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

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

2-Е ИЗДАНИЕ, ПЕРЕРАБОТАННОЕ И ДОПОЛНЕННОЕ

В 3 томах

3

Перевод с английского
канд. биол. наук В. П. Коржа,
канд. биол. наук Н.В. Сониной,
канд. биол. наук Н. М. Руткевич,
канд. биол. наук Г. И. Эйснер,
Т. Д. Аржановой, Г. В. Крюковой, А. В. Никашина

под редакцией акад. Г. П. Георгиева, д-ра биол. наук Ю.С. Ченцова

«Мир»

Москва 1994

ББК 28.070
М75
УДК 576.32/36

Издание выпущено в счет дотации, выделенной Комитетом РФ по печати

Авторы: Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж., Рэфф М., Роберте К., Уотсон Дж.
Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд., М75 перераб. и доп. Т. 3. Пер. с англ.-М.: Мир, 1994.-504 с., ил.
ISBN 5-03-001985-5

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. 3 рассматриваются проблемы клеточной дифференцировки и организации специализированных тканей, анализируются общебиологические и молекулярно-генетические аспекты злокачественного перерождения клеток.

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

ББК 28.070

Учебное издание

Брюс Албертс,
Деннис Брей,
Джулиан Льюис,
Мартин Рэфф,
Кейт Робертс
Джеймс Д. Уотсон

МОЛЕКУЛЯРНАЯ
БИОЛОГИЯ
КЛЕТКИ

2-е издание, переработанное и дополненное

В 3-х томах

Том 3

Лицензия Л.Р. № 010174 от 22.01.92 г.
Зав. редакцией канд. биол. наук М. Д. Гроздова
Ведущие редакторы: Ю. И. Лашкевич, М. Б. Николаева, М. Р. Погосбекова
Редактор Н. В. Пересыпкина
Художник Е. И. Волков
Художественные редакторы А. Е. Волков, Л. М. Аленичева
Технический редактор М. А. Страшнова
Корректор Н. Н. Светлова

ИБ № 7581

Сдано в набор 19.11.92г. Подписано к печати 21.09.94г. Формат 84 x 108 1/16. Бумага офсетная. Печать офсетная. Гарнитура таймс. Объем 15,75 бум. л. Усл. печ.л. 52,93. Усл.кр.-отт. 103,74. Уч.изд.л. 55,25. Изд. № 4/7793. Тираж 10000 экз. Зак. 2292.

Издательство «Мир» Комитета Российской Федерации по печати 129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., д. 2

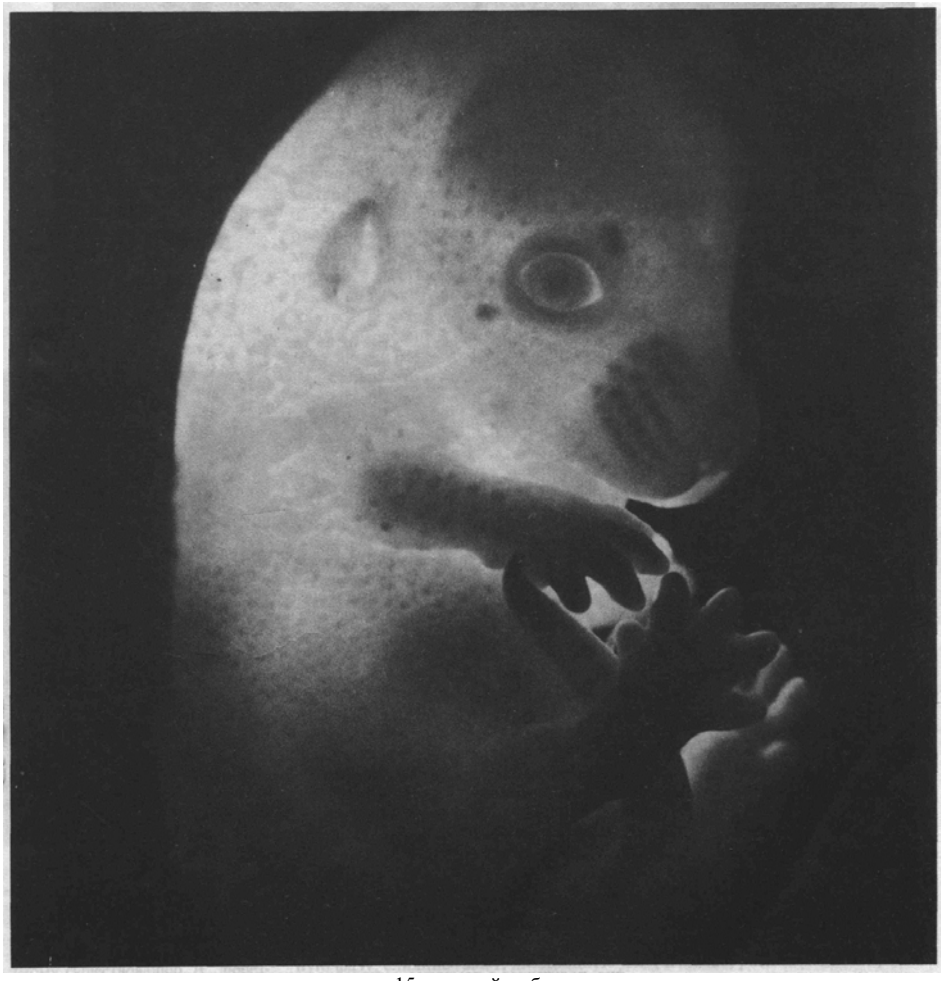
Можайский полиграфкомбинат Комитета Российской Федерации по печати 143200, г. Можайск, ул. Мира, 93

Редакция литературы по биологии

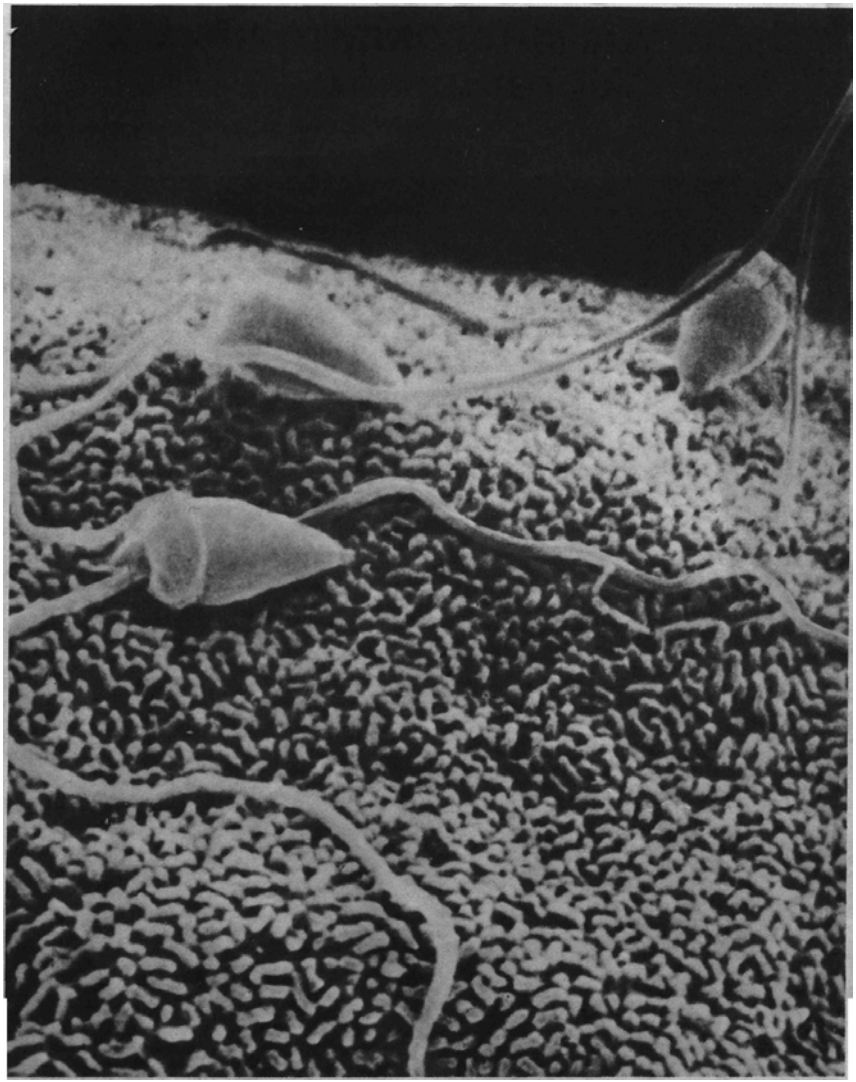
ISBN 5-03-001988-X (русск.)
ISBN 5-03-001985-5
ISBN 0-8240-3965-6 (англ.)

© 1989 by Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and James D. Watson
© перевод на русский язык, Корж В. П., Сонина Н. В., Руткевич Н.М., Эйснер Г. И., Никашин А. В., Аржанова Т. Д., Крюкова Г. В.
1994

III От клеток к многоклеточным организмам



15-дневный эмбрион мыши



Сперматозоид на поверхности яйцеклетки морского ежа. Фотография, полученная с помощью растрового электронного микроскопа. (С любезного разрешения Brian Dale.)

15 Половые клетки и оплодотворение

Размножение возможно и без полового процесса. Одноклеточные организмы могут размножаться простым митотическим делением. Многие растения размножаются вегетативным путем, образуя многоклеточные дочерние особи, которые впоследствии отделяются от материнского организма. Подобные явления имеют место и в животном царстве: так, одиночная многоклеточная гидра производит потомков, отпочковывая их от своего тела (рис. 15-1). Актинии и некоторые морские черви делятся на две половинки, каждая из которых регенерирует недостающую часть организма. У ящериц встречаются даже такие виды, которые представлены лишь женскими особями и размножаются без спаривания. Такого рода **бесполое размножение - процесс** весьма несложный и не ведет к образованию новых форм: все потомство генетически идентично родительскому организму. В отличие от этого при **половом размножении** происходит смешивание геномов двух разных особей данного вида, и образующиеся в результате потомки обычно генетически отличаются друг от друга и от обоих родителей. Половое размножение, по-видимому, имеет большие преимущества, так как оно свойственно подавляющему большинству растений и животных. Даже многие прокариоты и некоторые другие организмы, обычно размножающиеся неполовым путем, в некоторых случаях переходят к половому размножению, в результате которого возникают новые комбинации генов. В этой главе мы познакомимся с клеточными механизмами, функционирующими при половом размножении, но прежде чем переходить к подробностям, мы рассмотрим причины возникновения этого аппарата и преимущества, которые он дает.

15.1. Преимущества полового процесса

Цикл полового размножения включает чередование **гаплоидных** поколений клеток, каждая из которых имеет одинарный набор хромосом, с **диплоидными** поколениями, где клетки обладают двойным хромосомным набором (рис. 15-2). Смешивание геномов происходит благодаря слиянию двух гаплоидных клеток, из которых образуется одна диплоидная. В свою очередь новые гаплоидные клетки образуются из диплоидных в результате деления особого типа, называемого *мейозом.* В процессе генетической рекомбинации в мейозе парные хромосомы обмениваются ДНК, после чего новые их комбинации расходятся в разные клетки, которые теперь содержат одинарные наборы хромосом (см. разд. 15.2.2). В результате каждая клетка нового гаплоидного поколения получает новое сочетание генов, происходящих частично от одной родительской клетки предыдущего гаплоидного поколения и частично от другой. Таким образом, благодаря циклам, включающим гаплоидную фазу, слияние гамет, диплоидную фазу и мейоз, распадаются старые комбинации генов и создаются новые.

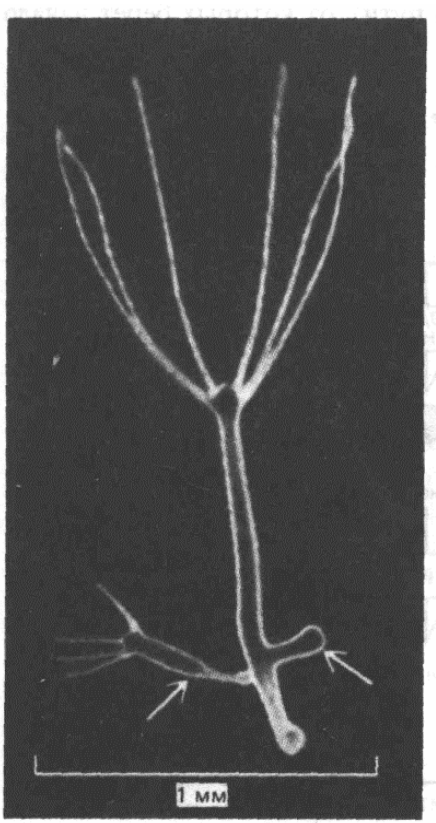


Рис. 15-1. Гидра, от которой отпочковываются две новые особи (указаны *стрелками).* Потомки генетически идентичны родительскому организму; они в конце концов, отделяются и переходят к независимому существованию. (С любезного разрешения Matai Hornbruch.)

15.1.1. У многоклеточных животных диплоидная фаза бывает сложной и продолжительной, а гаплоидная - простой и кратковременной

В ходе полового цикла клетки размножаются путем обычного митотического деления - чаще всего во время диплоидной фазы (см. разд. 13.5). Исключение составляют некоторые простые организмы, например дрожжи (путем митоза у них размножаются только гаплоидные клетки, диплоидная же клетка, образовавшись, сразу переходит к мейозу), а также растения, хотя и не в столь яркой форме; у последних митотические деления происходят и в гаплоидной, и в диплоидной фазах. При этом у всех растений, за исключением наиболее примитивных, гаплоидная фаза очень короткая и простая, тогда как диплоидная представлена длительным периодом развития и роста. Почти у всех многоклеточных животных, и в том числе у всех позвоночных, гаплоидная фаза еще короче. Практически весь свой жизненный цикл они проводят в диплоидном состоянии; гаплоидные клетки живут очень недолго, они совсем не делятся и специально приспособлены для полового слияния (рис. 15-3).

Гаплоидные клетки, которые сливаются при оплодотворении, называются **гаметами.** В типичном случае образуются гаметы двух типов: крупные неподвижные *яйцеклетки* (или *яйца)* и мелкие, способные передвигаться *спермии* (или *сперматозоиды)* (рис. 15-4). Во время диплоидной фазы, начинающейся сразу после слияния гамет, клетки размножаются и специализируются, образуя сложный многоклеточный организм. У большинства животных (но не растений) полезно различать клетки **зародышевой линии** (зачаткового пути), от которых берет начало



Рис. 15-2. Жизненный цикл организма, размножающегося половым путем, включает чередование диплоидного поколения клеток с гаплоидным.

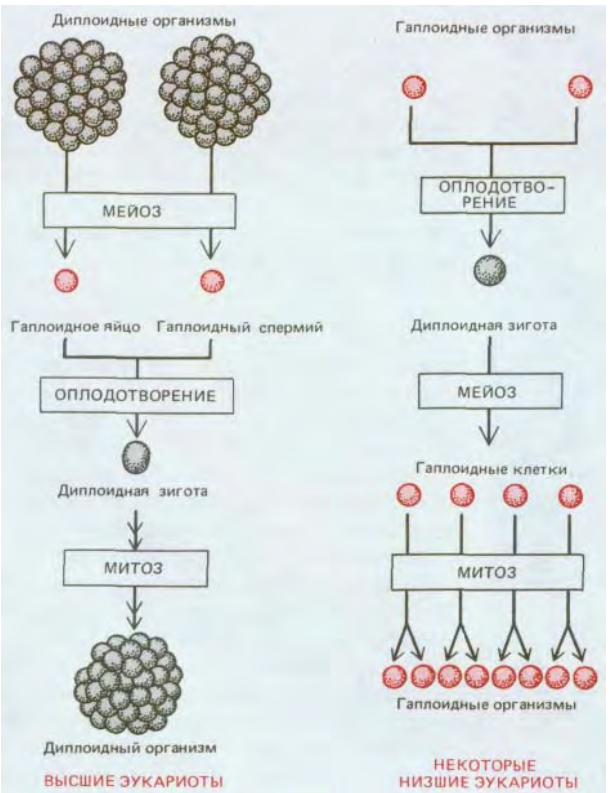


Рис. 15-3. Эта схема показывает, как размножаются в диплоидной фазе клетки высших эукариот, образуя многоклеточный организм, в котором гаплоидными становятся только гаметы. Напротив, у некоторых низших эукариот размножаются именно гаплоидные клетки, а единственной диплоидной клеткой является зигота, которая существует очень недолго после оплодотворения. Гаплоидные клетки выделены цветом

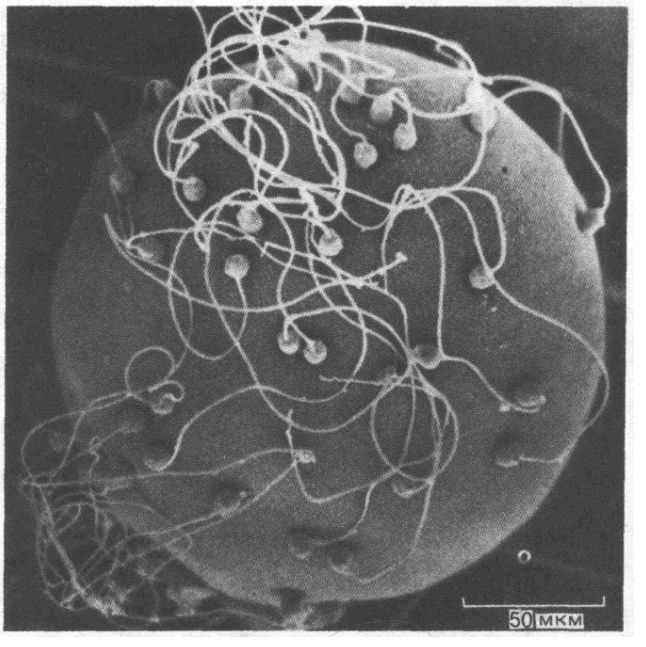


Рис. 15-4. Яйцеклетка двустворчатого моллюска с многочисленными спермиями, прикрепившимися к ее поверхности. Микрофотография получена с помощью сканирующего электронного микроскопа. (С любезного разрешения David Epel.)

следующее поколение гамет, и соматические клетки, образующие весь остальной организм и не оставляющие потомства. В некотором смысле соматические клетки нужны только для того, чтобы способствовать выживанию и размножению клеток зачаткового пути **(половых клеток).**

15.1.2. Половое размножение делает организмы конкурентоспособными в условиях изменчивости окружающей среды

Аппарат полового размножения сложен, и средства, «затрачиваемые» на него, очень велики. Какие же преимущества он дает, и почему он выработался в процессе эволюции? При наличии генетической рекомбинации родительские особи производят потомков, которые будут отличаться от них самым непредсказуемым образом, причем среди новых случайных сочетаний генов, по крайней мере, половина может оказаться хуже родительских генотипов. Но если это так, то почему половое размножение должно быть выгоднее бесполого, при котором потомки будут сохранять все родительские гены? Хотя для специалистов по генетике популяций этот вопрос все еще до конца не ясен, основной вывод, по-видимому, состоит в том, что перетасовка генов в процессе полового размножения способствует выживанию вида при изменении условий среды. Если родительская особь производит много потомков с самыми разнообразными комбинациями генов, имеется больше шансов на то, что хотя бы один потомок окажется хорошо приспособленным для будущих жизненных обстоятельств, какими бы они ни были. Для объяснения преимуществ полового размножения в борьбе за существование было предложено много гипотез. Одна из них дает представление о том, какими могли быть первые этапы эволюции полового размножения. Ход эволюции в значительной мере зависит от мутаций, которые изменяют существующие гены, образуя вместо них новые *аллели* (варианты) этих генов. Предположим, что у двух особей в некоторой популяции возникли благоприятные мутации, затрагивающие разные *генетические локусы,* а значит, и разные функции.

У бесполого вида каждая из этих особей даст начало клону мутантных потомков, и два новых клона будут конкурировать до тех пор, пока один из них не одержит верх. Один из благоприятных аллелей, появившихся благодаря мутациям, будет, таким образом, распространяться, тогда как другой в конце концов исчезнет. Теперь представим себе, что один из исходных мутантов обладает генетически обусловленной особенностью, позволяющей ему время от времени включать в свой геном гены из других клеток. В условиях борьбы за существование приобретение генов у клеток конкурирующего клона равносильно созданию клетки, несущей все благоприятные мутации. Такая клетка будет обладать наибольшей приспособленностью, и полученные ею преимущества обеспечат распространение в популяции особенности, позволяющей включать в свой геном гены других клеток. Естественный отбор будет благоприятствовать такому примитивному половому размножению.

Какими бы ни были истоки полового размножения, поразительно то, что эволюция практически всех сложных организмов, доживших до наших дней, протекала благодаря чередованию многих поколений, размножавшихся половым путем. Несмотря на обилие бесполых организмов, они, по-видимому, остались весьма примитивными. Почему? Возможно, ответ состоит в том, что половое размножение создает особые возможности для генетического обновления, ведущего к развитию сложных организмов. Обо всем этом мы будем говорить дальше.

15.1.3. Новые гены появляются в результате дупликаций и дивергенции

Для эволюции сложного организма требуется нечто большее, чем улучшение уже имеющихся генов: нужны новые гены для осуществления новых функций. Как они появляются?

Многие белки многоклеточного животного могут быть сгруппированы в семейства: коллагены, глобины, сериновые протеазы и т. п. Белки одного семейства близки как по своей функции, так и по аминокислотной последовательности. Вряд ли можно сомневаться в том, что гены белков каждого такого семейства произошли от единственного предкового гена в результате процессов *дупликации* и *дивергенции* (разд. 10.5.3). Разные члены одного семейства белков часто бывают характерны для различных тканей тела, где они выполняют похожие, но несколько различающиеся функции. Создание новых генов благодаря дивергенции и специализации имеющихся играло, очевидно, решающую роль в эволюции сложных многоклеточных организмов. В этом отношении диплоидные организмы обладают важным преимуществом: у них имеется добавочная копия каждого гена, и эта копия может мутировать и служить исходным материалом для создания чего-то нового. Гаплоидные виды не могут так же легко вступать на путь, ведущий к увеличению и усложнению генома. Чтобы механизм этих процессов стал ясен, нам нужно будет несколько подробнее рассмотреть связь между половым размножением и диплоидией.

15.1.4. Половое размножение сохраняет диплоидность у диплоидных видов

У диплоидного организма имеются две копии каждого гена - по одной от каждого из родителей; однако для выживания и нормальной жизнедеятельности в большинстве случаев бывает достаточно одной копии. Мутация, нарушающая функцию жизненно важного гена, для гаплоидного организма летальна, но она может оказаться безвредной



Рис. 15-5. Из этой схемы видно, каким образом при половом размножении диплоидные организмы сохраняют диплоидность в ходе эволюции. Для простоты рассматриваются только летальные рецессивные мутации. Аналогичным образом обстоит дело и с вредными рецессивными мутациями.

для диплоида, если затронута лишь одна из двух копии гена, т. е. если организм *гетерозиготен* по мутации. Как правило, в геномах диплоидных организмов содержится много *рецессивных леталей.* Нередко гетерозиготные особи обладают несколько пониженной приспособленностью, поэтому распространение таких аллелей затруднено. Однако даже в том случае, когда приспособленность гетерозигот не снижена, на частоту появления в популяции рецессивных леталей накладывает ограничение половое размножение (рис. 15-5). Если обе родительские особи несут рецессивную летальную мутацию в одном и том же гене, их потомок может унаследовать две мутантные копии этого гена и не получить ни одной нормальной; такой *гомозиготный* организм погибнет, и вместе с ним будут утрачены мутантные копии гена. Чем больше распространен в популяции летальный аллель, тем быстрее он будет элиминироваться. В результате устанавливается равновесие между скоростью элиминации летального аллеля и скоростью его образования за счет новых мутаций. При равновесии рецессивный летальный аллель встречается в популяции достаточно редко (хотя и значительно чаще, чем это было бы у гаплоидного организма): подавляющее большинство особей будут иметь две функциональные копии гена. Сходным образом обстоит дело и с теми рецессивными мутациями, которые просто вредны (ведут к снижению численности потомства), но не летальны. В общем случае при наличии полового размножения и генетической рекомбинации отбор обеспечивает такое положение, при котором у большинства особей в большей части генных локусов остаются две функционально взаимозаменяемые копии гена, т. е. геном сохраняет диплоидность.

Для сравнения рассмотрим популяцию, первоначально состоящую из диплоидных особей, которые размножаются бесполым способом. В отсутствии генетической рекомбинации ничто не препятствует тому, чтобы две копии каждого гена эволюционировали различными путями. Вредные рецессивные мутации будут накапливаться в геноме до тех пор, пока диплоидность не сменится состоянием, при котором общее количество ДНК остается прежним, но сохраняется лишь одна функционирующая копия каждого из первоначальных необходимых генов. Организм становится «функционально гаплоидным». Представление о промежутках времени, необходимых для подобных эволюционных изменений, можно получить, рассматривая эволюцию чукучановых рыб[1]. Эти рыбы происходят от предков, у которых около 50 млн. лет назад произошла полная дупликация прежде диплоидного генома и они стали, таким образом, тетраплоидами. Подсчитано, что около 50% «лишних» пар генов, кодирующих белки, утратили с тех пор свое функциональное значение.

15.1.5. Диплоидный вид обладает лишней копией каждого гена, способной мутировать и выполнять после этого новую функцию

Большинство мутаций являются вредными, поскольку они нарушают функцию гена, которая уже была оптимизирована в ходе естественного отбора. Однако иногда может произойти мутация, которая модифицирует имеющийся ген таким образом, что он приобретает новую полезную функцию. Как правило, такая мутация делает ген неспособным осуществлять свою первоначальную функцию и, если эта функция была жизненно необходимой, гаплоидный организм гибнет. Однако в ди-

---

1)Чукучановые (Catostomidae)-семейство пресноводных рыб отряда карпообразных.- *Прим. ред.*

плоидном организме подобного рода мутация в одной из двух копий гена не просто терпима - она приносит пользу. Даже небольших преимуществ, которые получит организм благодаря новому мутантному гену, будет достаточно, чтобы перекрыть ущерб, нанесенный потерей одной из двух исходных копий гена: гетерозиготная особь будет извлекать пользу как из старой, так и из новой функции гена. Гомозиготы, имеющие две копии старого аллеля или две копии нового, окажутся менее приспособленными. В подобных случаях, когда имеется *преимущество гетерозигот,* мутантный ген быстро распространяется в диплоидной популяции с половым размножением - до тех пор, пока не будет достигнуто равновесие, при котором и старые, и новые аллели представлены с высокой частотой и доля гетерозиготных особей велика. Это явление называется *сбалансированным полиморфизмом.* Однако кое-чем приходится расплачиваться: при скрещивании двух гетерозигот значительная часть потомков в соответствии с обычными законами Менделя окажется гомозиготной и поэтому хуже приспособленной. Но такое положение не будет сохраняться вечно - из него есть выход.

15.1.6. Диплоидный вид может быстро обогащать свой геном, приобретая новые гены

Время от времени у всех организмов происходит спонтанное *удвоение генов:* хромосома, содержащая одну копию гена G, в результате ошибки в репликации ДНК дает начало хромосоме, в которую входят уже две копии этого гена, расположенные одна за другой. Такие дупликации сами по себе не дают никаких преимуществ и встречаются, как правило, у очень немногих особей. Предположим, однако, что дупликация произошла в локусе, содержащем полезный мутантный аллель G*, который с высокой частотой присутствует в популяции в связи с отбором в пользу гетерозигот и сосуществует в геноме с исходным аллелем G (рис. 15-6). Тогда велика вероятность того, что в диплоидной клетке, содержащей хромосому GG (несущую дупликацию), ее гомолог будет содержать аллель G*, так что получится генотип GG/G*. Затем в результате *генетической рекомбинации* в мейозе (см. ниже) могут образоваться гаметы с генотипом GG*. В этих гаметах исходный ген G и мутантный G*. расположенные один за другим, не будут уже двумя аллелями, конкурирующими за один и тот же локус; теперь это два отдельных гена, каждый из которых занимает собственный локус. Такая комбинация выгодна, и она станет быстро распространяться, пока, наконец, вся популяция не будет состоять из гомозигот GG*/GG* (см. рис. 15-6). Преимущество особей с таким генотипом состоит не только в обладании обоими генами - старым G и новым G*, но и в том, что они могут передавать это преимущество всем своим потомкам.

Таким образом, у диплоидного вида с половым размножением могут возникать новые гены в результате мутаций в добавочных копиях имеющихся генов; эти новые гены могут распространиться в популяции благодаря отбору в пользу гетерозигот, причем не будут потеряны и исходные гены; и наконец, новые гены могут дополнительно включаться в геном в результате процессов дупликации генов и генетической рекомбинации. Такая последовательность событий возможна только у диплоидных видов. Обогащение генома у гаплоидного вида связано с большими трудностями. Если в процессе приобретения нового гена вид должен сохранить и старый ген, то ему придется ждать возникновения нужной мутации у одной из очень немногих особей, у которых уже произошла дупликация соответствующего локуса. А поскольку и мутации, и дупликации в определенном локусе происходят очень редко, гаплоидному виду приходится дожидаться совпадения этих событий

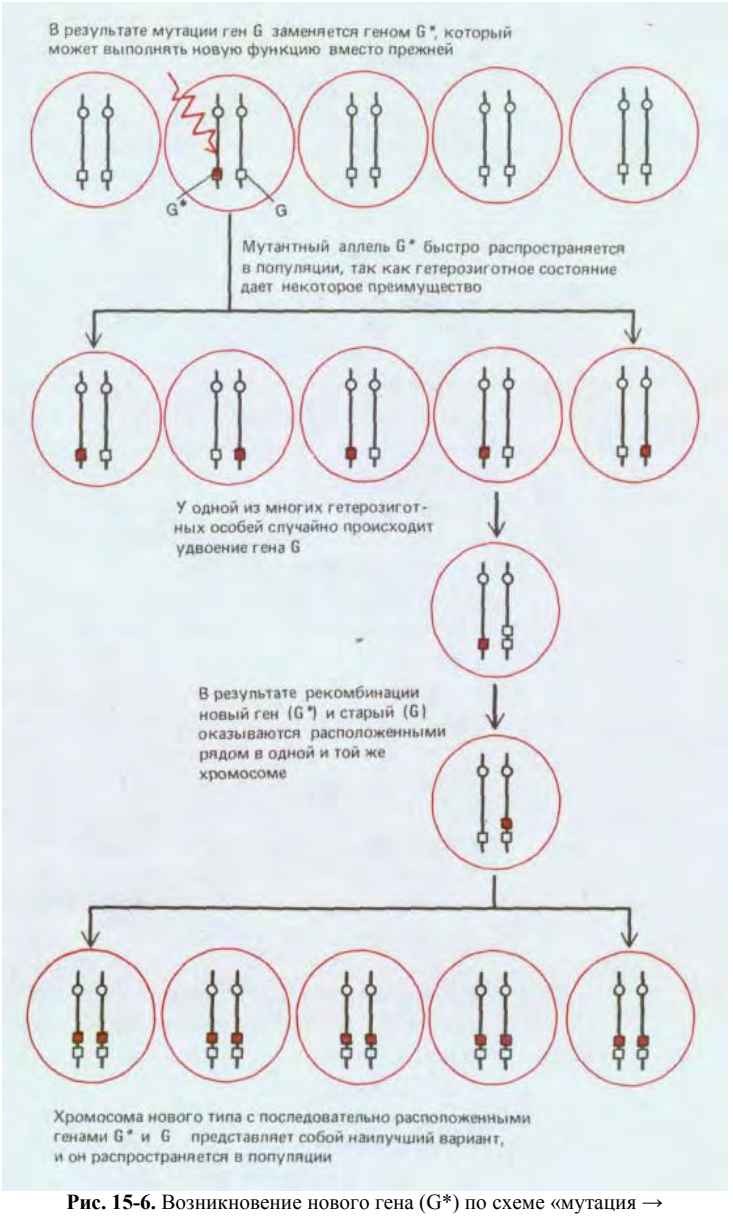


Рис. 15-6. Возникновение нового гена (G*) по схеме «мутация → распространение → дупликация» в процессе полового размножения диплоидного организма.



