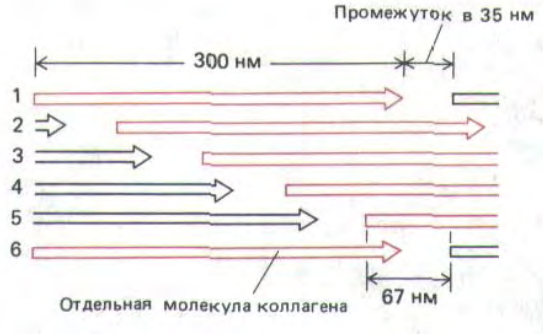


Рис. 14-36. Схема ступенчатого расположения молекул коллагена (они изображены в виде стрелок) в коллагеновой фибрилле. Молекулы в соседних рядах сдвинуты друг относительно друга на 67 нм, а промежутки между молекулами в продольном ряду составляют 35 нм. При такой величине этого промежутка продольное расположение молекул повторяется через каждые пять рядов, так что, например, молекулы в рядах 1 и 6 лежат точно друг против друга.

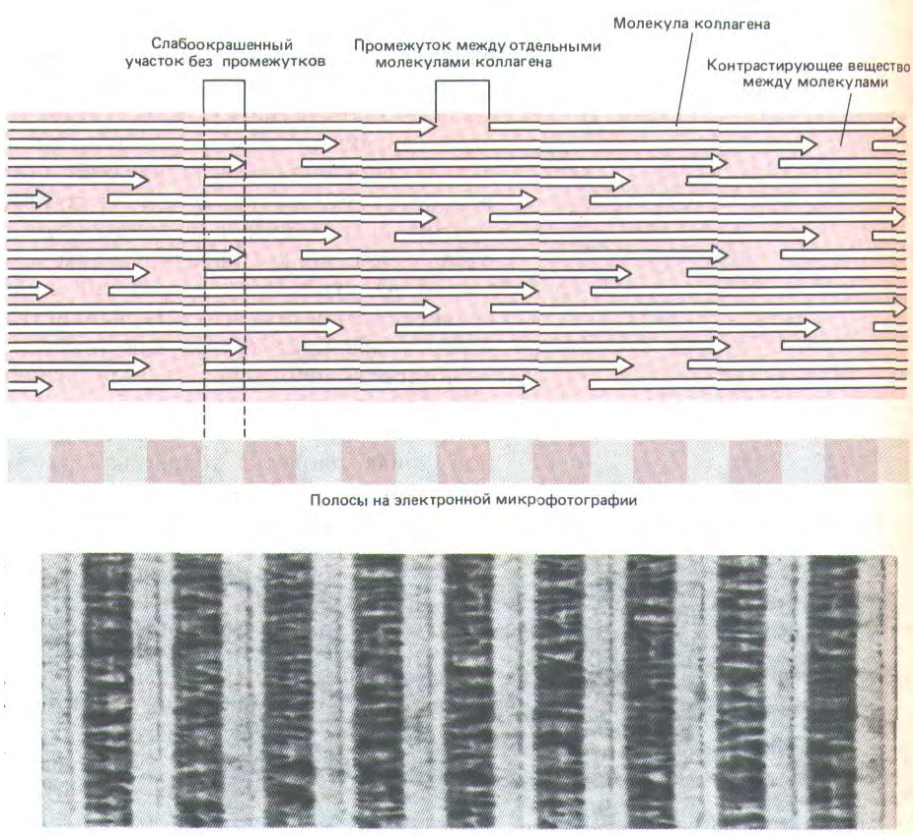


Рис. 14-37. Эта схема объясняет, каким образом ступенчатое расположение молекул коллагена приводит к поперечной исчерченности фибриллы после негативного контрастирования. Поскольку контрастирующее вещество заполняет только промежутки между молекулами в каждом ряду, эти промежутки выглядят как темные полосы. Внизу - электронная микрофотография негативно контрастированной фибриллы (любезно предоставлена Robert Horne.)

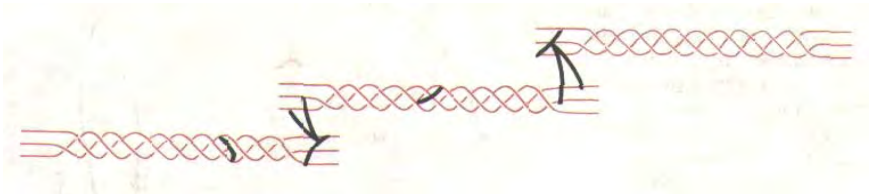


Рис. 14-38. Внутримолекулярные и межмолекулярные сшивки между модифицированными боковыми цепями лизина в коллагеновой фибрилле. Сшивки образуются в несколько этапов. Вначале некоторые остатки лизина и гидроксилизина дезаминируются внеклеточным ферментом лизилоксидазой, и здесь появляются альдегидные группы, обладающие высокой реакционной способностью. Затем эти группы самопроизвольно реагируют с образованием ковалентных связей друг с другом или с другими остатками лизина или гидроксилизина, так что в сшивке может участвовать более двух аминокислотных боковых цепей. Некоторые из образуемых связей относительно нестабильны и в конце концов модифицируются, превращаясь в разнообразные более стабильные сшивки. Обратите внимание, что большинство сшивок образуется между короткими неспиральными сегментами на обоих концах молекул коллагена (см. рис. 14-35).

нию ковалентных сшивок между остатками лизина внутри коллагеновых молекул и между ними (рис. 14-38). Ковалентные связи такого типа встречаются только в коллагене и эластине. Если блокировать их образование, содержащие коллаген ткани становятся хрупкими и такие структуры, как кожа, сухожилия и кровеносные сосуды, будут легко разрываться. Количество и тип сшивок изменяются от ткани к ткани. Например, в ахилловом сухожилии, для которого прочность на разрыв очень важна, такие сшивки в коллагене особенно многочисленны.

14.2.9. Организация коллагеновых фибрилл во внеклеточном матриксе приспособлена к потребностям ткани [17]

Коллагеновые фибриллы имеют разную толщину и по-разному организуются в различных тканях. Например, в коже млекопитающих они расположены наподобие прутьев в плетеных изделиях и поэтому сопротивляются нагрузкам по всем направлениям. В сухожилии они собраны в параллельные пучки, уложенные вдоль главной оси, а в зрелой костной ткани и роговице их расположение напоминает чередующиеся слои в фанере - фибриллы каждого слоя уложены параллельно друг другу почти под прямым углом к фибриллам соседних слоев. Так же организованы они и в коже головастика (рис. 14-39).

Сами клетки соединительной ткани определяют размер и расположение коллагеновых фибрилл. В клетках могут экспрессироваться один или несколько генов для разных типов молекул фибриллярного проколлагена (в том числе и минорные типы, не представленные в табл. 14-3), и клетки могут таким образом регулировать распределение молекул после их секреции. Контролируя порядок, в котором последовательно отщепляются пропептиды аминного и карбоксильного концов, секретируя наряду с коллагеном различные виды и количества неколлагеновых макромолекул матрикса и направляя формирование коллагеновых фибрилл в тесной взаимосвязи с плазматической мембраной, клетки могут определять геометрию и свойства фибрилл в своем ближайшем окружении. Наконец, образование большего или меньшего числа сшивок в коллагене зависит от требуемой прочности на растяжение. На рис. 14-40 схематически представлены этапы синтеза фибриллярного коллагена и сборки структур высшего порядка.

14.2.10. Клетки могут участвовать в организации секретируемых ими коллагеновых фибрилл, изменяя натяжение матрикса [18]

Есть еще один механизм, с помощью которого выделяющие коллаген клетки определяют пространственную организацию образуемого ими матрикса. Фибробласты воздействуют на выработанный ими коллаген, ползая по нему и растягивая его, что способствует уплотнению его в слои и вытягиванию в волокна. Такая механическая роль фибробластов в структурировании коллагенового матрикса была наглядно продемонстрирована in vitro. Если поместить фибробласты в культуральную чашку с переплетением случайно ориентированных коллагеновых фибрилл, образующих гель, то клетки, передвигаясь, начнут тянуть за



Рис. 14-39. Электронная микрофотография поперечного среза кожи головастика. Видно, что слои коллагеновых фибрилл, подобно слоям дерева в фанере, уложены так, что фибриллы соседних слоев пересекаются под прямым углом. Такое расположение встречается также в зрелой костной ткани и в роговице. (С любезного разрешения Jerome Gross.)

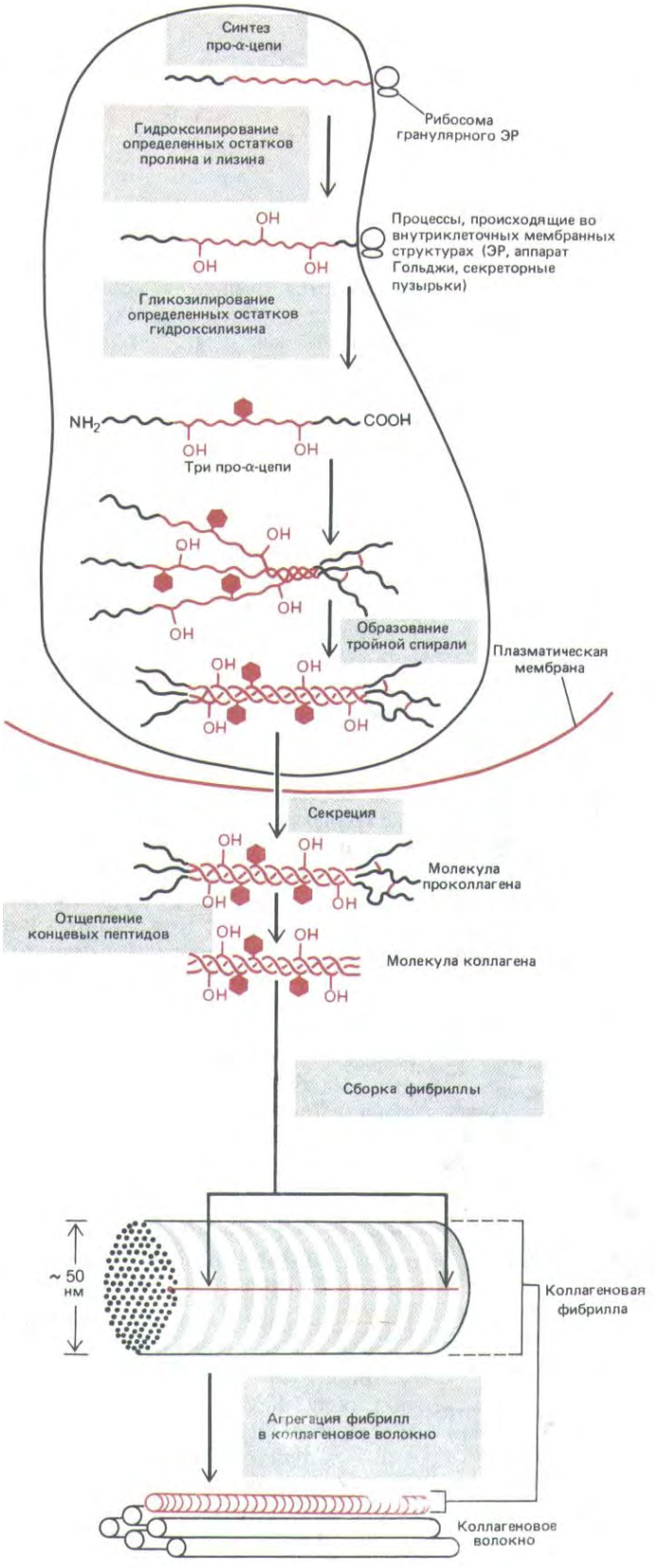


Рис. 14-40. Схема различных внутриклеточных и внеклеточных событий при образовании коллагеновой фибриллы. В качестве примера того, как фибриллы могут упорядочение располагаться во внеклеточном пространстве, показана их последующая сборка в большое коллагеновое волокно, видимое в световой микроскоп. Ковалентные сшивки, стабилизирующие внеклеточные агрегаты, не показаны. У человека известно много наследственных заболеваний, при которых нарушается образование коллагеновых фибрилл, что не удивительно при столь большом числе ферментативных реакций, участвующих в этом процессе.

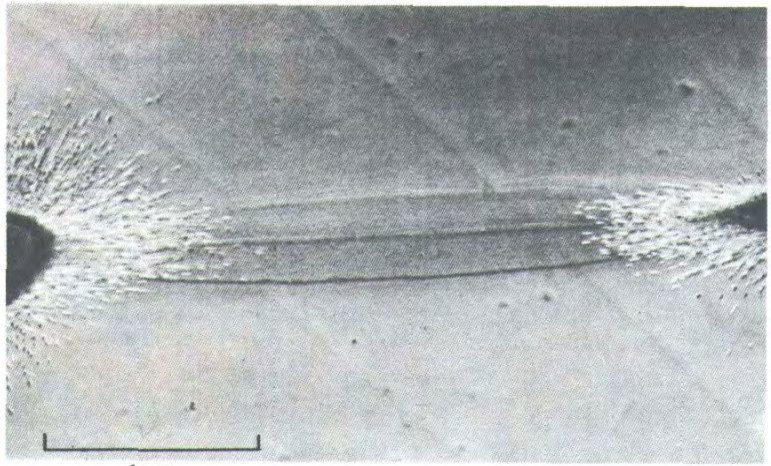


Рис. 14-41. Микрофотография участка между двумя кусочками сердца куриного эмбриона. Эти эксплантаты, содержавшие много фибробластов и мышечных клеток, росли на коллагеновом геле в течение 4 дней. Обратите внимание, что между эксплантатами образуется плотная полоса из параллельных коллагеновых волокон. (D. Stopak, A. K. Harris. Dev. Biol. 90: 383-398, 1982.)

собой фибриллы из окружающего геля и последний сожмется до малой доли своего первоначального объема. Подобным же способом группа фибробластов может окружить себя капсулой из плотно упакованных коллагеновых волокон, ориентированных тангенциально.

Если два кусочка эмбриональной ткани с фибробластами поместить на некотором расстоянии друг от друга на коллагеновый гель, то коллаген организуется в компактную полосу ориентированных волокон, соединяющих оба эксплантата (рис. 14-41). Затем фибробласты будут мигрировать из обоих эксплантатов вдоль этих параллельных волокон. Таким образом, фибробласты влияют на расположение коллагеновых волокон, а эти волокна в свою очередь воздействуют на распределение фибробластов. Вполне возможно, что фибробласты играют сходную роль и в организации внеклеточного матрикса на макроуровне, участвуя, например, в создании сухожилий и связок, а также прочных, плотных слоев соединительной ткани, окружающих и скрепляющих большинство органов.

14.2.11. Молекулы коллагена типа IV организованы в ламинарную сеть [19]

Молекулы **коллагена типа IV** в некоторых отношениях отличаются от фибриллярного коллагена. Во-первых, регулярная повторяющаяся последовательность аминокислот Gly-X-Y в α-цепи типа IV во многих участках прерывается, локально нарушая спиральную трехцепочечную структуру молекулы коллагена. Во-вторых, молекулы «проколлагена» типа IV не расщепляются после выхода из клетки и, таким образом, сохраняют свои пропептиды; взаимодействуя через неотщепленные пропептидные домены, они организуются в пластоподобную многослойную сеть, а не в фибриллы. Электронно-микроскопические исследования показывают, что эти молекулы, по-видимому, ассоциируются пропептидами своих карбоксильных концов в димеры, которые при дальнейшей ассоциации образуют обширную сеть (рис. 14-42). Дисульфидные и другие ковалентные сшивки стабилизируют такие ассоциации. По-видимому, слои коллагена типа IV составляют основу всех базальных мембран; другие компоненты базальной мембраны будут обсуждаться позже (разд. 14.2.15).



Рис. 14-42. Гипотетическая схема сборки молекул коллагена IV в многослойную сеть, составляющую основу всякой базальной мембраны. Модель основана на электронных микрофотографиях препаратов (с круговым напылением) таких молекул в процессе их сборки in vitro. (По данным P. D. Yurchenco, E. C. Tsilibary, A. S. Charonis, H. Furthmayr. J. Histochem. Cytochem. 34: 93-102, 1986.)

14.2.12. Эластин-это белок с изменчивой случайной конформацией и поперечными сшивками, придающий тканям упругость [20]

Некоторые ткани, например кожа, кровеносные сосуды и легкие, должны быть не только прочными, но и эластичными. Обширная сеть **эластических волокон** внеклеточного матрикса придает этим тканям необходимую им способность сжиматься после временного растяжения. Главный компонент таких волокон - **эластин** - это весьма гидрофобный негликозилированный белок (около 830 аминокислотных остатков в длину), который, подобно коллагену, необычайно богат пролином и глицином, но в отличие от коллагена содержит очень мало гидроксипролина и совсем не содержит гидроксилизина. Молекулы эластина секретируются во внеклеточное пространство, где образуют волокна и слои, в которых эти молекулы связаны множеством сшивок в разветвленную сеть (рис. 14-43). Сшивки образуются между остатками лизина с помощью того же механизма, что и в коллагене (см. рис. 14-38). Функция эластина (в отличие от функции большинства других белков) требует того, чтобы его пептидные цепи оставались развернутыми и сохраняли гибкую случайную конформацию (рис. 14-44). Именно такая структура сети из сшитых между собой, произвольным образом изогнутых эластических волокон позволяет всей сети растягиваться и снова сжиматься, подобно

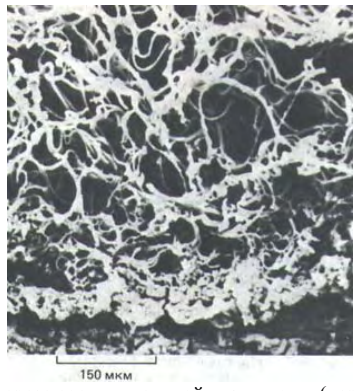


Рис. 14-43. Густая сеть эластических волокон в срезе соединительной ткани кожи (дермы) человека. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Для того чтобы убрать коллаген и гликоз-аминогликаны, ткань подвергали нагреву под давлением. (T. Tsuji, R. M. Lavker, A. M. Kligman. J. Microscop. 115: 165-173, 1978.)



Рис. 14-44. Схема различных случайных конформаций молекулы эластина. В отличие от большинства белков эластин не приобретает какой-то уникальной структуры, а постоянно переходит от одной частично развернутой случайной конформаций к другой, третьей и т.д.

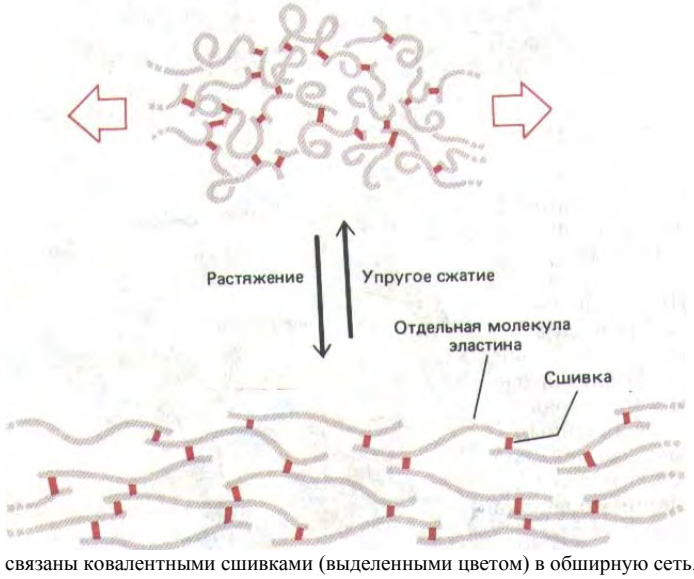


Рис. 14-45. Молекулы эластина связаны ковалентными сшивками (выделенными цветом) в обширную сеть. Поскольку каждая молекула в такой сети способна растягиваться и сжиматься, то и вся сеть растягивается и сжимается, подобно резине.

резиновой ленте (рис. 14-45). Эластиновые волокна могут растягиваться по крайней мере в пять раз больше, чем резиновая лента такого же поперечного сечения. Вплетенные в сеть эластических волокон длинные нерастяжимые коллагеновые фибриллы ограничивают растяжимость всей сети и тем самым предотвращают разрыв ткани.

Эластические волокна состоят не только из эластина. Они содержат также гликопротеин, который в основном распределен в виде микрофибрилл по поверхности волокна. Эластические волокна формируются в тесной связи с плазматической мембраной клетки, секретирующей эластин и микрофибриллярный гликопротеин. Микрофибриллы появ-

ляются раньше самого эластина и, возможно, помогают клетке организовать из выделяемых ею молекул эластина волокна и слои, образующиеся во внеклеточном матриксе.

14-14

14.2.13. Фибронектин внеклеточный гликопротеин, способствующий адгезии между клеткой и матриксом [21]

Внеклеточный матрикс содержит несколько **адгезивных гликопротеинов,** которые связываются и с клетками, и с другими макромолекулами матрикса, способствуя прикреплению клеток к матриксу. Из них лучше всего охарактеризован **фибронектин** - крупный, образующий фибриллы гликопротеин, встречающийся во всем животном царстве. Это димер, состоящий из двух одинаковых субъединиц (каждая почти из 2500 аминокислотных остатков); субъединицы соединены парой дисульфидных связей вблизи от карбоксильных концов и свернуты в серию глобулярных доменов, разделенных участками гибкой полипептидной цепи (рис. 14-46). Как показывает секвенирование, молекула фибронектина состоит в основном из трех коротких много раз повторяющихся последовательностей аминокислот, и это позволяет предполагать, что ген, кодирующий фибронектин, образовался в результате многократной дупликации трех малых генов.

Существуют три формы фибронектина: 1) растворимая димерная форма *(фибронектин плазмы},* которая циркулирует в крови и тканевых жидкостях и, как полагают, способствует свертыванию крови, заживлению ран и фагоцитозу; 2) олигомеры фибронектина, которые могут быть временно прикреплены к поверхности клеток *(поверхностный фибронектин);* 3) труднорастворимая фибриллярная форма фибронектина во внеклеточном матриксе *(матриксный фибронектин).* В поверхностных

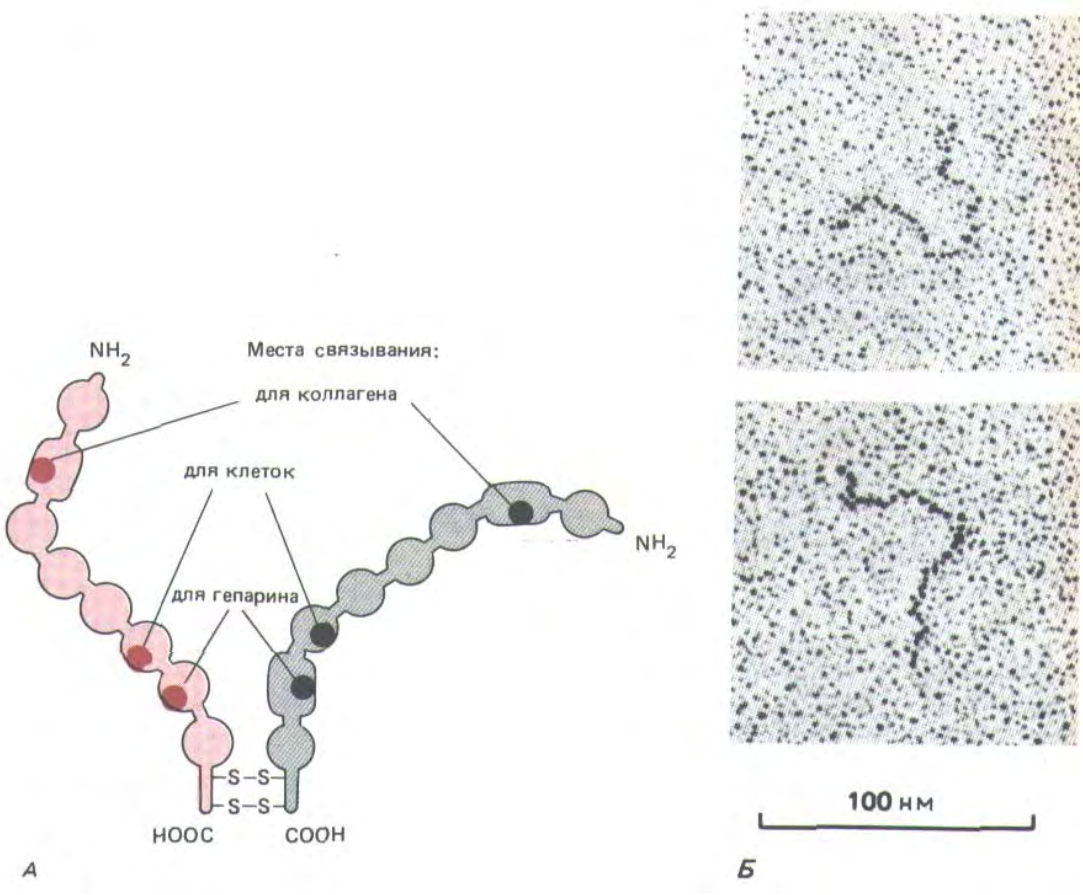


Рис. 14-46. *А.* Схематическое изображение структуры димера фибронектина. *Б.* Электронные микрофотографии отдельных молекул, напыленных платиной. Две полипептидные цепи сходны, но не идентичны; вблизи карбоксильного конца они соединены двумя дисульфидными связями. Каждая цепь свернута в ряд глобулярных доменов, соединенных гибкими полипептидными сегментами. Отдельные домены предназначены для связывания с той или иной молекулой или клеткой (это указано для трех доменов). Для простоты отмечены не все известные участки связывания. [Б-J. Engel et al. J. Mol. BioI. 150: 97-120, 1981. Copyright Academic Press Inc. (London) Ltd.]

и матриксных агрегатах димеры фибронектина связаны друг с другом дополнительными дисульфидными сшивками.

Фибронектин - многофункциональная молекула, в которой различные глобулярные домены играют разную роль. Например, один домен связывается с коллагеном, другой - с гепарином, третий - со специфическими рецепторами на поверхности клеток различных типов и т. д. (см. рис. 14-46). Таким образом фибронектин участвует в организации матрикса и способствует прикреплению к нему клеток.

Роль различных доменов, в особенности доменов, связывающихся с клетками, была изучена путем расщепления молекулы на отдельные домены протеолитическими ферментами или путем синтеза специфических белковых фрагментов химическим методом или с помощью рекомбинантных ДНК. Так, из протеолитических фрагментов был выделен домен, ответственный за связывание с клеткой, и определена его аминокислотная последовательность. Были приготовлены синтетические пептиды, соответствующие различным сегментам этого домена, и удалось выяснить, что за связывающую активность ответственна специфическая трипептидная последовательность (Arg-Gly-Asp, или R-G-D). Пептиды, содержащие эту **RGD-последовательность,** конкурируют за места связывания на клетке и таким образом ингибируют прикрепление клеток к фибронектину; когда же эти пептиды связываются с твердой поверхностью, они обусловливают прикрепление к ней клеток. RGD-последовательность содержится не только в фибронектине - она является общей для многочисленных внеклеточных адгезивных белков и узнается целым семейством гомологичных рецепторов клеточной поверхности, связывающих эти белки (разд. 14.2.17). Хотя в молекулах, узнаваемых этими рецепторами, имеется общая трипептидная последовательность, каждый рецептор специфически узнаёт свою собственную небольшую группу адгезивных молекул; таким образом, связывание с рецептором должно также зависеть и от других участков адгезивной белковой последовательности.

Фибронектин важен не только для клеточной адгезии, но и для миграции клеток. В зародышах беспозвоночных и позвоночных он, по-видимому, во многих случаях направляет миграцию. Например, большие количества фибронектина находятся вдоль пути передвижения клеток проспективной мезодермы при гаструляции у амфибий (разд. 16.1.4). Миграцию этих клеток можно подавить либо путем инъекции в бластоцель антител к фибронектину, либо путем введения полипепти-дов, содержащих трипептид, связывающийся с клетками, но без тех доменов фибронектина, которые связываются с матриксом. Полагают, что фибронектин способствует миграции клеток, помогая их прикреплению к матриксу. Такое действие должно быть тонко сбалансировано так, чтобы сцепление клеток с матриксом происходило, но не приводило к их иммобилизации. Позднее мы вернемся к вопросу о том, как может быть достигнут такой баланс многочисленными адгезивными молекулами, которые участвуют в определении путей морфогенетических движений.

14.2.14. Множественные формы фибронектина синтезируются при альтернативном сплайсинге РНК [22]

Фибронектин, будучи представителем обширного семейства RGD-содержащих адгезивных молекул, и сам по себе, как уже отмечалось, может существовать во многих формах; даже в одном димере полипептидные цепи могут слегка различаться. И тем не менее все различные полипептидные цепи фибронектина кодируются одним большим геном; у крысы его длина составляет более 70 тысяч п. н., и он содержит около 50 экзонов, т. е. это один из самых крупных генов охарактеризованных

до настоящего времени. При транскрипции получается одна длинная молекула РНК, которая подвергается сплайсингу в разных вариантах, при которых в зависимости от типа клеток образуется одна или несколько из примерно 20 различных мРНК. Неясно, чем определяется выбор вариантов сплайсинга РНК и каковы функциональные различия получающихся при этом полипептидных цепей. Судя по некоторым данным, одной из функций альтернативного сплайсинга РНК-транскрипта для фибронектина человека состоит в добавлении к определенным молекулам фибронектина дополнительного связывающегося с клетками домена, отличного от RGD-содержащего участка.

Фибронектин - не единственный секретируемый гликопротеин, участвующий в адгезии между клетками и матриксом. Например, **тенасцин** тоже является внеклеточным адгезивным гликопротеин ом, однако он встречается значительно реже, чем фибронектин, и наиболее обычен в эмбриональных тканях. В нервной системе он секретируется глиальными клетками, и полагают, что некоторые нейроны связываются с ним через посредство специфического протеогликана клеточной поверхности. Тенасцин представляет собой крупный комплекс из шести связанных дисульфидными сшивками полипептидных цепей, расходящихся из центра, подобно спицам колеса (см. рис. 14-51).

Некоторые клетки, особенно эпителиальные, секретируют внеклеточный адгезионный гликопротеин иного типа, называемый *ламинином,* который является одним из основных белков всех базальных мембран. Он связывается как с эпителиальными клетками (а также с клетками некоторых других типов), так и с коллагеном типа IV-главным типом коллагена в базальной мембране.

14.2.15. Базальная мембрана-это специализированная форма внеклеточного матрикса, содержащая в основном коллаген типа IV, протеогликаны и ламинин [23]

Базальная мембрана представляет собой тонкий слой специализированного внеклеточного матрикса, подстилающий пласты эпителиальных клеток; кроме того, она окружает отдельные мышечные волокна, жировые клетки и шванновские клетки (которые, наматываясь на перифери-



Рис. 14-47. Три варианта расположения базальной мембраны (представлена черной линией). Базальная мембрана клетки может окружать (например, мышечные), подстилать слои эпителиальных клеток или располагаться между двумя клеточными слоями (как в почечных клубочках). Обратите внимание, что в почечных клубочках в обоих слоях клеток имеются разрывы, так что барьером проницаемости, определяющим, какие молекулы из крови перейдут в мочу, служит базальная мембрана. Поскольку в клубочках эта мембрана-результат слияния двух базальных мембран, образованных эндотелиальными и эпителиальными клетками, то она вдвое толще большинства таких мембран.

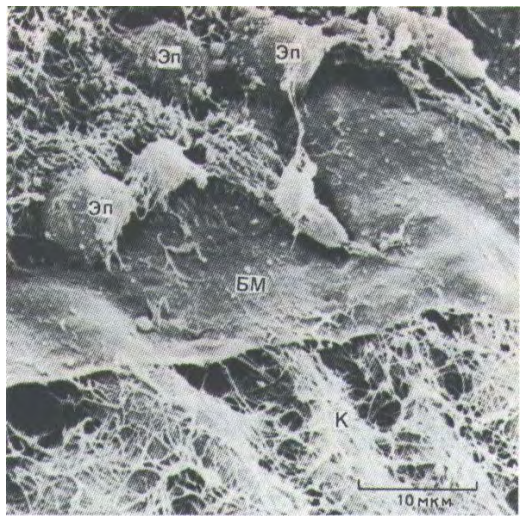


Рис. 14-48. Базальная мембрана роговицы куриного эмбриона. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Часть эпителиальных клеток (Эп) была удалена, чтобы показать верхнюю поверхность базальной мембраны *(БМ).* Обратите внимание, что с нижней поверхностью мембраны взаимодействует густая сеть коллагеновых фибрилл *(К).* Макромолекулы базальной мембраны синтезируются лежащими на ней эпителиальными клетками. (С любезного разрешения Robert Trelstad.)

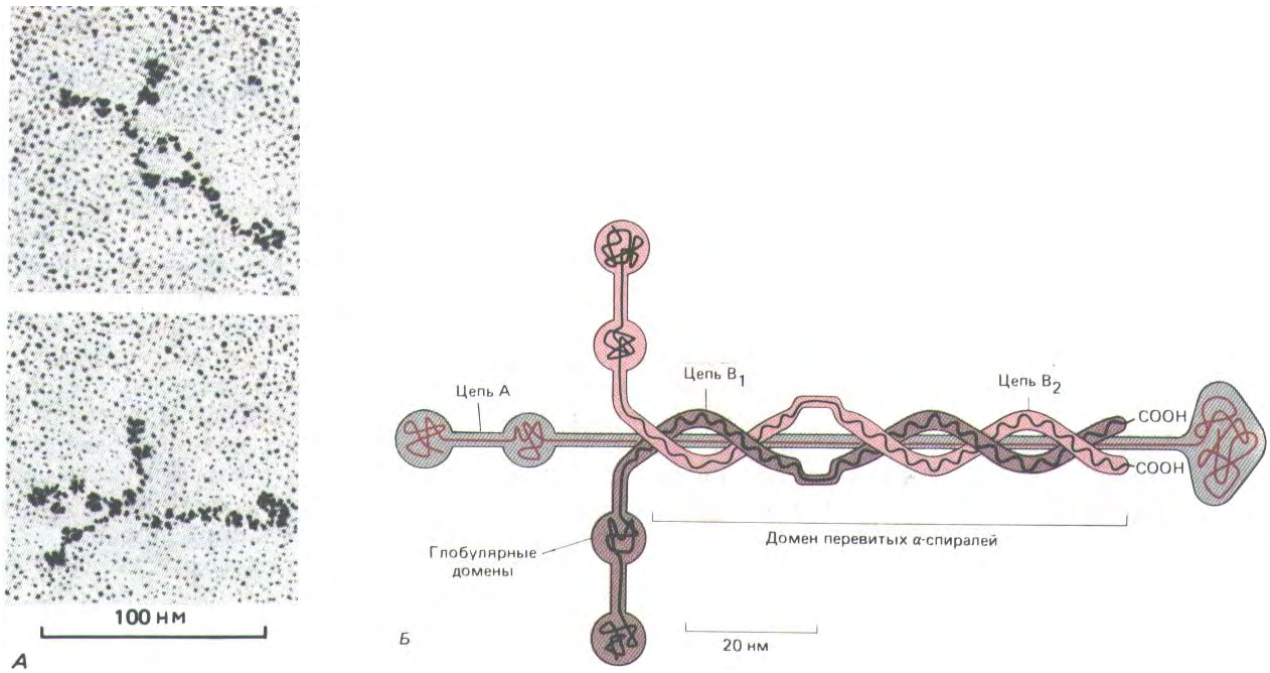


Рис. 14-49. *А.* Электронные микрофотографии молекул ламинина (препарат, напиленный платиной). *Б,* Схема структуры ламинина. Этот мультидоменный гликопротеин состоит из трех полипептидных цепей (A, B, и B_2), соединенных дисульфидными связями в форме асимметричного креста. [A-J. Engel et al. J. Mol. BioL, 150, 97-120, 1981. Copyright Acad. Press Inc. (London) Ltd; *Б-по* B.L. Hogan et al. In: Basement Membranes (S. Shibata, ed.), pp. 147-154. Amsterdam, Elsevier, 1985.]

ческие нервные волокна, образуют миелин). Таким образом, базальная мембрана отделяет эти клетки или клеточные слои от окружающей или подстилающей их соединительной ткани. В других местах, например в почечных клубочках или легочных альвеолах, базальная мембрана расположена между двумя различными слоями клеток и служит здесь высокоэффективным фильтром (рис. 14-47). Однако роль базальных мембран не сводится просто к функциям структурной опоры и фильтра. Они способны определять полярность клеток, влиять на клеточный метаболизм, упорядочивать белки в прилегающих плазматических мембранах, вызывать дифференцировку клеток и, подобно фибронектину, служить специфическими «магистралями» для клеточных миграций.

Базальная мембрана в основном синтезируется лежащими на ней клетками (рис. 14-48). Это, по существу, плотная прослойка из коллагена типа IV (см. рис. 14-42) с дополнительными специфическими молекулами по обе ее стороны, которые способствуют прикреплению ее к соседним клеткам или матриксу. Хотя состав базальных мембран несколько меняется от ткани к ткани и даже от участка к участку (разд. 14.2.17), все эти мембраны содержат коллаген типа **IV** вместе с протеогликанами (в

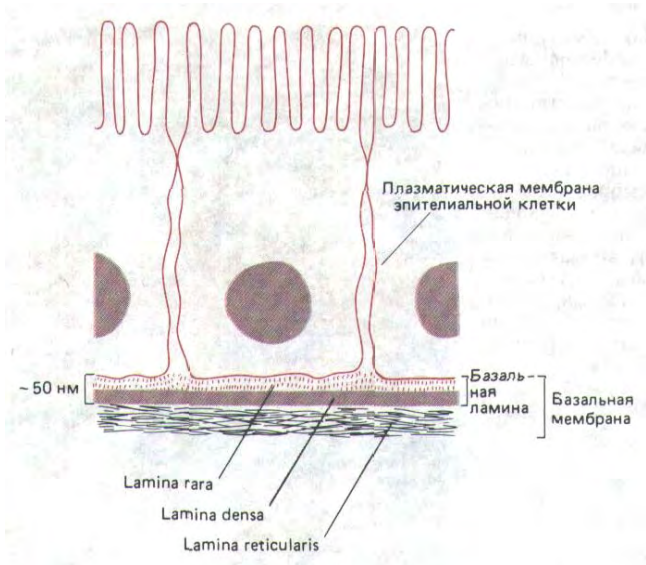


Рис. 14-50. Структура базальной мембраны, подстилающей эпителиальные клетки, как она видна на поперечных срезах в электронном микроскопе.

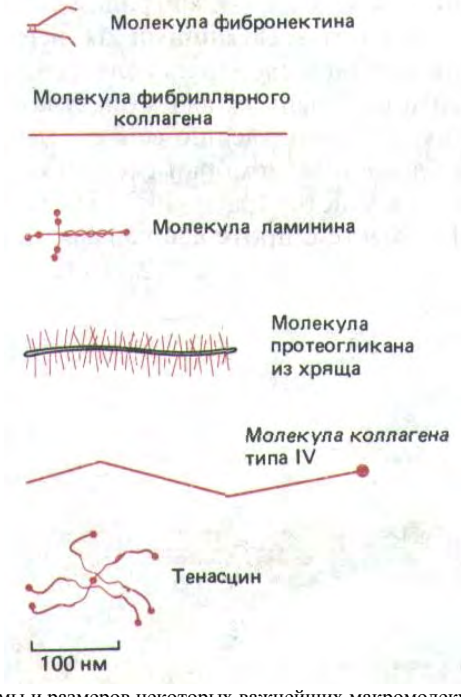


Рис. 14-51. Сравнение формы и размеров некоторых важнейших макромолекул внеклеточного матрикса.

основном гепарансульфатами) и гликопротеинами *лиминином* и *энтактином*. **Ламинин** представляет собой крупный (мол. масса около 850000) комплекс из трех очень длинных полипептидных цепей, расположенных в форме креста и удерживаемых вместе дисульфидными связями (рис. 14-49). Подобно фибронектину, он состоит из нескольких функциональных доменов: один из них связывается с коллагеном типа IV, один - с гепарансульфатом и один или несколько других - с белковыми рецепторами ламинина на клеточной поверхности. Полагают также, что с каждой молекулой ламинина прочно связана одна гантелевидная молекула энтактина в месте соединения коротких ветвей «креста» с длинной ветвью.

Как видно на электронно-микроскопических препаратах после обычной фиксации и контрастирования, большинство базальных мембран состоит из двух слоев: электронопрозрачного слоя (lamina lucida, или гага), прилегающего к плазматической мембране клеток, находящихся на базальной мембране (обычно это эпителиальные клетки), и лежащего под ним электроноплотного слоя (lamina densa). В некоторых случаях имеется еще третий слой, содержащий коллагеновые фибриллы (lamina reticularis) и связывающий базальную мембрану с подлежащей соединительной тканью. Некоторые авторы называют «базальной мембраной» весь комплекс из трех слоев (рис. 14-50), толщина которого обычно достаточна для того, чтобы его можно было видеть в обычный микроскоп. Детальная молекулярная организация базальной мембраны еще не исследована, хотя электронная микроскопия с использованием меченых антител показывает, что lamina densa, по-видимому, состоит в основном из коллагена типа IV с молекулами протеогликана на обеих ее сторонах; как полагают, ламинин присутствует главным образом на той стороне lamina densa, которая обращена к плазматической мембране, где он участвует в прикреплении эпителиальных клеток к базальной мембране, тогда как фибронектин помогает связыванию макромолекул матрикса и клеток соединительной ткани на противоположной стороне.

На рис. 14-51 сравниваются размеры и форма некоторых важнейших макромолекул базальной мембраны.