Рис. 15-7. Образование нового гена у гаплоидного организма. Такая последовательность событий кажется гораздо более простой, чем та, которая показана на рис. 15-6, но требует для реализации значительно больше времени.

чрезвычайно долго (рис. 15-7). Детальные расчеты показывают, что обычно (за исключением ситуаций, когда частота дупликаций генов очень велика) диплоидный организм способен расширять свой геном и добавлять к нему новые гены с новыми функциями в сотни или даже тысячи раз быстрее, чем это происходит у гаплоидного организма. Наиболее ярко различие выражено в отношении тех мутаций, которые происходят с низкой частотой, а именно такие редкие мутации необходимы для обновления генома.

Итак, половое размножение идет «рука об руку» с диплоидностью, которая в свою очередь обеспечивает особо благоприятные условия для создания более крупного, более сложного и более гибкого генома. Конечно, эволюция может протекать по-разному, и указанный нами путь дупликаций и дивергенции генов, безусловно, далеко не единственный. Тем не менее, половое размножение, по-видимому, оказало огромное влияние на истоки и способы распространения в популяции генетических изменений, сделав возможным появление столь сложных организмов, как мы сами.

Теперь можно перейти к детальному описанию клеточных механиз-

мов полового процесса. В последующих разделах сначала будет рассмотрен мейоз, в ходе которого осуществляется генетическая рекомбинация и из диплоидных клеток образуются гаплоидные гаметы; затем мы обратимся к самим гаметам и, наконец, познакомимся с процессом оплодотворения, при котором гаметы сливаются, образуя новый диплоидный организм.

Заключение

При половом размножении происходит циклическое чередование диплоидного и гаплоидного состояний: диплоидная клетка делится путем мейоза, порождая гаплоидные клетки, а гаплоидные клетки попарно сливаются при оплодотворении и образуют новые диплоидные клетки. Во время этого процесса происходит перемешивание и рекомбинация геномов, в результате чего появляются особи с новыми наборами генов. Высшие растения и животные большую часть жизненного цикла проводят в диплоидной фазе, а гаплоидная фаза у них очень короткая. Вероятно, процесс эволюции благоприятствовал половому размножению, так как случайная генетическая рекомбинация увеличивала шансы организмов на то, что хотя бы некоторые из их потомков выживут в непредсказуемо изменчивом мире. Половой процесс необходим также для поддержания диплоидности; он способствует созданию условий для быстрой выработки новых генов у высших растений и животных.

15.2. Мейоз

Понимание того факта, что половые клетки гаплоидны и поэтому должны формироваться с помощью особого механизма клеточного деления, пришло в результате наблюдений, которые к тому же едва ли не впервые навели на мысль, что хромосомы содержат генетическую информацию. В 1883 г. было обнаружено, что ядра яйца и спермия определенного вида червей содержат лишь по две хромосомы, в то время как в оплодотворенном яйце их уже четыре. Хромосомная теория наследственности могла, таким образом, объяснить давний парадокс, состоящий в том, что роль отца и матери в определении признаков потомства часто кажется одинаковой, несмотря на огромную разницу в размерах яйцеклетки и сперматозоида.

Еще один важный смысл упомянутого открытия состоял в том, что половые клетки должны формироваться в результате ядерного деления особого типа, при котором весь набор хромосом делится точно пополам. Деление такого типа носит название **мейоз** (слово греческого происхождения, означающее «уменьшение». Название другого вида деления клеток-митоз-происходит от греческого слова *mitos,* означающего «нить»; в основе такого выбора названия лежит нитеподобный вид хромосом при их конденсации во время деления ядра - данный процесс имеет место как при обычном, так и при мейотическом делении.) Поведение хромосом во время мейоза, когда происходит редукция их числа, оказалось более сложным, чем предполагали раньше. Поэтому важнейшие особенности мейотического деления удалось установить только к началу 30-х годов в итоге огромного числа тщательных исследований, объединивших цитологию и генетику.

15.2.1. При мейозе происходит не одно, а два деления ядра

Диплоидные ядра содержат по две копии каждой хромосомы (это не относится лишь к половым хромосомам), одна из которых происходит от мужского родителя, а другая - от женского. Эти две копии называются **гомологами,** и в большинстве клеток они ведут себя как совершенно независимые хромосомы. Когда благодаря репликации ДНК каждая хромосома удваивается, две ее копии остаются сначала соединенными вместе (их называют **сестринскими хроматидами).** При обычном клеточном делении (описанном в гл. 13) сестринские хроматиды выстраиваются в экваториальной плоскости веретена таким образом, что их кинетохорные волокна направлены к противоположным полюсам. В результате сестринские хроматиды в анафазе отделяются друг от друга (теперь они называются хромосомами), и каждая дочерняя клетка наследует по одной копии каждого гомолога (см. разд. 13.5). Между тем гаплоидные гаметы, образовавшиеся при делении диплоидной клетки путем мейоза, содержат по одной хромосоме каждой гомологичной пары (отцовского или материнского происхождения), т. е. только половину исходного числа хромосом. В связи с этим к аппарату клеточного деления здесь предъявляется дополнительное требование: гомологи должны иметь возможность «узнавать» друг друга и соединяться в пары, перед тем как они выстроятся на экваторе веретена. Такое спаривание, или конъюгация, гомологичных хромосом материнского и отцовского происхождения происходит только в мейозе (рис. 15-8); подробности этого процесса будут рассмотрены позже.

При наличии механизма конъюгации отцовских и материнских гомологичных хромосом и их последующего расхождения мейоз мог бы в принципе осуществляться путем видоизменения одного митотического цикла, если бы в нем выпала фаза удвоения хромосом (S) и гомологи спаривались перед фазой М. Тогда в результате следующего клеточного деления могли бы непосредственно образоваться две гаплоидные клетки. Однако на самом деле процесс мейоза более сложен. Перед конъюгацией каждый из гомологов подвергается удвоению, образуя пару тесно связанных сестринских хроматид аналогично тому, как это происходит при обычном клеточном делении. Специфические особенности мейоза проявляются лишь после завершения репликации ДНК. Вместо того чтобы отделиться друг от друга, сестринские хроматиды ведут себя как единое целое (как будто дупликация хромосом не произошла): каждый дуплицированный гомолог конъюгирует с партнером, образуя структуру, состоящую из четырех хроматид и называемую *бивалентом.* Бивалент располагается на экваторе веретена, и в анафазе дуплицированные гомологи (каждый из которых состоит из двух сестринских хроматид) отделяются друг от друга и расходятся к противоположным полюсам причем в каждом из них две сестринские хроматиды остаются соединенными. Таким образом, при **первом делении мейоза** каждая дочерняя клетка наследует две копии одного из двух гомологов и поэтому содержит диплоидное количество ДНК. Однако она отличается от обычных диплоидных клеток в двух отношениях: 1) обе копии ДНК каждой хромосомы происходят лишь от одной из двух гомологичных хромосом, имевшихся в исходной клетке (хотя, как мы увидим, в результате генетической рекомбинации происходит некоторое перемешивание материнских и отцовских ДНК), и 2) эти две копии клетка получает в виде тесно связанных сестринских хроматид, составляющих единую хромосому (рис. 15-8).

Теперь образование гаплоидных ядер гамет может очень просто происходить в результате **второго деления мейоза,** при котором хромосомы выстраиваются на экваторе нового веретена и без дальнейшей

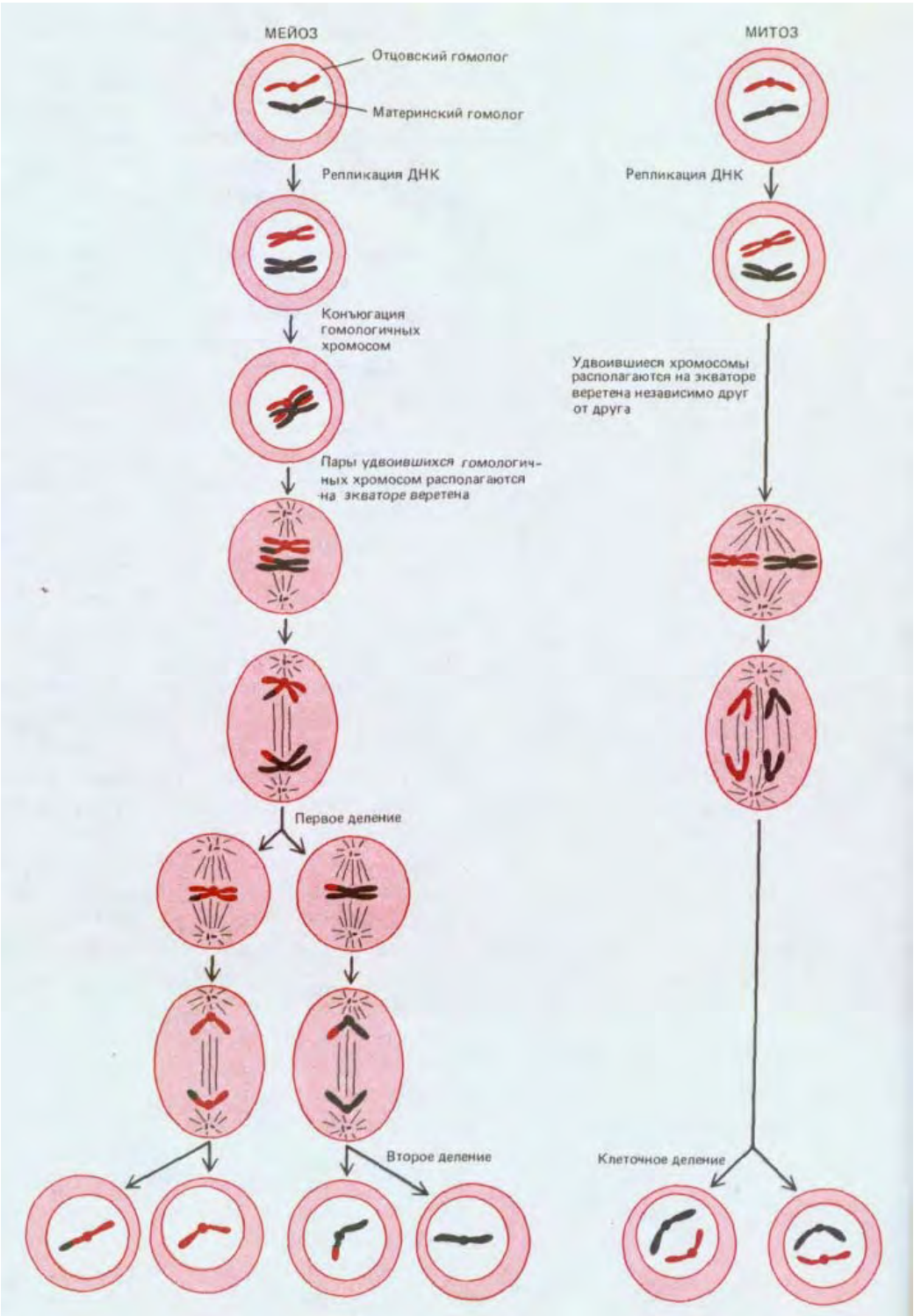


Рис. 15-8. Сравнение мейоза с обычным митозом (схема). Для простоты показана только одна пара гомологичных хромосом. Спаривание гомологичных хромосом происходит только в мейозе; поскольку перед спариванием каждая хромосома удваивается и состоит из двух сестринских хроматид, для образования гаплоидных гамет необходимы два клеточных деления. Поэтому из любой диплоидной клетки, вступающей в мейоз, образуются четыре гаплоидные клетки. В мейозе при конъюгации гомологичных хромосом между ними осуществляется кроссинговер; объяснение сути этого явления дается позже.

репликации ДНК сестринские хроматиды отделяются друг от друга, как при обычном митозе, образуя клетки с гаплоидным набором ДНК. Таким образом, мейоз состоит из двух клеточных делений, следующих за единственной фазой удвоения хромосом, так что из каждой клетки, вступающей в мейоз, получаются в итоге четыре гаплоидные клетки (рис. 15-8). Иногда процесс мейоза протекает аномально, и гомологи не могут отделиться друг от друга - это явление называется **нерасхождением хромосом.** Некоторые из образующихся в этом случае гаплоидных клеток получают недостаточное количество хромосом, в то время как другие приобретают их лишние копии. Из подобных гамет формируются неполноценные эмбрионы, большая часть которых погибает.



Рис. 15-9. Схема, иллюстрирующая два основных механизма перераспределения генетического материала во время мейоза. *А.* У организма с *n* хромосомами в результате независимого расхождения гомологичных хромосом в первом делении мейоза может получиться 2" различных гаплоидных гамет. В данном случае $n = 3$ и может быть 8 различных типов гамет. *Б.* В I профазе мейоза происходит кроссинговер-гомологичные хромосомы обмениваются участками, что ведет к перераспределению генов. В последовательностях ДНК двух гомологов всегда имеется большое число незначительных различий, поэтому оба механизма увеличивают наследственную изменчивость организмов, размножающихся половым путем.

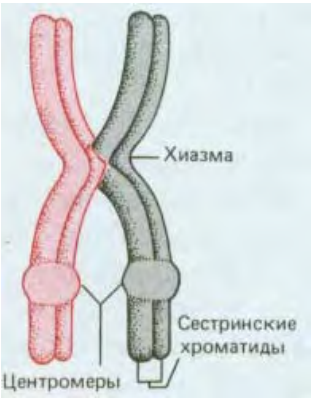


Рис. 15-10. Схематическое изображение спаренных гомологичных хромосом при переходе к I метафазе мейоза. В предшествующей профазе произошел один кроссинговер, и в результате образовалась одна хиазма. Обратите внимание, что четыре хроматиды сгруппированы в две пары сестринских нитей, причем в каждой паре они тесно сближены не только в области центромеры, но и по всей длине. Поэтому всю такую группу хроматид часто называют *бивалентом.*

15.2.2 Пересортировка генов усиливается благодаря кроссинговеру между гомологичными несестринскими хроматидами

Как мы уже видели, гены могут перемешиваться благодаря слиянию гамет двух различных особей. Однако генетические изменения осуществляются не только этим путем. Никакие два потомка одних и тех же родителей (если только это не идентичные близнецы) не будут абсолютно одинаковыми. Дело в том, что задолго до слияния двух гамет, во время мейоза, осуществляются два различных вида пересортировки генов.

Один вид пересортировки - это результат случайного распределения разных материнских и отцовских гомологов между дочерними клетками при 1-м делении мейоза; каждая гамета получает свою, отличную от других выборку материнских и отцовских хромосом (рис. 15-9 А). Из одного только этого факта следует, что клетки любой особи могут в принципе образовать 2" генетически различающихся гамет, где n-гаплоидное число хромосом. Например, у человека каждый индивидуум способен образовать по меньшей мере $2^{23} = 8{,}4\text{-}10^6$ генетически различных гамет. Однако на самом деле число возможных гамет неизмеримо больше из-за **кроссинговера** (перекреста) - процесса, происходящего во время длительной профазы 1-го деления мейоза, когда гомологичные хромосомы обмениваются участками. У человека в каждой паре гомологичных хромосом кроссинговер происходит в среднем в двух-трех точках. Как показано на рис. 15-9 *Б,* такой процесс «перетасовывает» гены любой хромосомы в гаметах.

При кроссинговере происходит разрыв двойной спирали ДНК в одной материнской и одной отцовской хроматиде, а затем получившиеся отрезки воссоединяются «наперекрест» (процесс **генетической рекомбинации).** То, что известно о деталях молекулярного механизма этого процесса, в общих чертах представлено в гл. 5. Рекомбинация происходит в профазе 1-го деления мейоза, когда две сестринские хроматиды так тесно сближены друг с другом, что их невозможно увидеть в отдельности (см. ниже). Гораздо позже в этой растянутой профазе становятся яснораличимы две отдельные хроматиды каждой хромосомы. В это время видно, что они связаны своими центромерами и тесно сближены друг с другом по всей длине. Два гомолога остаются связанными в тех точках, где произошел кроссинговер между отцовской

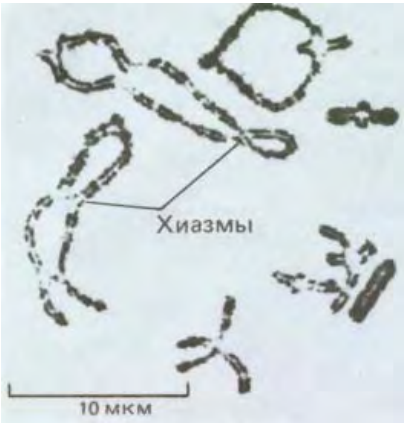


Рис. 15-11. Световая микрофотография бивалентов с множественными хиазмами на стадии диплотены. Изображенные здесь крупные хромосомы прямокрылого особенно удобный объект для цитологических исследований. (С любезного разрешения Bernard John.)

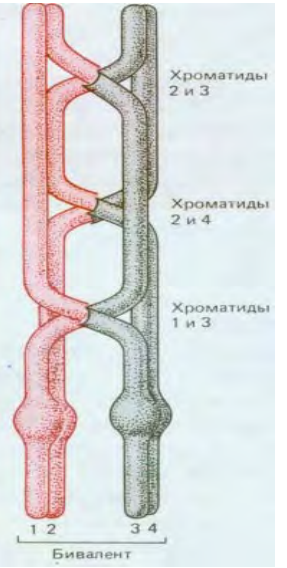


Рис. 15-12. Представлены три хиазмы - результат трех отдельных перекрестов. Каждая из двух хроматид одной хромосомы может перекрещиваться с любой хроматидой другой хромосомы бивалента. Например, в данном случае хроматида 3 обменялась участками одновременно с двумя хроматидами - 1 и 2.

и материнской хроматидами. Видно, что в каждой такой точке, которую называют **хиазмой,** две из четырех хроматид перекрещиваются (рис. 15-10). Таким образом, хиазмы - это морфологический результат произошедшего кроссинговера, который сам по себе недоступен для наблюдения.

На этой стадии мейоза гомологи в каждой паре (или биваленте) остаются связанными друг с другом по меньшей мере одной хиазмой. Во многих бивалентах бывает большее число хиазм, так как возможны множественные перекресты между гомологами (рис. 15-11 и 15-12).

15.2.3. В конъюгации хромосом участвует синаптонемальный комплекс

В профазе 1-го деления мейоза во время конъюгации *(синопсиса)* и разделения хромосом в них происходят сложнейшие морфологические изменения. В соответствии с этими изменениями профаза делится на пять последовательных стадий - *лептотену, зиготену, пахитену, диплотену* и *диакинез* (рис. 15-13). Самое поразительное явление - это инициация тесного сближения хромосом в **зиготене,** когда между парами сестринских хроматид в каждом биваленте начинает формироваться специализированная структура, называемая *синаптонемальным комплексом.* Момент полной конъюгации хромосом считают началом **пахитены,** которая обычно продолжается несколько дней; после разделения хромосом наступает стадия **диплотены,** когда впервые становятся видны хиазмы.

Для генетической рекомбинации необходимо тесное сближение рекомбинирующих хромосом. **Синаптонемальный комплекс,** который формируется перед самой пахитеной и распадается сразу после нее, удерживает гомологичные хромосомы рядом, скрепляя их по всей длине; полагают, что он необходим для осуществления кроссинговера. Синаптонемальный комплекс представляет собой длинное белковое образование, напоминающее веревочную лестницу, к противоположным сторонам которого плотно прилегают два гомолога (бивалент, рис. 15-14). Сестринские хроматиды каждого гомолога остаются тесно сближенными, а их ДНК образует многочисленные петли по ту же сторону от белковой «лестницы». Таким образом, хотя гомологичные хромосомы в синаптонемальном комплексе сближены по всей длине, материнские и отцовские хроматиды, которые впоследствии будут обмениваться участками, остаются по разные стороны от «лестницы», причем разделяющее их расстояние превышает 100 нм.

Как показывают цитологические исследования, конъюгации хромосом предшествует формирование белковой нити вдоль каждого из гомологов. По мере осуществления конъюгации эти нити, по-видимому, сближаются, превращаясь в боковые элементы синаптонемального комплекса и образуя две стороны белковой «лестницы». И первоначальные нити, и эти боковые элементы содержат белок, который очень хорошо окрашивается серебром, что позволяет видеть эти структуры как с помощью светового микроскопа, так и на электронных микрофотографиях (рис. 15-15).

Мы не знаем, что заставляет гомологичные участки хромосом точно ориентироваться друг против друга на стадии зиготены. Вряд ли для этого необходимо спаривание комплементарных оснований по всей длине взаимодействующих хромосом, поскольку хроматин одного из гомологов в синаптонемальном комплексе расположен достаточно далеко от хроматина другого гомолога, а в отдельных случаях синаптонемальный комплекс может объединять участки двух негомологичных хромосом. Одно из возможных объяснений состоит в том, что конъюга-

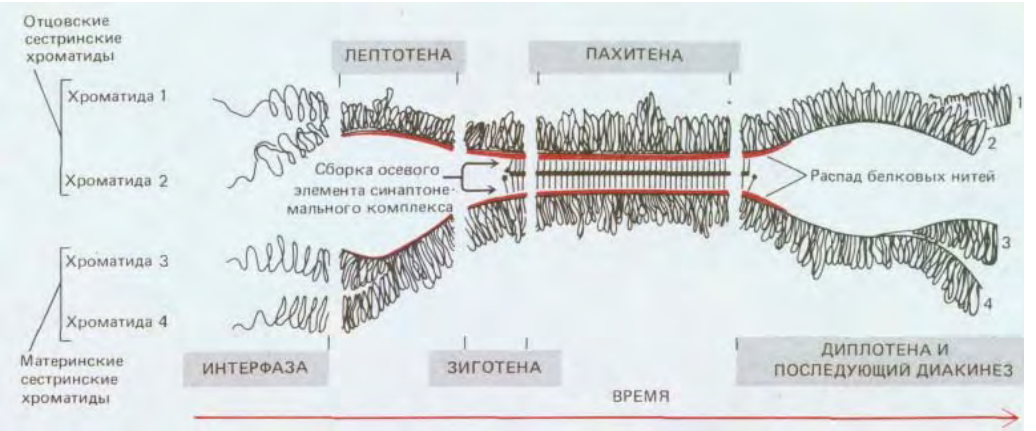


Рис. 15-13. Последовательность событий при синапсисе и разъединении хромосом в I профазе мейоза. Полностью сформированный синаптонемальный комплекс существует на протяжении всей стадии пахитены.

ция хромосом начинается с взаимодействия комплементарных пар оснований ДНК в небольших специфических участках каждой хромосомы. Затем синаптонемальный комплекс соединяет оставшиеся области ориентированных друг против друга хромосом. Какой-то механизм такого рода локального соответствия необходим для объяснения того факта, что наличие в одной из двух гомологичных хромосом инвертированного участка обычно (хотя и не всегда) приводит к местному нарушению нормального синапсиса во время зиготены, так что гомологичные гены могут конъюгировать даже в области инверсии (рис. 15-16 и 15-17). Отдельные стадии мейоза показаны на рис. 15-18, где дается и подробное описание соответствующих процессов.

15.2.4. Как полагают, обмены между хроматидами происходят при участии рекомбинационных узелков

Синаптонемальный комплекс обеспечивает структурную основу, необходимую для рекомбинационных событий, но сам он, вероятно, непосредственно в них не участвует. Как полагают, важную роль в этих событиях играют **рекомбинационные узелки,** которые представляют собой очень крупные белковые комплексы с диаметром около 90 нм (для сравнения заметим, что крупная молекула глобулярного белка массой 400000 дальтон имеет диаметр порядка 10 нм). Рекомбинационные узелки «сидят» на некоторых расстояниях друг от друга на «лестнице» синаптонемального комплекса, между двумя гомологичными хроматидами (см. рис. 15-14). Предполагается, что это место расположения крупных мультиферментных «рекомбинационных аппаратов», которые подтягивают друг к другу локальные участки ДНК материнской и отцовской хроматид через область синаптонемального комплекса шириной 100 нм.

О такой функции рекомбинационных узелков говорят некоторые косвенные данные:

1. Общее число узелков примерно равно общему числу хиазм, наблюдаемых позже в профазе.

2. Узелки распределены вдоль синаптонемального комплекса таким же образом, как и перекресты; например, подобно перекрестам, узелки отсутствуют в тех областях, где синаптонемальный комплекс соединяет отрезки гетерохроматина. Кроме того, генетические и цитологические исследования показывают, что произошедший кроссинговер препятствует осуществлению другого кроссинговера в близлежащем участке хромосомы. Точно так же и узелки, как правило, не располагаются очень близко друг к другу.

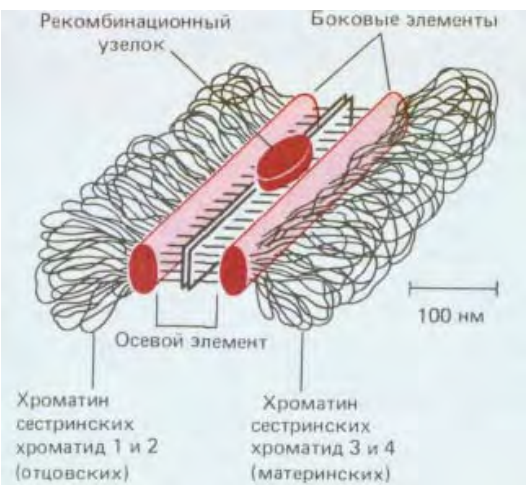


Рис. 15-14. Схематическое изображение типичного синаптонемального комплекса. Здесь представлен лишь небольшой участок этого длинного, похожего на лестницу образования. Показаны боковые и осевой (центральный) элементы комплекса, а также рекомбинационный узелок. Сходные синаптонемальные комплексы обнаруживаются у самых различных организмов - от дрожжей до человека. Однако об образующих эти комплексы белковых молекулах почти ничего не известно.

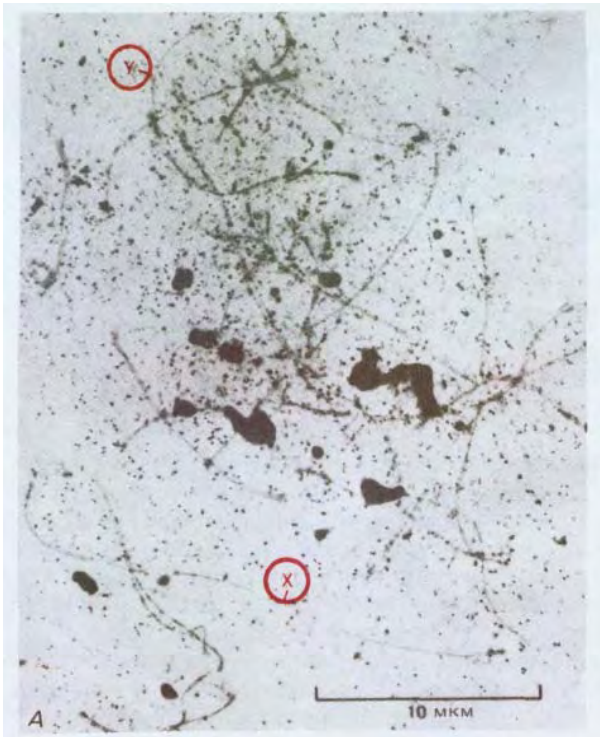






Рис. 15-15. Электронные микрофотографии полных наборов хромосом в окрашенных серебром давленых препаратах сперматоцитов мыши на *(А)* ранней (зиготена), *(Б)* средней (пахитена) и *(В)* поздней (диплотена) стадиях профазы первого деления мейоза. (Фото любезно предоставлены Montrose J. Moses.)

А. **Спаривание (зиготена).** Перед конъюгацией хромосом белковые нити отделены друг от друга; затем они сближаются и, когда в одном или нескольких местах инициации синапсиса между хромосомами установится надлежащее расстояние, начинает формироваться синаптонемальный комплекс (часто с конца хромосомы). На примере половых хромосом (X и Y) видно, что для спаривания нередко приходится преодолевать огромные расстояния внутри ядра, однако механизм этого движения неизвестен. Темные тельца-ядрышки.

Б. **Завершение спаривания (пахитена).** Синапсис завершается, когда синаптонемальные комплексы связывают попарно все гомологичные аутосомы. X- и Y-хромосомы конъюгируют не полностью. Происходит кроссинговер между хроматидами, которые на таких фотографиях неразличимы.

В. **Расхождение хромосом (диплотена).** Перед разрушением белковых нитей последние отделяются друг от друга, что означает окончание синапсиса. На препарате они еще кое-где связаны сохранившимися отрезками синаптонемального комплекса; как полагают, это те места, в которых произошел кроссинговер. Позже, когда хроматин конденсируется и становятся различимыми хроматиды, на места кроссинговера указывают хиазмы

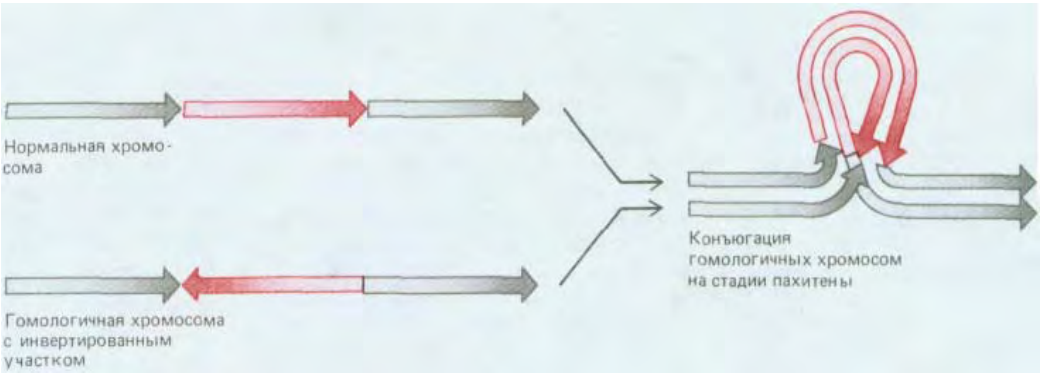


Рис. 15-16. Схема образования синаптонемального комплекса между нормальной хромосомой и ее гомологом, имеющим инвертированный участок. Подобные структуры указывают на то, что гомологичные хромосомы конъюгируют благодаря локальному сходству определенных участков. Сравните данный рисунок с рис. 15-17.