14.2.16. Вязальные мембраны выполняют многообразные и сложные функции [24]

Функции базальной мембраны чрезвычайно разнообразны. В почечных клубочках необычно толстая базальная мембрана работает как молекулярный фильтр, регулируя переход молекул из крови в мочу (см. рис. 14-47). Для этой функции, по-видимому, необходимы протеогликаны, так как их удаление с помощью специфических ферментов ведет к утрате фильтрующих свойств мембраны. Базальная мембрана может также служить избирательным барьером для клеток. Например, базальная мембрана, подстилающая эпителиальный слой, обычно предотвращает контакт фибробластов подлежащей соединительной ткани с эпителиальными клетками, но не препятствует прохождению через нее макрофагов, лимфоцитов и нервных волокон.

Базальная мембрана играет важную роль в процессе регенерации ткани после повреждения. При нарушении целости мышечной, нервной или эпителиальной ткани сохранившаяся базальная мембрана служит субстратом для миграции регенерирующих клеток. Таким образом легко восстанавливается исходная архитектура ткани. Наиболее яркий пример роли базальной мембраны в регенерации мы находим при изучении *нервно-мышечного соединения,* в котором нервная клетка передает стимул волокну скелетной мышцы.

В месте нервно-мышечного контакта (синапса) базальная мембрана имеет особое химическое строение, распознаваемое, например, антителами, которые связываются с ней исключительно в этом участке. Одна из функций базальной мембраны здесь состоит, по-видимому, в координировании пространственной организации компонентов по обе стороны синапса. Данные в пользу центральной роли базальной мембраны синаптического соединения в восстановлении синапса после повреждения мышцы или нерва будут обсуждаться в гл. 19 (разд. 19.8.3). Такие исследования ясно показывают, что мы еще многого не знаем о химической и функциональной специализации базальной мембраны. Они позволяют также предположить, что минорные (но пока не идентифицированные) компоненты внеклеточного матрикса могут играть решающую роль в управлении процессами морфогенеза в эмбриональном развитии.

14.2.17. Интегрины способствуют связыванию клеток с внеклеточным матриксом [25]

Чтобы понять, как внеклеточный матрикс взаимодействует с клетками, нужно изучить молекулы клеточной поверхности, связывающиеся с компонентами матрикса, а также молекулы самого матрикса. Как уже отмечалось, некоторые протеогликаны являются интегральными компонентами плазматической мембраны; их сердцевинный белок либо пронизывает липидный бислой, либо ковалентне присоединен к нему. Связываясь с большинством компонентов внеклеточного матрикса, эти протеогликаны способствуют прикреплению клеток к матриксу. Однако компоненты матрикса тоже прикрепляются к клеточной поверхности с помощью специфических рецепторных протеогликанов. Ввиду таких сложных взаимодействий между макромолекулами матрикса во внеклеточном пространстве вопрос о том, где кончаются компоненты плазматической мембраны и где начинается внеклеточный матрикс, - в значительной степени семантический. Например, гликокаликс клетки часто состоит из компонентов обеих этих структур (см. разд. 6.3.1).

Рецепторы матрикса отличаются от поверхностных клеточных рецепторов для гормонов и других растворимых сигнальных молекул тем, что

связывают свои лиганды с относительно низким сродством (K_a = 10^6-10^8 л/моль), и тем, что их концентрация на поверхности клеток примерно в 10-100 раз больше. Поэтому такие рецепторы, вероятно, могут функционировать кооперативно, а клетки могут отвечать на организованную группу лигандов в матриксе, а не на отдельные молекулы. В пользу этого предположения говорит то, что растворимые фрагменты матрикса, прикрепляющиеся к клеткам, обычно не вызывают у клетки ответ, вызываемый теми же компонентами, закрепленными в матриксе.

Рецептор фибронектина на фибробластах млекопитающих - один из наиболее изученных рецепторов для компонентов матрикса. Первоначально он был идентифицирован как гликопротеин плазматической мембраны, который связывается в колонке с фибронектином и может быть элюирован с помощью небольшого белка, содержащего прикрепляющуюся к клетке последовательность RGD (разд. 14.2.13). Рецептор представляет собой нековалентно связанный комплекс из двух различных высокомолекулярных полипептидных цепей, называемых α- и β-цепями. Он работает как трансмембранный линкер, осуществляя взаимодействие между актином цитоскелета внутри клетки и фибронектином во внеклеточном матриксе (рис. 14-52). Позднее мы увидим, что такие взаимодействия через плазматическую мембрану могут поляризовать и клетку и матрикс. Было охарактеризовано много других рецепторов для матрикса, в том числе таких, которые связывают коллаген и ламинин, и показано, что они родственны рецептору фибронектина на фибробластах. Называемые **интегринами,** все они являются гетеродимерами с α- и β-цепями, гомологичными цепям рецептора для фибронектина. Вероятно, большинство из них узнаёт последовательности RGD в компонентах матрикса, с которыми они связываются.

Имеется по крайней мере три семейства в огромном суперсемействе интегринов; члены одного семейства имеют одну общую α-цепь, но различаются своими β-цепями. Одно из семейств включает рецептор фибробластов для фибронектина и по меньшей мере еще пять других членов. Другое семейство включает рецептор на кровяных пластинках, связывающий некоторые компоненты матрикса, в том числе фибронектин и *фибриноген* - белок, взаимодействующий с пластинками в процессе свертывания крови: при *болезни Гланцмана* - наследственном дефиците этих рецепторов - у больных плохо свертывается кровь. Третье семейство интегринов составляют рецепторы, находящиеся главным образом на поверхности лейкоцитов; один из них носит название *LFA-1* (lympho-

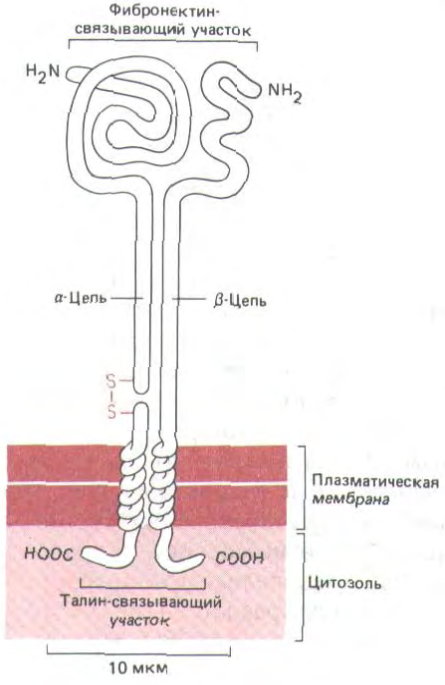


Рис. 14-52. Рецептор фибронектина на клеточной поверхности и его субъединицы. Судя по электронным микрофотографиям изолированных рецепторов, форма молекулы близка к изображенной на рисунке. Глобулярная «головка» выступает над липидным бислоем более чем на 20 нм. Связываясь с фибронектином снаружи и с цитоскелетом внутри клетки (через прикрепительный белок талин), рецептор действует как трансмембранный линкер. Обе цепи, α и β, гликозилированы (на схеме не показано) и удерживаются вместе нековалентными связями. Первоначально α-цепь синтезируется в виде одной полипептидной цепи с мол. весом 140000, которая затем расщепляется на малую трансмембранную цепь и большую внеклеточную цепь, соединенные дисульфидной связью. Внеклеточная часть β-цепи состоит из повторяющихся участков, богатых цистеином, что указывает на большое число межцепочечных дисульфидных связей (не показаны). Рецептор фибронектина принадлежит к обширному суперсемейству гомологичных рецепторов для матрикса, называемых *интегринами,* большинство из которых узнает последовательности RGD связываемых ими внеклеточных белков.

cyte function associated), другой -*Mac-1,* так как он в основном встречается на макрофагах. Эти рецепторы участвуют как в межклеточных взаимодействиях, так и во взаимодействиях клеток с матриксом; они играют решающую роль в способности этих клеток бороться с инфекцией. Люди с наследственным *дефицитом лейкоцитарной адгезии* неспособны синтезировать β-субъединицу; поэтому их лейкоциты лишены целого семейства рецепторов, и больные подвержены повторным бактериальным инфекциям. Ряд гликопротеинов клеточной поверхности, участвующих в позиционно-специфической клеточной адгезии у личинок *Drosophila,* тоже принадлежат к суперсемейству интегринов, однако их отношение к трем семействам, свойственным млекопитающим, неизвестно.

Однако не все рецепторы для матрикса принадлежат к этому суперсемейству. Например, некоторые клетки, по-видимому, используют для прикрепления к коллагену неродственный трансмембранный гликопротеин, а у многих клеток, как уже упоминалось, имеются интегральные мембранные протеогликаны, прикрепляющие клетки к внеклеточному матриксу.

14.2.18. Цитоскелет и внеклеточный матрикс взаимодействуют через плазматическую мембрану [26]

Макромолекулы внеклеточного матрикса оказывают поразительное воздействие на поведение клеток в культуре, влияя не только на их движение, но и на форму, полярность, метаболизм и дифференцировку. Например, клетки эпителия роговицы при росте на искусственных поверхностях производят очень мало коллагена; если же культивировать их на ламинине, коллагене или фибронектине, то они накапливают и секретируют коллаген в больших количествах. Другие примеры влияния внеклеточного матрикса на метаболизм и дифференцировку клеток будут обсуждаться в гл. 17 (разд. 17.7.1).

Матрикс может также влиять на организацию цитоскелета клетки. Обычно базальные поверхности эпителиальных клеток, растущих на пластике или стекле, имеют неправильную форму, а прилегающий к ним изнутри цитоскелет дезорганизован. Но когда те же клетки растут на подложке из подходящих макромолекул внеклеточного матрикса, базальные поверхности становятся гладкими, а цитоскелет над ними - таким же упорядоченным, как в интактной ткани. Сходные результаты были получены на культурах фибробластов, подвергшихся опухолевой трансформации. Трансформированные клетки часто вырабатывают меньше фибронектина, чем нормальные культивируемые клетки, и отличаются от них поведением: например, они слабо прикрепляются к субстрату и неспособны распластываться на нем или формировать организованные внутриклеточные пучки актиновых филаментов, известных под названием *стрессовых волокон* (разд. 11.1.17). У некоторых из таких клеток недостаток фибронектина по крайней мере частично ответствен за их аномальное поведение: если клетки растут на матриксе из организованных волокон фибронектина, то они распластываются и формируют внутриклеточные стрессовые волокна, лежащие параллельно волокнам внеклеточного фибронектина.

Взаимодействие между внеклеточным матриксом и цитоскелетом бывает двусторонним: внутриклеточные актиновые филаменты могут влиять на расположение секретируемых молекул фибронектина. Например, в культуре поблизости от фибробластов волокна внеклеточного фибронектина выстраиваются по направлению смежных внутриклеточных стрессовых волокон (рис. 14-53). Если такие клетки обработать цитохалазином, который разрушает внутриклеточные актиновые фила-

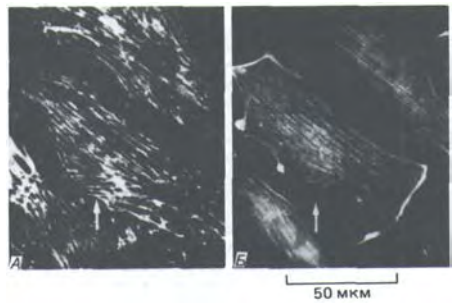


Рис. 14-53. Иммунофлуоресцентные микрофотографии внеклеточных волокон фибронектина *(А)* и внутриклеточных пучков актиновых филаментов *(Б)* в трех культивируемых фибробластах крысы. Для выявления фибронектина использованы антитела к фибронектину с присоединенным родамином, а для выявления актина-антитела к актину с присоединенным флуоресцеином. Обратите внимание, что направление волокон фибронектина совпадает с направлением пучков актиновых нитей. (R. O. Hynes, A. T. Destree. Cell 15: 875-886, 1978. Copyright Cell Press.)

менты, то волокна фибронектина отделяются от клеточной поверхности (точно так же, как во время митоза, когда клетка округляется). Ясно, что должна существовать связь между внеклеточным фибронектином и внутриклеточными актиновыми филаментами через плазматическую мембрану фибробласта. Такую связь осуществляют рецепторы фибронектина, о которых уже говорилось, что эти трансмембранные белки соединяют фибронектин с актиновыми филаментами через такие внутриклеточные прикрепительные белки, как талин (см. разд. 11.2,8. и рис. 14-52). Участок рецептора, связывающий талин, содержит остаток тирозина, фосфорилирование которого тирозин-специфической протеинкиназой, по-видимому, инактивирует этот участок и таким образом разрушает связь между фибронектином и кортикальными актиновыми филаментами. Как полагают, прикрепление клеток к матриксу может регулироваться таким путем специфическими факторами роста, активирующими тирозин-специфические киназы (см. рис. 13-37).

Поскольку цитоскелет клеток способен упорядочивать секретируемые ими макромолекулы матрикса, а те в свою очередь организуют цитоскелет контактирующих с ними клеток, внеклеточный матрикс может в принципе распространять упорядочивание от клетки к клетке (рис. 14-54). Таким образом, можно полагать, что внеклеточный матрикс играет центральную роль в создании и поддержании ориентации клеток в тканях и органах в процессе развития; например, параллельное расположение фибробластов и коллагеновых волокон в сухожилии мог бы частично отражать именно такие взаимодействия между клетками и матриксом. Трансмембранные рецепторы для матрикса служат в этом процессе упорядочивания «посредниками».

Заключение

Клетки в соединительных тканях погружены в сложный внеклеточный матрикс, который не только скрепляет клетки и ткани, но и влияет на развитие, полярность и поведение контактирующих с ним клеток. Матрикс содержит различные волокнообразующие белки, вплетенные в гидратированный гель, состоящий из сети цепочек гликозаминогликанов. Гли-



Рис. 14-54. Гипотетическая схема передачи упорядоченности от клетки к клетке через внеклеточный матрикс. Для простоты на рисунке показано, как одна клетка влияет на ориентацию соседних клеток, но та же схема позволяет объяснить и взаимное влияние клеток друг на друга.

козамшогликаны представляют собой разнородную группу длинных, отрицательно заряженных полисахаридных цепей, которые (за исключением гиалуроновой кислоты) ковалентна связаны с белками, образуя молекулы протеогликанов.

Существуют волокнообразующие белки двух функциональных типов: преимущественно структурные (коллаген и эластин) и главным образом адгезивные (такие, как фибронектин и ламинин). Фибриллярные коллагены (типы I, II и III) представляют собой канатовидные трехспиральные молекулы, которые во внеклеточном пространстве агрегируют в длинные фибриллы, а те в свою очередь могут организовываться в разнообразные высокоупорядоченные структуры. Молекулы коллагена типа IV организуются в пластоподобные сети, составляющие основу всех базальных мембран. Молекулы эластина благодаря многочисленным поперечным сшивкам образуют сеть волокон и слоев, которые могут растягиваться и вновь сокращаться, придавая матриксу упругость. Фибронектин и ламинин служат примерами крупных адгезивных гликопротеинов матрикса; фибронектин очень широко распространен в соединительных тканях, а ламинин содержится главным образом в базальной мембране. Благодаря своим множественным прикрепительным доменам такие белки способствуют клеточной адгезии и участвуют в организующем влиянии внеклеточного матрикса на клетки. Многие из этих адгезивных гликопротеинов содержат общую трипептидную последовательность (RGD), которая составляет часть структуры, узнаваемой интегринами - членами суперсемейства гомологичных трансмембранных рецепторов для компонентов матрикса.

Все белки и полисахариды матрикса локально секретируются клетками, соприкасающимися с матриксом; в тесном взаимодействии с наружной поверхностью плазматической мембраны эти молекулы могут упорядочиваться. Поскольку структура и ориентация матрикса в свою очередь влияет на ориентацию контактирующих с ним клеток, весьма вероятно, что упорядоченность будет распространяться по матриксу от клетки к клетке.

14.3. Межклеточное узнавание и адгезия [27]

До сих пор мы рассматривали, как межклеточные соединения и внеклеточный матрикс удерживают клетки вместе в зрелых тканях и органах. Но каким образом клетки объединяются друг с другом на начальных стадиях формирования тканей? Существуют по меньшей мере два принципиально различных способа. Чаще всего ткань образуется из «клеток-основательниц», потомки которых остаются вместе просто потому, что они прикреплены к макромолекулам внеклеточного матрикса и/или к другим клеткам (рис. 14-55). Конкретные особенности таких соединений и определяют структуру клеточного ансамбля. Эпителиальные клеточные пласты обычно возникают именно таким путем, и процессы эмбрионального развития животных в значительной части сводятся к формированию, изгибанию и дифференцировке таких клеточных пластов, что приводит к созданию тканей и органов взрослого организма. Как правило, все клетки раннего зародыша организованы в эпителии, и только позже некоторые клетки изменяют свои адгезивные свойства, выходят из пластов и формируют ткани других типов (разд. 16.1.4-16.1.II).

Другая стратегия формирования ткани представляется более сложной и включает миграцию клеток: одна клеточная популяция проникает в другую и объединяется с ней (а иногда и с другими мигрирующими клетками), формируя ткань смешанного происхождения. Например, в зародышах позвоночных клетки *нервного гребня* выселяются из эпи-



Рис. 14-55. Простейший механизм образования ткани из клеток. Потомки клеток-основательниц удерживаются в эпителиальном слое с помощью базальной мембраны и механизмов межклеточной адгезии (включая специализированные межклеточные соединения).



Рис. 14-56. Пример более сложного механизма построения ткани из клеток. Клетки нервного гребня мигрируют из эпителия на верхней поверхности нервной трубки и направляются во многие другие участки зародыша, где образуют различные группы клеток и ткани. Здесь показано, как эти клетки объединяются и дифференцируются в два скопления нейронов периферической нервной системы. Такие скопления называют *ганглиями.* Другие клетки нервного гребня в ганглии дифференцируются в опорные (сателлитные) клетки, окружающие нейроны.



Рис. 14-57, Световая микрофотография ползущего плазмодия миксомицета *Dictyostelium discoideum.* (С любезного разрешения David Francis.)

телиальной (нервной) трубки, в состав которой они первоначально входили, и по определенным путям мигрируют во многие другие участки. Там они группируются и дифференцируются в различные ткани, в том числе и элементы периферической нервной системы (рис. 14-56). Для такого процесса нужен какой-то механизм, направляющий клетки к месту их назначения, например секреция растворимого химического агента, привлекающего мигрирующие клетки (путем *хемотаксиса),* или отложение во внеклеточном матриксе адгезивных молекул типа фибронектина (разд. 14.2.13), направляющих миграцию клеток по определенным путям (путем *контактной ориентировки).*

Достигнув места назначения, мигрирующая клетка должна узнавать другие клетки соответствующего типа, чтобы формировать вместе с ними ткань. Даже в тканях, образующихся без миграции, составляющие их клетки, по-видимому, специфически узнают друг друга: если такую развивающуюся ткань диссоциировать на отдельные клетки, то они предпочтительно вновь ассоциируют друг с другом, а не с клетками другой ткани (разд. 14.3,4). По-видимому, такое специфическое межклеточное узнавание способствует тому, что клетки развивающейся ткани остаются в контакте друг с другом и отделены от клеток соседних тканей.

В попытках понять, как узнают друг друга клетки в развивающихся животных тканях, были проведены остроумные эксперименты на некоторых простых микроорганизмах, способных переходить от одноклеточного существования к многоклеточному и обратно. Независимо от их значения как возможных моделей межклеточного взаимодействия у животных эти организмы интересны и сами по себе.

14.3.1. Миксамебы слизевика при голодании агрегируют с образованием многоклеточных плодовых тел [28]

Слизевик (миксомицет) *Dictyostelium discoideum* представляет собой эукариотический организм, геном которого только в 10 раз больше, чем у бактерии, и в 100 раз меньше, чем у человека. Эти организмы живут в лесной подстилке в виде отдельных подвижных клеток, называемых *миксамебами,* питающихся бактериями и дрожжами и при оптимальных условиях делящихся раз в несколько часов (в лабораторных условиях их можно выращивать в жидкой синтетической среде). Когда запасы пищи истощаются, миксамебы перестают делиться и собираются вместе, образуя крошечные (1-2 мм) многоклеточные червеобразные существа (плазмодии), ползающие наподобие слизней и оставляющие за собой след из слизи (рис. 14-57).

Каждый плазмодий формируется путем агрегации до 100000 клеток и проявляет черты поведения, не свойственные свободноживущим миксамебам. Например, плазмодий чрезвычайно чувствителен к свету и теплу и может мигрировать по направлению к такому слабому источнику света, как флуоресцирующий циферблат часов; по-видимому, такое поведение помогает ему двигаться в направлении более благоприятных условий. По мере движения клетки приступают к дифференцировке,

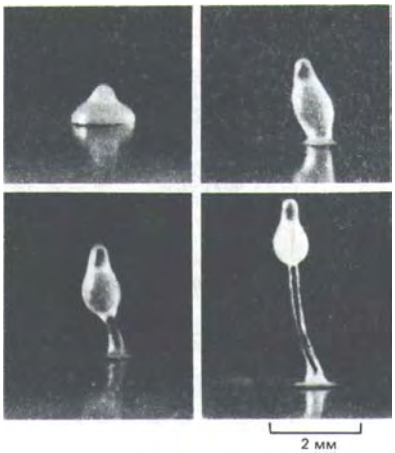


Рис. 14-58. Разные стадии образования плодового тела *Dictyostelium discoideum.* (Световые микрофотографии; с любезного разрешения John Bonner.)

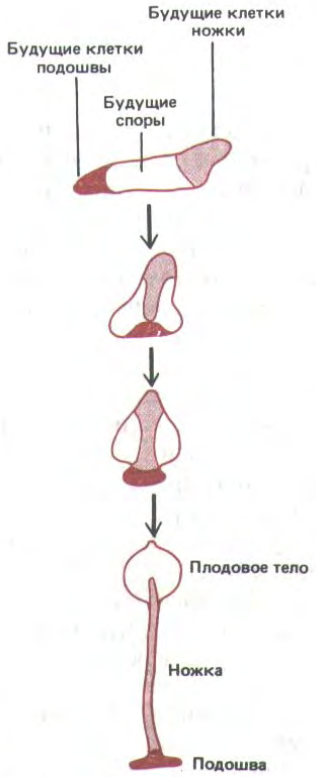


Рис. 14-59. Миграции клеток при формировании плодового тела у *Dictyostelium discoideum.* Клетки передней части слизевика перемещаются вниз и образуют ножку, а клетки средней части мигрируют вверх и дифференцируются в споры, образующие плодовое тело.

результатом которой примерно через 30 ч после начала агрегации будет образование миниатюрной, напоминающей растение структуры, состоящей из ножки и плодового тела (рис. 14-58). В плодовом теле содержится множество *спор,* которые могут долгое время выживать даже в крайне неблагоприятных условиях. На рис. 14-59 схематически показаны сложные миграции клеток, происходящие при формировании ножки и плодового тела. Клетки на переднем конце плазмодия становятся участком ножки, следующие за ними дифференцируются в споры, а замыкающие-в подошву. И клетки ножки, и споры покрываются внеклеточным матриксом (в виде целлюлозных стенок), и в конце концов все клетки, за исключением спор, погибают. Только при наступлении благоприятных условий споры прорастают в свободноживущих миксамеб, возобновляющих цикл (рис. 14-60).

14.3.2. Амебы слизевика агрегируют в результате хемотаксиса [29]

При формировании плазмодия отдельные клетки слизевика агрегируют в результате *хемотаксиса,* который нам придется рассмотреть, прежде чем обсуждать роль межклеточной адгезии. Одна из реакций на голодание у миксамеб состоит в том, что они начинают вырабатывать и выделять cAMP, который служит хемотаксическим сигналом, привлекающим других миксамеб. (Как мы знаем из гл. 12, в прокариотических и животных клетках cAMP служит внутриклеточным сигналом; *Dictyostelium-единственный* организм, у которого он действует еще и как внеклеточная сигнальная молекула.) По-видимому, агрегация инициируется случайным образом: любые клетки, начинающие первыми секретировать циклический AMP, привлекают другие клетки и таким образом становятся *центрами агрегации.* Циклический AMP, вырабатываемый такими «клетками-инициаторами», секретируется отдельными «импульсами» и связывается специфическими рецепторами на поверхности соседних голодающих амеб, направляя тем самым их движение

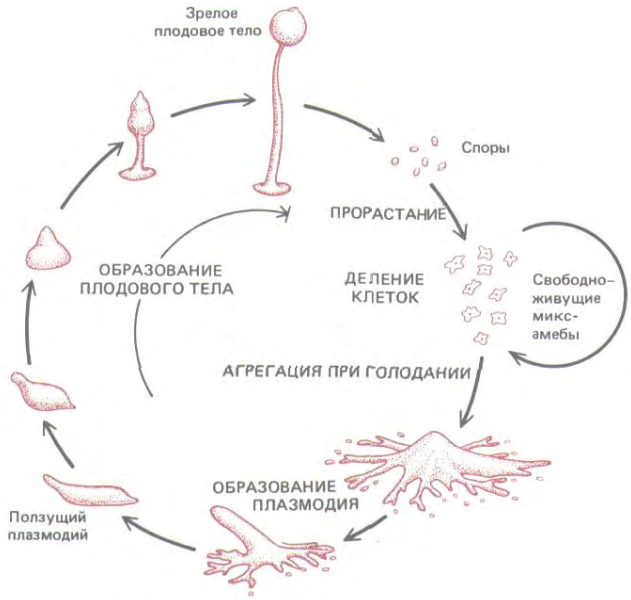


Рис. 14-60. Жизненный цикл *Dictyostelium discoideum.* При голодании свободноживущие миксамебы агрегируют с образованием подвижного плазмодия, который затем образует плодовое тело. При благоприятных условиях высвобождающиеся из плодового тела споры прорастают и вновь превращаются в амеб.

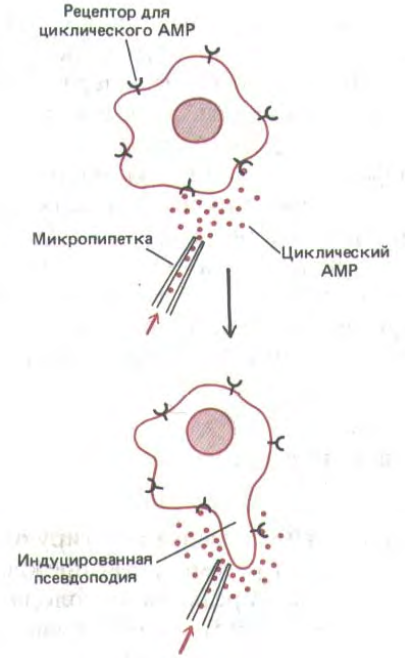


Рис. 14-61. Нанесение небольшого количества циклического AMP на любую точку поверхности голодающей клетки (амебы) *Dictyostelium* тотчас же вызывает образование псевдоподии в этой точке. Такой механизм позволяет амебе двигаться по направлению к источнику cAMP. Чтобы воздействовать на клетку, циклический AMP должен связаться со специфическими рецепторами на ее поверхности.

в сторону источника циклического AMP. Такой хемотаксический ответ можно продемонстрировать, нанеся из микропипетки ничтожное количество cAMP на любой участок поверхности клетки голодающей миксамебы. Ответом будет немедленное образование псевдоподии, растущей в сторону пипетки (рис. 14-61); псевдоподия прикрепляется к поверхности, на которой находится клетка, и тянет клетку в том же направлении. Как только образуется центр агрегации, зона его влияния быстро расширяется, так как агрегирующие клетки не только отвечают на сигнал циклического AMP, но и передают его от клетки к клетке. Каждый импульс циклического AMP побуждает соседние клетки не только к движению к источнику импульса, но и к испусканию собственного импульса в виде циклического AMP. Этот новый, высвобождающийся с небольшой задержкой импульс в свою очередь ориентирует находящиеся рядом клетки, вызывая у них тоже выброс cAMP, и т.д. Таким образом возникают регулярные чередующиеся волны циклического AMP, распространяющиеся из каждого центра агрегации, заставляя более удаленных миксамеб двигаться внутрь концентрическими или спиральными волнами, которые можно видеть на кадрах цейтраферных фильмов (рис. 14-62). Преимущество такой системы передачи состоит в том, что по мере распространения из центра сигнал постоянно возобновляется, не ослабляясь на большом расстоянии. В отличие от этого сигнал, распространяющийся только путем диффузии, постепенно ослабевает по мере распространения. Это различие можно ясно увидеть, сравнивая процесс агрегации у *Dictyostelium discoideum* и у *D. minutum*-формы, у которой релейная система передачи отсутствует. У *D. munutum* уровень сигнала, исходящего из каждого центра агрегации, сильно ослабевает, и в результате формируются очень мелкие плазмодии и плодовые тела.

14.3.3. Межклеточная адгезия у слизевиков зависит от специфических гликопротеинов клеточной поверхности [30]

Помимо активации сигнальной системы циклического AMP голодание миксамеб *Dictyostelium* вызывает экспрессию сотен новых генов, и некоторые из них кодируют молекулы межклеточной адгезии, участвующие в агрегации клеток. Полагают, например, что один из связывающих углеводы белков (т.е. лектинов, см. разд. 6.3.1)-**дискоидин-1**-выделяет-ся голодающими клетками для обеспечения примитивных форм контактной ориентировки. Связываясь с поверхностью миксамебы и с субстратом, по которому она мигрирует, он мог бы способствовать образованию потоков миксамеб, движущихся к центрам агрегации, во многом подобно тому, как фибронектин направляет миграцию клеток во время гаструляции. В самом деле, связывание клетки с дискоидином-1 зависит от того же трипептида RGD, который содержится в фибронектине и многих других адгезивных белках (разд. 14.2.13).

Различные вновь синтезируемые белки способствуют процессу межклеточной адгезии, позволяя мигрирующим миксамебам плотно слипаться друг с другом и формировать многоклеточный организм. В первые 8 ч голодания клетки слипаются с помощью Ca^{2+}-зависимого механизма с участием адгезивной молекулы, называемой **контактным сайтом В.** Через 8 ч вступает в действие другая адгезионная система, где слипание клеток осуществляется Ca^{2+}-независимым механизмом с участием молекулы межклеточной адгезии, называемой **контактным сайтом А.** Контактные сайты А и В были выделены и идентифицированы как интегральные гликопротеины плазматической мембраны с помощью остроумного иммунологического метода, представленного на рис. 14-63. Позднее этот метод был использован для идентификации молекул межклеточной адгезии также и у позвоночных.

Каким образом гликопротеины клеточной поверхности, такие как контактные сайты А и В, связывают клетки друг с другом? На рис. 14-64 представлены три возможных механизма: 1) молекулы одной клетки могут связываться с такими же молекулами соседних клеток (так называемое *гомофильное* связывание); 2) молекулы одной клетки могут связываться с иного рода молекулами соседних клеток *(гетерофильное* связывание); и 3) рецепторы клеточной поверхности соседних клеток могут связываться друг с другом, секретируя мультивалентные линкерные молекулы. Как выяснилось, у животных действуют все эти три механизма.

Полагают, что контактный сайт А обеспечивает слипание клеток путем гомофильного механизма, так как после присоединения белка к синтетическим агрегатам эти агрегаты связываются только с клетками, вырабатывающими контактный сайт А, и это связывание блокируется, если клетки предварительно обработаны антителами к контактному сайту А. Секвенирование ДНК показывает, что контактный сайт А - это лишь один раз пронизывающий мембрану белок, по-видимому, не родственный ни одному из до сих пор известных белков межклеточной адгезии (см. ниже).

14.3.4. Диссоциированные клетки позвоночных могут вновь ассоциироваться в организованную ткань благодаря селективной межклеточной адгезии

Привлекательность использования таких микроорганизмов, как *Dictyo-stelium,* при изучении агрегации клеток состоит в том, что этот процесс нормально протекает в культуральной чашке, где он доступен для

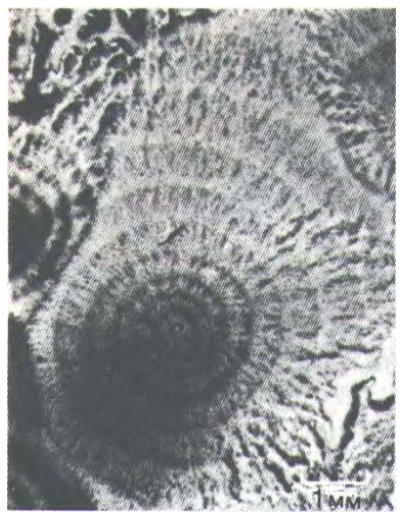


Рис. 14-62. «Волны» голодающих амеб *Dictyostelium,* движущихся к центру агрегации. При таком малом увеличении отдельные амебы не видны. (Световая микрофотография; с любезного разрешения Günter Gerisch.)

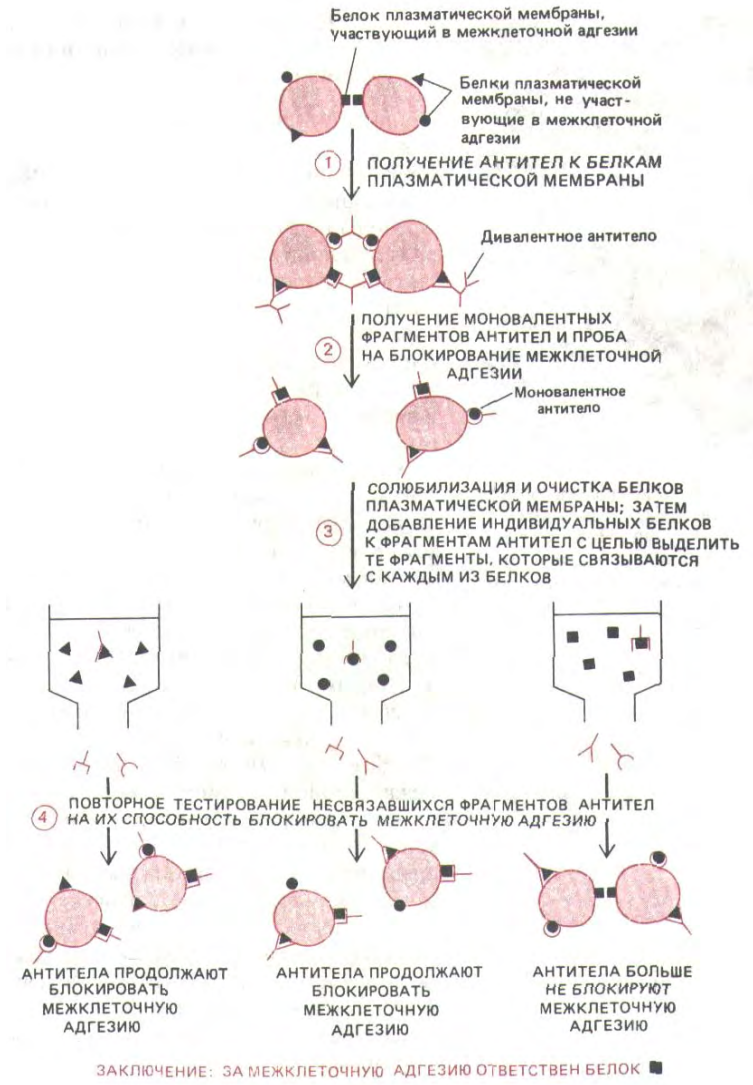


Рис. 14-63. Иммунологический метод идентификации белков плазматической мембраны, участвующих в межклеточной адгезии. На этапе 1 получают антитела (обычно кроличьи) к исследуемым клеткам или к их изолированным плазматическим мембранам. На этапе 2 выделяют и тестируют моновалентные фрагменты, чтобы получить препарат антитела, блокирующий межклеточную адгезию. (Используются моновалентные фрагменты, полученные с помощью протеаз - см. разд. 18.2.4), так как они не сшивают клетки и, таким образом, не вызывают «ложной» адгезии. Для выявления молекул клеточной поверхности, участвующих в межклеточной адгезии, белки плазматической мембраны солюбилизируют, отделяют друг от друга и каждую фракцию испытывают на способность нейтрализовать действие фрагментов антител, блокирующее агрегацию клеток (этапы 3 и 4). Затем фракции, проявившие такую способность, очищают и вновь тестируют до тех пор, пока не будет получен чистый белок (этот процесс на схеме не показан). Другой Иммунологический подход состоит в получении большого числа моноклональных антител (разд. 4.5.4) к антигенам клеточной поверхности и их скрининге для выявления тех, которые будут блокировать межклеточную адгезию. Оба иммунологических метода основаны на важном общем наблюдении: простое нанесение на клеточную поверхность антител само по себе не препятствует нормальной клеточной адгезии; адгезия блокируется только тогда, когда мишенями для связывания антител служат специфические молекулы клеточной поверхности, участвующие в адгезии.

исследования. К сожалению, такая возможность изучать процессы клеточного узнавания в ходе развития многоклеточных животных представляется редко. Обычно мы можем в лучшем случае диссоциировать клетки формирующейся ткани, а затем испытывать их способность вновь объединяться in vitro. В отличие от тканей взрослого организма, которые трудно разделить на отдельные клетки, эмбриональные ткани позвоночных легко диссоциируют при воздействии малых концентраций протеолитического фермента трипсина, иногда в сочетании с удалением внеклеточного кальция с помощью подходящего хелатора (например, ЭДТА). Эти воздействия нарушают межбелковые взаимодействия (многие из которых зависят от Ca^{2+}, см. разд. 14.3.7), удерживающие клетки вместе. Поразительно то, что такие диссоциированные клетки часто вновь объединяются in vitro в структуры, напоминающие исходную ткань. Таким образом, структура ткани не является только результатом процесса развития, а активно поддерживается и стабилизируется системой взаимного сродства клеток друг к другу и к внеклеточному

матриксу. Поэтому можно надеяться, что изучение реагрегации диссоциированных клеток в культуре поможет выяснить роль адгезии между клетками и между клетками и матриксом в создании и поддержании организации тканей.

В этом смысле поучительны эксперименты на культивируемых клетках *эпидермиса* (эпителия кожи). В этой ткани решающую роль в удерживании вместе клеток, называемых *кератиноцитами,* в многослойном пласте на базальной мембране играют Ca^{2+}-зависимые адгезионные системы. Кератиноциты в базальном слое кожи - относительно недифференцированные клетки, они быстро пролиферируют и поставляют новые клетки в верхние слои, где клеточные деления прекращаются и происходит окончательная дифференцировка (разд. 17.4.2). Помещенные на подходящий субстрат в культуре, диссоциированные кератиноциты будут точно так же делиться и дифференцироваться. Однако если в культуре поддерживать концентрацию Ca^{2+} ниже нормы, то Ca^{2+}-за-висимые адгезионные системы не смогут действовать и кератиноциты будут *расти в виде* монослоя, где перемещаны *как делящиеся,* так и дифференцирующиеся клетки. Если затем повысить концентрацию Ca^{2+}, то пространственная организация клеток вскоре изменится; монослой преобразуется в многослойный эпителий, где пролиферирующие клетки образуют базальный слой, прилегающий к субстрату, а дифференцирующиеся клетки выделяются в верхние слои, так же как и в нормальной коже. Это позволяет предполагать, что послойное расположение кератиноцитов в зависимости от состояния их дифференцировки поддерживается Ca^{2+}-зависимыми механизмами межклеточной адгезии (см. рис. I4-68).

14.3.5. Реагрегация диссоциированных клеток позвоночных зависит от тканеспецифических систем узнавания [32]

При нормальном развитии большинства тканей не встречается сортировка случайно перемешанных клеток разных типов (разд. 16.4). Тем не менее, если диссоциированные эмбриональные клетки из двух разных тканей позвоночного, например из печени и сетчатки, перемешать, то эти агрегаты из перемешанных клеток будут постепенно рассортировываться в соответствии с тканевой принадлежностью клеток. Такой тест, по-видимому, выявляет тканеспецифические системы межклеточного узнавания, которые удерживают вместе клетки в развивающейся ткани. Подобные системы узнавания можно продемонстрировать и другим способом. Как показано на рис. 14-65, диссоциированные клетки легче слипаются с агрегатами своей собственной ткани, чем с агрегатами других тканей. Таким образом, два разных теста - определение степени сродства клеток в опытах с длительной инкубацией (рассортировка клеток) и оценка тенденции клеток присоединяться к уже имеющимся агрегатам - дают сходный результат.

Какова молекулярная основа такой избирательной межклеточной адгезии у позвоночных? По-видимому, здесь, как и у слизевиков, ответственны два разных механизма межклеточной адгезии, один из которых Ca^{2+}-независимый, а другой - Ca^{2+}-зависимый, и в каждом из них участвует особое семейство гомологичных гликопротеинов клеточной поверхности.



Рис. 14-64. Три возможных способа взаимодействия между молекулами клеточной поверхности в процессе межклеточной адгезии.