3. Некоторые мутации у дрозофилы приводят к аномальному распределению перекрестов по длине хромосом и резко пониженной частоте рекомбинаций; при этом у мух оказывается меньше рекомбинационных узелков и их размещение вдоль хромосомы изменено так же, как и распределение перекрестов. Такая корреляция служит веским доводом в пользу того, что каждый кроссинговер определяется локализацией одного узелка.

4. Как полагают, при генетической рекомбинации в области каждого кроссинговера происходит синтез некоторого количества ДНК (см. разд. 5.4.5). Метод радиоавтографии в сочетании с электронной микроскопией позволяет показать, что радиоактивные предшественники включаются в пахитенную ДНК главным образом в области рекомбинационных узелков или поблизости от них.

Поскольку рекомбинационных узелков бывает примерно столько же, сколько происходит перекрестов, можно думать, что эти узелки очень эффективно вызывают рекомбинацию между хроматидами двух гомологичных хромосом. К сожалению, о структуре рекомбинационных узелков и механизме их действия пока ничего не известно.

15.2.5. Хиазмы играют важную роль в расхождении хромосом во время мейоза

Кроссинговер не только способствует перетасовке генов, но играет также важнейшую роль при расхождении двух гомологов в дочерние ядра. Дело в том, что именно хиазмы удерживают вместе материнские и отцовские гомологи до анафазы I, выполняя здесь ту же функцию, что



Рис. 15-17. Тесная конъюгация двух гомологичных хромосом мыши, одна из которых содержит инверсию, на стадии пахитены. В петле виден рекомбинационный узелок (см. разд. 15.2.4). Слева - электронная микрофотография; справа поясняющая схема. (P. A. Poorman et al., Chromosoma, **83,** 419. 1981.)

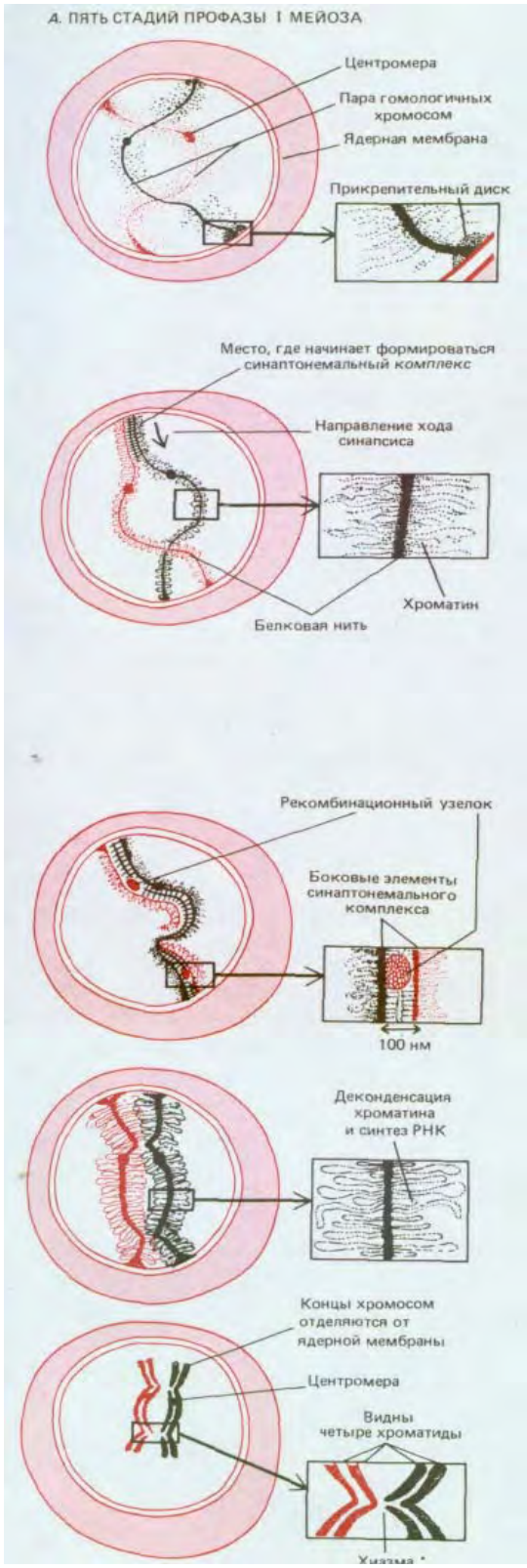


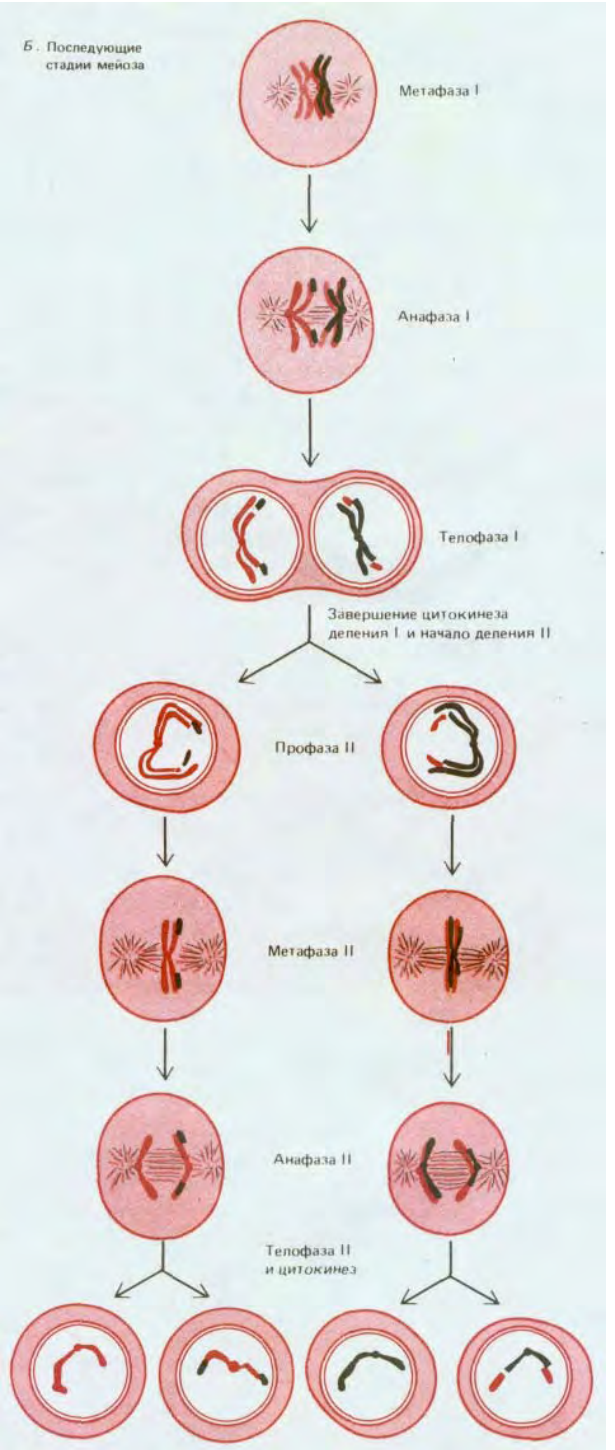
Рис. 15-18. Схемы, показывающие видимые изменения двух гомологичных хромосом на протяжении мейоза. Представлен ход событий в клетках млекопитающих, хотя весьма сходную картину можно наблюдать и в клетках многих других организмов. *А* - пять стадий первой профазы мейоза (А); Б - последующие стадии мейоза.

ЛЕПТОТЕНА. Профаза I начинается со стадии лептотены, когда видно, что каждая хромосома, изменив свою интерфазную конформацию, переходит в конденсированную форму, образуя длинное, тонкое волокно с белковой осевой нитью. Каждая хромосома обоими концами прикреплена к ядерной мембране с помощью специализированной структуры, называемой прикрепительным диском. Хотя каждая хромосома уже реплицировалась и состоит из двух сестринских хроматид, эти хроматиды очень тесно сближены, и поэтому каждая хромосома кажется одиночной (отдельные хроматиды не различимы вплоть до поздней профазы - до стадии диплотены или диакинеза)

ЗИГОТЕНА. Моментом перехода лептотены в зиготену считают начало синапсиса - тесной конъюгации двух гомологов. Конъюгация часто начинается с того, что гомологичные концы двух хромосом сближаются на ядерной мембране, а затем процесс соединения гомологов распространяется вдоль хромосом от обоих концов. В других случаях синапсис может начинаться во внутренних участках хромосом и продолжаться по направлению к их концам с тем же конечным результатом. Как полагают, каждый ген приходит в соприкосновение с гомологичным ему геном другой хромосомы. Когда гомологи конъюгируют, их белковые нити сближаются, образуя два *боковых элемента* длинного образования, напоминающего лестницу и называемого *синаптонемальным комплексом.* Каждую пару хромосом, образовавшуюся в I профазе мейоза, обычно называют бивалентом; но, поскольку каждая гомологичная хромосома пары состоит из двух тесно сближенных сестринских хроматид, для каждой пары больше подходит другое название *тетрада*

ПАХИТЕНА. Как только завершается синапсис по всей длине хромосом, клетки вступают в стадию пахитены, на которой они могут оставаться несколько суток. На этой стадии в продольной щели синаптонемального комплекса появляются крупные *рекомбинационные узелки,* которым приписывают важную роль в обмене участками между хромосомами. Такие обмены приводят к перекрестам между двумя несестринскими хроматидами: в обменах участвует по одной хроматиде из двух спаренных хромосом. В пахитене перекресты еще не видны, но позднее все они проявляются в виде хиазм

ДИПЛОТЕНА. Стадия диплотены в 1 профазе мейоза начинается с разделения конъюгировавших хромосом. Синаптонемальный комплекс распадается, что позволяет двум гомологичным



хромосомам бивалента несколько отодвинуться друг от друга. Однако они все еще связаны одной или несколькими хиазмами, т. е. местами, где произошел кроссинговер. В ооцитах (развивающихся яйцеклетках) диплотена может растянуться на месяцы или годы, так как именно на этой стадии хромосомы конденсируются и синтезируют РНК, обеспечивая яйцеклетку резервными веществами. В особых случаях диплотенные хромосомы становятся исключительно активными в отношении синтеза РНК; такие хромосомы *типа ламповых щеток* находят у амфибий и некоторых других организмов ДИАКИНЕЗ. Диплотена незаметно переходит в диакинез - стадию, предшествующую метафазе, когда прекращается синтез РНК и хромосомы конденсируются, утолщаются и отделяются от ядерной мембраны. Теперь ясно видно, что каждый бивалент содержит четыре отдельные хроматиды, причем каждая пара сестринских хроматид соединена центромерой, тогда как несестринские хроматиды, претерпевшие кроссинговер, связаны хиазмами. После окончания длительной профазы I два ядерных деления без разделяющего их периода синтеза ДНК доводят процесс мейоза до конца. Эти стадии обычно занимают не более 10% всего времени, необходимого для мейоза, и они носят те же названия, что и соответствующие стадии митоза. В оставшейся части первого деления мейоза различают метафазу I, анафазу I и телофазу I. К концу первого деления хромосомный набор редуцируется, превращаясь из тетраплоидного в диплоидный, совсем как при митозе, и из одной клетки образуются две. Решающее различие состоит в том, что при первом делении мейоза в каждую клетку попадают *две сестринские хроматиды,* соединенные в области центромеры, а при митозе - две разделившиеся хроматиды. Далее, после кратковременной интерфазы II, в которой хромосомы не удваиваются, быстро происходит второе деление - профаза II, анафаза II и телофаза II. В результате из каждой диплоидной клетки, вступившей в мейоз, образуются четыре гаплоидных ядра.

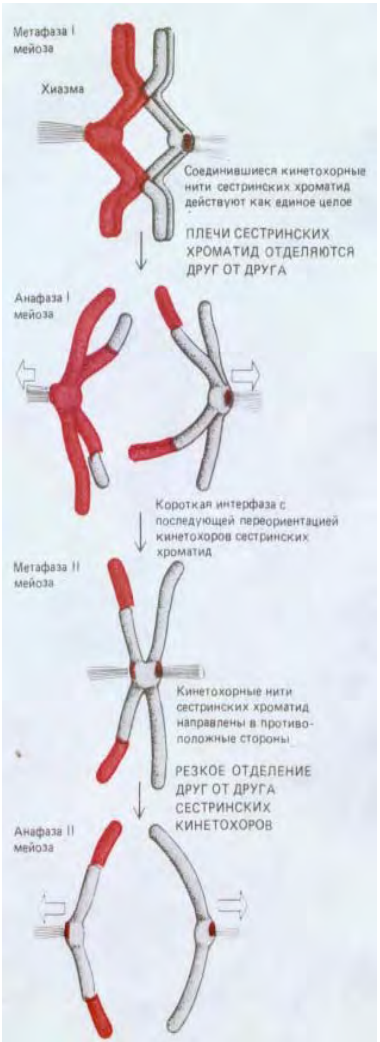


Рис. 15-19. Сравнение механизмов упорядоченного расположения хромосом в метафазе и их расхождения в анафазе при первом и втором делениях мейоза. Во втором делении используются те же механизмы, что и в обычном митозе (см. гл. 13).

и центромеры в обычном митозе. У мутантных организмов с пониженной частотой кроссинговера в мейозе у отдельных пар хромосом отсутствуют хиазмы, и такие хромосомы не способны нормально расходиться. В результате значительная доля образующихся гамет содержит слишком много или слишком мало хромосом - последний случай служит примером нерасхождения хромосом.

Существуют по меньшей мере два важных различия между механизмами расхождения хромосом в обычном митозе и при первом делении мейоза:

1) если при митозе нити веретена, прикрепленные к кинетохорам двух сестринских хроматид, отходят в противоположных направлениях, то в первой метафазе мейоза эти нити у обеих сестринских хроматид отходят в одном и том же направлении (рис. 15-19);

2) при митозе расхождение хроматид к полюсам инициируется отделением друг от друга сестринских кинетохоров (так начинается анафаза, разд. 13.5.7), тогда как в первой анафазе мейоза это движение, по-видимому, начинается в результате исчезновения мало изученных сил, которые удерживают плечи сестринских хроматид в тесно сближенном состоянии, что в свою очередь ведет к распаду хиазм, связывающих материнские и отцовские хромосомы (см. рис. 15-9). Это не только позволяет объяснить тот факт, что у многих организмов хиазмы необходимы для нормального расположения хромосом в метафазе I, но и дает ответ на вопрос, почему у хромосом, образующихся в анафазе I, плечи сестринских хроматид обыкновенно не слипаются, что придает им необычный «развернутый» вид и делает их похожими на митотические хромосомы (рис. 15-19).

15.2.6. Расхождение половых хромосом тоже обеспечивается их конъюгацией

Мы объяснили, каким образом конъюгация гомологичных хромосом обусловливает их расхождение в две дочерние клетки. Но как обстоит дело с половыми хромосомами, которые у самцов млекопитающих не гомологичны? У самок имеются две X-хромосомы, которые конъюгируют и расходятся так же, как другие гомологи. Однако самцы обладают одной X - и одной Y-хромосомой, и эти хромосомы должны конъюгировать во время первой метафазы, чтобы сперматозоиды содержали либо X -, либо Y-хромосому, но исключалось наличие или отсутствие в них сразу обеих половых хромосом. Требуемая конъюгация становится возможной благодаря наличию небольшого участка на конце каждой из этих хромосом, где между ними имеется гомология; эта гомология позволяет половым хромосомам X и Y спариваться во время первой профазы мейоза (рис. 15-15, *Б)*. Таким образом, гарантируется конъюгация X- и Y-хромосом и образование спермиев только двух типов: одни содержат Y-хромосому и дают начало эмбриону мужского пола, а другие - X-хромосому и дают начало эмбриону женского пола.

15.2.7. Второе деление мейоза напоминает обычный митоз

Мейоз состоит из двух последовательных клеточных делений, первое из которых длится почти столько же, сколько весь мейоз, и гораздо сложнее второго (рис. 15-20). Первое деление отличается рядом уникальных особенностей. Например, репликация ДНК во время подготовительной фазы S, как правило, занимает значительно больше времени, чем при митозе. Кроме того, клетки могут пребывать в стадии мейотической профазы I несколько дней, месяцев и даже лет, в зависимости от вида организма и типа образующихся гамет. (Эта



Рис. 15-20. Сравнение длительностей различных стадий мейоза, представленных на рис. 15-18. Показаны примерные временные интервалы для самца млекопитающего (мыши) и растения (лилии). Эти интервалы различны для женских и мужских гамет (яиц и спермиев) одного и того же вида и для одинаковых гамет разных видов. Например, мейоз у мужчины длится 24 дня, а у самца мыши 12 дней. Однако во всех случаях профаза первого деления мейоза намного продолжительнее, чем все остальные стадии, вместе взятые.

растянутая фаза первого деления мейоза традиционно называется профазой, хотя она обладает большим сходством с фазой G_2 обычного митоза в том отношении, что ядерная оболочка остается все время интактной и исчезает лишь тогда, когда начинается формирование нитей веретена, т.е. когда профаза I переходит в метафазу I.)

После окончания первого деления мейоза у двух дочерних ядер вновь образуются оболочки и начинается короткая интерфаза. В это время хромосомы несколько деспирализуются, однако, вскоре они опять конденсируются и начинается профаза II. Поскольку в этот период синтеза ДНК не происходит, создается впечатление, что у некоторых организмов хромосомы переходят непосредственно от одного деления к другому. Профаза II у всех организмов короткая: ядерная оболочка разрушается, когда формируется новое веретено, после чего, быстро сменяя друг друга, следуют метафаза II, анафаза II и телофаза II. Так же как и при митозе, у сестринских хроматид образуются кинетохорные нити, отходящие от центромеры в противоположных направлениях. В метафазной пластинке две сестринские хроматиды удерживаются вместе до анафазы, когда они разделяются благодаря внезапному расхождению их кинетохоров (рис. 15-19). Таким образом, второе деление мейоза сходно с обычным митозом (этого нельзя сказать о первом делении мейоза). Единственное существенное различие состоит в том, что здесь имеется по одной копии каждой хромосомы, а не по две, как в митозе.

Мейоз заканчивается формированием ядерных оболочек вокруг четырех гаплоидных ядер, образовавшихся в телофазе II (см. рис. 15-18, *Б*). Как мы увидим, у позвоночных к концу мейоза яйцеклетка уже полностью сформирована (а в некоторых случаях и оплодотворена), тогда как спермий еще только начинает свое развитие.

Заключение

При мейозе в результате двух последовательных клеточных делений, следующих за одним циклом репликации ДНК, из одной диплоидной клетки образуются четыре гаплоидные. У *животных начальные фазы формирования яйцеклетки и сперматозоида сходны. В обоих случаях в мейозе доминирует профаза I, которая может занимать 90% всего времени мейоза. В этот период каждая хромосома состоит из двух тесно сближенных сестринских хроматид. Кроссинговер (перекрест) между хромосомами осуществляется на стадии пахитены в профазе I, когда конъюгация каждой пары гомологичных хромосом закрепляется синаптонемальным комплексом. Как полагают, каждый перекрест происходит при участии крупного рекомбинационного узелка и приводит к образованию хиазмы, сохраняющейся вплоть до анафазы I. В результате первого деления мейоза в каждую дочернюю клетку попадает по одной хромосоме из каждой пары гомологов, состоящих в это время из соединенных сестринских хроматид. Затем без репликации ДНК быстро протекает второе деление, при котором каждая сестринская хроматида попадает в отдельную гаплоидную клетку.*

15.3. Гаметы [9]

У эмбрионов всех позвоночных на ранней стадии развития определенные клетки обособляются как предшественники будущих гамет. Такие **первичные половые клетки** мигрируют в развивающиеся гонады (яичники у самок, семенники у самцов), где после периода митотического размножения претерпевают мейоз и дифференцируются в зрелые гаметы. Затем слияние яйцеклетки и спермия после спаривания иници-

рует процесс развития эмбриона, у которого, в свою очередь, формируются первичные половые клетки, т. е. открывается новый цикл.

Пока не ясно, по какой именно причине определенные клетки у зародыша млекопитающего превращаются в половые клетки, но известно, что, по крайней мере, у одного организма определяющим фактором служит какой-то компонент (или компоненты) цитоплазмы яйца: у дрозофилы специфическая область цитоплазмы - *полярная плазма,* расположенная на заднем полюсе яйца, - содержит мелкие гранулы, богатые РНК *(полярные гранулы);* клетки, образующиеся в этой части яйца и содержащие полярные гранулы, становятся первичными половыми клетками и, в конечном счете, мигрируют в гонады, где из них развиваются гаметы. Если полярную плазму ввести в передний полюс яйца, то клетки, которые должны были стать соматическими, превратятся в половые.

15.3.1. У высших животных яйцеклетка это единственная клетка, из которой может развиться новая особь

По крайней мере, в одном отношении **яйцеклетки - самые** удивительные из всех животных клеток: будучи активированы, они могут дать начало целому новому организму, причем иногда для этого достаточно нескольких дней или недель. У высших животных это исключительная привилегия яйцеклеток. Активация обычно является следствием слияния яйцеклетки со спермием при *оплодотворении,* хотя, как мы позже увидим, во многих случаях яйцеклетку можно активировать иными, зачастую поразительно простыми способами (см. разд. 15.4.3). Активация яйцеклетки запускает программу развития, постепенное развертывание которой приводит к образованию новой особи.

У большинства животных, не относящихся к млекопитающим, ранний этап развития яйцеклетки сводится главным образом к ряду быстрых клеточных делений, или *дроблению,* при котором общая масса эмбриона остается, как правило, неизменной. В процессе дробления яйца образующиеся клетки постепенно становятся все меньше, пока не достигнут обычной величины зрелой соматической клетки. Хотя на ранних стадиях дробления синтезируются огромные количества ДНК и белков, в это время нет необходимости в синтезе РНК (в транскрипции генов). Это объясняется тем, что еще до оплодотворения в клетках накапливаются огромные резервы информационных РНК, рибосом, транспортных РНК и всех предшественников, необходимых для синтеза макромолекул, а также особых информационных РНК, кодирующих белки, которые необходимы для протекания ранних стадий развития.

Особенно большие запасы питательных веществ требуются тем яйцеклеткам, которые проходят длительный период эмбрионального развития вне родительского организма; в связи с этим яйца земноводных и птиц значительно крупнее, чем, например, яйцеклетки млекопитающих. Пресноводные и морские беспозвоночные, развивающиеся из небольших яйцеклеток вне родительского организма (такие, как морские ежи), обычно быстро превращаются в способных к самостоятельному питанию личинок.

Во взрослом организме из яйцеклетки может образоваться клетка любого типа. Тем не менее, ее отнюдь нельзя считать недифференцированной клеткой. Она в высшей степени специализирована для выполнения одной-единственной функции - построения новой особи. Прежде чем обсуждать вопрос о том, как протекает развитие яйцеклетки до того момента, когда она становится готова к оплодотворению, рассмотрим вкратце некоторые из ее уникальных особенностей.

15.3.2. Яйцеклетки представляют собой высокоспециализированные клетки, способные к независимому развитию и обладающие большими запасами питательных веществ и совершенной оболочкой [10]

Наиболее очевидная отличительная черта яйцеклетки - это ее большие размеры. Типичная яйцеклетка имеет сферическую или овальную форму, а диаметр ее составляет у человека и морского ежа около 100 мкм, у лягушек и рыб от 1 до 2 мм, а у птиц и рептилий измеряется сантиметрами (напомним, что величина типичной соматической клетки всего лишь около 20 мкм) (рис. 15-21 и 15-22). Столь же внушительными могут быть размеры ядра; например, в яйце лягушки величиной 1500 мкм диаметр ядра составляет около 400 мкм; в преддверии быстрых делений, следующих сразу за оплодотворением, в таком ядре откладываются запасы белков.

Потребность клетки в питательных веществах удовлетворяет в основном желток - материал протоплазмы яйца, богатый липидами и белками. Он обычно содержится в дискретных образованиях, называемых *желточными гранулами.* В яйцеклетках, развитие которых протекает вне материнского организма и приводит к формированию крупных животных, желток может занимать более 95% всего объема, тогда как у млекопитающих, чьи эмбрионы получают большую часть питательных веществ от матери, объем желтка составляет менее 5% объема яйцеклетки.

Другой важной специфической структурой яйцеклетки является наружная **яйцевая оболочка** покров из особого неклеточного вещества, состоящего в основном из гликопротеиновых молекул, часть которых секретирует сама яйцеклетка, а другую часть - окружающие клетки. У многих видов оболочка имеет внутренний слой, непосредственно прилегающий к плазматической мембране яйцеклетки и называемый у млекопитающих **zona pellucida** (рис. 15-23), а у других позвоночных и беспозвоночных (например, у морского ежа) **- вителлиновым слоем.** Этот слой защищает яйцеклетку от механических повреждений; в некоторых яйцеклетках он действует также как видоспецифический барьер для спермиев, позволяющий проникать внутрь только спермиям того же вида или очень близких видов (см. разд. 15.4.2). У животных, не относящихся к млекопитающим, соседние клетки часто выделяют добавочные оболочки, покрывающие вителлиновый слой. Например, когда яйца лягушки проходят из яичника по яйцеводу (трубка, по которой яйца выводятся наружу), их оболочка приобретает несколько дополнительных слоев из студнеобразного вещества, выделяемого эпителиальными клетками яйцевода. Аналогичным образом у куриного яйца при прохождении его по яйцеводу (после оплодотворения) появляются «белок» и твердая скорлупа, тогда как яйца насекомых покрываются тонкой прочной оболочкой, получившей название *хориона* и выделяемой *фолликулярными клетками,* окружающими каждое яйцо.

Многие яйцеклетки (в том числе и яйцеклетки млекопитающих) содержат специализированные секреторные пузырьки, находящиеся под плазматической мембраной в наружном, или кортикальном, слое цитоплазмы (рис. 15-24). При активации яйцеклетки спермием эти кортикальные гранулы высвобождают содержимое путем экзоцитоза, в результате свойства яйцевой оболочки изменяются таким образом, что через нее уже не могут проникнуть внутрь яйцеклетки другие спермин (см. разд. 15.4.5).

В то время как кортикальные гранулы обычно равномерно распределены во всем кортексе яйцеклетки, другие компоненты цитоплазмы могут располагаться крайне асимметрично. Например, в яйце лягушки



Рис. 15-21. Три различных яйца в натуральную величину. Диаметр яйцеклетки человека составляет 0,1 мм.



Рис. 15-22. Относительные размеры различных яйцеклеток по сравнению с величиной типичной соматической клетки.

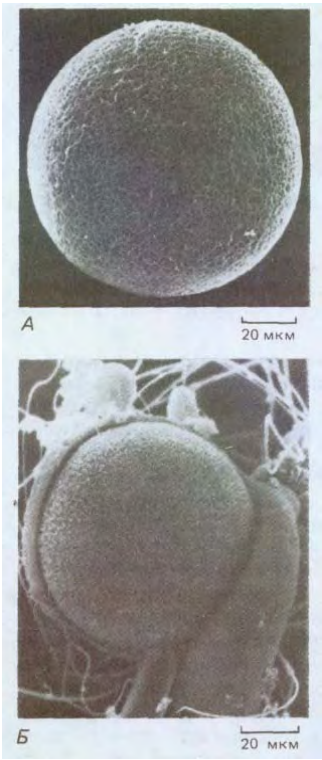


Рис. 15-23. *А.* Микрофотографии яйцеклетки хомячка, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. Хорошо видна zona pellucida; на фото *Б эта* оболочка (к которой прикрепилось много спермиев) частично отогнута и можно видеть лежащую под ней плазматическую мембрану яйцеклетки с многочисленными микроворсинками. (M. Pillips, J. Ultrastruct. Res., 72, 1-12, 1980.)

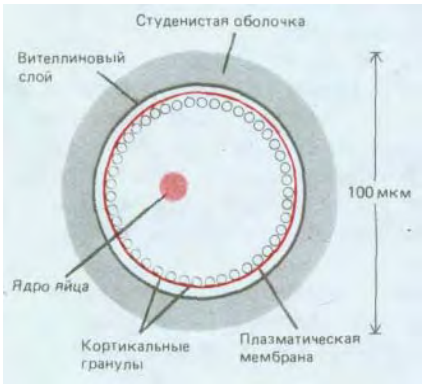


Рис. 15-24. Схематический разрез яйца морского ежа; видно расположение гранул. Обратите внимание на то, что вителлиновый слой покрыт студенистой оболочкой, толщина которой доходит до 30 мкм.

большая часть желтка находится на одном (вегетативном) полюсе, тогда как ядро располагается ближе к противоположному (анимальному) полюсу. Полярность яйцеклетки, которая зависит главным образом от внешних условий, часто определяет полярность развивающегося эмбриона (см. разд. 16.1.1).

15.3.3. Яйцеклетка проходит в своем развитии несколько стадий [10, 11]

Развивающаяся яйцеклетка называется **ооцитом;** ее дифференцировка в зрелую яйцеклетку (или яйцо), включающая в себя ряд высокоспециализированных стадий, отличается от обычных клеточных циклов. Мы уже знаем, что вместо того, чтобы продолжать делиться посредством обычного митоза, половые клетки осуществляют два последних деления путем более сложного процесса-мейоза. Более того, у ооцитов выработались специальные механизмы, позволяющие им приостанавливать ход мейоза: ооциты на длительный период задерживаются в профазе 1, увеличиваясь в это время в размерах, а позже они в преддверии оплодотворения во многих случаях временно останавливают свое развитие на стадии метафазы II.

Хотя детали развития яйцеклетки **(оогенеза)** различаются у разных видов, основные стадии сходны (рис. 15-25). Первичные половые клетки мигрируют в формирующуюся гонаду и превращаются в **оогонии;** после периода митотического размножения оогонии дифференцируются в **ооциты первого порядка,** которые приступают к первому делению мейоза. Происходит репликация ДНК, и каждая хромосома состоит после этого из двух хроматид; гомологичные хромосомы конъюгируют по всей своей длине, и между хроматидами спаренных хромосом осуществляется кроссинговер. На этой стадии профаза приостанавливается на то или иное время, которое может составлять от нескольких дней до многих лет в зависимости от вида организма. Во время этой затянутой профазы (или, в некоторых случаях, при наступлении половой зрелости) ооциты первого порядка приобретают наружные оболочки и кортикальные гранулы, накапливают рибосомы, желток, гликоген, липиды и информационную РНК, которая впоследствии направляет синтез белков, необходимых для ранних стадий роста эмбриона и подготовки к развертыванию программы развития. Во многих ооцитах такая активность отражается на видимой структуре все еще спаренных хромосом: они деспирализуются и образуют боковые петли, приобретая характерный вид «ламповых щеток», свойственный хромосомам, активно осуществляющим синтез РНК (см. разд. 9.2.4).