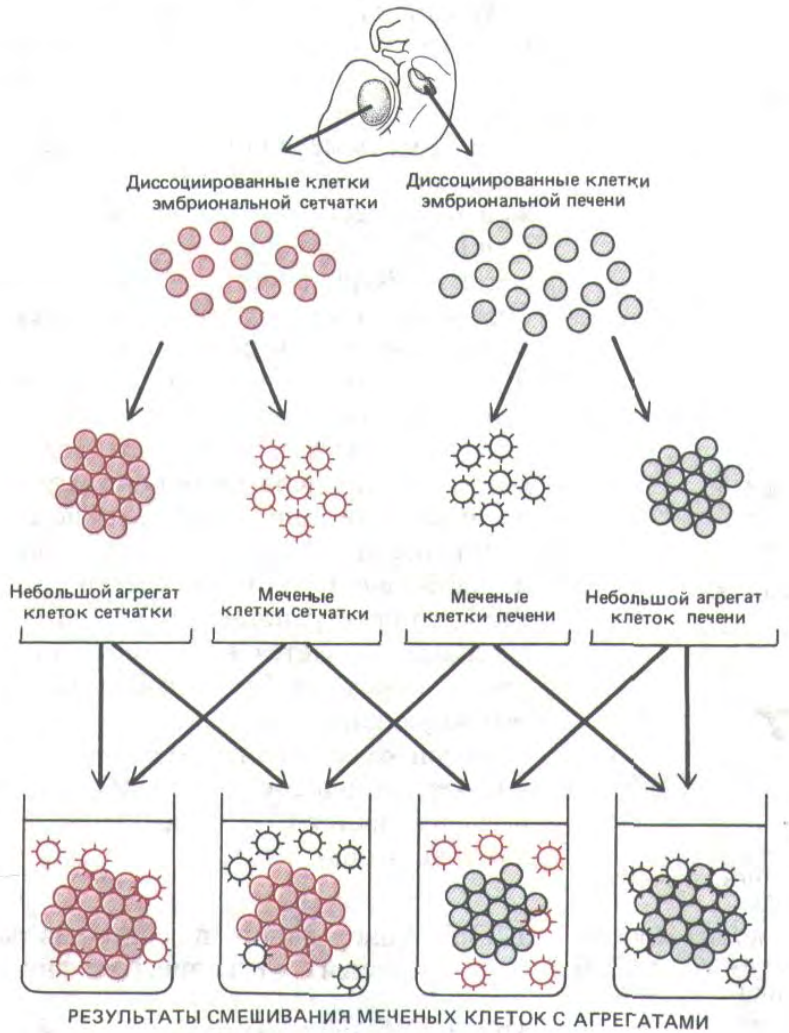


Рис. 14-65. Тканеспецифическая адгезивность диссоциированных эмбриональных клеток позвоночных по данным теста со связыванием радиоактивных клеток. Адгезивность можно оценить, определив число меченых клеток, связавшихся с клеточными агрегатами за тот или иной промежуток времени. Склонность к адгезии выше между клетками одного типа. В часто используемой модификации этого теста клетки метят флуоресцентным или радиоактивным маркером и исследуют их связывание с монослоем немеченых клеток в культуре.

14.3.6. У позвоночных в Ca^{2+}-независимой межклеточной адгезии участвуют гликопротеины плазматической мембраны из суперсемейства иммуноглобулиноов; таковы, например, молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM)

Для идентификации некоторых гликопротеинов клеточной поверхности, участвующих в межклеточной адгезии у позвоночных, был использован иммунологический метод, представленный на рис. 14-63. В одном из наиболее изученных примеров были получены фрагменты моновалентного антитела к клеткам сетчатки куриного эмбриона. Затем были отобраны антитела, ингибирующие реагрегацию этих клеток in vitro. Мембранные белки клеток сетчатки были затем фракционированы и испытаны на способность нейтрализовать блокирующую активность антител. Таким путем был идентифицирован крупный (около 1000 аминокислотных остатков) трансмембранный гликопротеин, названный **молекулой адгезии нервных клеток** (N-CAM). N-CAM экспрессируется на поверхности нервных и глиальных клеток (разд. 19.1.6), «склеивая» их при участии Ca^{2+}-независимого механизма. Если такие мембранные белки очистить и ввести в синтетические фосфолипидные пузырьки, то эти пузырьки будут склеиваться друг с другом, а также с клетками, имеющими N-CAM на своей поверхности; однако склеивание блокируется, если клетки предварительно обработать моновалентными антителами к N-CAM. Это указывает на то, что N-CAM связывает клетки друг с другом с помощью гомофильного взаимодействия, непосредственно соединяющего две молекулы N-CAM(СМ. рис. 14-64).

Антитела к N-CAM нарушают нормальный ход развития сетчатки в тканевой культуре, а при введении в развивающийся глаз цыпленка препятствуют нормальному росту аксонов нервных клеток сетчатки. Как мы увидим позже (разд. 19.7.8), это позволяет предполагать, что N-CAM играет важную роль в развитии центральной нервной системы, способствуя межклеточной адгезии. Кроме того, клетки нервного гребня, формирующие периферическую нервную систему, находясь в составе нервной трубки, имеют большое количество N-CAM на своей поверхности и теряют его при миграции. Но когда они агрегируют, образуя ганглии, N-CAM появляется вновь (см. рис. 14-56), что указывает на важную роль N-CAM в построении ганглия. N-CAM экспрессируется также во время критических стадий в развитии многих ненервных тканей, где, как полагают, эти молекулы способствуют удержанию вместе специфических клеток.

Существует несколько форм N-CAM, каждая из которых кодируется отдельной мРНК. Разные мРНК образуются при альтернативных вариантах сплайсинга РНК-транскрипта одного и того же крупного гена. У большинства форм N-CAM большая внеклеточная часть полипептидной цепи (около 680 аминокислотных остатков) идентична и организована в виде пяти доменов, гомологичных доменам иммуноглобулинов, характерным для молекул антител (разд. 18.3.3). Таким образом, N-CAM принадлежит к тому же древнему суперсемейству «белков узнавания», что и антитела (разд. 18.6.20). Разные формы N-CAM различаются главным образом сегментами, связанными с мембраной, и цитоплазматическими доменами и поэтому могут по-разному взаимодействовать с цитоскелетом; в самом деле, одна из форм не пронизывает липидный бислой и соединена с плазматической мембраной только ковалентной связью с фосфатидилинозитолом (разд. 8.6.13) (рис. 14-66), в то время как другая секретируется и встраивается во внеклеточный матрикс. Каковы функциональные различия всех этих форм, не известно.

У позвоночных находят все больше гликопротеинов клеточной поверхности, осуществляющих Ca^{2+}-независимую межклеточную адгезию, которые принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов. Однако не все поверхностные белки, участвующие в такой адгезии, относятся к этому суперсемейству; например, те, которые функционируют только в присутствии внеклеточных ионов Ca^{2+}, принадлежат к другому семейству.

14.3.7. Кадгерины - семейство гомологичных гликопротеинов клеточной поверхности - осуществляют у позвоночных Ca^{2+}-зависимую межклеточную адгезию [34]

Иммунологические методы, представленные на рис. 14-63, сыграли также решающую роль в открытии трех родственных гликопротеинов клеточной поверхности, называемых кадгеринами, которые участвуют в Ca^{2+}-зависимой межклеточной адгезии у позвоночных. *E-кадгерин* имеется на поверхности многих эпителиальных клеток (и в клетках зародышей млекопитающих до имплантации), *N-кадгеринка* поверхности нервных клеток, клеток сердца и хрусталика, а *P-кадгерин — на.* клетках плаценты и эпидермиса; как и N-CAM, все они иногда встречаются и в других тканях в процессе развития. Эти три кадгерина являются гомологичными трансмембранными гликопротеинами, лишь однократно проходящими через мембрану (каждый из них состоит примерно из 700 аминокислотных остатков), и в этом отношении они сходны с N-CAM. Однако в отсутствие Ca^{2+} конформация кадгеринов сильно изменяется и поэтому они быстро расщепляются протеолитическими ферментами. Поскольку некоторые клетки, например эндотелиальные,

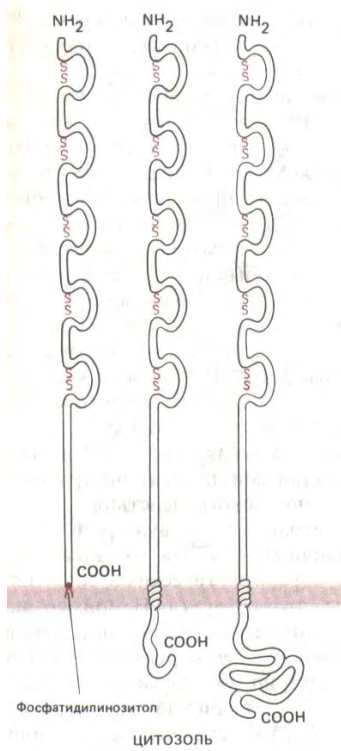


Рис. 14-66. Схематическое изображение трех форм N-CAM. Во всех трех случаях внеклеточная часть полипептидной цепи одинакова и организована в виде пяти доменов, сходных с доменами иммуноглобулинов. Каждый такой домен представляет собой петлю, концы которой связаны дисульфидными мостиками. (По данным B. A. Cunningham et al. Science 236: 799-800, 1987. Copyright 1987 by the AAAS.)

проявляют Ca^{2+}-зависимую адгезию, но при этом не экспрессируют ни одного из трех известных кадгеринов, можно ожидать, что будут открыты новые представители семейства кадгеринов.

Лучше всех охарактеризован Е-кадгерин, называемый также молекулой адгезии печеночных клеток (L-CAM) или *увоморулином.* Большая внеклеточная часть его полипептидной цепи образует три гомологичных домена, по всей видимости не родственных доменам иммуноглобулинов. Вероятно, он играет важную роль в скреплении клеток различных эпителиев. Например, Ca^{2+}-зависимая реагрегация диссоциированных эпителиальных клеток печени блокируется антителами к Е-кадгерину. В зрелых эпителиальных тканях Е-кадгерин обычно концентрируется в *адгезионных поясах,* где он, как полагают, служит трансмембранным линкером, связывающим кортикальные актиновые цитоскелеты клеток, удерживая их вместе (разд. 14.1.3). Он также участвует в компактизации бластомеров в раннем зародыше мыши (разд. 16.2.4). Во время компактизации вначале рыхло расположенные бластомеры прижимаются друг к другу, плотно упаковываются и связываются межклеточными соединениями. Антитела к Е-кадгерину блокируют компактизацию бластомеров, тогда как антитела, реагирующие со многими другими поверхностными молекулами этих клеток, не оказывают такого действия.

Кажется вероятным, что кадгерины играют ключевую роль и на более поздних стадиях развития позвоночных, так как их появление и исчезновение коррелирует с важными морфогенетическими событиями, при которых ткани отграничиваются друг от друга. Например, по мере формирования нервной трубки и отделения ее от покровной эктодермы (разд. 16.1.9) в клетках развивающегося нервного эпителия исчезает Е-кадгерин и появляется N-кадгерин (а также и N-CAM) (рис. 14-67). Когда клетки нервного гребня мигрируют из нервной трубки, они теряют N-кадгерин (как и N-CAM, см. выше), но вновь начинают вырабатывать его позднее, при формировании нервного ганглия (см. рис. 14-56).

Биологическое значение поразительной зависимости белков межклеточной адгезии из семейства кадгеринов от концентрации ионов кальция не известно. Например, еще нет никаких данных о том, что для контроля межклеточной адгезии в процессе развития осуществляется регуляция внеклеточной концентрации кальция.

14.3.8. Молекулы клеточной поверхности, участвующие в адгезии между клетками и между клетками и матриксом, можно рассматривать как элементы морфогенетического кода [35]

Цитофизиологические, морфологические и биохимические исследования указывают на то, что клетка даже одного определенного типа использует много различных молекулярных механизмов прикрепления к другим клеткам и к внеклеточному матриксу. Некоторые из этих механизмов связаны со специализированными межклеточными соединениями, а другие - нет (рис. 14-68). Поскольку отдельная клетка использует большое число адгезивных систем, почти у каждого типа клеток найдется хотя бы одна система межклеточной адгезии, общая с любым другим типом, и поэтому все клетки будут обладать некоторым сродством Друг к другу. Обычно клетки разных тканей (и даже от весьма далеких видов) способны образовывать друг с другом десмосомы, щелевые контакты и адгезионные соединения. Это позволяет предполагать, что участвующие в таких соединениях белки высококонсервативны (идет ли речь о разных тканях или видах). Однако точно так же, как каждая клетка многоклеточного животного содержит определенный набор поверхност-

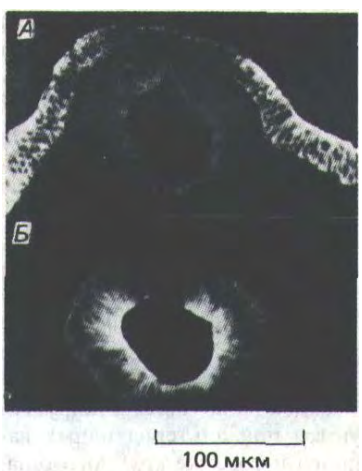


Рис. 14-67. Иммунофлуоресцентные микрофотографии поперечного среза куриного эмбриона: развивающаяся нервная трубка помечена антителами к Е-кадгерину *(А)* и к N-кадгерину (5). Обратите внимание, что клетки лежащей выше эктодермы содержат только Е-кадгерин, а клетки нервной трубки утратили Е-кадгерин, но в них появился N-кадгерин. (С любезного разрешения Kohei Hatta и Masatoshi Takeichi.)

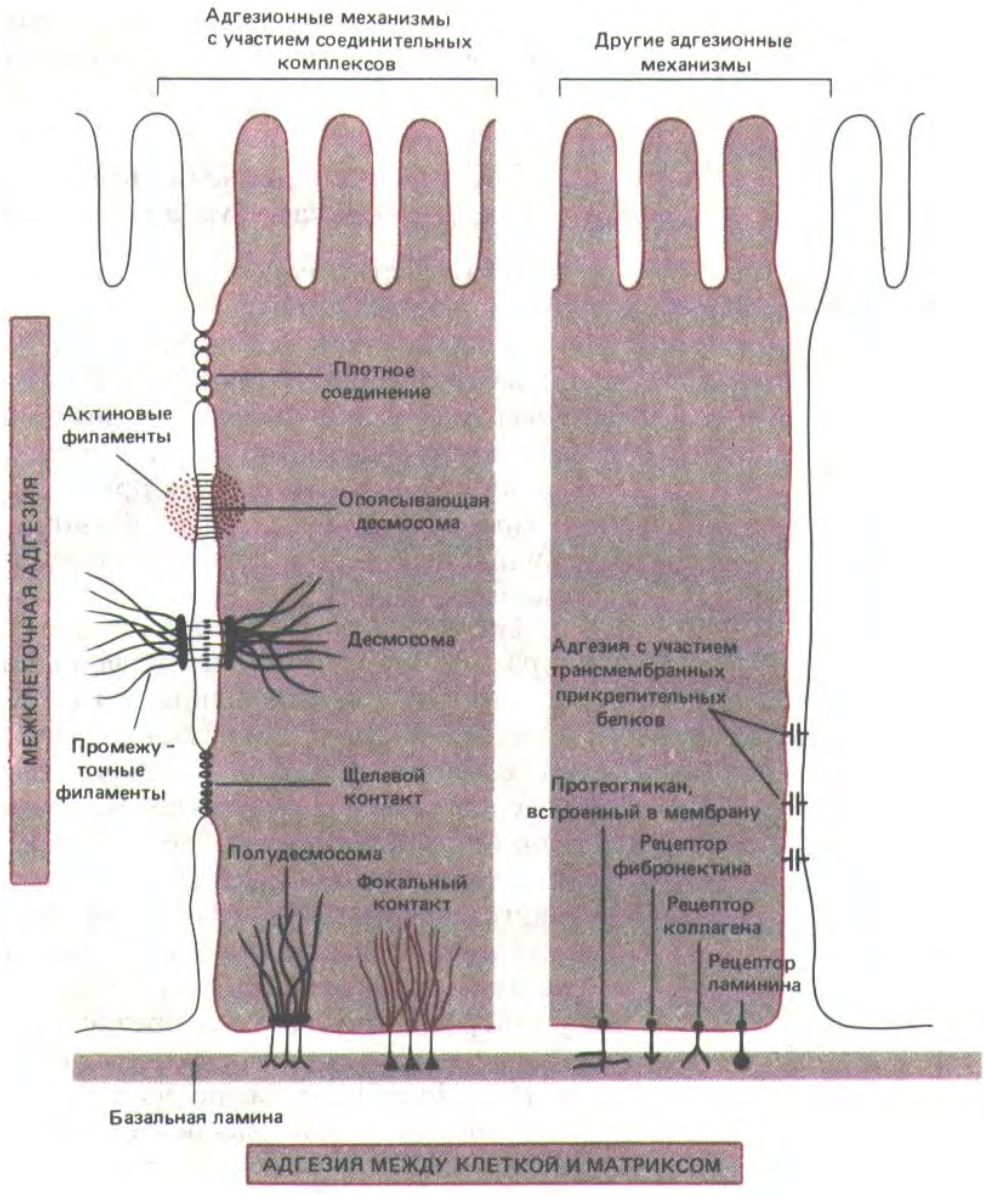


Рис. 14-68. Обобщенная схема адгезионных механизмов, используемых типичными эпителиальными клетками для прикрепления друг к другу и к внеклеточному матриксу (базальной мембране). Слева представлены механизмы с участием специализированных областей, видимых при электронной микроскопии обычных препаратов и (или) препаратов, полученных методом замораживания-скалывания. Справа иные механизмы. В некоторых случаях в соединении клеток между собой или с матриксом при помощи тех и других механизмов участвуют одни и те же гликопротеины клеточной поверхности. Как указывалось в тексте, все специализированные адгезионные механизмы, за исключением щелевых контактов, являются Ca^{2+}-зависимыми; из остальных адгезионных механизмов лишь некоторые зависимы от Ca^{2+}

ных рецепторов, дающий ей возможность специфическим образом реагировать на комплементарный набор растворимых сигнальных молекул (гормонов или локальных медиаторов), так и каждая клетка в ткани обладает определенной комбинацией (или концентрацией) рецепторов, позволяющих ей связываться определенным специфическим образом с другими клетками или с внеклеточным матриксом.

В отличие от рецепторов для растворимых веществ, которые связывают свои специфические лиганды с высоким сродством, рецепторы, связывающие молекулы клеточной поверхности или внеклеточного матрикса, осуществляют это с относительно низким сродством. Поэтому действие этих рецепторов основано на многократном увеличении силы связывания за счет одновременного соединения многих рецепторов со многими лигандами соседней клетки или внеклеточного матрикса. Поскольку у каждых двух клеток имеется некоторый спектр специфических рецепторов адгезии для других клеток и для матрикса, а также их концентраций и распределения по клеточной поверхности, то это и будет определять суммарное сродство, с которым клетки связываются друг с другом и с матриксом. Можно полагать, что именно этот спектр и есть тот «морфогенетический код», который определяет, как клетки будут организованы в ткани. Поскольку животные клетки даже близко родственных типов правильно рассортировываются in vitro, они должны быть способны определять относительно малые различия в адгезивных свойствах и использовать эти различия для установления лишь наиболее

адгезивных из многих возможных контактов с другими клетками и матриксом. Наблюдения над подвижными клетками в культуре позволяют предполагать, как бы это могло осуществляться.

14.3.9. Высокоподвижные клетки служат чувствительными детекторами малых различий в адгезивности [36]

Клетки, участвующие в морфогенетических процессах у зародыша, часто очень подвижны. Если такие клетки диссоциировать и поместить в культуральную чашку, то вначале они будут по всем направлениям выпускать микрошипы и ламеллоподии, а затем активно расползаться по поверхности чашки. Эта подвижность часто совпадает с появлением различий между клетками и, следовательно, с периодом, когда важную роль должны будут играть процессы клеточного узнавания. Например, в зародыше *Xenopus* клетки внезапно становятся очень подвижными на стадии перехода к средней бластуле, когда начинается транскрипция генов (разд. 16.1.2).

Интенсивное изучение клеточной подвижности проводилось на культурах фибробластов, нейтрофилов и регенерирующих нейронов. Его результаты, суммированные в гл. И, указывают на то, что подвижные клетки являются чрезвычайно чувствительными детекторами малых различий в адгезивности. Микрошипы и ламеллоподии, выпускаемые во всех направлениях, по-видимому, участвуют в процессе «перетягивания каната», в результате которого клетка поляризуется и уверенно движется в направлении наиболее адгезивной части субстрата, даже если различия в адгезивности очень малы (разд. 11.6.3). Фибробласты, например, будут неуклонно двигаться вверх по малому градиенту адгезивности, создавшемуся на поверхности культуральной чашки. Изучение хемотаксиса у нейтрофилов позволяет предполагать, что подвижная клетка способна выявлять различия в адгезивности по обеим сторонам клетки всего лишь в 1%. Подобным же образом клетки в тканях могли бы с высокой чувствительностью расшифровывать «морфогенетический код» на клеточных поверхностях, уверенно двигаясь для установления тесного контакта с теми "из соседних клеток, к которым они наиболее адгезивны.

14.3.10. Временные контакты могут инициировать тканеспецифическую межклеточную адгезию, которая затем стабилизируется контактами соединительного комплекса [37]

Какие из многочисленных типов межклеточных соединений, описанных в начале этой главы, могли бы осуществляться при миграции клеток и их взаимном узнавании при формировании тканей и органов? Чтобы выяснить это, можно использовать электронную микроскопию при изучении контактов между соседними клетками во время их передвижения в развивающемся зародыше или в зрелых тканях при репарации повреждений. Такие исследования показывают, что эти контакты, как правило, не приводят к формированию организованных межклеточных соединений. Тем не менее контактирующие мембраны часто тесно прижимаются друг к другу и располагаются параллельно, разделенные щелью в 10-20 нм. Именно на такое расстояние (около 13 нм) выступает из плазматической мембраны гемагглютинин вируса гриппа - первый гликопротеин плазматической мембраны, у которого была установлена трехмерная структура (разд. 8.6.12). Гликопротеины двух соседних плазматических мембран могут взаимодействовать друг с другом через щель в 10-20 нм, осуществляя адгезию. Такой тип временного контакта может быть оптимальным для клеточной локомоции-достаточно тес-

ный для сцепления, но не настолько плотный, чтобы клетка не могла передвигаться.

Поскольку контакты соединительного комплекса между подвижными эмбриональными клетками не видны (за исключением, возможно, небольших щелевых контактов), формирование межклеточных соединений может быть важным механизмом иммобилизации клеток внутри организованной ткани, когда она уже сформировалась. Разумная гипотеза состоит в том, что временная адгезия белков клеточной поверхности приводит к тканеспецифической межклеточной адгезии, которая затем стабилизируется в результате образования межклеточных соединений. Поскольку многие из трансмембранных гликопротеинов, участвующих в этом процессе, способны диффундировать в плоскости плазматической мембраны, они могут накапливаться в местах межклеточного контакта и, таким образом, использоваться как для временной адгезии, так и для формирования специализированных соединительных структур. Так, некоторые белки межклеточной адгезии, например Е-кадгерины (разд. 14.3.7), могут способствовать инициации межклеточной адгезии, а позднее становиться составной частью межклеточных соединений.

Чтобы расшифровать правила узнавания и связывания, используемые в морфогенезе сложных тканей, идеальной была бы возможность инактивировать различные типы белков-рецепторов межклеточной адгезии и адгезии между клетками и матриксом индивидуально и в различных комбинациях. По мере того как возрастает число охарактеризованных моноклональных антител и белковых фрагментов, каждый из которых блокирует один-единственный тип молекулы межклеточной адгезии или рецептора матрикса, и по мере того как гены, кодирующие эти белки клеточной поверхности, становятся доступными для использования in vitro и в трансгенных животных, эта мечта биологов развития становится реальностью.

Заключение

Диссоциированные и перемешанные клетки разных эмбриональных тканей позвоночных вновь ассоциируют предпочтительно с клетками той же ткани. Первоначальные трудности при изучении молекулярных механизмов, лежащих в основе нормальной организации клеток в сложные ткани у высших животных, стимулировали переход к изучению более простых систем. Свободноживущие миксамебы клеточного слизевика Dictyostelium discoideum при голодании агрегируют с образованием многоклеточных плодовых тел. Их межклеточная адгезия осуществляется по меньшей мере двумя гликопротеинами клеточной поверхности: один действует в раннем развитии и зависит от концентрации внеклеточного кальция, а другой - в более поздней стадии и не требует присутствия кальция. Процесс тканеспецифического узнавания у позвоночных, возможно, тоже осуществляется гликопротеинами клеточной поверхности по меньшей мере двух семейств: члены одного-Ca^{2+}-зависимые (кадгерины), другого-Co^{2+}-независимые (представленные N-CAM и другими членами суперсемейства иммуноглобулинов). Оба семейства молекул межклеточной адгезии, по-видимому, играют важную роль в управлении морфогенезом позвоночных. Поскольку клетки даже одного типа используют различные молекулярные механизмы слипания друг с другом (и с внеклеточным матриксом), специфичность межклеточной адгезии, наблюдаемая в эмбриональном развитии, должна быть суммарным результатом сродства большого числа разных адгезионных систем. Проявляемая подвижными клетками способность определять малые различия в адгезивности позволяет представить себе, каким образом специфические

комбинации, концентрации и распределение молекул межклеточной адгезии и рецепторов для матрикса, имеющиеся у клеток каждого типа могли бы использоваться в качестве необходимого «морфогенетического кода».

Литература

Цитированная

1. *Bock G., Clark S., eds.* Junctional Complexes of Epithelial Cells. Ciba Symposium 125, New York, Wiley, 1987.
   Farquhar M. G., Palade G. E. Junctional complexes in various epithelia. J. Cell Biol., 17, 375-412, 1963.
   Gilula N. B. Junctions between cells. In: Cell Communication (R. P. Cox, ed), pp. 1-29. New York, Wiley, 1974.
   Goodenough D. A., Revel J. P. A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver. J. Cell Biol., 45, 272-290, 1970.
   Staehelin L.A., Hull B. E. Junctions between living cells. Sci. Am., 238(5), 141 152, 1978.
2. *Diamond J. M.* The epithelial junction: bridge, gate and fence. Physiologist, 20, 10-18, 1977.
   Madara J. L. Tight junction dynamics: is paracellular transport regulated? Cell, 53, 497-498, 1988.
   Madara J. L., Dharmsathaphorn K. Occluding junction structure-function relationships in cultured epithelial monolayer. J. Cell Biol., 101, 2124-2133, 1985.
   Simons K., Fuller S. D. Cell sufrace polarity in epithelia. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 243-288, 1985.
   van Meer G., Gumbiner B., Simons K. The tight junction does not allow lipid molecules to diffuse from one epithelial cell to the next. Nature, 322, 639-641, 1986.
3. *Burridge K., Fath K., Kelly T., Nuckolls G., Turner C.* Focal adhesions: transmem-brane junctions between the extracellular matrix and the cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 487-526, 1988.
   Geiger B., Volk T., Volberg T. Molecular heterogeneity of adherens junctions. J. Cell Biol., 101, 1523-1531, 1985.
4. *Franks W. W., Cowin P., Schmelz M., Kuppell H.-P.* The desmosomal plaque and the cytoskeleton. In: Junctional Complexes of Epithelial Cells. Ciba Foundation Symposium 125 (G. Bock, S. Clark, eds.), pp. 26-48, New York, Wiley, 1987. *Garrod D. R.* Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tussues. J. Cell Sci. Suppl. 4, 221-237, 1986.
   Jones J. C. R., Yokoo K. M., Goldman R. D. Further analysis of pemphigus autoanti-bodies and their use in studies on the heterogeneity, structure, and function of desmosomes. J. Cell Biol., 102, 1109-1117, 1986.
   Steinberg M. S. et al. On the molecular organization, diversity and functions of desmosomal proteins. In: Junctional Complexes of Epithelial Cells. Ciba Foundation Symposium 125 (G. Bock, S. Clark, eds.), pp. 3-25. New York, Wiley, 1987.
5. *Bennett M., Spray D., eds.* Gap Junctions. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985.
   Furshpan E. J., Potter D. D. Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. Curr. Top. Dev. Biol., 3, 95-127, 1968.
   Giluda N. B., Reeves 0. R., Steinbach A. Metabolic coupling, ionic coupling and cell contacts. Nature, 235, 262-265, 1972.
   Hooper M. L., Subak-Sharpe J. H. Metabolic cooperation between cells. Int. Rev. Cytol., **69,** 45-104, 1981.
   Loewenstein W.R. The cell-to-cell channel of gap junctions. Cell, **48,** 725-726, 1987. *Neyton J., Trautmann A.* Single-channel currents of an intercellular junction. Nature, 317, 331-335, 1985.
   Pitts J.D., Finbow M.E. The gap junction. J. Cell Sci., Suppl. 4, 239-266, 1986.
   Young J. D.-E., Cohn Z. A., Gilula N. B. Functional assembly of gap junction conductance in lipid bilayers: demonstration that the major 27 kd protein forms the Junctional channel. Cell, 48, 733-743, 1987.
6. *Caspar D. L. D., Goodenough D., Makowski L., Phillips W. C.* Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and X-ray diffraction. J. Cell Biol., 74, 605-628, 1977.
   Gilula N. B. Topology of gap junction protein and channel function. In: Junctional Complexes of Epithelial Cells. Ciba Foundation Symposium 125 (G. Bock, S. Clark, eds.), pp. 128-139, New York, Wiley, 1987.
   Paul D. L. Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein. J. Cell Biol., 103, 123-134, 1986.

Unwin P. N. T., Zampighi G. Structure of the junction between communicating cells. Nature, 283, 545-549, 1980.

7. *Caveney S.* The role of gap junctions in development. Annu. Rev. Physiol., 47, 318-335, 1985.
Warner A. E. The role of gap junction in amphibian development. J. Embryol. Exp. Morphol. Suppl. 89, 365-380, 1985.
Warner A. E., Guthrie S.C., GilulaN.B. Antibodies to gap-junctional protein selectively disrupt junctional communication in the early amphibian embryo. Nature, 311, 127-131, 1984.
8. *Rose B., Loewenstein W. R.* Permeability of cell junction depends on local cytoplas-mic calcium activity. Nature, 254, 250-252, 1975.
Saez S. C. et. al. Cyclic AMP increases junctional conductance and stimulates phosphorylation of the 27-kDa principal gap junction polypeptide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 2473-2477, 1986.
Spray D. C., Bennett M. V. L. Physiology and pharmacology of gap junctions. Annu. Rev. Physiol., 47, 218-303, 1985.
Turin L., Warner A. E. Intracellular pH in early *Xenopus* embryo: its effect on current flow between blastomeres. J. Physiol. (Lond.), 300, 489-504, 1980.
9. *Hay E.D., ed.* Cell Biology of Extracellular Matrix. New York, Plenum, 1981. *McDonald J. A.* Extracellular matrix assembly. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 183-208, 1988.
Piez K. A., Reddi A. H., eds. Extracellular Matrix Biochemistry. New York, Elsevier, 1984.
10. *Evered D., Whelan J., eds.* Functions of the Proteoglycans, Ciba Foundation Symposium 124. New York, Wiley, 1986.
Hascall V. C., Hascall G. K. Proteoglycans. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E.D. Hay, ed.), pp. 39-63. New York, Plenum, 1981.
Wight T. N.. Meeham R. P., eds. Biology of Proteoglycans. San Diego, CA, Academic Press, 1987.
11. *Laurent T.C., Eraser J. R. E.* The properties and turnover of hyaluronan. In: Functions of the Proteoglycans. Ciba Foundation Symposium 124 (D. Evered, J. Whelan, eds.), pp. 9-29. New York, Wiley, 1986.
Toole B. P. Glycosaminoglycans in Morphogenesis. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E.D. Hay, ed.), pp. 259-294. New York, Plenum, 1981.
12. *Dorfman A.* Proteoglycan biosynthesis. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E.D. Hay, ed.), pp. 115-138. New York, Plenum, 1981.
Hassell J. R., Kimura J. H., Hascall V. C. Proteoglycan core protein families. Annu. Rev. Biochem., 55, 539-567, 1986.
Heinegärd D., Paulsson M. Structure and metabolism of proteoglycans. In: Extracellular Matrix Biochemistry (K. A. Piez, A. H. Reddi, eds.), pp. 277-328. New York, Elsevier, 1984.
Ruoslahti E. Structure and biology of proteoglycans. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 229-255, 1988.
13. *Fransson L.-A.* Structure and function of cell-associated proteoglycans. Trends Biochem. Sci., 12, 406-411, 1987.
Höök M., Kjjellen L., Johansson S., Robinson J. Cell-surface glycosaminoglycans. Annu. Rev. Biochem., 53, 847-869, 1984.
Rees D. A. Polysaccharide Shapes, Outline Studies in Biology, pp. 62-73. London, Chapman and Hall, 1977.
Scott J. E. Proteoglycan-collagen interactions. In: Functions of the Proteoglycans. Ciba Foundation Symposium 124 (D. Evered, J. Whelan, eds.), pp. 104-124. New York, Wiley, 1986.
14. *Burgeson R.E.* New collagens, new concepts. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 551-577, 1988.
Linsenmayer T. F. Collagen. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E. D. Hay, ed.), pp. 5-37. New York, Plenum, 1981.
Martin G. R., Timpl R., Muller P. K., Ktihn K. The genetically distinct collagens. Trends Biochem. Sci., 10, 285-287, 1985.
15. *Fleischmajer R., Olsen B.R., Ktihn K., eds.* Biology, Chemistry, and Pathology of Collagen. Ann. N.Y. Acad. Sci., Vol. 460, 1985.
Olsen B. R. Collagen Biosynthesis. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E.D. Hay, ed.), pp. 139-177. New York, Plenum, 1981.
Woolley D. E. Mammalian collagenases. In: Extracellular Matrix Biochemistry (K.A. Piez, A.H. Reddi, eds.), pp. 119-157. New York, Elsevier, 1984.
16. *EyreD.R., PazM.A., Gallop P.M.* Cross-linking in collagen and elastin. Annu. Rev. Biochem., 53, 717-748, 1984.
Piez K. A. Molecular and aggregate structures of the collagens. In: Extracellular Matrix Biochemistry (K.A. Piez, A.H. Reddi, eds.), pp. 1-39. New York, Elsevier, 1984.
17. *Prockop D.J., Kivirikko K.I.* Heritable diseases of collagen. New Engl. J. Med., 311, 376-386, 1984.

Trelstad R. L., Silver F. H. Matrix assembly. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E. D. Hey, ed.), pp. 179 215. New York, Plenum, 1981.
18. *Stopak D., Harris A. K.* Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. Dev. Biol., 90, 383-398, 1982.
19. *Yurchenco P.O., Furthmayr H.* Self-assembly of basement membrane collagen, Biochemistry, 23, 1839-1850, 1984.
Yurchenco P. D., Ruben G. C. Basement membrane structure in situ: evidence for lateral associations in the type IV collagen network. J. Cell Biol., 105, 2559-2568, 1987.
20. *Cleary E. G., Gibson M. A.* Elastin-associated microfibrils and microfibrillar proteins. Int. Rev. Connect. Tissue Res., 10, 97-209, 1983.
Gosline J. M., Rosenbloom J. Elastin. In: Extracellular Matrix Biochemistry (K.A. Piez, A.H. Reddi, eds.), pp. 191 227. New York, Elsevier, 1984.
Ross R., Bornstein P. Elastic fibers in the body. Sci. Am., 224(6), 44 52, 1971.
21. *Dufour S., Duband J.-L., Kornblihtt A. R., ThieryJ.P.* The role of fibronectins in embryonic cell migrations. Trends Genet., 4, 198-203, 1988.
Hynes R.O. Molecular biology of fibronectin. Annu. Rev. Cell Biol., 1, 67-90, 1985. *Hynes R.O.* Fibronectins. Sci. Am., 254(6), 42-51, 1986.
Hynes R. 0., Yamada K. M. Fibronectins: multifunctional modular proteins. J. Cell Biol., 95, 369-377, 1982.
Ruoslahti E., Pierschbacher M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. Science, 238, 491-497, 1987.
22. *Humphries M. J., Akiyama S. K., Komoriya A., Olden K., Yamada K. M.* Neurite extension of chicken peripheral nervous system neeurons on fibronectin: relative importance of specific adhesion sites in the central cell-binding domain and the alternatively spliced type III connecting segment. J. Cell Biol., 106, 1289-1297, 1988.
Tamkun J. W., Schwarzbauer J. E., Hynes R. 0. A single rat fibronectin gene generates three different mRNAs by alternative splicing of a complex exon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5140-5144, 1984.
23. *Farquhar M. G.* The glomerular basement membrane: a selective macromolecular filter. In: Cell Biology of Extracellular Matrix (E.D. Hay, ed.), pp. 335-378. New York, Plenum, 1981.
Martin G. R., Timpl R. Laminin and other basement membrane components. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 57-85, 1987.
Sasaki M., Kato S., Kohno K., Martin G. R., Yamada Y. Sequence of the cDNA encoding the laminin Bl chain reveals a multidomain protein contaning cysteine-rich repeats. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 935 939, 1987.
24. *Reist N.E., Magill C., McMahan U.J.* Agrin-like molecules at synaptic sites in normal denervated and damaged skeletal muscles. J. Cell Biol., 105, 2457-2469, 1987.
25. *Anderson D. C., Springer T.A.* Leukocyte adhesion deficiency: an inherited defect in the Mac-1, LFA-1 and PI50,95 glycoprotein. Annu. Rev. Med., 38, 175-194, 1987.
Buck C.A., Horwitz A.F. Cell surface receptors for extracellular matrix molecules. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 179-205, 1987.
Hynes R.O. Integrins: a family of cell surface receptors. Cell, 48, 549-554, 1987. *Ruoslahti E.* Fibronectin and its receptors. Annu. Rev. Biochem., 57, 375-414, 1988.
26. *Bornstein P., Duksin D., Balian G., Davidson J. M., Crouch E.* Organization of extracellular proteins on the connective tissue cell surface: relevance to cell-matrix interactions in vitro and in vivo. Ann. N. Y. Acad. Sci., 312, 93-105, 1978.
Burridge K., Path K., Kelly T., Nuckolls u., *Turner C.* Focal adhesion: transmem-brane junctions between the extracellular matrix and cytoskeleton. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 487-526, 1988.
Horwitz A., Duggan K., Buck C., Beckerle M. C., Burridge K. Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. Nature, 320, 531-533, 1986.
Hyens R. Structural relationships between fibronectin and cytoplasmic cytoskeletal networks. In: Cytoskeletal Elements and Plasma Membrane Organization (G. Poste, G. L. Nicolson, eds.) Vol 7, pp. 100-137. Amsterdam, Elsevier, 1981.
Watt F. T. The extracellular matrix and cell shape. Trends Biochem. Sci., 11, 482-485, 1986.
27. *Le Douarin N.. Smith J.* Development of the peripheral nervous system from the neural crest. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 375-404, 1988.
McClay D. R., Ettensohn C.A. Cell adhesion and morphogenesis. Annu. Rev. Cell Biol., 3, 319-346, 1987.
28. *Loomis W. F. Dictyostelium discoideum.* A Developmental System. New York, Academic Press, 1975.
29. *Banner J. T.* Chemical signals of social amoebae. Sci. Am., 248 (4), 114 120, 1983. *Gerisch G.* Cyclic AMP and other signals controlling cell development and differentiation in *Dictyostelium.* Annu. Rev. Biochem., 56, 853 879, 1987.

30. *Gerisch G.* Interrelation of cell adhesion and differentiation in *Dictyostelium discoideum.* J. Cell Sci., Suppl. 4, 201-219, 1986.
Gerisch G. Univalent antibody fragments as tools for the analysis in *Dictyostelium.* Curr. Top. Dev. Biol., 14, 243-270, 1980.
31. *Hennings H., Holbrook K.A.* Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture. An ultrastructural study. Exp. Cell Res., 143, 127-142, 1983.
32. *Moscona A.A., Hausman R.E.* Biological and biochemical studies on embryonic cell-cell recognition. In: Cell and Tissue Interactions. Society of General Physiologists Series (J. W. Lash, M. M. Burger, eds.), Vol. 32, pp. 173-185. New York, Raven, 1977.
Roth S., Weston J. The measurement of intercellular adhesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 58, 974 980, 1967.
33. *Cunningham B. A. et al.* Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglo-bulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. Science, 236, 799-806, 1987.
Edelman G. M. Cell-adhesion molecules: a molecular basis for animal form. Sci. Am., 250(4), 118-129, 1984.
Edelman G. M. Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. Annu. Rev. Cell Biol., 2 81-116, 1986.
Rutishauser U., Goridis C. N-CAM: the molecule and its genetics. Trends Genet., 2, 72-76, 1986.
Williams A. F., Barclay A. N. The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. Annu. Rev. Immunol., 6, 381-406, 1988.
34. *Takeichi M.* The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development, 102, 639-655, 1988.
35. *Ekblom P., Vestweber D., Kemler R.* Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 27 48, 1986.
Garrod D. R. Desmosomes, cell adhesion molecules and the adhesive properties of cells in tissues. J. Cell Sci. Suppl. 4, 221-237, 1986.
Jessel T. M. Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. Neuron, 1, 3-13, 1988.
Steinberg M. S. The adhesive specification of tissue self-organization. In: Morphogenesis and Pattern Formation (T. G. Connelly et al., eds.), pp. 179-203. New York, Raven, 1981.
36. *Devereotes P., Zigmond S. H.* Chemotaxis in eukaryotic cells. Annu. Rev. Cell Biol., 4, 649-686, 1988.
37. *TrinkausJ.P.* Cells into Organs, 2nd ed., pp. 69-178, Englewood Cliffs, NJ, Prentice-Hall, 1984.