Следующая фаза развития, называемая **созреванием** яйцеклетки, начинается лишь с наступлением половой зрелости. Под влиянием гормонов (см. ниже) происходит первое деление мейоза: хромосомы снова конденсируются, ядерная оболочка исчезает (этот момент обыкновенно принимают за начало созревания), и в анафазе I реплицированные гомологичные хромосомы расходятся в дочерние ядра, каждое из которых содержит теперь половину исходного числа хромосом. Но цитоплазма делится очень несимметрично, так что к концу первого деления получаются две клетки, резко различающиеся по величине: одна представлена маленьким **полярным тельцем,** а другая - большим **ооцитом второго порядка,** в котором заложены все возможности для развития. На

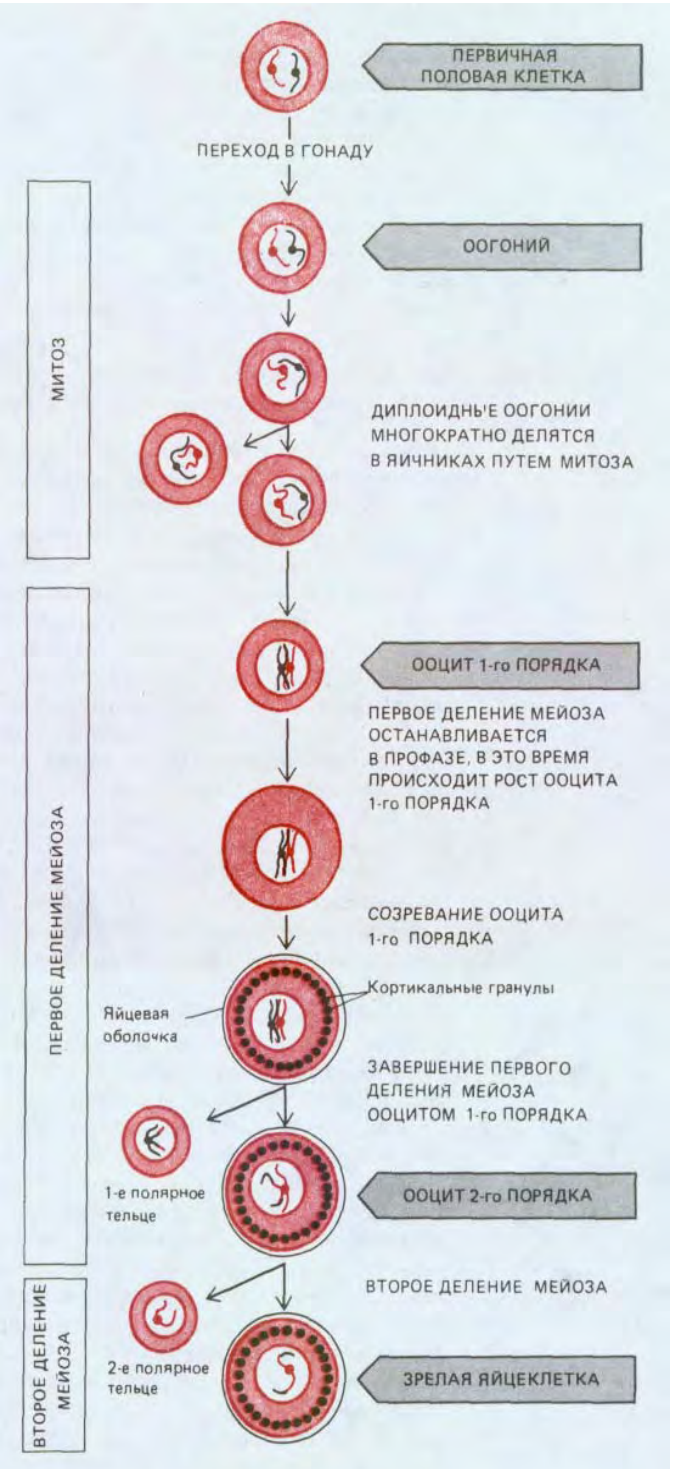


Рис. 15-25. Различные стадии оогенеза. Из первичных половых клеток, мигрирующих в яичник на ранней стадии эмбриогенеза, развиваются оогонии. После ряда митотических делений оогонии приступают к первому делению мейоза, и на этой стадии их называют уже ооцитами первого порядка. У млекопитающих ооциты первого порядка формируются очень рано и остаются на стадии профазы I (у человека это происходит между 3-м и 8-м месяцами эмбрионального развития) до тех пор, пока самка не достигнет половой зрелости. После этого под влиянием гормонов периодически созревает небольшое число ооцитов, которые завершают первое деление мейоза и превращаются в ооциты второго порядка; последние претерпевают второе деление мейоза и становятся зрелыми яйцеклетками. Стадия, на которой яйцеклетка выходит из яичника и оплодотворяется, у разных животных различна. У большинства позвоночных созревание ооцитов приостанавливается на стадии метафазы II и ооцит второго порядка завершает мейоз лишь после оплодотворения. Все полярные тельца в конечном счете дегенерируют. Однако у большинства животных, в том числе и у млекопитающих, полярные тельца остаются внутри яйцевой оболочки, а у некоторых видов первое полярное тельце успевает до дегенерации претерпеть одно деление.

этой стадии каждая из хромосом все еще состоит из двух сестринских хроматид; в таком виде хромосомы остаются вплоть до второго деления мейоза, когда хроматиды отделяются друг от друга в результате процесса, сходного с анафазой митоза (см. разд. 15.2.7). После окончательного расхождения хромосом в анафазе II цитоплазма большого

ооцита второго порядка вновь делится асимметрично, что ведет к образованию зрелой **яйцеклетки** (или яйца) и еще одного маленького полярного тельца; при этом обе клетки получают гаплоидное число одиночных хромосом (см. рис. 15-25). Благодаря двум несимметричным делениям цитоплазмы ооциты сохраняют большую величину, хотя они и претерпели два деления мейоза. Все полярные тельца очень малы, и они постепенно дегенерируют.

У большинства позвоночных созревание ооцитов продолжается до метафазы II и приостанавливается на этой стадии. При **овуляции** ооцит второго порядка освобождается из яичника и в том случае, когда происходит оплодотворение, завершает мейоз.

15.3.4. Яйцеклетка достигает крупных размеров благодаря специальным механизмам [10, 11]

Небольшой соматической клетке диаметром 10-20 мкм обычно требуется около суток, для того чтобы удвоить массу при подготовке к делению. Той же клетке при таких же скоростях синтеза макромолекул понадобилось бы очень много времени, чтобы достичь в тысячу раз большей массы, характерной для яйцеклетки млекопитающего (диаметр 100 мкм), или в миллион раз большей массы яйца насекомого (диаметр 1000 мкм). Между тем некоторые насекомые живут всего лишь несколько дней и ухитряются производить яйца, диаметр которых даже больше 1000 мкм. Ясно, что их яйцеклетки должны обладать особыми механизмами для достижения столь крупных размеров.

Одним из факторов, способствующих такому росту, является наличие в клетке дополнительных копий генов. У яйцеклеток многих животных завершение мейоза откладывается почти до самого конца созревания, так что эти яйцеклетки содержат удвоенный диплоидный набор хромосом в течение большей части периода их роста. Таким образом, они содержат вдвое больше ДНК для синтеза РНК, чем имеет средняя соматическая клетка в фазе клеточного цикла. В некоторых яйцеклетках процесс накопления дополнительной ДНК идет еще дальше, приводя к образованию большого числа добавочных копий определенных генов. В гл. 9 мы уже видели, что для образования достаточного числа рибосом, на которых происходит синтез белков, соматическим клеткам большинства организмов требуется от 10 до 500 копий генов рибосомной РНК. Поскольку яйцеклетки нуждаются в еще большем количестве рибосом для белкового синтеза на ранних стадиях эмбриогенеза, в яйцеклетках многих животных гены рРНК амплифицируются; так, в яйцах рыб и амфибий содержится 1-2 млн. копий таких генов (рис. 15-26).

Рост многих яиц в какой-то степени зависит от биосинтетической активности других клеток. Например, один из важных компонентов крупной яйцеклетки - желток - обычно синтезируется вне яичника и затем переносится в ооцит. У птиц, амфибий и насекомых белковые вещества желтка образуются в клетках печени (или их функциональных аналогах), которые выделяют эти вещества в кровь. Ооциты, находящиеся в яичниках, извлекают эти будущие белковые компоненты желтка из внеклеточной жидкости путем эндоцитоза при участии специфических рецепторов (см. рис. 6-72). Питанию ооцитов могут также способствовать вспомогательные клетки, находящиеся в яичнике. Эту функцию в оогенезе в зависимости от вида организма выполняют вспомогательные клетки яичника двух различных типов. У некоторых беспозвоночных имеются **клетки-кормилицы:** они обычно окружают яйцеклетку и соединены с ней цитоплазматическими мостиками, по которым макромолекулы могут прямо переходить в ее цитоплазму. Клетки-кормилицы синтезируют для яйцеклеток насекомых такие компоненты (рибосомы,

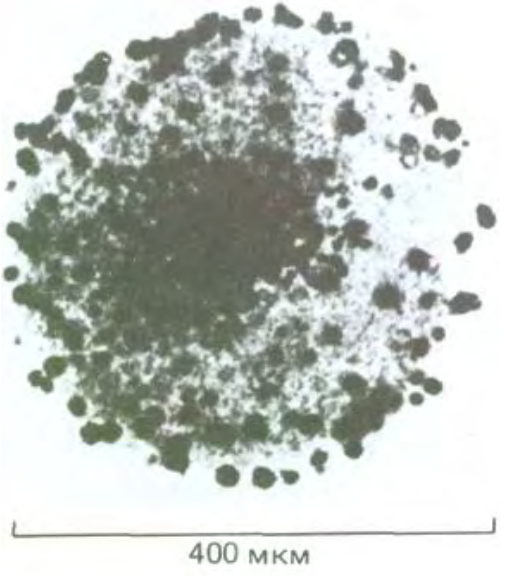


Рис. 15-26. Микрофотография изолированного ядра из яйца лягушки. Ядро окрашено крезиловым фиолетовым, чтобы можно было видеть множество ядрышек результат многократной амплификации генов рибосомной РНК. (D. D. Brown., I. Dawid, Science, **160,** 273-275, 1968.)

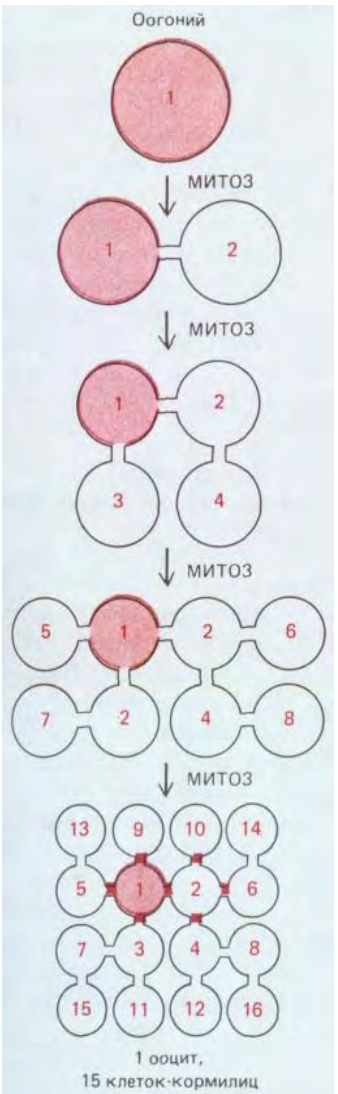


Рис. 15-27. Эта схема показывает, как из одного оогония *Drosophila* образуется 15 клеток-кормилиц и один ооцит; все они связаны между собой цитоплазматическими мостиками. При каждом митозе все клетки однократно делятся: при первом митозе из клетки 1 образуются клетки 1 и 2; при втором митозе из клетки 1 образуются клетки 1 и 3, а из клетки 2-клетки 2 и 4 и т.д. Поскольку цитоплазматические мостики образуются во всех тех местах, где остатки веретена деления связывали во время телофазы две дочерние клетки, эти мостики соединяют лишь те клетки, которые образовались в результате общего митоза. В яйцеклетку превращается только клетка 1 или 2; возможно, это связано с тем, что только эти клетки соединены межклеточными мостиками с четырьмя другими. Необычной особенностью таких делений является то, что размер клетки не удваивается перед митозом, так что с каждым делением клетка становится все меньше и меньше. Позже, во время созревания яйца, клетки-кормилицы становятся чрезвычайно крупными; они образуют большие количества макромолекул и таких органелл, как рибосомы и митохондрии, и «накачивают» их внутрь ооцита по цитоплазматическим мостикам.

мРНК, белки и т. п.), которые у позвоночных яйцеклетка производила бы для себя сама.

У некоторых видов клетки-кормилицы происходят из того же оогония, из которого образуется соединенный с ними ооцит. Например, у дрозофилы оогоний претерпевает четыре митотических деления, в результате которых образуется 16 клеток. Одна из этих клеток становится яйцом, а другие превращаются в клетки-кормилицы и остаются соединенными друг с другом и с яйцом цитоплазматическими мостиками (рис. 15-27). В клетках-кормилицах происходит многократная репликация ДНК без деления самой клетки, поэтому каждая клетка постепенно достигает очень больших размеров, а количество ДНК в ней в тысячу раз превосходит обычную величину (такая ДНК находится в *политенных хромосомах;* см. разд. 9.2.5). Все 15 клеток-кормилиц, содержащих сотни и тысячи эквивалентов генома, синтезируют вещества, необходимые для одной-единственной яйцеклетки.

Еще один вид клеток, которые помогают обеспечить питание развивающихся ооцитов,- это **фолликулярные клетки,** имеющиеся как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Они расположены вокруг ооцита в виде

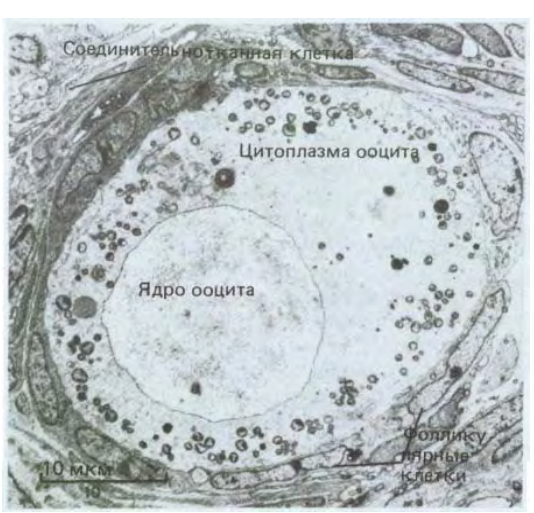


Рис. 15-28. Примордиальный фолликул кролика, состоящий из центрального ооцита, который окружен одним слоем уплощенных фолликулярных клеток (электронная микрофотография). Примордиальный фолликул заключен в базальную мембрану, плохо различимую на фотографии, которая в свою очередь окружена соединительной тканью яичника. Обратите внимание, что на этой стадии развития ооцит первого порядка не имеет zona pellucida и кортикальных гранул. (J. Van Blerkom, P. Motta, Cellular Basis of Mammalian Reproduction, Baltimore: Urban and Schwarzenberg, 1979.)

эпителиального слоя (рис. 15-28) и связаны с ним щелевыми контактами, через которые могут проходить малые молекулы, но не макромолекулы (разд. 14.1.5). Хотя подобные клетки не могли бы через эти контакты снабжать ооцит готовыми макромолекулами, возможно, что они помогают обеспечить его малыми молекулами-предшественниками, из которых образуются макромолекулы. Кроме того, фолликулярные клетки часто выделяют макромолекулы, которые либо входят в состав оболочки яйцеклетки, либо путем эндоцитоза поступают в растущий ооцит.

Благодаря вспомогательным клеткам, окружающим ооцит, становится возможным продолжение его развития; и у позвоночных, и у беспозвоночных именно вспомогательные клетки реагируют на действие полипептидных гормонов *(гонадотропинов),* в результате чего прерывается задержка ооцитов в профазе I и они становятся готовыми к дальнейшему созреванию.

15.3.5. Созревание ооцитов у позвоночных инициируется уменьшением внутриклеточной концентрации циклического AMP [12]

У многих животных завершение ооцитом мейоза I происходит лишь с наступлением половой зрелости, когда в крови появляются **гонадотропины.** Эти полипептидные гормоны стимулируют вспомогательные клетки яичника, побуждая их к выделению вторичного медиатора, который в свою очередь воздействует на ооциты и индуцирует процесс их созревания. Для большинства позвоночных **созреванием яйцеклетки** считается процесс развития ооцита первого порядка, охватывающий период времени от первого деления мейоза до новой задержки ооцита в метафазе II; на этой стадии теперь уже *ооцит второго порядка* остается до оплодотворения, под влиянием которого происходит завершение мейоза (рис. 15-25).

Процесс созревания яйцеклетки лучше всего изучен у амфибий. У этих животных гонадотропины, находящиеся под контролем гипофиза, действуя на окружающие ооциты фолликулярные клетки, инициируют выделение последними стероидного гормона *прогестерона.* Подобно другим стероидным гормонам, прогестерон диффундирует через плазматические мембраны большинства клеток-мишеней и связывается с внутриклеточными рецепторными белками, регулирующими транскрипцию специфических генов (см. разд. 12.2.1). Однако в созревании ооцита прогестерон, по-видимому, участвует иначе: полагают, что он связывается с рецепторными белками плазматической мембраны. При этом происходит инактивация аденилатциклазы плазматической мембраны ооцита, в результате чего снижается концентрация циклического AMP в цитозоле и соответственно активность cAMP-зависимой протеинкиназы (А-киназы, см. разд. 12.4.1).

Имеются убедительные свидетельства того, что снижение активности А-киназы является необходимым и достаточным условием для запуска программы созревания ооцита. Микроинъекции каталитически активного фрагмента киназы, активного в отсутствие циклического AMP (см. разд. 12.4.2), ингибируют созревание, индуцируемое прогестероном, тогда как микроинъекции специфического ингибитора киназы инициируют созревание даже при отсутствии прогестерона. Эксперименты на мышиных ооцитах, проводившиеся также с помощью метода микроинъекций, показали, что у млекопитающих действует аналогичный внутриклеточный механизм передачи сигналов. Субстраты А-киназы пока не выявлены, однако полагают, что ими могут быть фосфопротеины, входящие в *систему прерывания мейотического деления I,* ответственную за задержку ооцита в профазе I. По имеющейся гипотезе,

активность таких фосфопротеинов определяется фосфорилированием, осуществляемым А-киназой; падение уровня циклического АМР снимает блокировку мейоза и инициирует его продолжение.

15.3.6. Созревание ооцитов связано с активацией фактора инициации М-фазы [13]

Пока еще не выяснено, как развиваются события после падения уровня циклического АМР, но в конце концов они приводят к активации белкового комплекса, называемого **фактором инициации М-фазы (ФИМ);** полагают, что он необходим для выхода из профазы I мейоза. В гл. 13 говорилось о том, что ФИМ крайне мало изменился в процессе эволюции эукариот. Его ключевая роль в обычном цикле клеточного деления обусловлена тем, что он инициирует переход клетки из G_2 в М-фазу (см. разд. 13.1.10). Как уже упоминалось, профаза I мейоза, несмотря на свое традиционное название, очень похожа на фазу G_2 обычного клеточного цикла: ДНК уже реплицировалась и является активной в отношении транскрипции, ядерная оболочка интактна, а митотическое веретено деления еще не сформировалось. Более того, подобно переходу из G_2 в М-фазу обычной делящейся клетки, переход от профазы I к М-фазе мейоза запускается ФИМ. В действительности ФИМ был впервые обнаружен в ооцитах лягушки в качестве *фактора, инициирующего созревание.* Зрелые ооциты лягушки задерживаются на стадии метафазы II, когда уровень ФИМ высок (см. далее). Если небольшую часть цитоплазмы такого зрелого ооцита ввести в незрелый ооцит, то под воздействием содержащегося в инъекции ФИМ нарушится целостность мембраны и начнется конденсация хромосом, т. е. будут наблюдаться эффекты, характерные для М-фазы и свидетельствующие о зрелости ооцита.

Замечательное свойство ФИМ состоит в том, что его можно неограниченно долго последовательно переносить из одного ооцита в другой без потери активности, несмотря на то что при подобных последовательных переносах разбавление раствора с ФИМ достигает огромных значений. Это означает, что инъекции ФИМ стимулируют синтез в реципиенте-ооците еще больших количеств ФИМ. Амплификация происходит даже в безъядерных ооцитах и в присутствии ингибиторов синтеза белков; такой факт указывает на то, что ФИМ скорее всего активирует уже существующие ФИМ, а не индуцирует синтез новых ФИМ.

Какой механизм лежит в основе такой автокаталитической реакции саморазмножения? Несмотря на то что к настоящему времени ФИМ еще не изучен досконально, имеются свидетельства того, что он фосфорилирован, что фосфорилированию принадлежит важная роль в возбуждении активности ФИМ и что по меньшей мере один из компонентов ФИМ является протеинкиназой. Таким образом, ФИМ может сам себя фосфорилировать и, следовательно, активировать. В ооцитах лягушки *инактивация* А-киназы под действием прогестерона инициирует сложную последовательность событий (сопряженную с синтезом белков), которая в конце концов приводит к активации небольших количеств ФИМ, которые, в свою очередь, активируют новые ФИМ. Интенсивное фосфорилирование структурных белков ядерных оболочек и хромосом характерно для процессов, наблюдаемых в М-фазе (см. разд. 13.5.11), поэтому напрашивается предположение о том, что ФИМ синтезирует еще и неизвестную протеинкиназу, которая вызывает такого рода дальнейшие изменения (рис. 15-29).

Считают, что циклические изменения активности ФИМ, по-видимому, являются решающим фактором регуляции обычного митотического клеточного цикла, определяя моменты вступления клетки в митоз

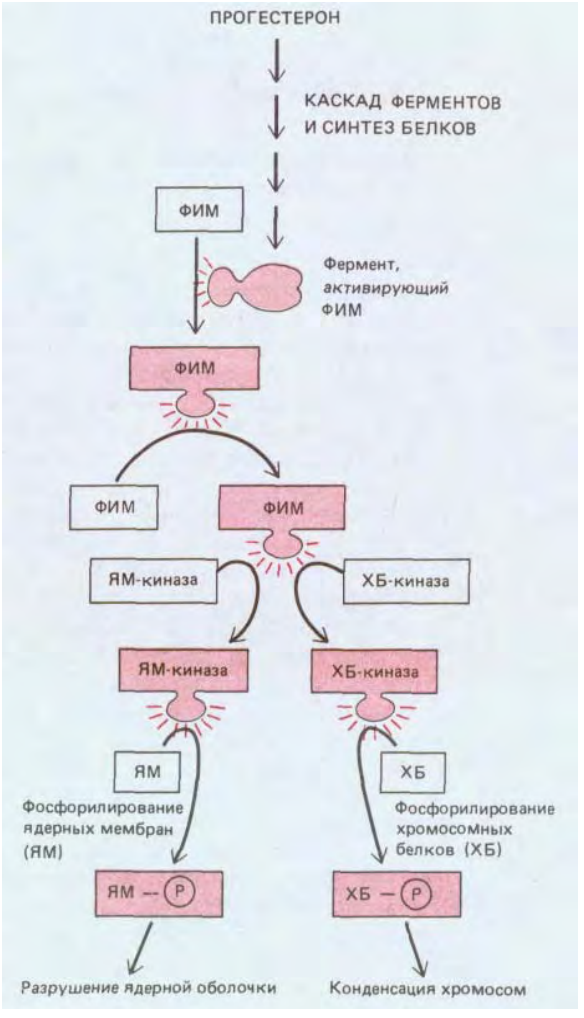


Рис. 15-29. Модель, демонстрирующая, каким образом вслед за воздействием прогестерона фактор инициации М-фазы (ФИМ) может индуцировать переход яйца лягушки из профазы 1 в метафазу. По предложенной гипотезе, прогестерон косвенно вызывает образование соответствующего фермента, который активирует небольшие количества ФИМ. Это приводит к активации не только больших количеств ФИМ (многократно усиленный отклик), но и протеинкиназ, фосфорилирующих ядерные мембраны и хромосомные белки. В результате целостность ядерной оболочки нарушается, хромосомы конденсируются и, таким образом, клетка вступает в метафазу. Последующая инактивация ФИМ приводит к тому, что воссоздается ядерная оболочка, хромосомы деконденсируются и, таким образом, клетка может вступить во второе деление мейоза (на рисунке не показано). Возможно, аналогичный механизм лежит в основе процесса созревания ооцитов млекопитающих. Один из компонентов ФИМ идентифицирован: это протеинкиназа. Она гомологична протеинкиназе дрожжей, кодируемой геном *cdc2/28* и играющей ключевую роль в регуляции клеточного цикла дрожжевых клеток.

и выхода из него (см. разд. 13.1.10). По-видимому, при созревании ооцитов ФИМ претерпевает аналогичные циклические изменения. Увеличение количества ФИМ сначала запускает прохождение ооцита через профазу и вступление его в метафазу I деления мейоза. Затем последующая инактивация ФИМ позволяет ооцитам завершить деление ядра, а новая активация ФИМ инициирует переход клетки в М-фазу II деления мейоза. Полагают, что *система задержки II мейотического деления* (ее иногда отождествляют с *цитостатическим фактором,* или ЦСФ, свойства которого слабо изучены) на этой стадии предотвращает инактивацию ФИМ, приостанавливая таким образом зрелые яйцеклетки на стадии метафазы П. Оплодотворение, возможно, благодаря повышению концентрации Ca^{2+} в цитозоле (см. разд. 15.4.5), позволяет ооцитам завершить II деление мейоза и вместе с последовательными сериями активации и инактивации ФИМ, определяющими прохождение клеток через повторяющиеся митотические деления, запускает процесс развития эмбриона.

15.3.7. Большая часть ооцитов, не созревая, погибает в яичнике человека [14]

Несмотря на то что молекулярные механизмы, лежащие в основе важнейших моментов в процессе развития и созревания ооцитов, по всей



Рис. 15-30. Микрофотография созревающего фолликула в яичнике крольчихи. Ооцит первого порядка крупнее, чем более молодые ооциты, представленные на рис. 15-28, и уже имеет кортикальные гранулы (на этом фото они плохо видны), а также узкую zona pellucida; ооцит окружен слоями фолликулярных клеток. Внутренние фолликулярные клетки имеют отростки, которые проходят сквозь zona pellucida и образуют щелевые контакты с ооцитом (правда, на фотографии все эти структуры видны нечетко). Весь фолликул окружен базальной мембраной. (J. Van Blerkom, P. Motta. Cellular Basis of Mammalian Reproduction, Baltimore, Urban and Schwarzenberg, 1979.)

видимости, весьма сходны у всех позвоночных, временные параметры этих процессов и характер запускающих их внеклеточных сигналов могут варьировать весьма значительно. Например, у человека эти сигналы значительно более сложны и гораздо менее изучены, чем у амфибий. Более того, количества зрелых яйцеклеток, образующихся у представителей этих двух видов, различаются поразительным образом. У самки лягушки в каждый сезон размножения на протяжении всего репродуктивного периода жизни из оогоний образуются ооциты; сотни их делятся и претерпевают овуляцию под действием гормонов. У женщины же лишь в первые месяцы внутриутробного развития из оогоний образуется несколько миллионов ооцитов, и все они, за исключением нескольких сотен, не созревая, погибают в яичнике.

Ооциты первого порядка у новорожденной девочки останавливаются в профазе I мейоза (подобно ооцитам первого порядка у амфибий), и большая их часть окружена одним слоем фолликулярных клеток; такой ооцит вместе с этими фолликулярными клетками представляет собой **примордиальный фолликул** (рис. 15-28). За некоторое время до рождения небольшая доля примордиальных фолликулов периодически начинает расти, превращаясь в **развивающиеся фолликулы:** их клетки увеличиваются и размножаются, образуя вокруг ооцита первого порядка многослойную оболочку; сам ооцит, оставаясь в профазе 1, растет, и у него формируются zona pellucida и кортикальные гранулы (рис. 15-30). В некоторых из развивающихся фолликулов образуется наполненная жидкостью полость, или *antrum,* при этом они превращаются в **антральные фолликулы** (рис. 15-31). Чем индуцируется первоначальный рост отдельных примордиальных фолликулов и превращение их в развивающиеся фолликулы, пока неясно. Однако продолжение развития, вероятно, зависит от гонадотропных гормонов гипофиза [в основном от *фолликулостимулирующего гормона (ФСГ)]* и от эстрогенов, секретируемых самими фолликулярными клетками.

Все развивающиеся фолликулы продолжают расти и в конце концов либо дегенерируют, либо в процессе овуляции высвобождают находящиеся внутри них ооциты. Однако созревание ооцита (прохождение через профазу I) и овуляция происходят лишь после наступления половой зрелости. С этого времени раз в месяц (примерно в середине менструального цикла) резкий подъем уровня другого гонадотропина - *лютеинизирующего гормона (ЛГ),* выделяемого гипофизом, - стимулирует рост в яичнике 15-20 тыс. развивающихся фолликулов. Из всех этих фолликулов лишь один завершает свое развитие: заключенный в нем ооцит первого порядка созревает, доходит до метафазы II деления мейоза и останавливается на этой стадии. Единственный стимулированный фолликул тем временем быстро увеличивается в размерах и разрывается на поверхности яичника, освобождая находящийся внутри него ооцит второго порядка, который к этому времени все еще остается заключенным в оболочку из фолликулярных клеток, внедренную в студ-



Рис. 15-31. Микрофотография антрального фолликула в яичнике крольчихи. Теперь здесь имеется много слоев фолликулярных клеток. Ядра ооцитов не попали в плоскость сечения и поэтому не видны на фотографии. Для сравнения обратите внимание на примордиальный фолликул значительно меньших размеров в верхнем правом углу. (J. Van Blerkom, P. Motta. Cellular Basis of Mammalian Reproduction, Baltimore, Urban and Schwarzenberg, 1979.)