Оглавление

8. Внутриклеточная сортировка макромолекул и сохранение клеточных компартментов 5

8.1 Компартментация в клетках высших организмов 5

8.1.1. Все эукариотические клетки содержат набор основных ограниченных мембраной органелл 5

8.1.2. Топология мембранных органелл связана с их эволюционным происхождением 8

8.1.3. Внутриклеточный транспорт белков по ЭР и аппарату Гольджи можно проследить с помощью радиоавтографии 10

8.1.4. Транспорт белков происходит по двум основным путям - через цитозоль и через ЭР 13

8.1.5. Белки могут перемещаться между компартментами двумя принципиально различными способами 14

8.1.6. Сигнальные пептиды и сигнальные участки определяют судьбу белка 15

8.1.7. Клетки не могут строить свои мембранные органеллы de novo: им требуется информация, содержащаяся в самой органелле 16

Заключение 17

8.2. Цитозоль 17

8.2.1. Организация цитозоля поддерживается белковыми филаментами 17

8.2.2. Многие белки претерпевают в цитозоле ковалентные модификации 18

8.2.3. Некоторые белки цитозоля прикреплены к цитоплазматической стороне мембраны через цепь жирной кислоты 19

8.2.4. Некоторые белки цитозоля являются короткоживущими 20

8.2.5. У эукариот избирательная замена белков происходит при помощи убикитин-зависимого протеолиза 21

8.2.6. Стабильность белка может определяться ферментами, повреждающими его N-конец 22

8.2.7. Белки теплового шока позволяют предотвратить накопление в клетке белковых агрегатов 23

Заключение 23

8.3. Транспорт белков и РНК в ядро и из ядра 24

8.3.1. Двойную ядерную мембрану пронизывают ядерные поры 24

8.3.2. Белки активно проникают в ядро через ядерные поры 26

8.3.3. В ядро активно переносятся только белки, содержащие специальные сигналы 27

8.3.4. Некоторые РНК покидают ядро через ядерные поры 28

Заключение 28

8.4. Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты 29

8.4.1. Митохондриальные сигнальные пептиды представляют собой амфипатические аминокислотные последовательности 29

8.4.2. Перенос веществ в митохондриальный матрикс зависит как от электрохимического градиента на внутренней мембране, так и от гидролиза АТР 30

8.4.3. Митохондриальные белки проникают в матрикс в зонах слипания, связывающих две мембраны 30

8.4.4. Когда белки проникают в митохондриальный матрикс, они разворачиваются 31

8.4.5. Для транспорта белков в межмембранное пространство митохондрий необходимы два сигнала 32

8.4.6. Для переноса белков из цитозоля во внешнюю митохондриальную мембрану также необходимо их разворачивание 33

8.4.7. Для того, чтобы направлять белки в тилакоидную мембрану хлоропластов, необходимы два сигнальных пептида 33

Заключение 34

8.5. Пероксисомы 35

8.5.1. Пероксисомы используют в реакциях окисления молекулярный кислород и перекись водорода 35

8.5.2. Все компоненты пероксисом поступают из цитозоля 37

Заключение 38

8.6. Эндоплазматический ретикулум 38

8.6.1. Прикрепленные к ЭР рибосомы определяют границы его гранулярных областей 39

8.6.2. Некоторые специализированные клетки изобилуют гладким ЭР 40

8.6.3. Гранулярные и гладкие области ЭР могут быть разделены центрифугированием 41

8.6.4. Гранулярные участки ЭР содержат белки, ответственные за связывание рибосом 43

8.6.5. Впервые сигнальные пептиды были обнаружены в белках, попадающих в ЭР 43

8.6.6. Частица, распознающая сигнал, направляет сигнальный пептид ЭР к специфическому рецептору в мембране ЭР 44

8.6.7. При переносе через мембрану ЭР не всегда продолжается удлинение полипептидной цепи 46
8.6.8. Различные пространственные структуры трансмембранных белков могут определяться комбинациями пептидов, детерминирующих начало и конец переноса 46
8.6.9. Общую конформацию трансмембранного белка можно предсказать по положению его гидрофобных аминокислот 49
8.6.10. Перенесенные в полость ЭР белки сворачиваются вновь 50
8.6.11. Дисульфидизомераза способствует образованию в полости ЭР правильных дисульфидных связей 51
8.6.12. Большинство белков, синтезированных в шероховатом ЭР, гликозилированы с помощью N-связанного олигосахарида 52
8.6.13. У некоторых трансмембранных белков вскоре после их поступления в ЭР С-концевой трансмембранный участок обменивается на ковалентно связанный фосфолипид инозитол 53
8.6.14. Большая часть липидных бислоев мембран собирается в ЭР 53
8.6.15. Белки-переносчики фосфолипидов могут доставлять их из ЭР в митохондрии и пероксисомы 57
Заключение 57

8.7. Аппарат Гольджи 58

8.7.1. В аппарате Гольджи происходит модификация олигосахаридных цепей 59
8.7.2. Углеводы клеточных мембран обращены к той стороне мембраны, которая топологически эквивалентна внеклеточному пространству 62
8.7.3. Зачем нужно N-гликозилирование? 62
8.7.4. В аппарате Гольджи происходит сборка протеогликанов 63
9.7.5. При образовании секреторных пузырьков белки часто подвергаются протеолизу 64
8.7.6. Цистерны Гольджи собраны в виде последовательных компартментов, в которых происходит процессинг продукта 65
Заключение 66

8.8. Транспорт белков из аппарата Гольджи в лизосомы 66

8.8.1. Внутриклеточное гидролитическое расщепление макромолекул происходит главным образом в лизосомах 66
8.8.2. Лизосомы - это гетерогенные органеллы 67
8.8.3. Существуют три пути поступления веществ в лизосомы 68
8.8.4. Лизосомные ферменты сортируются в аппарате Гольджи мембраносвязанным белкомрецептором, узнающим маннозо-6-фосфат 69
8.8.5. Рецептор маннозо-6-фосфата «курсирует» между специализированными мембранами 69
8.8.6. Присоединение к лизосомному ферменту нескольких групп маннозо-6-фосфата усиливает сигнал сортировки 72
8.8.7 Дефекты Glc-NAc-фосфотрансферазы вызывают у человека лизосомные болезни накопления 73
Заключение 74

8.9. Транспорт из аппарата Гольджи к секреторным пузырькам и к клеточной поверхности 74

8.9.1. Секреторные пузырьки отпочковываются от *транс*-сети Гольджи 75
8.9.2. Компоненты мембраны секреторных пузырьков используются вторично 76
8.9.3. В неполяризованных клетках белки и липиды, по-видимому, автоматически переносятся от ЭР и аппарата Гольджи к клеточной поверхности 77
8.9.4. Поляризованные клетки могут направлять белки из аппарата Гольджи к определенному участку плазматической мембраны 78
8.9.5. Вирусы используют аппарат сортировки клетки-хозяина 79
8.9.6. Белки вирусной оболочки несут сигналы, направляющие их к определенным внутриклеточным мембранам 80
Заключение 8 1

8.10. Везикулярный транспорт и сохранение индивидуальности компартментов 82

8.10.1. Некоторые белки удерживаются в ЭР и аппарате Гольджи в качестве постоянных компонентов 82
8.10.2. Существует по крайней мере два типа окаймленных пузырьков 83
8.10.3. Раскрыть механизм транспорта помогают мутантные клетки с нарушенной секрецией 84
8.10.4. Бесклеточные системы дают другой плодотворный подход к изучению молекулярных механизмов везикулярного транспорта 84
Заключение 86
Литература 86

9. Кеточное ядро 93

9.1. ДНК и белки, входящие в состав хромосом 95

9.1.1. Каждая хромосома образуется из одной длинной молекулы ДНК 95
9.1.2. . Каждая молекула ДНК, образующая хромосому, должна содержать центромеру, две теломеры и точки начала репликации 96
9.1.3. Большая часть ДНК хромосомы не кодирует жизненно важных белков или РНК 98
9.1.4. Каждый ген -это сложная функционально активная единица, предназначенная для регулируемого синтеза молекулы РНК 99
9.1.5. Сравнение ДНК родственных организмов позволяет выявить в ней консервативные и неконсервативные области 100
9.1.6. Хромосомы содержат разнообразные белки,

связанные с определенными последовательностями ДНК 101

9.1.7. Уменьшение подвижности в геле позволяет выявить сайт-специфические ДНК-связывающие белки в экстрактах клеток 102

9.1.8. Сайт-специфические ДНК-связывающие белки можно выделить и охарактеризовать, используя их сродство к ДНК 103

9.1.9. Многие сайт-специфические ДНК-связывающие белки имеют одинаковые области 104

9.1.10. Симметричные димеры ДНК-связывающих белков часто узнают симметричные последовательности нуклеотидов 104

9.1.11. Cro-белок принадлежит к семейству ДНК-связывающих белков, построенных по принципу «спираль-виток-спираль» 105

9.1.12. Молекулы белков при связывании с ДНК часто конкурируют или кооперируются друг с другом 106

9.1.13. Геометрия спирали ДНК зависит от последовательности нуклеотидов 106

9.1.14. Некоторые последовательности ДНК сильно изогнуты 109

9.1.15. Белки могут сворачивать ДНК в плотную спираль 109

9.1.16. Гистоны основные структурные белки хромосом эукариот 110

9.1.17. Связывание гистонов с ДНК приводит к образованию нуклеосом частиц, редставляющих собой единицу хроматина 111

9.1.18. Некоторые нуклеосомы расположены на ДНК неслучайным образом 112

9.1.19. Определенные сайты на хромосомах не содержат нуклеосом 1 1 3

9.1.20. Нуклеосомы обычно упаковываются вместе, образуя при этом упорядоченные структуры высшего порядка 1 1 3

9.1.21. Гистоновые белки H1 помогают соединять нуклеосомы 114

9.1.22. Нуклеосомы не мешают синтезу РНК 115

Заключение 1 1 8

9.2. Структура хромосомы 118

9.2.1. Хромосомы, по-видимому, состоят из серии петель 118

9.2.2. Митотические хромосомы состоят из максимально сконденсированного хроматина 119

9.2.3. Каждая митотическая хромосома содержит определенный набор очень больших доменов 121

9.2.4. ДНК хромосом типа ламповых щеток в интерфазе состоит из серии различающихся доменов 123

9.2.5. В политенных хромосомах также можно увидеть упорядоченные участки интерфазного хроматина 125

9.2.6. Отдельные домены хроматина в политенных хромосомах могут разворачиваться и вновь упаковываться как отдельные единицы 126

9.2.7. Гены на политенной хромосоме расположены, вероятно, как в дисках, так и в междисковых участках 127

9.2.8. В транскрипционно активных областях хроматин менее конденсирован 129

9.2.9. Активный хроматин обладает особыми биохимическими свойствами 130

9.2.10. Гетерохроматин сильно конденсирован и транскрипционно неактивен 131

Заключение 132

9.3. Репликация хромосом 133

9.3.1. В хромосомах высших эукариот сайты инициации репликации активируются группами 133

9.3.2. Сайтами инициации репликации служат определенные последовательности ДНК 135

9.3.3. Хромосома вируса SV40 реплицируется в бесклеточной системе млекопитающих 136

9.3.4. По мере репликации ДНК новые гистоны образуют хроматин 136

9.3.5. Теломеры состоят из коротких G-богатых повторов, которые добавляются к концам хромосом 138

9.3.6. Различные области одной и той же хромосомы в S-фазе реплицируются в разное время 138

9.3.7. Высококонденсированный хроматин реплицируется в поздней S-фазе 139

9.3.8. Гены в составе активного хроматина реплицируются в ранней S-фазе 139

9.3.9. Поздно реплицирующиеся участки совпадают с AT-богатыми полосами на метафазных хромосомах 140

9.3.10. Для чего необходим контроль времени включения точек начала репликации? 141

9.3.11. Факторы, связанные с хроматином, обеспечивают однократную репликацию ДНК в каждой S-фазе, блокируя повторение этого процесса 142

Заключение 143

9.4. Синтез и процессинг РНК 143

9.4.1. РНК-полимераза, начиная каждую новую цепь РНК, меняет субъединицы 144

9.4.2. Синтез РНК у эукариот осуществляют три различные РНК-полимеразы 145

9.4.3. Факторы транскрипции образуют стабильные комплексы на эукариотических промоторах 146

9.4.4. РНК-полимераза II транскрибирует некоторые последовательности ДНК гораздо чаще других 148

9.4.5. Предшественники информационной РНК ковалентно модифицированы с обоих концов 149

9.4.6. Для кэпирования и добавления poly A требуется РНК-полимераза II 150

9.4.7. Большая часть РНК, синтезированной РНК-полимеразой II, в ядре быстро распадается 151

9.4.8. При процессинге РНК из середины молекулы удаляются длинные последовательности нуклеотидов 153

9.4.9. К транскриптам гяРНК сразу же присоединяются белки и мяРНП 153
9.4.10. Последовательности нитронов удаляются в виде лассо-подобных РНК-структур 155
9.4.11. Из каждого транскрипта РНК обычно удаляется несколько интронных последовательностей 157
9.4.12. Один и тот же транскрипт РНК может сплайсироваться по-разному, при этом образуются мРНК, кодирующие разные белки 158
9.4.13. Изменения мРНК при талассемии демонстрируют механизм возникновения новых белков при сплайсинге 159
9.4.14. Сплайсинг РНК, катализируемый сплайсосомами, возможно, возник из самосплайсинга 160
9.4.15. Экспорт мРНК в цитоплазму происходит только после завершения сплайсинга 161
9.4.16. Рибосомные РНК синтезируются на тандемно расположенных копиях идентичных генов 162
9.4.17. Ядрышко -это центр образования рибосом 164
9.4.18. Ядрышко - это высокоорганизованная структура внутри ядра 165
9.4.19. После каждого митоза ядрышко образуется заново из специфических участков хромосомы 167
9.4.20. Во время интерфазы отдельные хромосомы находятся на определенных местах в ядре 167
9.4.21. Насколько сильно структурировано ядро? 169
Заключение 1 70
Литература 170

10. Контроль генной экспрессии 176

10.1 Стратегии генетического контроля 176

10.1.1. В различных типах клеток многоклеточного организма содержится одинаковая ДНК 176
10.1.2. В различных типах клеток синтезируются разные наборы белков 177
10.1.3. Экспрессия гена может регулироваться на каждом этапе пути от ДНК к РНК и к белку 178
10.1.4. Белки-регуляторы могут либо активировать, либо подавлять транскрипцию генов 179
10.1.5. Комбинации нескольких регуляторных белков, контролирующих активность генов, могут определять развитие многих типов клеток 179
10.1.6. Активность гена обычно зависит от действия нескольких регуляторных белков 181
10.1.7. Главные белки-регуляторы активируют сразу много генов 181
10.1.8. Один-единственный главный белок-регулятор может превратить фибробласт в миобласт 182
Заключение 183

10.2. Контроль инициации транскрипции 183

10.2.1. Белки-репрессоры бактерий связываются вблизи промоторов и подавляют транскрипцию определенных генов 184
10.2.2. Бактериальный белок-активатор взаимодействует с РНК-полимеразой и способствует инициации транскрипции 186
10.2.3. Изменения в фосфорилировании белков могут влиять на активность генов 188
10.2.4. Гибкость ДНК позволяет регуляторным белкам, связывающимся с отдаленными участками, влиять на транскрипцию генов 189
10.2.5. Различные сигма-факторы позволяют бактериальной РНК-полимеразе узнавать разные промоторы 189
10.2.6. Потребность в общих факторах транскрипции приводит к появлению дополнительных элементов в системе контроля транскрипции эукариотических генов 191
10.2.7. Большинство генов эукариот находится под контролем промоторов и энхансеров 191
10.2.8. Большинство энхансеров и элементов, расположенных перед промотором,- это последовательности, которые связывают белки, участвующие в комбинационном контроле 192
10.2.9. Большинство регуляторных белков содержит домены, функция которых различна 195
10.2.1 .Эукариотические белки-регуляторы могут включаться и выключаться 197
10.2.1 .Механизм действия энхансера до конца не выяснен 197
.Заключение 198

10.3. Молекулярно-генетические механизмы, участвующие в образовании разных типов клеток 199

10.3.1. У многих бактерий некоторые последовательности ДНК перестраиваются, что приводит к включению и выключению генов 199
10.3.2. Главный регуляторный локус определяет тип спаривания у дрожжей 201
10.3.3. Способность переключать тип спаривания наследуется асимметрично 202
10.3.4. Сайленсер, вероятно, «закрывает» участок хроматина у дрожжей 203
10.3.5. Два белка бактериофага, подавляющие синтез друг друга, могут участвовать в стабильном переключении на молекулярном уровне 204
10.3.6. Регуляторные белки у эукариот тоже могут детерминировать альтернативные стабильные состояния 206
10.3.7. Кооперативно связывающиеся кластеры белков-регуляторов могут передаваться непосредственно от родителей к потомкам 207
10.3.8. В клетках высших эукариот гетерохроматин содержит особым образом конденсированные области ДНК 207

10.3.9. Инактивация Х-хромосомы наследственно предопределена 208

10.3.10. Гены дрозофилы могут выключаться благодаря наследуемым свойствам структуры хроматина 210

10.3.11. Для оптимальной экспрессии гена часто бывает необходимо его определенное положение в хромосоме 211

10.3.12. Для активации эукариотических генов может быть необходима локальная деконденсация хроматина 212

10.3.13. Напряжение, возникающее при суперспирилизации ДНК, позволяет осуществлять воздействие на расстоянии 212

10.3.14. Механизм образования активного хроматина остается неясным 214

10.3.15. В ходе эволюции многоклеточных организмов возникают новые уровни генного контроля 215

10.3.16. При делении клеток позвоночных тип метилирования ДНК передается по наследству 216

10.3.17. Метилирование ДНК у позвоночных способствует тому, что клетка придерживается выбранного пути развития 217

10.3.18. CG-богатые островки позволяют выявить у млекопитающих около 30000 генов «домашнего хозяйства» 218

10.3.19. Сложный характер регуляции генов необходим для образования многоклеточного организма 220

Заключение 221

10.4. Посттранскрипционный контроль 222

10.4.1. Аттенуация транскрипции приводит к преждевременной терминации синтеза некоторых молекул РНК 222

10.4.2. Сплайсинг РНК может регулироваться таким образом, что один и тот же ген направляет синтез различных форм белка 223

10.4.3. Альтернативный сплайсинг РНК может использоваться для включения и выключения генов 224

10.4.4. Механизмы, ответственные за выбор сайта для регулируемого сплайсинга РНК, неизвестны 225

10.4.5. Изменение сайта, в котором происходят расщепление транскрипта РНК и его полиаденилирование, может менять карбоксильный конец белка 225

10.4.6. Открытие альтернативного сплайсинга требует пересмотра понятия «ген» 226.

10.4.7. Экспорт РНК из ядра может регулироваться 227

10.4.8. Белки, связывающиеся с 5'-лидерной областью мРНК, участвуют в негативном контроле трансляции 228

10.4.9. Присутствие энхансера трансляции в некоторых вирусных мРНК свидетельствует о существовании механизма позитивного контроля трансляции 229

10.4.10. Многие мРНК- объект контроля на уровне трансляции 230

10.4.11. Сдвиг рамки трансляции приводит к образованию двух белков на одной молекуле мРНК 230

10.4.12. Экспрессия генов может контролироваться изменением стабильности мРНК 231

10.4.13. Для избирательной деградации мРНК необходим постоянный синтез белка 232

10.4.14. Некоторые мРНК расположены в определенных областях цитоплазмы 233

10.4.15. Редактирование мРНК изменяет смысл информационной РНК 233

10.4.16. Реакции, катализируемые РНК, вероятно, имеют весьма древнее происхождение 234

Заключение 235

10.5. Организация и эволюция ядерного генома 236

10.5.1. Точковые мутации обусловливают небольшие изменения генома, а его перестройка или увеличение осуществляются в ходе генетической рекомбинации 236

10.5.2. Тандемно повторяющиеся последовательности ДНК стремятся остаться неизмененными 237

10.5.3. На примере семейства глобиновых генов можно проследить, как случайные дупликации ДНК способствуют эволюции организмов 238

10.5.4. Гены, кодирующие новые белки, могут образоваться при рекомбинации экзонов 239

10.5.5. Вероятно, большинство белков кодируются генами, состоящими из многих небольших экзонов 240

10.5.6. Основная фракция ДНК высших эукариот состоит из повторяющихся некодирующих последовательностей нуклеотидов 242

10.5.7. Функция сателлитной ДНК неизвестна 242

10.5.8. Эволюция геномов ускоряется транспозирующимися элементами по крайней мере трех типов 243

10.5.9. Транспозоны могут влиять на регуляцию генов 245

10.5.10. Транспозиционные взрывы приводят к катастрофическим изменениям в геномах и повышают биологическое разнообразие 246

10.5.11. Около 10% генома человека занимают два семейства транспозонов, которые, по-видимому, размножились лишь недавно 247

Заключение 248

Литература 248

11. Цитоскелет 254

11.1. Мышечное сокращение 255

11.1.1. Сократительными элементами клеток скелетной мышцы служат миофибриллы 255

11.1.2. Миофибриллы построены из повторяющихся ансамблей толстых и тонких филаментов 257

11.1.3. Сокращение - результат скольжения тонких и толстых филаментов друг относительно друга 257

11.1.4. Тонкие филаменты состоят в основном из актина 258

11.1.5. Толстые филаменты состоят из миозина 259

11.1.6. Миозиновые хвосты самоорганизуются в биполярные толстые филаменты 259

11.1.7. Источником энергии для мышечного сокращения служит гидролиз АТР 260

11.1.8. Миозин действует как актин-зависимая АТРаза 261

11.1.9. С актиновыми филаментами взаимодействуют головки миозина 261

11.1.10. Миозиновые головки «шагают» по актиновому филаменту в направлении плюс-конца 262

11.1.11. Мышечное сокращение инициируется внезапным повышением концентрации Ca^{2+} в цитозоле 264

11.1.12. Сокращение скелетной мышцы регулируется ионами Ca^{2+} при участии тропонина и тропомиозина 265