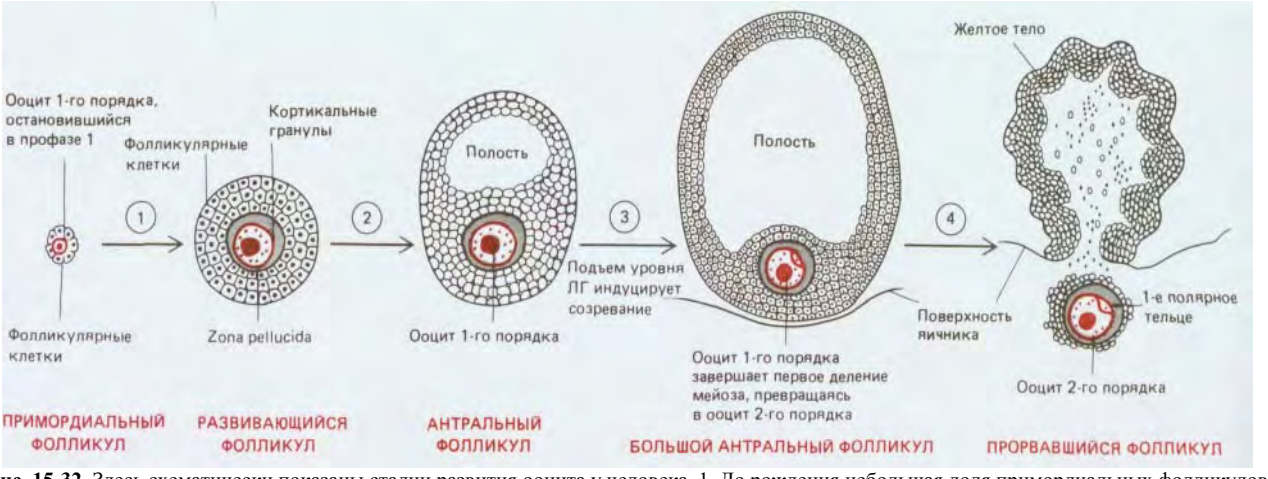


Рис. 15-32. Здесь схематически показаны стадии развития ооцита у человека. 1. До рождения небольшая доля примордиальных фолликулов последовательно начинает расти, и эти фолликулы называют теперь развивающимися. 2. Некоторые из развивающихся фолликулов накапливают жидкость, превращаясь в антральные фолликулы. 3. С наступлением половой зрелости раз в месяц волна лютеинизирующего гормона (ЛГ) побуждает примерно 20 антральных фолликулов к ускоренному росту, однако завершает созревание и претерпевает овуляцию лишь один из этих фолликулов; ооцит первого порядка, находящийся в этом фолликуле, завершает первое деление мейоза, образуя полярное тельце и превращаясь в ооцит второго порядка (рис. 15-25). 4. Ооцит второго порядка, который был остановлен на стадии метафазы мейоза II, вместе с полярным тельцем и частью окружающих полярных клеток освобождается в тот момент, когда фолликул разрывается на поверхности яичника. Ооцит второго порядка завершает второе деление мейоза только в том случае, если он будет оплодотворен. После овуляции опустевший фолликул превращается в эндокринное образование *(желтое тело),* которое секретирует прогестерон, тем самым готовя матку к приему оплодотворенного ооцита. Если оплодотворение не наступает, желтое тело претерпевает обратное развитие, а внутренняя слизистая оболочка матки отслаивается и выводится из организма во время менструации.

необразный матрикс (рис. 15-32). Инициация завершения мейоза у освобожденного ооцита произойдет лишь в том случае, если он будет оплодотворен спермием не позже, чем через сутки (или чуть более того).

Каким образом подъем уровня ЛГ, происходящий в середине менструального цикла, инициирует созревание ооцита? По-видимому, фолликулярные клетки, окружающие ооцит, обычно оказывают ингибирующее воздействие на его созревание, поскольку ооциты спонтанно возобновляют ход мейоза в том случае, когда от них удаляют антральные фолликулы и лишают среду, в которой культивируется ооцит, стимулирующих гормонов.. Подъем уровня ЛГ может стимулировать созревание яйцеклетки путем устранения ингибирующего воздействия фолликулярных клеток.

Одна из загадочных особенностей созревания яйцеклетки у человека состоит в том, что лишь малая часть из многочисленных антральных фолликулов, имеющихся в яичниках к моменту ежемесячного выброса ЛГ, начинает расти, и из этих растущих фолликулов только один завершает созревание и освобождает ооцит: остальные обречены на дегенерацию. Вероятно, тотчас после того, как созревание «избранного» фолликула достигло определенной критической точки, вступает в действие некий механизм обратной связи, благодаря которому никакой другой фолликул не может созреть и претерпеть овуляцию в том же цикле. Это означает, что в течение примерно 40-летнего репродуктивного периода у женщины выделяется лишь 400-500 яйцеклеток. Оставшиеся 3 млн. ооцитов первого порядка, имевшиеся в организме к моменту рождения, дегенерируют. До сих пор остается загадкой, почему огромное число яйцеклеток формируется лишь для того, чтобы погибнуть в яичниках.

Ооциты второго порядка, освобождающиеся из яичника (при овуляции) к концу репродуктивного периода, образуются из ооцитов первого порядка, которые провели в остановленной профазе I от 40 до 50 лет. Дефекты, возникающие за это время в яйцеклетке, могут быть причиной высокой частоты генетических аномалий среди детей, рожденных немолодыми женщинами. Например 1% детей у женщин старше 40 лет страдает *синдромом Дауна,* обусловленным трисомией по 21-й хромосоме (следствие нерасхождения соответствующих гомологов при делении ядра созревающего ооцита в мейозе I) (рис. 15-33).

15.3.8. Спермии отлично приспособлены для внесения своей ДНК в яйцеклетку [15]

У большинства видов имеется два вида гамет, поразительно отличающихся друг от друга. Если яйцеклетка - одна из самых крупных клеток

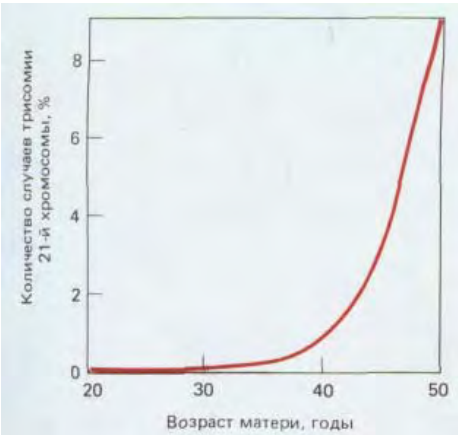


Рис. 15-33. Увеличение числа случаев трисомии по 21-й хромосоме (синдрома Дауна) у новорожденных в зависимости от возраста матери. (По: L. Mastroianni, Jr. and J. D. Digger, eds. Fertilization and Embryonic Development in Vitro, p. 260, Plenum, 1981.

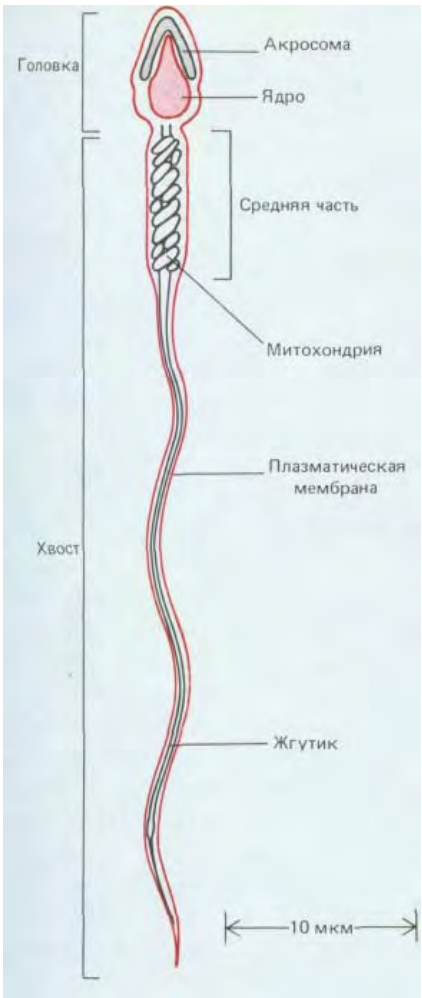


Рис. 15-34. Сперматозоид человека, схематически представленный в продольном разрезе.

организма, то **спермий** (или **сперматозоид)** обычно меньше всех других клеток. Яйцеклетка и сперматозоид наилучшим образом, но по-разному, приспособлены для распространения имеющихся в них генов. Яйцеклетка обеспечивает выживаемость материнских генов за счет больших запасов веществ, необходимых для роста и развития, а также благодаря прекрасной защитной оболочке. В противоположность этому сперматозоид обычно наилучшим образом справляется с задачей оплодотворения и сохранения отцовских генов благодаря тому, что является исключительно подвижным и обладает обтекаемой формой, позволяющей ему быстро двигаться. Сперматозоиды действуют в условиях жесточайшей конкуренции, и подавляющее их большинство погибает в процессе исполнения своей миссии: из миллиардов сперматозоидов, выделяемых мужчиной в течение репродуктивного периода жизни лишь считанные единицы достигают своей цели и оплодотворяют яйцеклетку.

Типичный спермий (рис. 15-34)-это клетка, снабженная мощным жгутиком, благодаря которому она движется в жидкой среде; при этом спермий «избавлен от всего лишнего» и не обременен такими органеллами, как рибосомы, эндоплазматический ретикулум или аппарат Гольджи, присутствия которых не требуется для передачи ДНК яйцеклетке. С другой стороны, спермии содержат много митохондрий, расположенных в тех местах, где они могут наиболее эффективно снабжать энергией жгутик. Спермий обычно состоит из двух морфологически и функционально различающихся частей, заключенных в единую плазматическую мембрану: из **головки,** содержащей необычайно сильно уплотненное гаплоидное ядро, и **хвоста,** который продвигает всю клетку по направлению к яйцу и способствует прохождению головки через яйцевую оболочку. ДНК в ядре неактивна и исключительно плотно упакована, так что объем ее доведен до минимума. Хромосомы многих сперматозоидов обходятся даже без гистонов, свойственных соматическим клеткам, вместо этого здесь имеются простые белки, обладающие большим положительным зарядом.

В головке спермия, вплотную к передней части ядерной мембраны, располагается специализированный секреторный пузырек, называемый **акросомой** (рис. 15-34). Этот пузырек содержит гидролитические ферменты, позволяющие спермию проникнуть сквозь наружные яйцевые оболочки. Когда его головка приходит в контакт с яйцеклеткой, содержимое акросомы высвобождается путем экзоцитоза (так называемая *акросомальная реакция).* У беспозвоночных в ходе этой реакции выводятся наружу специфические белки, прочно прикрепляющие спермий к яйцевой оболочке (см. разд. 15.4.2).

Подвижный хвост спермия представляет собой длинный жгутик, аксонема которого начинается от базального тельца, расположенного сразу за ядром. Ранее (разд. 11.3.5) уже говорилось, что аксонема состоит из двух одиночных центральных микротрубочек, окруженных девятью равноотстоящими друг от друга дублетами микротрубочек. У некоторых животных (в том числе у млекопитающих) жгутик спермия отличается от других жгутиков тем, что вокруг его аксонемы лежат еще девять *внешних плотных волокон* неизвестного состава, так что вместо обычной схемы 9 + 2 мы имеем здесь схему 9 + 9 + 2 (рис. 15-35 и 15-36). Эти плотные волокна жестки и не могут сокращаться; неизвестно, способствуют ли они энергичным изгибам жгутика, которые вызываются скольжением соседних дублетов микротрубочек относительно друг друга (разд. II.3.6). Энергию для движения жгутика поставляет гидролиз ATP, синтезируемого высокоспециализированными митохондриями, которые находятся именно там, где они больше всего нужны, т. е. в передней части хвоста (называемой *средней частью сперматозоида)* (рис. 15-34 и 15-35).



Рис. 15-35. Средняя часть сперматозоида млекопитающего в поперечном разрезе (по данным электронной микроскопии). Жгутик состоит из аксонемы и девяти окружающих ее плотных волокон. Аксонема построена из двух одиночных микротрубочек, окруженных девятью двойными микротрубочками. Расположение митохондрии (изображена в цвете) отлично обеспечивает доставку АТР, необходимого для движения жгутика; ее необычное строение является результатом слияния отдельных митохондрий во время дифференцировки сперматиды

15.3.9. У многих млекопитающих спермии образуются постоянно [16]

Между процессами образования яйцеклеток (оогенез) и сперматозоидов **(сперматогенез)** у млекопитающих существует ряд важных различий. Например, мы уже говорили о том, что у женщин на ранней стадии эмбриогенеза из размножающихся оогоний образуется ограниченное число ооцитов, которые через определенные промежутки времени по очереди претерпевают овуляцию. С другой стороны, сперматогенез у мужчин начинается только после полового созревания и затем непрерывно продолжается в эпителиальной выстилке очень длинных, сильно извитых трубочек, называемых *семенными канальцами,* которые находятся в семенниках. Незрелые половые клетки, называемые **сперматогониями,** располагаются на самой периферии канальца, у базальной мембраны, где они все время делятся путем митоза. Некоторые из дочерних клеток перестают делиться и дифференцируются в **сперматоциты первого порядка.** Эти клетки вступают в I профазу мейоза, в которой происходит кроссинговер между их спаренными гомологичными хромосомами, а затем заканчивают первое деление, образуя по два **сперматоцита второго порядка;** у человека каждый из них содержит 22 дуплицированные аутосомы и одну дуплицированную хромосому X или Y. Каждая хромосома по-прежнему состоит из двух сестринских хроматид, и когда оба сперматоцита второго порядка претерпевают второе деление мейоза, образуются четыре **сперматиды** с гаплоидным числом одиночных хромосом. Затем такие гаплоидные сперматиды в результате морфологической дифференцировки превращаются в зрелые спермии, которые выходят в просвет семенного канальца (рис. 15-37 и 15-38), а позднее - в *придаток семенника,* представляющий собой извитую трубочку, охватывающую семенник; здесь спермии накапливаются и здесь же продолжается их созревание.

Подобно оогенезу, сперматогенез находится под влиянием гормональной регуляции. После наступления половой зрелости гипофиз мужчины начинает выделять гормон, о котором уже говорилось при обсуждении оогенеза у млекопитающих; это лютеинизирующий гормон (ЛГ). Под воздействием ЛГ клетки Лейдига, расположенные между семенными канальцами в семенниках, выделяют большие количества мужского полового гормона *тестостерона.* Последний в свою очередь инициирует сперматогенез; возможно, это происходит благодаря действию тестостерона на *клетки Сертоли,* которые сплошным слоем покрывают развивающиеся спермии, защищая их и обеспечивая их питание (рис. 15-38).

Одна из загадочных и уникальных особенностей спермиев состоит в том, что в процессе их развития митотические и мейотические деления не сопровождаются полным, доведенным до конца делением цитоплазмы (цитокинезом); поэтому все дифференцирующиеся дочерние клетки, происходящие из одного сперматогония, соединены цитоплазматическими мостиками (рис. 15-39). Такие мостики остаются до самого конца дифференцировки спермиев, т. е. до того момента, когда отдельные



Рис. 15-36. Поперечный срез жгутика сперматозоида морской свинки (электронная микрофотография). Здесь отсутствуют митохондрии, поскольку сечение произведено в области хвоста сперматозоида, позади его средней части. В представленном участке жгутика два из девяти плотных волокон оканчиваются и сливаются с внешней волокнистой оболочкой. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)



Рис. 15-37. Различные стадии сперматогенеза. Сперматогонии развиваются из первичных половых клеток, мигрирующих в семенники на ранней стадии эмбрионального развития. Когда животное достигает половой зрелости, сперматогонии начинают быстро размножаться, причем часть из их потомков сохраняет способность к непрерывным неограниченным делениям (сперматогонии типа стволовых клеток), а другая часть (созревающие сперматогонии) после ограниченного числа последовательных митозов приступает к мейозу, превращаясь в сперматоциты первого порядка. После завершения второго деления мейоза сперматоциты первого порядка превращаются в гаплоидные сперматиды, дифференцирующиеся в зрелые спермии. Сперматогенез отличается от оогенеза (рис. 15-25) в нескольких отношениях: 1) после полового созревания в мейоз непрерывно вступают новые клетки; 2) из каждой приступившей к мейозу клетки образуется не одна, а четыре зрелые гаметы и 3) зрелые спермии формируются после завершения мейоза в ходе сложного процесса клеточной дифференцировки.

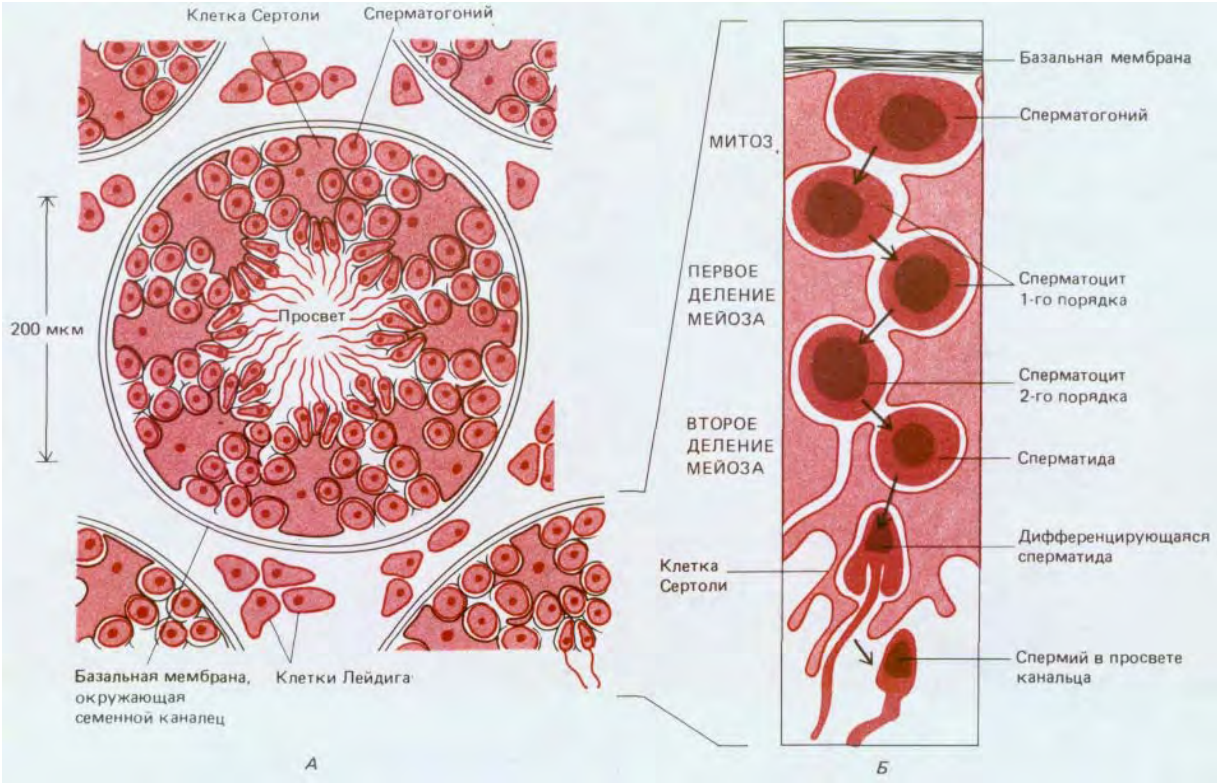


Рис. 15-38. Крайне упрощенная схема поперечного разреза семенного канальца из семенника млекопитающего. *А.* На всех представленных здесь стадиях сперматогенеза развивающиеся гаметы тесно связаны с *клетками Сертоли;* последние представляют собой крупные клетки, занимающие пространство от базальной мембраны до просвета семенного канальца. На ход сперматогенеза оказывает влияние тестостерон, выделяемый *клетками Лейдига,* которые располагаются в промежутках между семенными канальцами. *Б.* Делящиеся сперматогонии находятся вблизи базальной мембраны. Некоторые из этих клеток перестают делиться путем митоза и приступают к мейозу, превращаясь в сперматоциты первого порядка. В конце концов зрелые спермии выходят в просвет канальца. Завершение сперматоцитом мейоза и превращение его в сперматиду занимает у человека около 24 дней, и еще 5 недель требуется на превращение сперматиды в спермий. Спермии претерпевают дальнейшее созревание, обретают подвижность в придатке яичка и лишь тогда становятся совершенно зрелыми.

сперматозоиды переходят в просвет канальцев. Группа клеток, связанных подобным образом, называется *синцитием.* Наличие этой структуры объясняет синхронность появления зрелых спермиев в любом данном участке семенного канальца.

15.3.10. Ядра спермиев гаплоидны, однако, процессом дифференцировки этих клеток управляет диплоидный геном [17]

В отличие от яйцеклеток у сперматозоидов дифференцировка в основном осуществляется после того, как они завершают мейоз и становятся гаплоидными. Благодаря цитоплазматическим мостикам, каждый развивающийся гаплоидный спермий может получать весь набор продуктов полного диплоидного генома. То, что дифференцировкой спермиев, так же как и дифференцировкой яйцеклеток, управляет диплоидный геном, важно по двум причинам. Во-первых, в исходном диплоидном геноме, как правило, содержится некоторое число дефектных аллелей - рецессивных летальных мутаций (разд. 15.1.4); гаплоидная клетка, получившая один из этих дефектных аллелей, весьма вероятно, погибнет, если она не будет обеспечена продуктами нормального аллеля, закодированными в других ядрах, которые его содержат. Во-вторых, у некоторых организмов (например, у человека) одни спермии получают при мейозе X-хромосому, а другие - Y-хромосому. Поскольку X-хромосома содержит много весьма важных генов, отсутствующих в Y-хромосоме, можно думать, что если бы не цитоплазматические мостики между развивающимися спермиями, то те из них, которые получили Y-хромосому, не выжили бы, и в результате в следующем поколении не было бы ни одного мужчины.

И в самом деле, имеются прямые экспериментальные данные о том, что дифференцировкой спермиев управляют продукты диплоидного

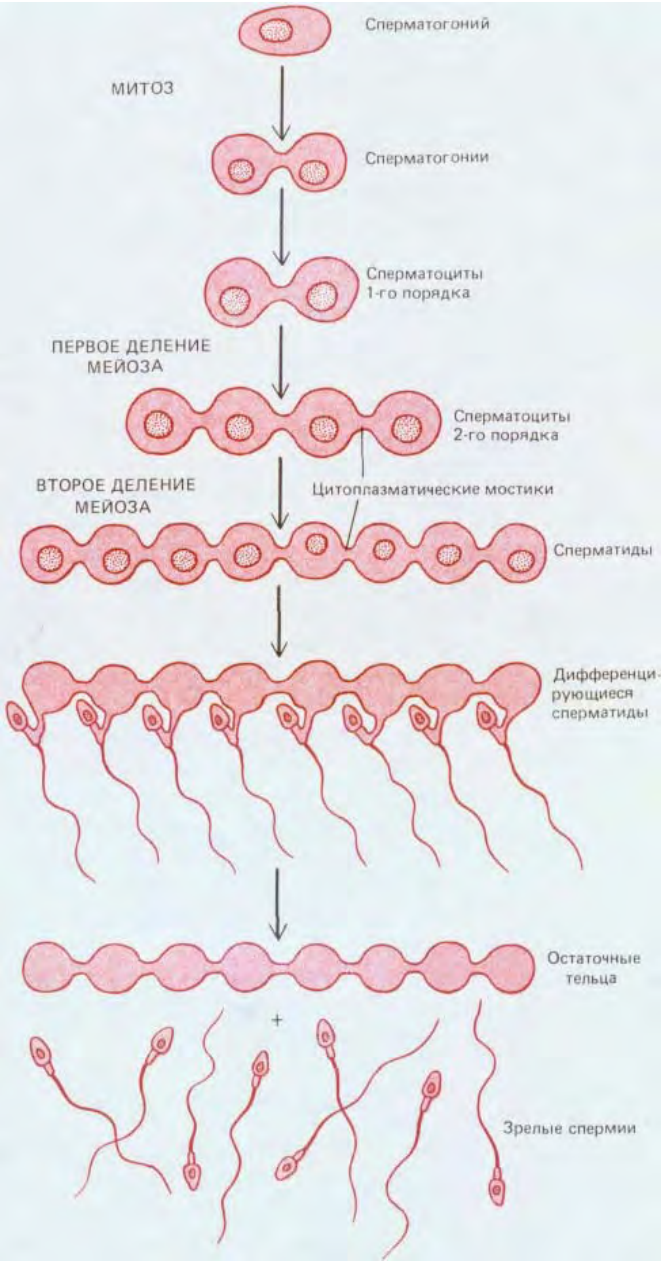


Рис. 15-39. Эта схема показывает, каким образом потомки одного созревающего сперматогония на протяжении всего периода дифференцировки их в зрелые спермии остаются связанными друг с другом цитоплазматическими мостиками. Для простоты показано, что в митоз вступают только два созревающих соединенных сперматогония, из которых в конечном счете образуются восемь связанных между собой гаплоидных сперматид. На самом деле число связанных клеток, проходящих два деления мейоза и совместно дифференцирующихся, значительно больше, чем здесь показано.

генома. Часть таких данных была получена при исследовании *дефектных в отношении расхождения хромосом мутантов* дрозофилы, у которых в процессе мейоза хромосомы неравномерно распределяются между дочерними клетками; в результате одни сперматозоиды содержат слишком мало хромосом, другие - слишком много, а у некоторых их вообще нет. Поразительно то, что дифференцировка всех этих клеток, даже тех, в которых вовсе нет хромосом, протекает нормально. Этот факт можно объяснить на основе упомянутого выше предположения: продукты недостающих хромосом могли бы доставляться путем диффузии по цитоплазматическим мостикам, связывающим соседние клетки. Не исключено и иное объяснение: в диплоидных сперматогониях или сперматоцитах первого порядка могут заранее, еще до мейоза, создаваться «инструкции» для дифференцировки спермия (предположительно в виде долгоживущих мРНК), так что нет необходимости в функционировании гаплоидного генома в период самой дифференцировки. Независимо от

того, какое из этих объяснений верно, очевидно, что при дифференцировке спермии используются продукты обоих хромосомных наборов, хотя собственное ядро клетки при этом гаплоидно.

Заключение

Яйцеклетки развиваются из первичных половых клеток, которые на ранней стадии развития организма мигрируют в яичник и превращаются там в оогонии. После периода митотического размножения оогонии становятся ооцитами первого порядка, которые, вступив в первое деление мейоза, задерживаются в профазе I на время, измеряемое сутками или годами в зависимости от вида организма. В период этой задержки ооцит растет и накапливает рибосомы, мРНК и белки, зачастую используя при этом другие клетки, включая окружающие вспомогательные клетки. Дальнейшее развитие (созревание яйцеклетки) зависит от полипептидных гормонов (гонадотропинов), которые, воздействуя на окружающие каждый ооцит вспомогательные клетки, побуждают их индуцировать созревание небольшой части ооцитов. Эти ооциты завершают первое деление мейоза, образуя маленькое полярное тельце и крупный ооцит второго порядка, который позже переходит в метафазу второго деления мейоза; у многих видов ооцит задерживается на этой стадии до тех пор, пока оплодотворение не инициирует завершение мейоза и начало развития эмбриона.

Спермий обычно представляет собой маленькую и компактную клетку, которая в высокой степени специализирована для функции внесения своей ДНК в яйцеклетку. В то время как у многих организмов весь пул ооцитов образуется еще на ранней стадии развития самки, у самцов после наступления половой зрелости в мейоз непрерывно вступают все новые и новые половые клетки, причем каждый сперматоцит первого порядка дает начало четырем зрелым спермиям. Дифференцировка спермиев осуществляется после мейоза, когда ядра гаплоидны. Однако, поскольку при митотическом делении зрелых сперматогониев и сперматоцитов цитокинез не доводится до конца, потомки одного сперматогония развиваются в виде синцития. В связи с этим дифференцировка спермия может контролироваться продуктами хромосом от обоих родителей.

15.4. Оплодотворение [18]

После своего выхода из гонады как яйцеклетка, так и спермий обречены на гибель в считанные часы, если они не отыщут друг друга и не сольются в процессе **оплодотворения.** Оплодотворение спасает эти клетки от гибели: яйцеклетка активируется и приступает к осуществлению программы развития, а ядра двух гамет сливаются, формируя таким образом геном нового организма. Большая часть того, что нам известно об оплодотворении, - это результат исследований на морских беспозвоночных, в особенности на морских ежах (рис. 15-40). У подобных организмов оплодотворение осуществляется в морской воде, куда выводятся огромные количества сперматозоидов и яиц. Такой процесс *наружного оплодотворения* гораздо более доступен для изучения, чем *внутреннее оплодотворение* у млекопитающих, осуществляющееся в половых путях самки. В связи с этим наше обсуждение оплодотворения будет относиться главным образом к морским ежам. Несмотря на огромную эволюционную дистанцию, которая отделяет млекопитающих от морских ежей, клеточные и молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса их оплодотворения, по-видимому, весьма сходны.



Рис. 15-40. Фотография двух видов морских ежей, обычно используемых при изучении оплодотворения. Наверху показан *Strongylocentrotus purpuratus,* внизу *Strongylocentrotus franciscanus.* Фотографии почти в натуральную величину. (С любезного разрешения Victor Vacquier.)

15.4.1. Контакт со студенистой оболочкой яйца инициирует у спермии морского ежа акросомальную реакцию [19]

У самки типичного морского ежа в организме содержится 10^7 яиц, а у самца - 10^{12} спермиев, что дает возможность получать гаметы морского ежа в очень больших количествах в виде чистых популяций, где все клетки находятся на одинаковой стадии развития. При смешении гамет различные этапы взаимодействия спермиев с яйцеклетками протекают синхронно с точностью до секунд. Процесс оплодотворения начинается в тот момент, когда головка спермия приходит в соприкосновение со студенистой оболочкой (рис. 15-24) яйцеклетки. Такой контакт инициирует у спермия **акросомальную реакцию.** В этой реакции содержимое акросомы выводится в окружающее пространство. У морских ежей и многих других морских беспозвоночных высвобождение содержимого акросомы сопровождается образованием длинного содержащего актин **акросомального отростка,** который вытягивается из переднего конца спермия. Как показано на рис. 15-41, кончик этого отростка покрывается компонентами бывшей мембраны акросомы, а также содержимым акросомы, включающим: 1) гидролитические ферменты, с помощью которых спермий проходит через студенистую оболочку яйцеклетки и достигает вителлинового слоя; 2) специфические белки, обеспечивающие связывание верхушки отростка с вителлиновым слоем (см. ниже), и 3) гидролитические ферменты, благодаря которым акросомальный отросток прокладывает себе путь сквозь этот слой к плазматической мембране яйцеклетки. При контакте мембрана на кончике акросомального отростка сливается с мембраной яйцеклетки, что позволяет ядру сперматозоида войти в яйцеклетку (рис. 15-41).

У спермиев морского ежа акросомальную реакцию вызывает полисахаридный компонент (полимер сульфатированной фруктозы) студенистой оболочки яйца: если выделить это вещество из яиц и добавить его к сперматозоидам, оно за несколько секунд инициирует обычную акросомальную реакцию. Полисахарид студенистой оболочки связывается с гликопротеиновым рецептором плазматической мембраны спермия, вызывая ее деполяризацию; по-видимому, в результате такой деполяризации в мембране открываются каналы для Ca^{2+}, что позволяет ионам Ca^{2+} войти в спермий. В то же время полисахарид студенистой оболочки активирует протонные насосы плазматической мембраны спермия; эти насосы обеспечивают отток из клетки ионов H^+ в обмен на

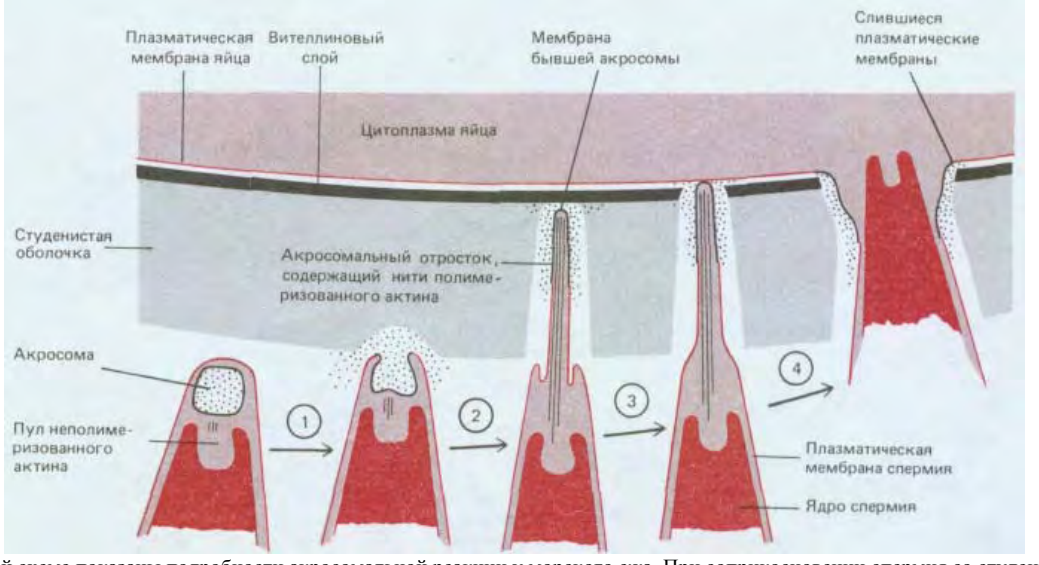


Рис. 15-41. На этой схеме показаны подробности акросомальной реакции у морского ежа. При соприкосновении спермия со студенистой оболочкой яйца содержимое акросомы высвобождается путем экзоцитоза (1), после чего следует бурная полимеризация актина, в результате которой образуется длинный акросомальный отросток, проникающий в студенистую оболочку (2). Вышедшие из акросомы белки (показаны *черными точками)* прилипают к поверхности акросомального отростка и служат как для связывания спермия с вителлиновым слоем, так и для разрушения этого слоя (3). Когда бывшая акросома (мембрана которой образует теперь верхушку акросомального отростка) приходит в контакт с плазматической мембраной яйца (3), две мембраны сливаются, происходит распад актиновых нитей и спермий проникает в яйцо (4). Как спермий находит яйцеклетку для оплодотворения после того, как гаметы выходят в морскую воду? Яйца морского ежа выделяют пептид, называемый *резактом,* который является видоспецифическим хемоаттрактантом для спермиев морского ежа. Резакт связывается на поверхности спермия с трансмембранным рецептором, который, как обнаружено, представляет собой фермент гуанилатциклазу. Этот фермент катализирует синтез циклического GMP в сперматозоиде.

Na^+. Обусловленное этим повышение pH в головке спермия и увеличение концентрации цитозольного Ca^{2+} инициируют акросомальную реакцию. Было высказано предположение, что при повышении внутриклеточного pH неполяризованный актин в цитоплазме спермия отделяется от особых белков, в норме связывающих актин и блокирующих его полимеризацию (см. разд. 11.2.12); это приводит к формированию акросомального отростка в результате «взрывной» полимеризации актина.

Однако удлинение акросомального отростка связано не только с полимеризацией актина. Приток ряда ионов (Ca^{2+}, Na^+ и Cl^-) повышает количество осмотически активных молекул в головке спермия, что приводит к притоку в спермий воды. Вызванное этим резкое повышение гидростатического давления, вероятно, способствует удлинению акросомального отростка.

15.4.2. Связывание спермия с яйцеклеткой осуществляется при помощи видоспецифических макромолекул [20]

Видоспецифичность оплодотворения особенно важна для обитающих в воде животных, яйцеклетки и спермии которых выводятся в водную среду; ведь в этих условиях возможно их слияние с яйцеклетками и спермиями других видов. У морских ежей такая специфичность проявляется в связывании спермия с вителлиновым слоем, лежащим под студенистой оболочкой: иногда спермии претерпевают акросомальную реакцию при контакте с яйцеклеткой животного другого вида, однако спермии не могут связываться с такими яйцеклетками и, следовательно, не могут оплодотворять их.

Из спермы морского ежа было выделено вещество, которое считают ответственным за видоспецифическое связывание сперматозоидов с вителлиновым слоем. Это белок, получивший название *байндина,* содержится в акросоме. После своего высвобождения в акросомальной реакции он покрывает поверхность акросомального отростка и способствует прикреплению спермия к яйцу. У каждого вида морских ежей вырабатывается свой особый тип байндина, и молекулы этого байндина связываются с вителлиновым слоем яиц морского ежа только того же вида. Оказалось, что вителлиновый слой одного из видов морских ежей содержит видоспецифический гликопротеин, который выступает в роли *рецептора байндина в* процессе связывания. Есть данные о том, что байндин действует подобно лектину, узнающему специфические угле-

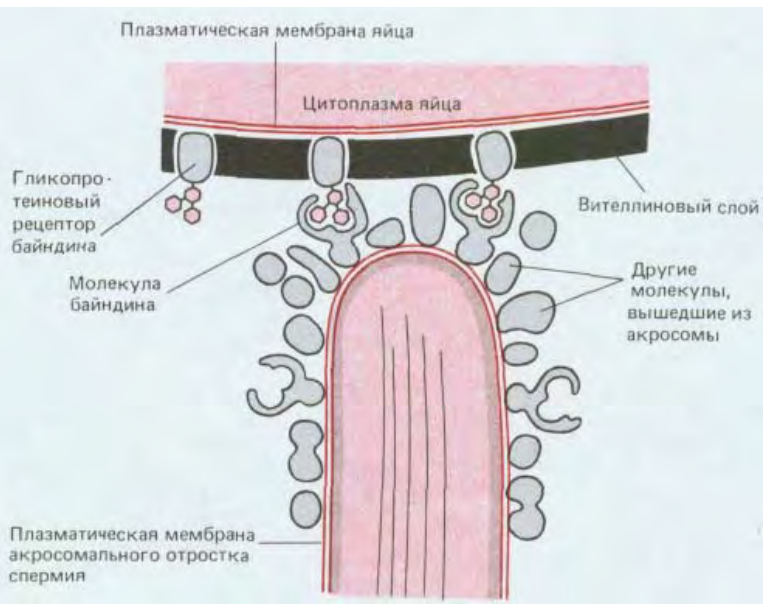


Рис. 15-42. Молекулы байндина, покрывающие поверхность акросомального отростка сперматозоида морского ежа (схематизировано). Как полагают, эти молекулы связываются специфической сахаридной цепью рецепторной молекулы, находящейся в вителлиновом слое яйца.

водные детерминанты в молекулах гликопротеинов (рис. 15-42). Предполагается, что, поскольку байндин способен инициировать слияние искусственных липидных пузырьков in vitro, он может быть катализатором слияния плазматических мембран акросомального отростка и яйцеклетки после того, как эти мембраны пришли в соприкосновение (разд. 6.5.16).

15.4.3. Активация яйцеклетки опосредуется изменениями внутриклеточных концентраций ионов [21]

Как только активированный спермий морского ежа прикрепляется к яйцу, акросомальный отросток быстро прокладывает себе путь через вителлиновый слой. Мембрана на верхушке отростка сливается с плазматической мембраной на кончике микроворсинки (рис. 15-43). Соседние микроворсинки быстро удлиняются и группируются вокруг спермия; затем, по мере того как микроворсинки постепенно растворяются, спермий головкой вперед затягивается в яйцо.

Сперматозоид запускает программу развития, заложенную в яйце. Перед оплодотворением яйцеклетка метаболически неактивна: она не синтезирует ДНК, а РНК и белки образуются в ней очень медленно. Яйцеклетка, вышедшая из яичника и лишенная теперь поддержки окружавших ее клеток, погибает в считанные часы, если не будет спасена спермием. Связывание спермия с поверхностью яйцеклетки индуцирует повышение ее метаболической активности, синтез ДНК и последующее дробление. Однако сам спермий служит лишь устройством для запуска уже заложенной в яйцеклетке программы. Сам он для этого не столь нужен: яйцеклетку можно активировать с помощью множества неспецифических химических или физических воздействий. Например, для яйца лягушки эффективным стимулом может быть укол иглой. (Развитие яйцеклетки, активированной в отсутствие спермия, называется **партеногенезом;** ряд организмов, в том числе некоторые позвоночные, обычно размножаются путем партеногенеза.) Начальные стадии активации яйцеклетки не могут зависеть от образования каких-либо новых белков, так как они протекают совершенно нормально в присутствии ядов, ингибирующих белковый синтез.

У морских ежей все ранние стадии активации яйца связаны с изменением концентраций содержащихся в нем ионов. Уже в первые секунды или минуты после внесения спермы в суспензию яйцеклеток в них происходят три различных сдвига: 1) увеличение проницаемости



Рис. 15-43. Один из моментов в процессе оплодотворения яйца морского ежа спермием (электронная микрофотография). Мембрана на верхушке акросомального отростка слилась с плазматической мембраной яйца на кончике одной из микроворсинок его поверхности. Неоплодотворенное яйцо морского ежа покрыто более чем 100 000 микроворсинками. (С любезного разрешения Frank Collins.)

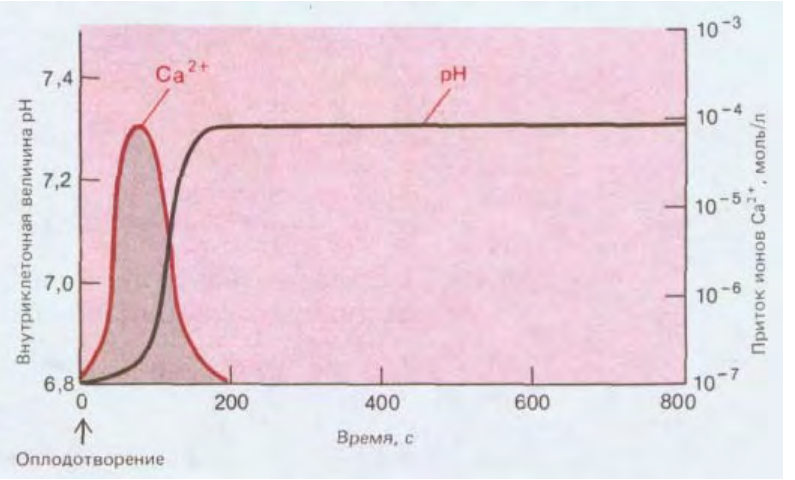


Рис. 15-44. Два ионных сдвига, ответственные за активацию яйца морского ежа после оплодотворения. Примерно через 10 с после оплодотворения начинается высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ в цитозоль; их концентрация через 2,5 мин возвращается к уровню, несколько превышающему тот, который свойствен неоплодотворенному яйцу. Приблизительно через 60 с включается механизм выведения ионов H^+, сопряженного с притоком Na^+, что ведет уже к длительному повышению внутриклеточного pH.

плазматической мембраны для Na^+ вызывает деполяризацию мембраны в течение нескольких секунд; 2) массовое высвобождение ионов Ca^{2+} из внутриклеточного хранилища кальция (разд. 11.6.3) ведет к заметному повышению их концентрации в цитозоле в течение примерно 10 с; 3) не более чем через 60 с начинается выведение ионов H^+, сопряженное с поглощением ионов Na^+, что приводит к значительному повышению внутриклеточного pH (рис. 15-44). Как будет описано ниже, эти ионные сдвиги обусловливают два физиологических эффекта: во-первых, благодаря им яйцо становится недоступным для проникновения других спермиев и, во-вторых, с их помощью осуществляются первые этапы в развертывании программы развития.

15.4.4. Деполяризация плазматической мембраны яйца обеспечивает быструю блокаду полиспермии [22]

Хотя к яйцеклетке может прикрепиться большое число сперматозоидов, только один из них обычно сливается с ее плазматической мембраной и вносит в клетку свое ядро. Если с яйцеклеткой сольются два или несколько спермиев (это называют *полиспермией),* то будут формироваться добавочные митотические веретена, что приведет к аномальному расхождению хромосом при дроблении; в таких случаях образуются неди плоидные клетки и развитие вскоре прекращается. Это означает, что яйцеклетки, окруженные большим количеством сперматозоидов, после оплодотворения одним из них должны каким-то образом быстро создать препятствие для проникновения дополнительных спермиев. Механизм такой **быстрой блокады полиспермии** не у всех одинаков.

У рыб в оболочках яиц имеется узкий канал, называемый *микропиле,* через который спермии могут проходить лишь один за другим; прохождение одного спермия стимулирует яйцо, вследствие чего содержимое кортикальных гранул высвобождается и закупоривает отверстие, преграждая вход другим спермиям. Однако у большинства организмов яйцеклетки не имеют микропиле и могут сливаться со спермием в любом участке своей поверхности. У яйцеклеток некоторых животных (таких, как морские ежи и амфибии) полиспермию предотвращает быстрая деполяризация плазматической мембраны после слияния с первым сперматозоидом. Мембранный потенциал яйца морского ежа составляет примерно — 60 мВ. Через несколько секунд после контакта со спермием мембранный потенциал резко падает и меняет знак, доходя приблизительно до + 20 мВ, а затем спустя примерно минуту начинает постепенно возвращаться к исходному уровню (рис. 15-45). Если предотвратить деполяризацию мембраны (в основном обусловленную при-

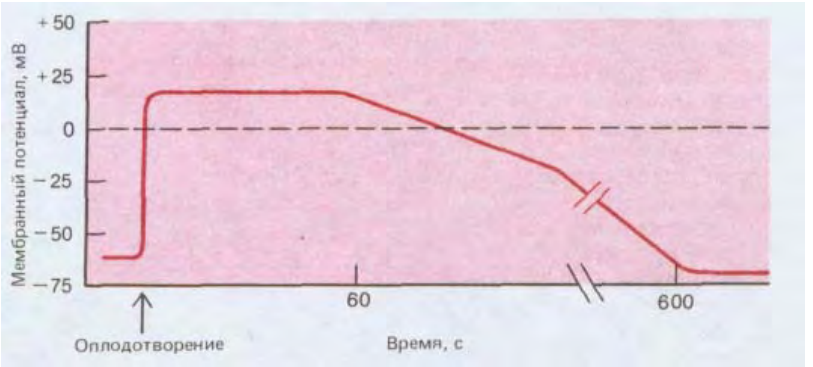


Рис. 15-45. Изменение мембранного потенциала яйца морского ежа после оплодотворения. Быстрая деполяризация каким-то образом препятствует слиянию с яйцеклеткой других спермиев, что обеспечивает быструю блокаду полиспермии.

током ионов Na^+ в яйцеклетку после контакта со спермием), проводя оплодотворение в среде с низкой концентрацией Na^+, то частота случаев полиспермии возрастает. Кроме того, если неоплодотворенную яйцеклетку искусственно деполяризовать, пропуская через нее ток с помощью микроэлектродов, то сперматозоиды будут способны прикрепляться к яйцеклетке, но не смогут сливаться с ней; если же теперь реполяризовать мембрану, прикрепившиеся спермии сольются с яйцеклеткой и проникнут в нее. Хотя молекулярный механизм этого явления неизвестен, кажется вероятным, что деполяризация мембраны, обычно происходящая при оплодотворении, изменяет конформацию какого-то важного белка плазматической мембраны яйца таким образом, что мембрана спермия уже не может слиться с нею.

Мембранный потенциал яйцеклетки через несколько минут после оплодотворения возвращается к норме; поэтому нужен еще какой-то механизм, препятствующий полиспермии в течение более длительного времени. В большинстве яйцеклеток (в том числе и в яйцеклетке млекопитающих) этот барьер создают вещества, которые освобождаются из кортикальных гранул, расположенных сразу под плазматической мембраной яйцеклетки.

15.4.5. За позднюю блокаду полиспермии ответственна кортикальная реакция [23]

Кортикальные гранулы яйца морского ежа сливаются с плазматической мембраной и высвобождают свое содержимое через 10-50 с после контакта яйца со спермием. **Кортикальная реакция** запускается сильным повышением концентрации свободных ионов Ca^{2+} в цитозоле. У активированного яйца морского ежа менее чем через минуту после присоединения спермия концентрация Ca^{2+} увеличивается примерно в сто раз, а затем спустя одну-две минуты снова снижается до обычного уровня (рис. 15-46). Роль ионов Ca^{2+} в запуске кортикальной реакции можно прямо продемонстрировать в опыте с изолированными плазматическими мембранами яиц морского ежа; к внутренней поверхности таких мембран еще прикреплены кортикальные гранулы и если добавить к этому препарату небольшое количество Ca^{2+}, то через несколько секунд происходит экзоцитоз.

В яйцах морского ежа кортикальная реакция приводит по меньшей мере к двум независимым последствиям: 1) протеолитические ферменты, вышедшие из кортикальных гранул, быстро разрушают рецепторы байндина вителлинового слоя, ответственные за связывание спермиев, и 2) освобождаемое содержимое кортикальных гранул вызывает отделение вителлинового слоя, ранее примыкающего к плазматической мембране, от поверхности яйца, и в то же время благодаря ферментам образуются поперечные сшивки между белками этого слоя, что делает



Рис. 15-46. Кортикальные гранулы, прикрепленные к изолированной мембране неоплодотворенной яйцеклетки морского ежа (микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа). При добавлении к такому препарату ионов Ca^{2+} кортикальные гранулы сливаются с плазматической мембраной и высвобождают свое содержимое путем экзоцитоза. Поскольку в каждой клетке имеется около 15 000 кортикальных гранул, в результате кортикальной реакции поверхность яйца менее чем за минуту увеличивается более чем вдвое; часть дополнительного мембранного материала идет на удлинение микроворсинок на поверхности всего яйца, тогда как остальная часть поступает в окаймленные ямки и пузырьки (V. D. Vacquier, Dev. Biol., **43,** 62-74, 1975.)

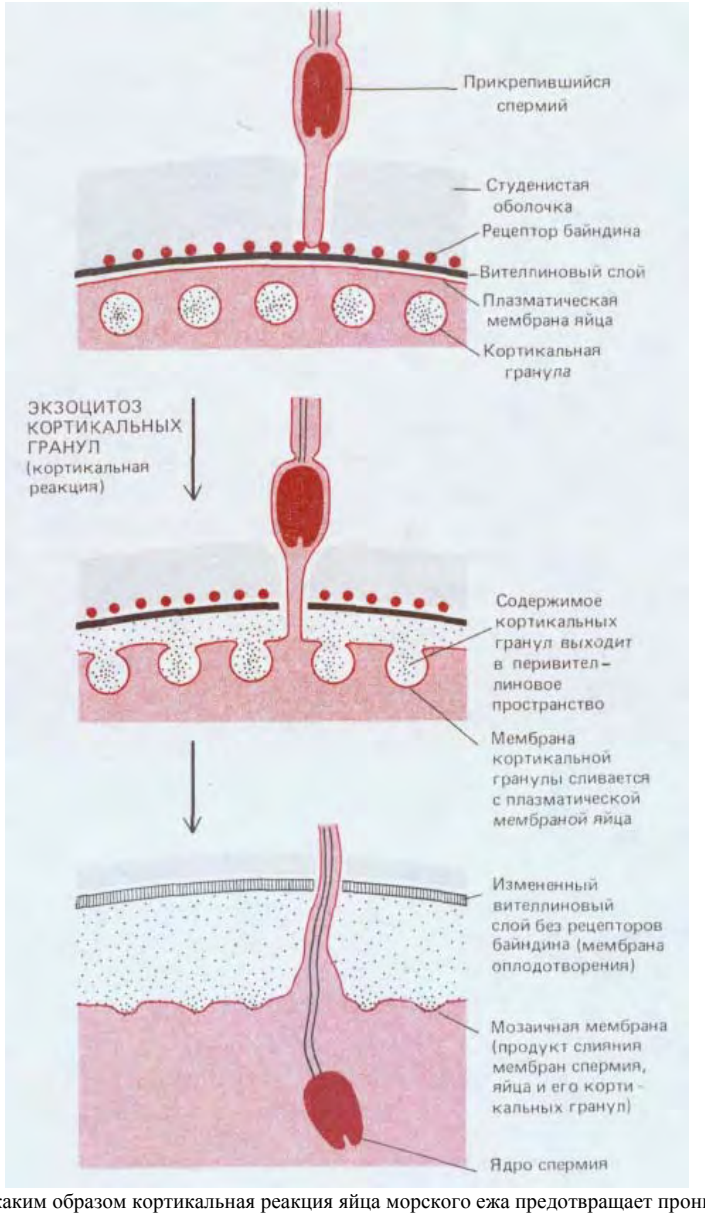


Рис. 15-47. Эта схема показывает, каким образом кортикальная реакция яйца морского ежа предотвращает проникновение в него дополнительных спермиев. Высвобождаемое содержимое кортикальных гранул вызывает расширение щели под вителлиновым слоем и изменяет этот слой так, что в нем исчезают рецепторы байндина и он превращается в «оболочку оплодотворения», через которую не могут проникнуть спермии. Такое «затвердение» вителлинового слоя происходит в основном благодаря образованию ковалентных сшивок между тирозиновыми боковыми цепями белков, вследствие чего формируется обширная нерастворимая белковая сетка.

его более жестким. В результате указанных событий формируется *оболочка оплодотворения,* с которой спермии не могут связаться и через которую они не могут проникнуть (рис. 15-47).

15.4.6. Активация яйцеклетки осуществляется с помощью инозитолфосфолипидного механизма клеточной сигнализации [24]

Деполяризация мембраны представляет собой первое обнаруживаемое изменение после оплодотворения, но, судя по всему, она нужна лишь для предотвращения полиспермии. Искусственная деполяризация мембраны не приводит к активации яйцеклетки; и наоборот, устранение деполяризации мембраны во время оплодотворения не подавляет активацию.

Есть много убедительных данных в пользу того, что программу развития яйцеклетки запускает кратковременное повышение концентрации Ca^{2+} в цитозоле (которое распространяется от места внедрения спермия по всей яйцеклетке в виде кольцевой волны - см. рис. 4-35). Концентрацию Ca^{2+} в цитозоле можно искусственно повысить либо путем прямой инъекции этих ионов в яйцеклетку, либо с помощью

ионофоров, переносящих Ca^{2+}, таких, например, как A23187 (см. разд. 6.4.19). Таким способом удается активировать яйцеклетки всех до сих пор исследованных животных, в том числе млекопитающих. Если же, напротив, предотвратить повышение концентрации Ca^{2+}, введя связывающее кальций вещество ЭГТА, активации при оплодотворении не происходит. Ионы Ca^{2+} действуют в клетке по меньшей мере одним способом - они присоединяются к Ca^{2+}-связывающему белку кальмодулину, который в свою очередь активирует много разнообразных белков клетки (разд. 12.4.3). Кальмодулин был найден в больших количествах во всех исследованных яйцеклетках.

Как оплодотворение приводит к повышению концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле яйцеклетки? В гл. 12 мы говорили о том, что внеклеточные лиганды, связываясь с рецепторными белками клеточной поверхности, вызывают гидролиз *фосфатидилтозитол-бисфосфата (PIP_2)* в плазматической мембране, в результате чего образуется *инозитолтрифосфат ($InsP_3$)* и *диацилглицерол;* $InsP_3$ в свою очередь инициирует высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ (разд. 12.3.9) в цитозоль, а диацилглицерол активирует *протеинкиназу С* (разд. 12.3.10). Эксперименты на морских ежах подтверждают предположение о том, что указанный механизм ответствен и за повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле при оплодотворении. Концентрация $InsP_3$ возрастает через несколько секунд после оплодотворения и сразу после этого повышается концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле; если в неоплодотворенное яйцо ввести путем инъекции $InsP_3$, то концентрация Ca^{2+} в цитозоле повышается и яйцеклетка активируется. Как и ожидалось, активация спермия связана с G-белком, который активирует специфическую фосфолипазу С, катализирующую гидролиз PIP_2 (см. разд. 12.3.9). Непонятно, однако, связывается ли спермий с рецептором плазматической мембраны яйцеклетки, функционально сопряженным с фосфолипазой С посредством G-белка, или при слиянии с яйцеклеткой он вводит в нее активатор G-белка.

Поскольку концентрация ионов Ca^{2+} в цитозоле после оплодотворения повышается лишь ненадолго (примерно на 1 мин), ясно, что это не может непосредственно приводить к событиям, происходящим на более поздних стадиях активации яйцеклетки. У морских ежей к таким событиям относятся повышение интенсивности синтеза белков, начинающееся через 8 мин после оплодотворения, и инициация синтеза ДНК спустя примерно 30 мин. Имеется большое число данных, указывающих на то, что активация протеинкиназы С играет важную роль на поздних стадиях активации, причем наиболее существенным в этот период является повышение внутриклеточного pH.

15.4.7. У некоторых организмов поздние биосинтетические процессы, связанные с активацией яйцеклетки, индуцируются повышением внутриклеточного pH [25]

У морских ежей активация протеинкиназы С диацилглицеролом приводит к активации (преимущественно посредством фосфорилирования) Na^+ — H^+-ионообменника плазматической мембраны яйцеклетки. Этот мембранный транспортный белок использует энергию, запасенную в виде трансмембранного градиента ионов Na^+, для откачивания ионов H^+ из клетки (см. разд. 6.4.10). Отток ионов H^+ приводит к тому, что величина pH внутри клетки возрастает с 6,6 до 7,2 и при дальнейшем развитии зиготы поддерживается на этом уровне (см. рис. 15-47). Считается, что необычно низкое значение внутриклеточного pH в неоплодотворенных яйцах морского ежа несет основную ответственность за поддержание яйцеклетки в метаболически неактивном состоянии; более



Рис. 15-48. Повышение внутриклеточного pH при инкубации клеток (например, яйцеклеток) в среде с аммиаком. Аммиак диффундирует через плазматическую мембрану и взаимодействует в цитозоле с ионами H^+, образуя NH+4, в результате чего внутриклеточная концентрация ионов H^+ падает и pH возрастает.

того, имеются убедительные свидетельства того, что именно повышение pH после оплодотворения индуцирует в оплодотворенных яйцах морского ежа позднюю биосинтетическую активность. Во-первых, если повысить pH в неоплодотворенных яйцах, инкубируя их в среде, содержащей аммиак (рис. 15-48), то процессы синтеза белков и репликации ДНК заметно усиливаются даже без повышения внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+}. Во-вторых, если сразу после оплодотворения поместить яйца в морскую воду, не содержащую ионов Ca^{2+} (так что не будет градиента Na^+ для откачивания ионов H^+), внутриклеточный уровень pH не повышается и поздние события, связанные с активацией яйца, не наступают. Такие яйца еще можно спасти, добавив к среде аммиак: тогда pH в клетке возрастает и даже при отсутствии внеклеточного Na^+ индуцируется синтез белков и ДНК.

Для заметного усиления белкового синтеза в оплодотворенных яйцах не нужен синтез новой РНК, поскольку этот феномен имеет место и в присутствии антибиотика актиномицина D, ингибирующего синтез РНК. Полагают, что в обычных условиях синтез белков усиливается в результате по меньшей мере двух независимых изменений: 1) ранее запасенные в яйце молекулы мРНК становятся доступными для синтеза белков; 2) происходит активация рибосом, что позволяет им быстрее транслировать мРНК. В отличие от этого ускорение белкового синтеза в неоплодотворенных яйцах, обработанных аммиаком, является следствием одной лишь усиленной мобилизации существующих молекул мРНК. Если мобилизация мРНК- по всей вероятности, результат повышения внутриклеточного pH, то движение рибосом вдоль цепей мРНК, по-видимому, ускоряется под влиянием какого-то другого фактора. Детали механизмов, лежащих в основе двух указанных типов активации, пока неясны.

Оплодотворение представляет собой в высшей степени уникальный феномен, однако в нем участвуют те же механизмы передачи клеточных сигналов, которые контролируют внутриклеточные процессы в сомати-

Таблица 15-1. Последовательность событий после оплодотворения яиц морского ежа

Событие	Время после оплодотворения	Внутриклеточное промежуточное звено
1. Деполяризация плазматической мембраны	<5с	Индуцированное спермием повышение проницаемости плазматической мембраны для ионов Na^+ (и до некоторой степени для Ca^{2+})
2. Гидролиз фосфатидилинозитол-бисфосфата	< 10 с	Активация фосфолипазы С
3. Повышение внутриклеточной концентрации свободных ионов Ca^{2+}	10-40 с	Индуцированное $InsP_3$ высвобождение связанных ионов Ca^{2+} из внутриклеточных хранилищ
4. Экзоцитоз кортикальных гранул	10-50 с	Повышение внутриклеточной концентрации Ca^{2+}
5. Повышение внутриклеточного значения pH	60 с	Активация Na^+ - H^+ -ионообменника протеинкиназой С
6. Усиление синтеза белков	8 мин	Повышение внутриклеточного pH
7. Слияние ядер спермия и яйца	30 мин	
8. Начало репликации ДНК	30-45 мин	Повышение внутриклеточного pH

ческих клетках (см. гл. 12). Последовательность некоторых событий активации яиц морского ежа после оплодотворения приведена в табл. 15-1.

15.4.8. В слиянии пронуклеусов спермиев и яиц морского ежа участвуют центриоли, вносимые спермием [26]

Оплодотворенную яйцеклетку называют **зиготой.** У большинства видов, включая морских ежей, оплодотворение завершается лишь после того, как сольются гаплоидные ядра (называемые *пронуклеусами)* двух гамет. Поскольку размеры яйцеклетки велики, пронуклеусам яйца и спермия приходится преодолевать значительные расстояния, прежде чем они сольются друг с другом. В связи с этим не вызывает удивления тот факт, что такое передвижение определяется структурой цитоскелета.

Спермий морского ежа вносит в зиготу не только свою ДНК - он отдает еще и две центриоли. Центриолям спермия в процессе оплодотворения принадлежит исключительно важная роль, так как яйцеклетка утрачивает свои центриоли при последнем делении мейоза. Центриоли спермия становятся центром, от которого расходятся лучи микротрубочек (такая структура называется *сперматической звездой),* по-видимому, направляющих пронуклеус самца к пронуклеусу самки: если с помощью колхицина вызвать деполимеризацию микротрубочек, движение пронуклеусов прекращается. Когда два сблизившихся пронуклеуса приходят в соприкосновение, их мембраны сливаются и формируется диплоидное ядро зиготы. Две центриоли спермия вместе со сперматическими звездами делятся, образуя два полюса митотического веретена для первого деления дробления.

15.4.9. Яйцеклетки млекопитающих могут быть оплодотворены in vitro [27]

Изучать яйцеклетки млекопитающих неизмеримо труднее, чем яйца морских ежей. В распоряжении исследователя имеются миллионы яиц морского ежа, тогда как при работе с яйцеклетками млекопитающих ему приходится довольствоваться лишь десятками или сотнями их. Тем не менее сейчас есть возможность оплодотворять эти яйцеклетки in vitro. (Хотя мы будем по-прежнему пользоваться термином «яйцеклетка», следует помнить, что в отношении млекопитающих речь идет об оплодотворенном ооците второго порядка - см. разд. 15.3.7.) Этот путь приносит реальную пользу: оплодотворенные яйцеклетки млекопитающих, пересаженные в матку, могут развиться в нормальных особей; благодаря такой методике многие бесплодные женщины получили возможность рожать нормальных детей. Оплодотворение яйцеклеток млекопитающих in vitro позволяет также изучать некоторые его механизмы.

Такие исследования показали, что хотя в общих чертах последовательности событий при оплодотворении млекопитающих и морских ежей сходны, отдельные этапы процессов могут существенно отличаться.