11.1.13. Другие вспомогательные белки поддерживают архитектуру миофибрилл и обеспечивают их эластичность 266

11.1.14. У позвоночных есть три основных типа мышц 267

11.1.15. И в гладкомышечных, и в немышечных клетках миозин активируется фосфорилированием его легких цепей 269

11.1.16. При фосфорилировании легких цепей немышечный миозин способен объединяться в филаменты 270

11.1.17. В немышечных клетках могут временно создаваться сократимые комплексы мышечного типа 271

11.1.18. Мышечные белки кодируются генами, составляющими мультигенные семейства 272

11.1.19. Разнообразие мышечных белков увеличивается за счет альтернативных способов сплайсинга их мРНК 273

Заключение 273

11.2. Актиновые филаменты и клеточный кортекс 274

11.2.1. Актин-связывающие белки «сшивают» ак-тиновые филаменты в обширные сети 274

11.2.2. Гельзолин, активированный ионами Ca^{2+}, вызывает фрагментацию актиновых фила-ментов 276

11.2.3. Движение цитоплазмы может осуществляться с участием миозина 276

11.2.4. Цитоплазматические потоки в гигантских клетках водорослей создаются при участии актина и миозина 277

11.2.5. Организация кортекса определяется взаимодействием актиновых филаментов с плазматической мембраной 278

11.2.6. Цитоскелетные сети, связанные с мембраной, создают для нее механический «каркас» 279

11.2.7. Микроворсинки -пример того, как пучки поперечно-сшитых актиновых филаментов могут стабилизировать локальные выпячивания плазматической мембраны 279

11.2.8. Благодаря фокальным контактам актиновые филаменты могут создавать тянущую силу, приложенную к субстрату 281

11.2.9. Рост актинового филамента происходит главным образом на плюс-конце 283

11.2.10. В актиновых филаментах происходит «тредмиллинг» составляющих их субъединиц 284

11.2.11. Многие клетки образуют на своей поверхности подвижные структуры, содержащие актин, - микрошипы и ламеллоподии 285

11.2.12. Взрывообразная полимеризация актина способствует образованию акросомального отростка у спермиев некоторых беспозвоночных 288

11.2.13. Сборка актина находится под контролем плазматической мембраны 288

11.2.14. Некоторые вещества влияют на поведение клеток, изменяя состояние полимеризации актина 289

11.2.15. Свойства клеточного кортекса зависят от баланса кооперативных и конкурентных взаимодействий обширной группы актинсвязывающих белков 290

Заключение 292

11.3. Движение ресничек 292

11.3.1. Для ресничек и жгутиков характерны колебательные движения - волны изгиба 292

11.3.2. Ресничка содержит пучок параллельных микротрубочек, образующих структуру типа 9 + 2 293

11.3.3. Микротрубочки - полые цилиндры, образованные молекулами тубулина 294

11.3.4. Вдоль стенки дублета микротрубочек проходит длинная тонкая нить 295

11.3.5. Аксонема ресничек и жгутиков содержит белковые связки, «ручки» и «спицы» 295

11.3.6. Аксонема движется благодаря скольжению микротрубочек 297

11.3.7. За скольжение ответствен динеин 297

11.3.8. Скольжение микротрубочек должно регулироваться, чтобы оно могло вызвать изгиб ресничек 298

11.3.9. Аксонему можно изучать генетическими методами 298

11.3.10. Центриоли выполняют в клетке две различные функции 299

11.3.11. Новые центриоли обычно возникают путем дупликации уже имеющихся 301

Заключение 302

11.4. Цитоплазматические микротрубочки 302

11.4.1. Микротрубочки - это высоколабильные структуры, чувствительные к антимитотическим агентам 302

11.4.2. Противоположные концы микротрубочек различны и растут с разной скоростью 303

11.4.3. Гидролиз нуклеотида усиливает нестабильность медленно растущих микротрубочек 304

11.4.4. Большинство микротрубочек в животных клетках растет от центросомы, которая служит центром организации микротрубочек 306

11.4.5. Динамическая нестабильность микротрубочек может служить одной из основ клеточного морфогенеза 308

11.4.6. Микротрубочки постепенно «созревают» благодаря посттрансляционным модификациям, которым подвергаются их тубулиновые субъединицы 309

11.4.7. Свойства цитоплазматических микротрубочек изменяются под влиянием белков, которые с ними связаны 310

11.4.8. Микротрубочки часто направляют передвижение органелл в цитоплазме 311

11.4.9. Кинезин и цитоплазматический динеин осуществляют движение пузырьков вдоль микротрубочек аксона в противоположных направлениях, используя энергию гидролиза АТР 311

11.4.10. Микротрубочки определяют местоположение эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи внутри клетки 312

Заключение 313

11.5. Промежуточные филаменты 313

11.5.1. Промежуточные филаменты образуются из фибриллярных полипептидов четырех типов 314

11.5.2. Промежуточные филаменты образуются из димерных субъединиц со стержневидным срединным доменом 316

11.5.3. Промежуточные филаменты простираются от ядерной оболочки до периферии клетки 316

11.5.4. Сборка промежуточных филаментов может контролироваться с помощью фосфорилирования 317

11.5.5. Ядерная ламина образована особым классом промежуточных филаментов 318

11.5.6. Кератиновые филаменты удивительно разнообразны 318

11.5.7. Какова функция промежуточных филаментов? 319

Заключение 320

11.6. Организация цитоскелета 320

11.6.1. В цитоплазме имеется сложная трехмерная сеть белковых нитей 321

11.6.2. Насколько упорядочена организация цитоплазмы? 322

11.6.3. Растягивание актинового кортекса способно вызывать поляризацию клетки, необходимую для ее направленного движения 323

11.6.4. Относительная роль актиновых филаментов и микротрубочек в миграции зависит от типа клеток 324

11.6.5. Натяжение актинового кортекса, возможно, помогает управлять движением животных клеток 325

11.6.6. Движению переднего края мигрирующей клетки может способствовать эндоцитозный цикл 327

11.6.7. Общими организаторами цитоскелета могут быть микротрубочки 327

11.6.8. Структурная организация цитоскелета одной клетки может передаваться соседним клеткам 328

11.6.9. В основе изгибания эпителиальных слоев у зародыша лежат координированные сокращения цитоскелета 329

11.6.10. . Развитие волосковых клеток в улитке внутреннего уха зависит от точного контроля полимеризации актина 330

Заключение 332

Литература 332

12. Межклеточная сигнализация 338

12.1. Три стратегии химической сигнализации: использование гормонов, локальных химических медиаторов и нейромедиаторов 339

12.1.1. Эндокринные клетки и нервные клетки специализированы для разных типов химической сигнализации 339

12.1.2. Главным регулятором эндокринной системы служит гипоталамус 340

12.1.3. Разные клетки по-разному реагируют на один и тот же сигнал 345

12.1.4. Реакция клетки на химический сигнал может быть в одних случаях быстрой и кратковременной, в других - медленной и продолжительной 345

12.1.5. Только жирорастворимые сигнальные молекулы могут самостоятельно проникать в клетку 346

12.1.6. Локальные химические медиаторы после их секреции быстро разрушаются, подвергаются обратному захвату или иммобилизуются 347

12.1.7. У млекопитающих клетки всех тканей непрерывно выделяют простагландины 348

Заключение 349

12.2. Сигнализацня с участием внутриклеточных рецепторов: механизмы действия стероидных гормонов 349

12.2.1. Комплексы стероидных гормонов с рецепторами присоединяются к специфическим последовательностям ДНК и регулируют транскрипцию генов 349

12.2.2. Стероидные гормоны часто вызывают и первичный, и вторичный ответ 351

12.2.3. В разных клетках-мишенях стероидные гормоны регулируют активность разных генов 352

Заключение 353

12.3. Механизмы передачи сигнала с участием рецепторных белков клеточной поверхности 359

12.3.1. Известны по меньшей мере три класса белковых рецепторов клеточной поверхности:

образующие канал, сопряженные с G-белками и каталитические 354
12.3.2. Циклический AMP -вездесущий посредник в животных клетках 355
12.3.3. Рецептор и аденилатциклаза - это отдельные белки, которые функционально взаимодействуют в плазматической мембране 356
12.3.4. Рецепторы активируют аденилатциклазу через стимулирующий G-белок (G_s) 357
12.3.5. G_s-белок - гетеротример, диссоциирующий при активации на субъединицы 357
12.3.6. Рецепторы подавляют активность аденилатциклазы через ингибирующий G-белок (G_i) 360
12.3.7. Ионы Ca^{2+} запасаются в специальном внутриклеточном компартменте 361
12.3.8. Ион Ca^{2+} действует как вездесущий внутриклеточный посредник 363
12.3.9. Инозитолтрисфосфат ($Ins\ P_3$) сопрягает активацию рецептора с освобождением Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ 363
12.3.10. Диацилглицерол, образующийся при гидролизе PIP_2, активирует протеинкиназу С 365
12.3.11. Так называемые ras-онкогены кодируют новый класс G-белков, участвующих в регуляции клеточного деления 367
12.3.12. Активаторы G-белков образуют большое семейство гомологичных гликопротеинов, семикратно пронизывающих мембрану 368
12.3.13. Многие каталитические рецепторы -гликопротеины с тирозин-специфической протеинкиназной активностью, однократно пронизывающие мембрану 369
12.3.14. Продукты некоторых онкогенов -это аномальные каталитические рецепторы с нерегулируемой киназной активностью 370
Заключение 371
12.4. Механизм действия циклического AMP и ионов кальция 372
12.4.1. cAMP активирует cAMP-зависимую протеинкиназу 372
12.4.2. cAMP ингибирует внутриклеточную протеинфосфатазу 374
12.4.3. Кальмодулин является вездесущим внутриклеточным рецептором для ионов кальция 375
12.4.4. Пути с участием cAMP и Ca^{2+} взаимодействуют между собой 376
12.4.5. cGMP тоже служит внутриклеточным посредником 377
12.4.6. Использование вторичных посредников и ферментных каскадов позволяет в огромной степени усиливать реакцию на внеклеточные сигналы 378
12.4.7. Концентрация какого-либо вещества может быстро изменяться лишь в том случае, если оно имеет короткое время жизни 378
12.4.8. Клетки могут резко отвечать на плавное повышение концентрации внеклеточного сигнала 380
Заключение 382

12.5. Адаптация клеток-мишеней 383
12.5.1. Некоторые формы десенсибилизации - результат эндоцитоза поверхностных рецепторов 383
12.5.2. Десенсибилизация часто бывает связана с фосфорилированием рецепторов 384
12.5.3. Некоторые формы десенсибилизации связаны с изменениями не в рецепторах, а в G-белках 384
12.5.4. Адаптация играет центральную роль в бактериальном хемотаксисе 385
12.5.5. В бактериальном хемотаксисе участвуют четыре гомологичных трансмембранных рецептора 387
12.5.6. Адаптация обусловлена метилированием белков 388
12.5.7. Активация рецептора и изменения во вращении жгутиков сопряжены через каскад фосфорилирования белков 389
Заключение 390
Литература 391

13. Рост и деление клеток 394
13.1. Фазы клеточного цикла и их причинные взаимосвязи 394
13.1.1. Репликация ядерной ДНК происходит в определенный период, составляющий часть интерфазы 395
13.1.2. Клеточный цикл легче всего изучать на культурах in vitro 396
13.1.3. Критические события клеточного цикла наступают внезапно на фоне непрерывного роста клеток 399
13.1.4. Синтез ДНК запускается изменением в цитоплазме - появлением активатора S-фазы 399
13.1.5. В каждом цикле весь геном реплицируется только один раз 400
13.1.6. Какой-то цитоплазматический сигнал задерживает подготовку к митозу, пока не завершена репликация ДНК 401
13.1.7. Митоз запускается «М-стимулирующим фактором» (MPF) 402
13.1.8. События хромосомного цикла –связанные между собой звенья одной цепи 403
13.1.9. Во время ранних делений дробления, когда клетки не растут, клеточный цикл бывает укорочен 403
13.1.10. М-стимулирующий фактор (MPF) вызывает митоз у самых разнообразных клеток 404
13.1.11. MPF генерируется цитоплазматическим осциллятором 405
Заключение 407

13.2. Дрожжи как модельная система 407

13.2.1. Каждая мутация, затрагивающая цикл деления дрожжевой клетки, останавливает или нарушает ход этого цикла в определенной его фазе 409

13.2.2. Дрожжевые мутанты *cdc* могут быть использованы для анализа сопряжения между событиями клеточного цикла 410

13.2.3. Регуляция размеров клетки зависит от факторов контроля клеточного цикла, действующих в точке старта 411

13.2.4. Клетки проходят через точку старта только после достижения критических размеров 411

13.2.5. Прохождение через точку старта зависит от протеинкиназы, родственной М-стимулирующему фактору (MPF) 413

Заключение 414

13.3. Регуляция клеточного деления у многоклеточных организмов 414

13.3.1. Различия в частоте деления клеток обусловлены разной длительностью паузы после митоза 414

13.3.2. Когда условия для роста становятся неблагоприятными, клетки животных, так же как и дрожжевые клетки, останавливаются в критической точке в G_1 в точке рестрикции 416

13.3.3. Длительность цикла пролиферирующих клеток, по-видимому, имеет вероятностный характер 417

13.3.4. Для пролиферации клеток разного типа требуются разные факторы роста 417

13.3.5. Соседние клетки конкурируют за факторы роста 419

13.3.6. Нормальные животные клетки в культуре перестают делиться при откреплении от субстрата 420

13.3.7. Деление клеток сопровождается изменениями в межклеточных соединениях 421

13.3.8. Клетки, которые не должны делиться, переходят в состояние покоя- G_0 422

13.3.9. Хромосомный цикл может становиться независимым от роста клеток 422

13.3.10. Вероятность перехода в G_0 обычно увеличивается с числом клеточных делений: старение клетки 423

Заключение 425

13.4. Гены «социального контроля» клеточного деления 425

13.4.1. Трансформация клетки в культуре позволяет выявлять гены, участвующие в социальном контроле клеточного деления 426

13.4.2. Опухолеродные вирусы служат источником легко клонируемых онкогенов 427

13.4.3. Опухоли, возникающие разными способами, содержат мутации одних и тех же протоонкогенов 428

13.4.4. Некоторые протоонкогены кодируют факторы роста или рецепторы факторов роста 429

13.4.5. Некоторые протоонкогены кодируют внутриклеточные медиаторы, участвующие в стимуляции деления клеток 430

13.4.6. Влияние онкогенов на регуляцию клеточного деления тесно связано с воздействием на адгезию клеток 431

13.4.7. Связь между клеточной пролиферацией и клеточной адгезией пока еще не понятна 433

13.4.8. Позиционные сигналы и автономные клеточные программы контролируют деление клеток в растущем организме 436

Заключение 437

13.5. Механика клеточного деления 438

13.5.1. М-фазу традиционно подразделяют на шесть стадий 439

13.5.2. Образование митотического веретена в М-фазе клетки сопровождается разительными изменениями динамических свойств микротрубочек 439

13.5.3. Во время митоза хромосомы прикрепляются к микротрубочкам своими кинетохорами 445

13.5.4. По-видимому, кинетохоры захватывают плюс-концы микротрубочек, отходящих от полюса веретена 447

13.5.5. Сестринские хроматиды прикрепляются своими кинетохорами к противоположным полюсам веретена 448

13.5.6. Сбалансированные силы, направленные к противоположным полюсам, удерживают хромосомы в метафазной пластинке 449

13.5.7. В анафазе сестринские хроматиды внезапно расходятся 451

13.5.8. Расхождение хромосом в анафазе состоит из двух процессов 452

13.5.9. Во время анафазы А происходит распад микротрубочек, прикрепленных к кинетохорам 452

13.5.10. В анафазе В, возможно, действуют две различные силы 454

13.5.11. В телофазе ядерная оболочка образуется сначала вокруг отдельных хромосом 456

13.5.12. Метафазу и интерфазу можно рассматривать как альтернативные «устойчивые» состояния клетки 457

13.5.13. Митотическое веретено определяет место, где происходит разделение цитоплазмы при цитокинезе 458

13.5.14. Актин и миозин создают силу, необходимую для цитокинеза 459

13.5.15. У высших растений цитокинез осуществляется совершенно иным способом 460

13.5.16. Цитокинез должен обеспечить правильное распределение цитоплазматических органелл 463

13.5.17. В особых случаях определенные клеточные компоненты могут передаваться только одной дочерней клетке 464

13.5.18. Сложный митотический процесс высших организмов развился постепенно из механизмов деления прокариот 465

Заключение 467
Литература 468

14. Клеточная адгезия, соединения между клетками и внеклеточный матрикс 473

14.1 Межклеточные соединения 474

14.1.1. Плотные соединения создают в эпителиальных клеточных пластах барьер проницаемости 475

14.1.2. Прикрепительные контакты связывают цитоскелет клетки с цитоскелетом соседней
клетки или с внеклеточным матриксом 477

14.1.3. Адгезионные соединения связывают внутриклеточные пучки актиновых филаментов с такими же пучками других клеток или с внеклеточным матриксом 478

14.1.4. Десмосомы связывают промежуточные филаменты соседних клеток; полудесмосомы связывают эти филаменты с базальной мембраной 480

14.1.5. Щелевые контакты позволяют малым молекулам переходить непосредственно из клетки в клетку 481

14.1.6. Коннексоны щелевого контакта являются олигомерами трансмембранного белка, несколько раз пронизывающего мембрану 482

14.1.7. Большинство клеток в ранних эмбрионах сообщается через щелевые контакты 484

14.1.8. Проницаемость щелевых контактов может регулироваться 485

Заключение 486

14.2. Внеклеточный матрикс 486

14.2.1. Внеклеточный матрикс состоит в основном из фибриллярных белков, погруженных в гидратированный полисахаридный гель 487

14.2.2. Цепи гликозаминогликанов занимают большие объемы пространства и образуют гидратированные гели 488

14.2.3. Гиалуроновая кислота, по-видимому, облегчает миграцию клеток во время морфогенеза и регенерации тканей 489

14.2.4. Протеогликаны состоят из длинных цепей гликозаминогликана, ковалентно связанных с сердцевинным белком 490

14.2.5. Цепи гликозаминогликанов могут располагаться во внеклеточном матриксе высокоупорядоченным образом 492

14.2.6. Главный белок внеклеточного матриксаколлаген 494

14.2.7. Секретируемые коллагены имеют на обоих концах неспиральные участки 496

14.2.8. Молекулы проколлагена типов I, II и III после их секреции расщепляются с образованием молекул коллагена, которые объединяются в фибриллы 497

14.2.9. Организация коллагеновых фибрилл во внеклеточном матриксе приспособлена к потребностям ткани 499

14.2.10. Клетки могут участвовать в организации секретируемых ими коллагеновых фибрилл, изменяя натяжение матрикса 499

14.2.11. Молекулы коллагена типа IV организованы в ламинарную сеть 501

14.2.12. Эластин - это белок с изменчивой случайной конформацией и поперечными сшивками, придающий тканям упругость 502

14.2.13. Фибронектин - внеклеточный гликопротеин, способствующий адгезии между клеткой и матриксом 504

14.2.14. Множественные формы фибронектина синтезируются при альтернативном сплайсинге РНК 505

14.2.15. Базальная мембрана -это специализированная форма внеклеточного матрикса, содержащая в основном коллаген типа IV, протеогликаны и ламинин 506

14.2.16. Ба зальные мембраны выполняют многообразные и сложные функции 509

14.2.17. Интегрины способствуют связыванию клеток с внеклеточным матриксом 509

14.2.18. Цитоскелет и внеклеточный матрикс взаимодействуют через плазматическую мембрану 511

Заключение 5 1 2

14.3. Межклеточное узнавание и адгезия 513

14.3.1. Миксамебы слизевика при голодании агрегируют с образованием многоклеточных плодовых тел 514

14.3.2. Амебы слизевика агрегируют в результате хемотаксиса 515

14.3.3. Межклеточная адгезия у слизевиков зависит от специфических гликопротеинов клеточной поверхности 517

14.3.4. Диссоциированные клетки позвоночных могут вновь ассоциироваться в организованную ткань благодаря селективной межклеточной адгезии 517

14.3.5. Реагрегация диссоциированных клеток позвоночных зависит от тканеспецифических систем узнавания 519

14.3.6. У позвоночных в Ca^{2+} -независимой межклеточной адгезии участвуют гликопротеины плазматической мембраны из суперсемейства иммуноглобулинов; таковы, например, молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM) 520

14.3.7. Кадгерины - семейство гомологичных глиопротеинов клеточной поверхности - осуществляют у позвоночных Ca^{2+} -зависимую межклеточную адгезию 521

14.3.8. Молекулы клеточной поверхности, участвующие в адгезии между клетками и между клетками и матриксом, можно рассматривать как элементы морфогенетического кода 522

14.3.9. Высокоподвижные клетки служат чувствительными детекторами малых различий в адгезивности 524

14.3.10. Временные контакты могут инициировать тканеспецифическую межклеточную адгезию, которая затем стабилизируется контактами соединительного комплекса 524

Заключение 525

Литература 526