Некоторые различия касаются спермиев. Сперматозоиды млекопитающих не способны оплодотворить яйцеклетку, пока они не подвергнутся процессу, называемому **капацитацией,** который индуцируется выделениями женского полового тракта. Механизм капацитации не ясен; возможно, она связана с изменениями в липидном и гликопротеиновом составах плазматической мембраны спермия, а также с повышением уровня его метаболизма и увеличением подвижности. Капацитированный спермий мыши проникает через толстый слой фолликулярных клеток и специфически связывается одним из главных гликопротеинов

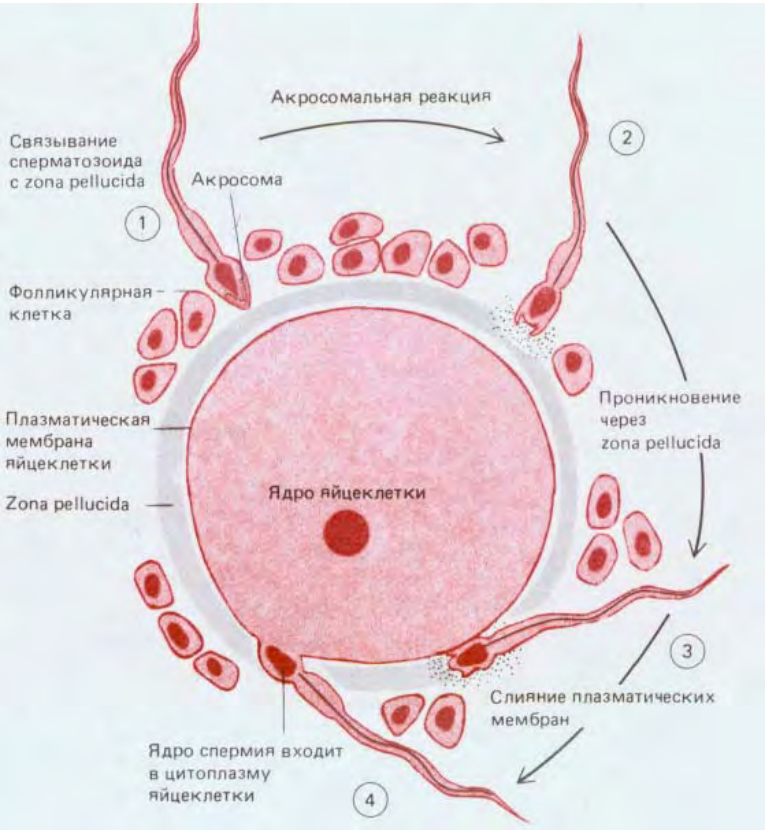


Рис. 15-49. Ход акросомальной реакции при оплодотворении яйцеклетки млекопитающего. Полагают, что у мышей и за связывание спермия, и за индукцию акросомальной реакции ответствен один и тот же гликопротеин zona pellucida. Обратите внимание на то, что спермий млекопитающего подходит к плазматической мембране яйцеклетке по касательной, так что слияние мембран происходит не на верхушке головки сперматозоида, а на ее боковой поверхности. У мышей диаметр *zona* pellucida состовляет 7 мкм, и спермий проходит это расстояние со скоростью примерно 1 мкм/мин.

zona pellucida - защитной оболочки, равноценной вителлиновому слою морского ежа (см. разд. 15.3.2). По крайней мере у нескольких видов один и тот же гликопротеин яйцеклетки, по-видимому, инициирует у спермия акросомальную реакцию. Например, у мыши zona pellucida состоит лишь из гликопротеинов, которые синтезируются растущими ооцитами и образуют самоорганизующуюся трехмерную структуру из связанных между собой волокон (см. рис. 15-23). Один из этих гликопротеинов, называемый ZP3, отвечает за связывание со спермием и за инициацию акросомальной реакции. Полагают, что при связывании с zona pellucida сперматозоид распознает специфическую углеводородную последовательность гликопротеина ZP3. Молекулы, участвующие в процессе распознавания, локализованы в плазматической мембране спермия, тогда как у морских ежей они располагаются в мембране акросомы. Zona pellucida, как и вителлиновый слой яиц морского ежа, служит барьером для межвидового оплодотворения; устранение ее часто приводит к исчезновению такого барьера. Например, яйцеклетки хомячка, у которых с помощью специфических ферментов удалена zona pellucida, могут быть оплодотворены сперматозоидами человека. Не удивительно, что такие гибриды («humsters») не развиваются.

При акросомальной реакции спермин млекопитающих высвобождают протеазы и гиалуронидазу, которые играют важную роль в проникновении спермия через zona pellucida. Однако здесь не формируется акросомальный отросток, сходный с тем, который образуется у морского ежа; у спермиев большинства млекопитающих с яйцеклеткой раньше всего сливается экваториальная (расположенная за акросомой) область плазматической мембраны, а не мембрана акросомы (рис. 15-49). Лишь относительно небольшое число спермиев млекопитающих обычно оказывается в состоянии добраться до претерпевшей овуляцию яйцеклетки (менее 200 из $3 \cdot 10^8$ сперматозоидов человека, выделяющихся при

коитусе, достигают места оплодотворения), поэтому необходимость в быстрой блокаде полиспермии несущественна: у млекопитающих не происходит быстрой деполяризации плазматической мембраны, сопровождающей оплодотворение и предотвращающей полиспермию у морских ежей и амфибий. С другой стороны, ферменты, высвобождающиеся при кортикальной реакции яйцеклеток млекопитающих, изменяют структуру яйцевой оболочки, обеспечивая медленную блокаду полиспермии. Например, в мышиных яйцеклетках фермент так видоизменяет гликопротеин ZP3, что он перестает связывать спермии или индуцировать у них акросомальную реакцию. В яйцеклетках некоторых млекопитающих в результате кортикальной реакции перестраивается не zona pellucida, а плазматическая мембрана, вследствие чего предотвращается слияние с яйцеклеткой дополнительных спермиев.

Другой характерной особенностью оплодотворения у млекопитающих является то, что центриоли присутствуют в яйцеклетках, а в спермиях их нет. Кроме того, в оплодотворенных яйцеклетках млекопитающих не происходит непосредственного слияния двух пронуклеусов: они сближаются, однако их хромосомы не соединяются до тех пор, пока мембрана каждого из пронуклеусов не будет разрушена при подготовке к первому делению дробления. Большая часть других ранних событий при оплодотворении яиц морского ежа, приведенных в табл. 15-1 (таких, как активация с помощью фосфатидилинозитол-бисфосфата и повышение концентрации ионов Ca^{2+} в цитозоле), осуществляется и в яйцеклетках млекопитающих. Следующие за этим изменения представляют собой часть процесса *эмбриогенеза,* в ходе которого зигота развивается в новый организм. Эмбриогенез, возможно, представляет собой самое поразительное явление во всей биологии; этот процесс - предмет следующей главы.

Заключение

Оплодотворение начинается с того момента, когда головка спермия приходит в соприкосновение с защитной оболочкой, окружающей яйцеклетку. Такой контакт индуцирует у спермия акросомальную реакцию, содержимое акросомы высвобождается, и некоторые из выделившихся белков облегчают прохождение спермия через плазматическую мембрану яйцеклетки, что делает возможным слияние с ней плазматической мембраны спермия. В результате оплодотворения благодаря гидролизу фосфатидилинозитол-бисфосфата, содержащегося в плазматической мембране яйцеклетки, инициируются бурные изменения в самой яйцеклетке. При активации яйцеклетки ее поверхность изменяется так, что становится невозможным слияние с ней дополнительных спермиев; один вид блокады полиспермии является следствием кортикальной реакции, при которой содержимое кортикальных гранул высвобождается, перестраивая яйцевую оболочку. Кроме того, внутри яйцеклетки также происходят определенные изменения, в результате чего после соединения пронуклеусов двух гамет, зигота становится способной к развертыванию программы развития.

Литература

Общая

Austin C. R., Short R. V., eds. Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, 2nd ed., Cambridge, U.K., Cambridge University Press, 1982.

Browder L., Developmental Biology, 2nd ed., Chapters 5, 6 and 8, Philadelphia, Saunders, 1980.

Epel D. The program of fertilization, Sci. Am., **237 (11),** 128-138, 1977.

Karp G., Berrill N. J. Development, 2nd ed., Chapters 4 and 5, New York, McGraw-Hill, 1981. *Longo F.J.* Fertilization, London, Chapman & Hall, 1987.

Цитированная

1. *Crow J. F.* The importance of recombination. In: The Evolution of Sex: An Examination of Current Ideas (R. E. Michod, B. R. Levin, eds.), pp. 56-73, Sunderland, MA, Sinauer, 1988.
Maynard Smith J. Evolution of Sex, Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1978.
Williams G.C. Sex and Evolution, Princeton, NJ: Princeton University Press, 1975.
2. *Ayala F., Kiger J.* Modern Genetics, 2nd ed., Menlo Park, CA: Benjamin-Cummings, 1984. F*erris S. D., Whitt G. S.* Loss of duplicate gene expression after polyploidization, Nature, **265,** 258-260, 1977.
Fincham J.R.S. Genetics, Boston: Jones and Bartlett, 1983.
3. *Lewis J., Wolpert L.* Diploidy, evolution and sex, J. Theor. Biol., **78,** 425-438, 1979.
Spofford J.B. Heterosis and the evolution of duplications. Am. Nat., **103,** 407-432, 1969.
4. *Evans C. W., Dickinson H. G., eds.* Controlling Events in Meiosis, Symp. Soc. Exp. Biol., Vol. 38, Cambridge, U.K., The Company of Biologists, 1984.
Whitehouse H. L. Towards an Understanding of the Mechanism of Heredity, 3rd ed., London, St. Martins, 1973.
Wolfe S. L Biology of the Cell, 2nd ed., pp. 432-470. Belmont, CA: Wadsworth, 1981.
5. *John B., Lewis K. R.* The Meiotic Mechanism. Oxford Biology Readers (J. J. Head, ed.), Oxford, Eng., Oxford University Press, 1976.
Jones G. H. The control of chiasma distribution. In Controlling Events in Meiosis (C. W. Evans, H.G. Dickinson, eds.), Symp. Soc. Exp. Biol., Vol. 38, pp. 293-320,
Cambridge, U.K. The Company of Biologists, 1984. *Orr-Weaver T.L., Szostak J. W.* Fungal recombination, Microbiol. Rev., 49, 33-58, 1985.
6. *Heyting C., Dettmers R. J., Dietrich A. J., Redeker E. J.* Two major components of synaptonemal complexes are specific for meiotic prophase nuclei, Chromosoma, **96,** 325-332, 1988.
Moses M.J. Synaptonemal complexes, Annu. Rev. Genet., **2,** 363-412, 1968.
Smithies O., Powers P. A. Gene conversions and their relationship to homologous pairing. Phil. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), 312, 291-302, 1986. *von Wettstein D., Rasmussen S. W., Holm P. B.* The synaptonemal complexes in genetic segregation, Annu. Rev. Genet., **18,** 331-413, 1984.
7. *Carpenter A. T. C.* Gene conversion, recombination nodules, and the initiation of meiotic synapsis, Bioessaays**, 6,** 232-236, 1987.
Carpenter A. T. C. Recombination nodules and synaptonemal complexes in recombination-defective females of Drosophila melanogaster, Chromosoma, **75,** 236-259, 1979.
8. *Buckle V., Mondello C., Darling S., Craig I. W., Goodfellow P. N.* Homologous expressed genes in the human sex chromosome pairing region, Nature, **317,** 739-741, 1985.
Chandley A.C. Meiosis in man. Trends Genet., **4,** 79-84, 1988. Solari A.J. The behavior of the XY pair in mammals, Int. Rev. Cytol., **38,** 273-317, 1974.
9. *Austin C. R., Short R. V., eds.* Reproduction in Mammals: I. Germ Cells and Fertilization, Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1982.
10. *Browder L.* Developmental Biology, p. 173-231, Philadelphia, Saunders, 1980. *Karp G., Berrill N. J.* Development, 2nd ed., pp. 116-138, New York, McGraw-Hill, 1981.
11. *Browder L.W., ed.* Oogenesis, New York, Plenum, 1985.
Davidson E.H. Gene Activity in Early Development, 3rd ed., pp. 305-407. Orlando, FJ, Academic, 1986.
Metz C.B., Monroy A., eds. Biology of Fertilization, Vol. 1: Model Systems and Oogenesis, Orlando FL, Academic, 1985.
12. *Bornslaeger E.A., Mattei P., Schultz R.M.* Involvement of cAMP-dependent protein kinase and protein phosphorylation in regulation of mouse oocyte maturation. Dev. Biol., **114,** 453-462, 1986.
Mailer J.L. Regulation of amphibian oocyte maturation. Cell Differ., **16,** 211-221, 1985.
Masui Y., Clarke H.J. Oocyte maturation, Int. Rev. Cytol., **57,** 185-282, 1979.
Sadler S. E., Mailer J. L. Inhibition of *Xenopus* oocyte adenylate cyclase by progesterone: a novel mechanism of action. Adv. Cyc. Nuc. Prot. Phosphor. Res., **19,** 179-194, 1985.
13. *Cyert M.S., Kirschner M. W.* Regulation of MPF activity *in vitro,* Cell, 53, 185-195, 1988.

Ford C. C. Maturation promoting factor and cell cycle regulation, J. Embryol, Exp. Morphol., Suppl, 89, 271-284, 1985.
Kirschner M., Newport J., Gerhart J. The timing of early developmental events in *Xenopus.* Trends Genet, **1,** 41-47, 1985.
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.
Mailer J.L. Regulation of amphibian oocyte maturation. Cell Differ., **16,** 211-221, 1985.
14. *Peters H., McNatty K. P.* The Ovary: A Correlation of Structure and Function in Mammals, pp. 11-22, 60-84, Berkeley: University of California Press, 1980.
Richards J. S. Hormonal control of ovarian follicular development, Recent Prog. Horm. Res., **35,** 343-373, 1979.
15. *Bellve A.R., O'Brien D.A.* The mammalian spermatozoon: structure and temporal assembly. In Mechanism and Control of Animal Fertilization (J. F. Hartmann, ed.), pp. 56-137, New York, Academic, 1983.
Fawcett D. W. The mammalian spermatozoon, Dev. Biol. **44**, 394-436, 1975.
Fawcett D. W., Bedford J. M., eds. The Spermatozoon, Baltimore, Urban & Schwarzenberg, 1979.
16. *Browder L.* Developmental Biology, pp. 146-172, Philadelphia, Saunders, 1980.
Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal, Physiol. Rev., 52, 198-236, 1972.
Karp G., Berrill N. J. Development, 2nd ed., pp. 100-116, New York, McGraw-Hill, 1981.
Metz C. B., Monroy A., eds. Biology of Fertilization, Vol. 2, Biology of the Sperm, Orlando, FL, Academic, 1985.
17. *Lindsley D.L.,* Tokuyasu K. T. Spermatogenesis. In: The Genetics and Biology of *Drosophila* (M. Ashburner, T. R. F. Wright, eds.), Vol. 2, pp. 225-294, New York, Academic, 1980.
Willison K., Ashworth A. Mammalian spermatogenic gene expression, Trends Genet, →351-355, 1987.
18. *Epel D.* Fertilization. Endeavour (New Series), **4,** 26-31, 1980.
Hendrick J. L., ed. The Molecular and Cellular Biology of Fertilization, New York, Plenum, 1986.
Longo F.J. Fertilization, London, Chapman & Hall, 1987.
Metz C. B., Monroy A., eds. Biology of Fertilization, Vol. 3, The Fertilization Response of the Egg. Orlando FL, Academic, 1985.
19. *Shapiro B.M.* The existential decision of a sperm. *Cell,* **49,** 293-294, 1987.
Shapiro B. M., Schackmann R. W., Tombes R. M., Kazazoglou T. Coupled ionic and enzymatic regulation of sperm behavior. Curr.. Top. Cell Regul**, 26,** 97-113,1985.
Tilney L. G., Inoue S. Acrosomal reaction of the Thyone sperm. III. The relationship between action assembly and water influx during the extension of the acrosomal process, J. Cell Biol., **100,** 1273-1283, 1985.
Trimmer J. S., Vacquier V. D. Activation of sea urchin gametes, Annu. Rev. Cell Biol., **2,** 1-26, 1986.
20. *Gao B., Klein L. E., Britten R. J., Davidson E. H.* Sequence of mRNA coding for bindin, a species-specific sea urchin sperm protein required for fertilization, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83,** 8634-8638, 1986.
Glabe C. G. Interaction of the sperm adhesive protein bindin, with phospholipid vesicles. II. Bindin induces the fusion of mixed-phase vesicles that contain phosphatidylcholine and phosphatidylserine *in vitro,* J. Cell Biol., **100,** 800-806, 1985.
Rossignol D.R., Earles B.J., Decker G. L., Lennarz W.J. Characterization of the sperm receptor on the surface of eggs of *Strongylocentrotus purpuratus.* Dev. Biol., **104**, 308-321, 1984.
Vacguier V.D., Moy G. W. Isolation of bindin: the protein responsible for adhesion of sperm to sea urchin eggs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74,** 2456-2460, 1977.
21. *Shatten G., Husler D.* Timing the early events during sea urchin fertilization, Dev. Biol., **100,** 244-248, 1983.
Trimmer J. S., Vacquier V. D. Activation of sea urchin gametes, Annu. Rev. Cell Biol., **2,** 1-26, 1986.
Whitaker M. J., Steinhardt R. A. Ionic signalling in the sea urchin egg at fertilization. In: Biology of Fertilization (C.B. Metz, A. Monroy, eds.), Vol. 3, pp. 168-222, Orlando FL, Academic, 1985.
22. *Jaffe L. A., Cross N. L.* Electrical regulation of sperm-egg fusion, Annu. Rev. Physiol**., 48,** 191-200, 1986.
23. *Kay E. S., Shapiro B. M.* The formation of the fertilization membrane of the sea urchin egg. In: Biology of Fertilization (C. B. Metz, A. Monroy, eds.), Vol. 3, pp. 45-81, Orlando FL, Academic, 1985.
Schuel H. Functions of egg cortical granules. In: Biology of Fertilization (C. B. Metz, A. Monroy, eds.), Vol. 3, pp. 1-44, Orlando FL, Academic, 1985.

24. *Eisen A., Reynolds G. T.* Source and sinks for the calcium released during fertilization of single sea urchin eggs, J. Cell Biol., **100,** 1522-1527, 1985.
Turner P. R., Jaffe L. A., Fein A. Regulation of cortical vesicle exocytosis in sea urchin eggs in inositol 1,4,5-triphosphate and GTP-binding protein. J. Cell Biol., **102,** 70-78, 1986.
Whitaker M., Irvine R.F. Inositol 1,4,5-triphosphate microinjection activates sea urchin eggs. Nature, **312,** 636-639, 1984.
25. *Dube F., Schmidt T., Johnson C. H., Epel D.* The hierarchy of requirements for an elevated intracellular pH during early development of sea urchin embryos. Cell, **40,** 657-666, 1985.
Winkler M. Translational regulation in sea urchin eggs: a complex interaction of biochemical and physiological regulatory mechanisms, *Bioessays,* **8,** 157-161, 1988.
26. *Schatten H., Schatten G., Mazia D., Balczon R., Simerly C.* Behavior of centrosomes during fertilization and cell division in mouse oocytes and in sea urchin eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 83, 105-109, 1986.
27. *Clegg E.D.* Mechanisms of mammalian sperm capacitation. In: Mechanism and Control of Animal Fertilization (J. F. Hartmann, ed.), pp. 178-212, New York, Academic, 1983.
Grobstein C. External human fertilization, Sci. Am., **240(6),** 57-67, 1979. *Wassarman P. M.* Early events in mammalian fertilization, Annu. Rev. Cell Biol., **3,** 109-142, 1987.
Wassarman P.M. Zona pellucida glycoproteins, Annu. Rev. Biochem., **57,** 415-442, 1988.

16 Клеточные механизмы развития

Организм любого многоклеточного животного можно рассматривать как клон клеток, образовавшихся из одной клетки-оплодотворенного яйца. Поэтому клетки тела, как правило, генетически идентичны, но различаются по фенотипу: одни становятся мышечными клетками, другие - нейронами, третьи - клетками крови и т. д. В организме клетки разного типа размещены строго упорядоченным образом, и благодаря этому тело обладает характерной формой. Все признаки организма определяются последовательностью нуклеотидов в геномной ДНК, которая воспроизводится в каждой клетке. Все клетки получают одни и те же генетические «инструкции», но интерпретируют их с учетом времени и обстоятельств - так, чтобы каждая клетка выполняла в многоклеточном сообществе свою специфическую функцию.

Многоклеточные организмы часто бывают очень сложными, но их построение осуществляется при помощи весьма ограниченного набора форм клеточной активности. Клетки растут, делятся и погибают, соединяются, движутся и меняют свою форму. Они дифференцируются, т. е. начинают или прекращают синтез определенных веществ, кодируемых геномом. Клетки выделяют в окружающую среду или образуют на своей поверхности вещества, влияющие на активность соседних клеток. Эти формы клеточного поведения являются универсальной основой развития животных. В данной главе мы попытаемся объяснить, каким образом реализация различных форм клеточной активности в нужное время и в нужном месте приводит к образованию целостного организма.

Мы не будем подробно шаг за шагом прослеживать от начала до конца развитие какого-то одного организма, а рассмотрим различные аспекты клеточного поведения, связанного с развитием, иллюстрируя общие принципы примерами тех животных, у которых они проявляются наиболее четко. Мы обсудим, каким образом и при участии каких сил клеточные перемещения приводят к формированию эмбриона, как под контролем собственных генов данных клеток и межклеточных взаимодействий развертывается пространственная картина дифференцировки и каким образом дифференцированные клетки, возникшие в разных частях эмбриона, оказываются в местах своего назначения, образуя сложные ткани и органы. Все эти вопросы будут рассмотрены на примере развития земноводных, морских ежей, мышей, мух, птиц, тараканов и нематод. Развитие растений будет обсуждаться в гл. 20.

16.1. Морфогенетические движения и формирование общей пространственной организации тела [1]

В этом и следующих разделах речь пойдет о том, как возникает пространственная организация раннего эмбриона и какие физические силы участвуют в его формировании. В качестве примера мы в основном будем обращаться к шпорцевой лягушке *Xenopus laevis* (рис. 16-1), раннее развитие которой было изучено особенно тщательно. Подобно

Рис. 16-1. Схема развития *Xenopus laevis* от оплодотворенного яйца до самостоятельно питающегося головастика. Вверху - спаривание взрослых самца и самки. Ниже представлены последовательные стадии развития (ранние стадии - вид сбоку; 10-часовой эмбрион-вид снизу; 19-часовой-вид сверху). Все рисунки (кроме верхнего) выполненны в одном масштабе. [P. D. Nieuwkoop, J. Faber, Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin), Amsterdam: North-Holland, 1956.]

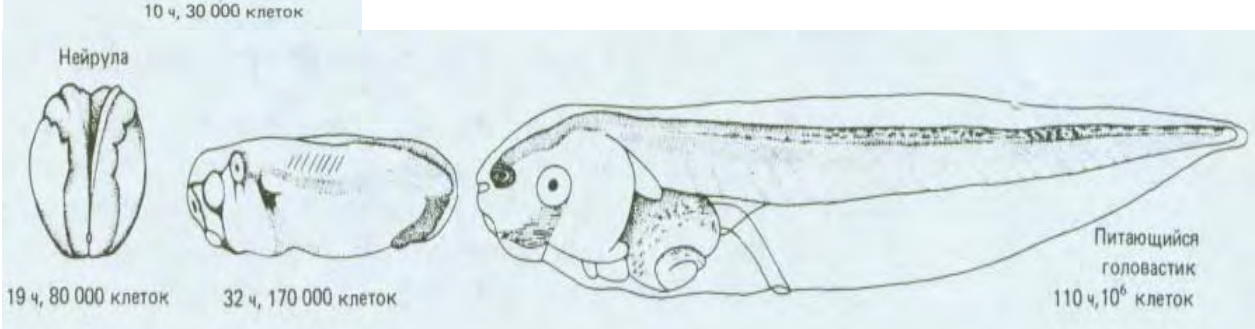


зародышам других земноводных, зародыши *Xenopus* относительно устойчивы к внешним воздействиям и поэтому служат удобным объектом для экспериментов.

Для того чтобы облегчить восприятие излагаемого материала, процесс эмбриогенеза позвоночных (и многих других групп животных) подразделен на три периода. Первый - это *дробление* оплодотворенного яйца на множество более мелких клеток, формирующих слой наподобие эпителия, из которого в результате процессов *гаструляции* и *нейруляции* образуются полость первичной кишки и *нервная трубка.* Затем следует период *органогенеза,* т. е. возникают различные органы и части тела (конечности, глаза, сердце и т. д.). Третий период развития характеризуется тем, что органы, сформировавшиеся в виде небольших структур, растут, пока не достигнут размеров, свойственных взрослому животному. Эти периоды не имеют четких границ и могут в значительной степени перекрываться. Развитие от стадии оплодотворенного яйца до начала органогенеза мы проследим на примере эмбриогенеза у *Xenopus.*

16.1.1. Полярность эмбриона земноводных определяется полярностью яйца [2]

Яйцо земноводных - это сравнительно крупная клетка (около 1 мм в диаметре), покрытая прозрачной неклеточной капсулой - студенистой оболочкой. Большая часть клетки заполнена желточными пластинками, состоящими в основном из белка и липидов. Желток сконцентрирован в нижней половине яйца, называемой **вегетативным полушарием;** верхнюю половину яйца называют **анимальным полушарием.** Оплодотворение инициирует превращение этой единичной клетки в многоклеточную личинку (головастика), у которой должны определяться передний и задний концы тела, брюшная и спинная стороны, а также срединная плоскость симметрии, разделяющая тело на правую и левую половины. Развитие зародыша удобно описывать, пользуясь системой трех осей: *переднезадней* (от головы к хвосту), *дорсовентральной* (от спины к животу) и *медиолатеральной* (от срединной плоскости влево и вправо). Такая полярность зародыша закладывается у земноводных на очень раннем этапе развития. Еще до оплодотворения анимальный и вегетативный полюсы яйца содержат различные наборы мРНК, равно как и разное количество белка и других клеточных компонентов, но при этом яйцо симметрично относительно анимально-вегетативной оси. Эта исходная анимально-вегетативная симметрия достаточна для создания цилиндрического эмбриона, обладающего переднезадней осью. Оплодотворение обеспечивает углубление различий в содержимом яйца земноводных, реализуемое в появлении дорсовентральной полярности. Наружный обогащенный актином слой цитоплазмы, называемый кортикальным слоем, или кортексом, внезапно поворачивается по отношению к внутреннему содержимому как единый сегмент, так что анимальный полюс кортекса смещается по отношению к анимальному полюсу внутреннего содержимого в направлении будущей вентральной стороны (рис. 16-2). Направление вращения определяется местом проникновения спермия; объяснить это, по-видимому, можно влиянием центросомы, привносимой спермием в яйцо. Поскольку такое вращение



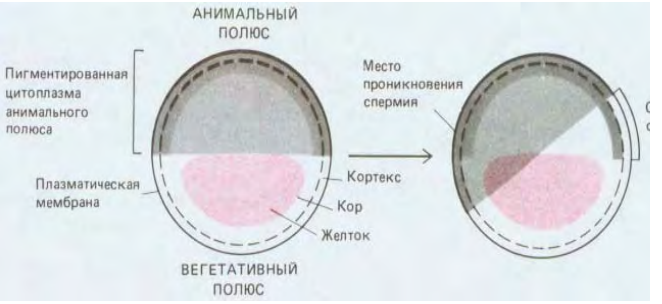


Рис. 16-2. Первое морфогенетическое движение после оплодотворения яйца лягушки. Кортекс яйца слой, толщиной примерно в несколько микрометров - поворачивается почти на 30° относительно внутренних слоев яйца в направлении, которое определяется местом проникновения спермия. У видов с окрашенной цитоплазмой анимального полюса такое вращение приводит к появлению четко наблюдаемого серого серпа, который расположен напротив места проникновения спермия.

вызывает в яйце смещение пигментных гранул, у некоторых земноводных появляется слабо пигментированная полоска, называемая *серым серпом.* Она образуется на стороне яйца, противоположной месту проникновения спермия. Место проникновения спермия соответствует, грубо говоря, брюшку; на противоположной стороне формируются дорсальные структуры, например спинной мозг (рис. 16-3). В результате воздействий, блокирующих вращение кортекса, развиваются так называемые радиализованные животные с кишечником, расположенным в центре тела, у которых отсутствует дорсовентральная асимметрия.

16.1.2. В результате дробления из одной клетки образуется множество клеток [3]

Поворот кортикального слоя завершается примерно через час после оплодотворения и создает условия для осуществления *дробления,* в ходе которого из одной крупной яйцеклетки за счет повторяющихся митозов образуется множество более мелких клеток **-бластомеров;** общая масса эмбриона при этом не меняется. Чтобы выжить, эмбрион должен быстро достичь стадии, когда он сможет самостоятельно питаться, плавать и спасаться от хищников, и поэтому первые деления дробления очень быстро следуют друг за другом; в этот период длительность клеточного цикла составляет около 30 мин (см. разд. 13.1.9). Высокая скорость репликации ДНК и чередования митозов не позволяет осуществлять транскрипцию генов и дробящийся эмбрион полностью зависит от запасов РНК, белка, мембран и других материалов, которые были накоплены в яйце в процессе его созревания в материнском организме. Только биосинтез ДНК имеет теперь жизненно важное значение, и ее необычно быстрая репликация становится возможной благодаря огромному числу мест, в которых начинается этот процесс (см. разд. 9.3.9). Борозда первого деления дробления делит яйцо по вертикали, т. е. в плоскости, проходящей через анимально-вегетативную ось; в результате образуются две симметричные половины яйца (рис. 16-4). Следующее деление вновь происходит вертикально, но под прямым углом к плоскости первого деления и приводит к образованию четырех клеток одинаковой величины. Борозда третьего деления дробления располагается горизонтально несколько выше срединной плоскости, поэтому образующиеся четыре верхние клетки меньше по размерам, чем нижние; к тому же нижние клетки содержат больше желтка. Примерно после 12 клеточных циклов скорость деления клеток резко снижается, нарушается также синхронность делений и начинается транскрипция генома зародыша. Это изменение, известное как *переход к средней бластуле* (ПСБ), по всей вероятности, отражает истощение определенного клеточного компонента материнского происхождения, который используется для связывания с вновь синтезируемой ДНК.



Рис. 16-3. Асимметрия яйца *Xenopus* показана на рис. *А.* Она определяет расположение осей тела будущего головастика, изображенное на рис. *Б.* Точная привязка осей яйца к телу головастика сложна, поскольку гаструляционные движения значительно меняют топологию зародыша. В первом приближении анимальный полюс соответствует переднему концу тела (голове), а серый серп соответствует дорсальной стороне тела.

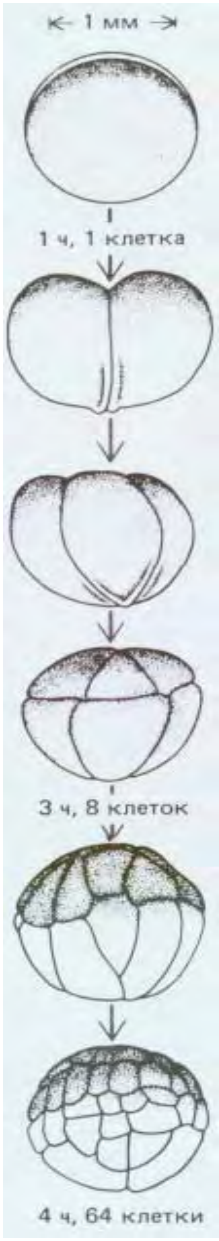


Рис. 16-4. Стадии дробления у *Xenopus* (вид сбоку).

У других животных взаимная ориентация плоскостей последовательных делений дробления может быть иной. В яйцах очень богатых желтком как, например, у птиц, борозды делений дробления не в состоянии разбить желток на части, и поэтому все ядра сосредоточены на анимальном полюсе; в результате зародыш развивается только из «шапочки» клеток, лежащих поверх желтка.

16.1.3. Бластула представляет собой полый шар, стенка которого образована одним слоем клеток [4]

Уже в самом начале развития эмбриона его клетки связаны между собой не только механически, но и с помощью щелевых контактов, через которые способны проходить ионы и другие низкомолекулярные вещества, передавая «послания», которые могут играть важную роль на более поздних стадиях развития (вместе с другими типами сигналов) для координации поведения клеток (см. разд. 14.1.7). На периферии зародыша бластомеры связаны друг с другом плотными контактами (см. разд. 14.1.1); это позволяет изолировать внутреннюю часть зародыша от окружающей среды. Примерно на стадии 16 бластомеров промежутки между клетками в центральной части зародыша расширяются и образуют единую полость-бластоцель; это результат переноса ионов натрия во внутренние межклеточные пространства через мембраны клеток; осмотическое давление внутри зародыша повышается и сюда начинает поступать вода. Клетки, окружающие бластоцель, образуют эпителиоподобный слой; теперь эту стадию развития называют бластулой (рис. 16-5). То, что клетки бластулы организованы как эпителиальный слой, жизненно важно для координации их дальнейшего поведения.

16.1.4. После гаструляции полый клеточный шар превращается в трехслойную структуру с первичной кишкой [5, 6]

После того как клетки бластулы сформировали эпителиальный слой[1], наступает время для координированных движений, приводящих к образованию гаструлы. Процесс образования гаструлы называют гаструляцией. Эта радикальная перестройка ведет к превращению полого клеточного шара в многослойную двустороннесимметричную структуру с кишечной трубкой, располагающейся в центре; в результате сложного

[1] Автор в данном случае употребляет не совсем точный термин, называя стенку бластулы эпителием или эпителиальным слоем. Дело в том, что эпителий - это дифференцированная ткань, образующаяся на более поздних стадиях развития из эктодермы (наружного зародышевого листка). Стенку зародыша на стадии бластулы называют бластодермой, и она лишь чисто внешне напоминает эпителиальную ткань. Из чисто технических соображений мы не во всех случаях исправляли эту неточность, и читателю следует иметь это в виду.- *Прим. ред.*

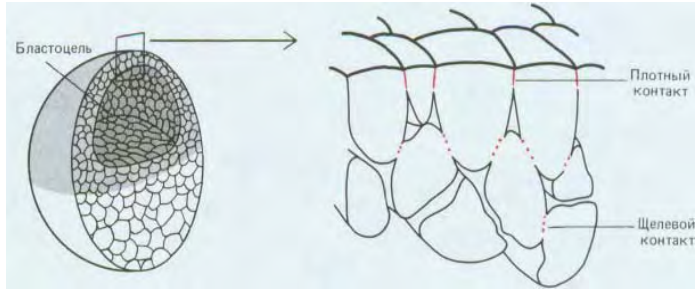


Рис. 16-5. Бластула. На этой стадии развития клетки образуют эпителиоподобный слой, окружающий полость, заполненную жидкостью,-бластоцель. Щелевые контакты обеспечивают электрическое сопряжение клеток, а плотные контакты наружной поверхности изолируют внутреннее пространство эмбриона от окружающей среды. Обратите внимание, что у *Xenopus* стенка бластулы образована несколькими слоями клеток, и только наружные клетки плотно прилегают друг к другу, как это имеет место в любом типе эпителия.

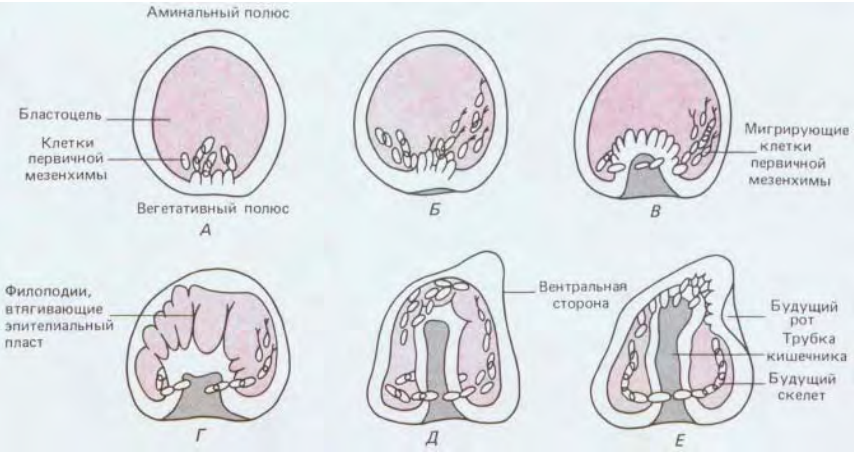


Рис. 16-6. Гаструляция у морского ежа. На вегетативном полюсе бластулы от ее стенки отделяются клетки первичной мезенхимы *(А)*. Эти клетки «ползут» вверх по внутренней поверхности стенки бластулы *(Б)*. В это время стенка бластулы в области вегетативного полюса (вегетативная пластинка) начинает впячиваться внутрь *(В)*. Клетки на верхушке инвагинирующей вегетативной пластинки образуют филоподии, прикрепляющиеся к поверхности внутренней стенки бластоцеля и подтягивают ее дальше в глубь бластоцеля, образуя полость первичной кишки *(Г, Д)*. Конец кишечной трубки вступает в контакт со стенкой бластулы; в этом месте впоследствии возникает ротовое отверстие (Е). (L. Wolpert, T. Gustafson, Endeavour, 26, 85-90, 1967.)

процесса инвагинации (впячивания) значительный участок эпителия перемещается с наружной поверхности внутрь зародыша. Последующее развитие теперь уже определяется взаимодействиями внутреннего, наружного и среднего слоев, возникающих в результате гаструляции. Гаструляция в той или иной форме происходит у всех многоклеточных животных. Так как с геометрической точки зрения гаструляция у земноводных выглядит «искаженной», мы сначала рассмотрим этот процесс у морского ежа -близкого родственника позвоночных (см. рис. 15-40, разд. 15.4.1).

Эмбрион морского ежа прозрачен, поэтому развитие его, внешнее и внутреннее, можно исследовать прижизненно; в то же время на этом объекте удобно изучать активность отдельных клеток. Исходным материалом для гаструляции является бластула, устроенная довольно просто: это - полый шар, стенку которого образуют около 1000 клеток, расположенных в один слой; полость бластулы называют бластоцелем. Всю эту структуру покрывает тонкий слой внеклеточного матрикса; у бластулы можно также различать вегетативный и анимальный полюсы. Гаструляция начинается с того, что на вегетативном полюсе от эпителия отделяются несколько десятков так называемых *клеток первичной мезенхимы* (рис. 16-6, *А*). По всей вероятности, эти клетки теряют способность связываться с другими клетками и внеклеточным матриксом наружной поверхности эмбриона и приобретают сродство к обогащенному фибронектином матриксу (см. разд. 14.2.13), который выстилает бластоцель. Эти клетки выходят в полость бластулы и движутся вдоль ее стенки, подтягиваясь на выпускаемых ими длинных тонких отростках *(филоподиях)* с «липкими» концами (рис. 16-7). Когда

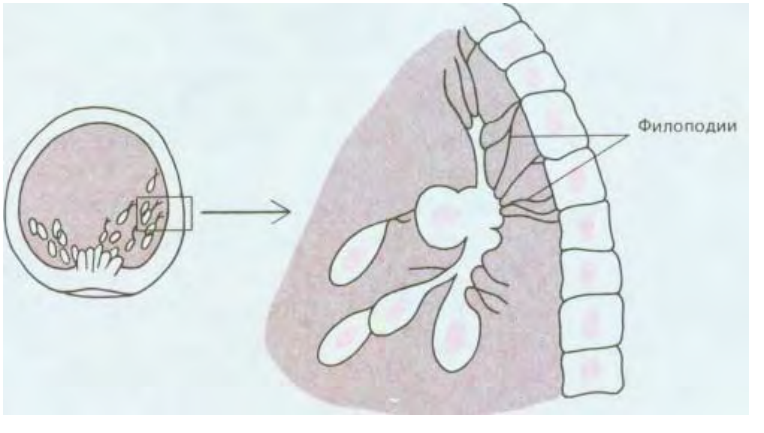


Рис. 16-7. Клетки первичной мезенхимы ползут по внутренней поверхности стенки бластулы, выпуская сократимые филоподии с «липкими» концами. (L. Wolpert, T. Gustafson, Endeavour, 26, 85-90, 1967.)

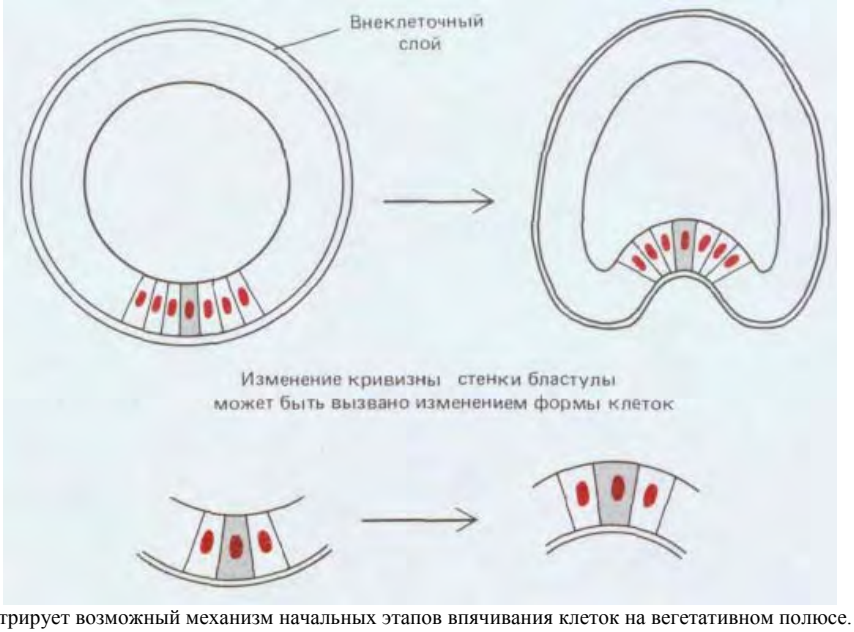


Рис. 16-8. Эта схема иллюстрирует возможный механизм начальных этапов впячивания клеток на вегетативном полюсе. Детали этого процесса на молекулярном уровне рассмотрены в разд. 16.1.6 и 11.6.9.

кончик филоподии вступает в контакт с поверхностью, к которой он может плотно прикрепиться, филоподия сокращается и тянет за собой клетку. Образовавшиеся филоподии, по-видимому, втягиваются обратно, а вместо них в других местах возникают новые, так что клетка может перемещаться то в одном, то в другом направлении. В конце концов, однако, клетки занимают четко определенное положение, что, по всей вероятности, обусловлено их специфическим сродством к каким-то участкам поверхности бластоцеля. Это было показано в опытах с моноклональными антителами, которые продемонстрировали высокоспециализированные различия между клетками в разных участках эмбриона в отношении химизма их поверхности (к этой теме мы вернемся позже - см. разд. 16.6.1). Коль скоро клетки первичной мезенхимы заняли свое место, они начинают формировать скелет (16-6, Е).

С началом миграции клеток первичной мезенхимы начинает инвагинировать (впячиваться) эпителий в области вегетативного полюса, образуя, таким образом, первичную кишку (рис. 16-6, *В).* При этом сначала изменяется форма эпителиальных клеток: внутренний конец клетки, обращенный к бластоцелю, становится шире чем наружный, и поэтому клеточный слой прогибается внутрь бластоцеля (рис. 16-8). Следующий этап инвагинации происходит за счет иного процесса-перераспределения клеток. Инвагинирующие клетки активно перестраиваются, но их форма при этом не меняется. В результате поначалу довольно широкая полость гаструлы превращается в длинную узкую кишечную трубку. Одновременно определенные клетки на верхушке этой кишечной трубки выпускают в бластоцель длинные филоподии, которые вступают в контакт со стенками полости, прилипают к ним и сокращаются, как бы помогая направлять процесс инвагинации (рис. 16-6, *Г, Д).* Движение прекращается после соприкосновения слепого конца кишечной трубки с наружной стенкой зародыша на его противоположном конце (рис. 16-6, Е). Позднее в месте контакта двух соприкасающихся слоев стенка зародыша прорывается, и на месте прорыва образуется вторичный рот. Поскольку клетки, которые своими филоподиями направляли инвагинацию, выполнили свою задачу, они отделяются от эпителия, перемещаются в пространство между кишечной трубкой и стенкой тела и превращаются в так называемую *вторичную мезенхиму,* которая со временем даст начало стенке целома и мускулатуре.

В результате гаструляции полая сферическая бластула превращается в трехслойную структуру: внутренний слой, т.е. стенку первичной

кишки, называют **энтодермой;** наружный слой, который так и остался снаружи, - эктодермой, а промежуточный рыхлый слой ткани, состоящий из первичной и вторичной мезенхимы, - **мезодермой.** Это - три первичных **зародышевых листка,** характерные для всех высших животных. Организация трехслойного эмбриона в общих чертах соответствует организации взрослого животного с пищеварительной трубкой внутри, эпидермисом снаружи и органами соединительного тканного происхождения между ними. В первом приближении можно сказать, что эти три типа тканей взрослого организма происходят соответственно из энтодермы, эктодермы и мезодермы, хотя встречаются и исключения (см. разд. 16.1.7, 16.1.8 и 16.1.9).

16.1.5. Гаструляционные движения основаны на четко скоординированных простых движениях клеток [1, 6, 7]

Гаструляционные движения основаны на относительно простом наборе основных движений клеток. Клетки могут менять свою форму в результате вытягивания или сокращения; они приклеиваются или отделяются от других клеток или внеклеточного матрикса; они могут секретировать вещества внеклеточного матрикса, которые сдерживают или направляют их движения. Такие виды клеточной активности, наряду с ростом клеток и их делением, лежат в основе всех морфогенетических движений как отдельных клеток, так и их групп, включая, в частности, такие процессы, как перераспределение клеток, обеспечивающее инвагинацию и образование первичной кишки. Гаструляция, будучи исключительно важным событием per se, кроме того, демонстрирует различные формы клеточного поведения.

В последующих главах будут обсуждаться механизмы, используемые клетками для изменения своей формы или адгезивных свойств. Индивидуальное развитие ставит перед нами особую проблему: необходимо понять, каким образом элементарные виды клеточной активности координированы во времени и пространстве; именно эта координация определяет поведение каждой из частей эмбриона. В настоящее время нам еще не вполне ясны прекрасно срежиссированные гаструляционные движения. Тем не менее эксперименты на земноводных позволяют ответить на вопрос, какие из частей гаструлирующего эмбриона движутся за счет своих собственных возможностей и какие части эмбриона находятся под воздействием внешних сил.

У зародышей земноводных присутствие клеток со значительным избытком желтка существенно замедляет инвагинацию, вследствие чего геометрия процесса становится более сложной, чем у морского ежа. Инвагинация начинается не на вегетативном полюсе, а несколько сбоку, где сначала образуется небольшое углубление, именуемое **бластопором.** Через него происходит вворачивание клеток будущей энтодермы (рис. 16-9). По мере углубления процесса инвагинации бластопор приобретает форму кольца, окружающего часть видимой снаружи энтодермы. Эта часть энтодермы называется желточной пробкой; здесь расположены клетки, обогащенные желтком (позже они попадут в полость кишки и будут переварены). В это же время бластодерма на анимальном полюсе активно расширяется и занимает место клеток, устремляющихся внутрь. В конце концов бластодерма анимального полушария покрывает всю наружную поверхность эмбриона, а размеры бластопора сильно уменьшаются.

В основе процесса инвагинации у земноводных, по-видимому, лежат те же механизмы, что и у морского ежа. Сначала происходит изменение формы клеток в области бластопора. У земноводных это так называемые *колбовидные клетки;* они характеризуются широким осно-

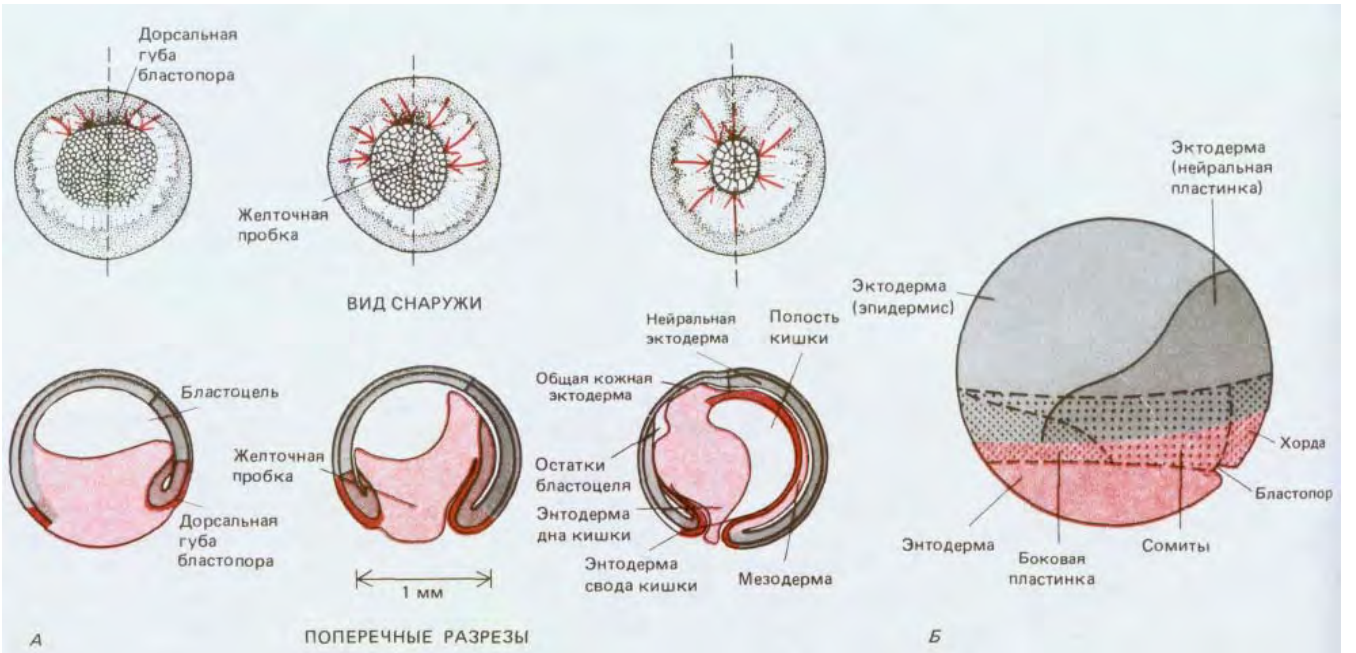


Рис. 16-9. *А.* Гаструляция у *Xenopus.* Внешний вид эмбриона *(вверху)* представлен со стороны вегетативного полюса; поперечные разрезы *(внизу)* проходят в плоскости, показанной штриховой линией. Направление движения клеток указано стрелками. *Б.* Карта презумптивных зачатков раннего эмбриона *Xenopus* (вид сбоку) с начала гаструляции указывает на происхождение клеток, которые вследствие гаструляционных движений примут участие в формировании трех зародышевых листков. Различные части мезодермы (боковая пластинка, сомиты, хорда) происходят из более глубоко расположенных клеток области, обозначенной точками; другие клетки этой области, в том числе наиболее поверхностные, дадут начало эктодерме (серый цвет, *вверху)* или энтодерме (различные оттенки красного цвета, *книзу).* (R. E. Keller, J. Exp. Zoob, **216,** 81-101, 1981.)

ванием и длинным узким концом, прикрепляющим клетки к внутренней поверхности стенки бластулы (рис. 16-10). Эти клетки тянут эпителий внутрь, вследствие чего на поверхности бластулы возникает продольная борозда. После формирования этой борозды клетки продолжают свое движение внутрь в виде пласта, принимающего участие в формировании кишки. Как и у морского ежа, это движение осуществляется за счет активной переупаковки клеток эпителия, особенно в краевой зоне, прилежащей к губе бластопора (рис. 16-10). Небольшие квадратные фрагменты изолированной ткани краевой зоны в условиях культуры могут спонтанно удлиняться и расширяться вследствие переупаковки клеток (рис. 16-10, *Б),* как если бы они находились в зародыше и устремлялись внутрь последнего через бластопор. Механизм перераспределения клеток, лежащий в основе этого *конвергентного расширения* остается загадкой. Вторичная направляющая, или движущая, сила обеспечивается будущими клетками мезодермы, которые мигрируют по внутренней поверхности крыши бластоцеля и тянут энтодерму за собой, подобно тому как это происходит у зародыша морского ежа, только у морского ежа в качестве движущей силы выступают будущие клетки вторичной мезенхимы. Крыша бластоцеля выстлана матриксом, богатым фибронектином, и при инъекции в бластоцель антител или пептидов, блокирующих взаимодействие фибронектина с рецепторами клеточной поверхности (см. разд. 14.2.13), нормальная гаструляция тормозится (в частности, у тритонов и саламандр) (рис. 16-11).

У земноводных, как и у морских ежей, гаструляция приводит к образованию трехслойного зародыша с наружным эктодермальным слоем, внутренней трубкой энтодермы, представляющей собой зачаток кишки, и мезодермой между ними. Ротовое отверстие образуется на переднем конце зародыша, где мезодерма отсутствует, и поэтому эктодерма может вступать в прямой контакт с энтодермой.

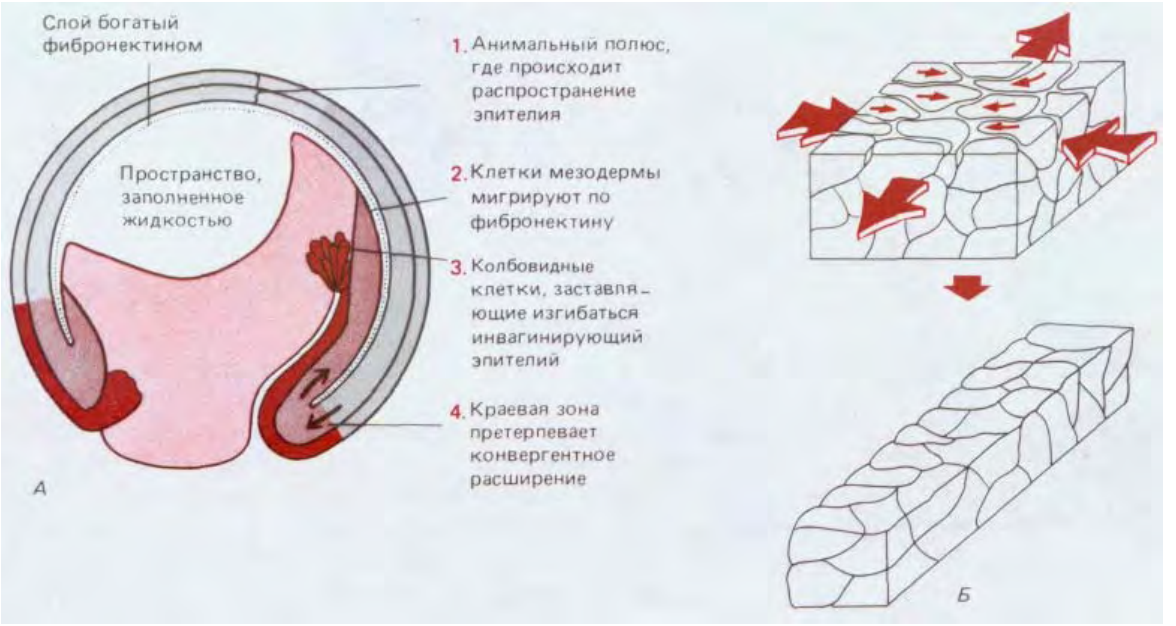


Рис. 16-10. *А.* На срезе через эмбрион *Xenopus,* сделанном во время гаструляции и проходящем в той же плоскости, что и на рис. 16-9, показаны четыре основных типа движений, лежащих в основе этого процесса. *Б.* Модель перераспределения клеток, приводящего к конвергентному вытягиванию, которое, возможно, является главной движущей силой процессов гаструляции у *Xenopus. (А* - из R.E. teller, J. Exp. Zool., **216,** 81-101, 1981; *Б-т* J. Gerhart, R. Keller, Annu. Rev. Cell Biol., 2, 201 229, 1986.)

16.1.6. Гаструляционные движения организованы вокруг бластопора [2, 7, 8]

Движения клеток в процессе гаструляции сложны, но упорядочены, что позволяет еще до гаструляции построить на поверхности эмбриона *карту презумптивных зачатков* (рис. 16-9, *Б),* которая показывает, из каких клеток предстоит формироваться различным частям взрослого организма. А как запускается и организуется весь сложный комплекс гаструляционных движений? У земноводных важным предварительным этапом является перераспределение содержимого яйца сразу же после оплодотворения. Инвагинация всегда начинается в том месте, которое соответствует расположению серого серпа (см. разд. 16.1.1): здесь в области будущей дорсальной губы бластопора вращение кортекса яйца по отношению к внутреннему содержимому, вызванное оплодотворением (см. рис. 16-2), по всей вероятности, создает сочетание клеточных компонентов, обладающее уникальными свойствами. Если в начале гаструляции у зародыша-донора удалить дорсальную губу бластопора и пересадить ее другому зародышу, то гаструляция зародыша - реци-

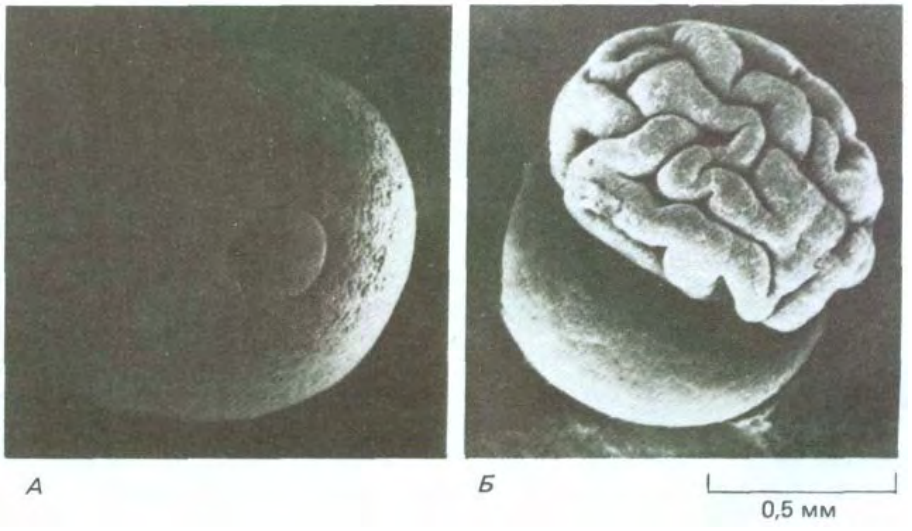


Рис. 16-11. *А.* Нормальный эмбрион тритона в конце гаструляции; энтодерма и мезодерма инвагинировали внутрь, бластопор приобрел форму кольца, окружающего крупные энтодермальные клетки, еще остающиеся на поверхности. Этот оставшийся участок энтодермы называют желточной пробкой. *Б.* Такой же эмбрион, у которого гаструляционные движения были блокированы инъекцией в полость бластулы антител против фибронектина. Клетки вегетативного полушария не способны перемещаться внутрь и остаются снаружи (гладкая округлая масса в нижней части рисунка); клетки анимального полушария образуют структуру, напоминающую пустой мешок, и вследствие гаструляционных движений, которые в норме приводят к его распространению по поверхности эмбриона, он стягивается в складки. [J. C. Boucaut et al., J. Embryol. Exp. Morphol., **89** (Suppl.), 211-227, 1985.]





Рис. 16-12. *А.* Схема эксперимента, показывающего, что дорсальная губа бластопора инициирует и контролирует гаструляционные движения и в случае пересадки организует второй набор структур зародыша. *Б.* Фотография возникающего в результате такой операции аксолотля, имеющего две головы и два хвоста. Подобные результаты получены и на *Xenopus,* хотя масштабы дупликации несколько отличаются. *(Б*-с любезного разрешения Jonathan Slack.)

пиента начнется как в области собственной губы бластопора, так и в области, куда была пересажена губа донора (рис. 16-12). Вследствие этой второй гаструляции происходит образование второго набора структур тела и возникает двойной зародыш (наподобие сиамских близнецов). Если для опытов с пересадкой использовать клетки, которые пигментированы иначе, то ткань реципиента легко отличить от имплантированной ткани. С помощью этого метода удалось показать, что имплантированная губа бластопора вовлекает в контролируемый ею процесс инвагинации эпителий хозяина. Далее мы покажем, что для образования трех зародышевых листков в процессе гаструляции исключительно важны химические и физические взаимодействия между клетками. Но сперва мы вкратце рассмотрим дальнейшее развитие энтодермы, мезодермы и эктодермы, из которых состоит эмбрион позвоночных после окончания гаструляции.

16.1.7. Из энтодермы образуется кишка и такие ее производные, как легкие и печень [9]

Энтодерма образует трубку-зачаток пищеварительного тракта; она тянется от рта до ануса. Эта трубка дает начало не только глотке, пищеводу, желудку и кишечнику, но также многим железам: слюнным, печени, поджелудочной железе; трахея и легкие также формируются из выростов стенки пищеварительного тракта, который вначале устроен весьма просто. Все эти выросты увеличиваются и превращаются в систему разветвленных трубочек, впадающих в кишку или гортань. Если говорить точнее, энтодерма формирует только внутренние эпителиальные компоненты этих структур - выстилку кишечника и секреторные клетки поджелудочной железы, а поддерживающие их мышечные или соединительнотканные элементы возникают из мезодермы.

16.1.8. Из мезодермы образуются соединительная ткань и мышцы, а также сердечно-сосудистая и мочеполовая системы [9, 10]

После завершения гаструляции образовавшийся средний зародышевый листок, мезодерма, разделяется на две части -для правой и для левой половины тела. Один из участков мезодермы в этот период специализируется, располагаясь вдоль центральной оси тела, и детерминирует деление тела на две половины - правую и левую. **Это-хорда,** представляющая собой тонкий клеточный тяж диаметром 80 мкм; над ней расположена эктодерма, под ней - энтодерма, а по бокам - мезодерма (см. рис. 16-15). Клетки хорды набухают, в них появляются вакуоли; это приводит к удлинению хорды и как следствие - к выпрямлению зародыша. У самых примитивных хордовых, не имеющих позвоночника, хорда выполняет функции опорной структуры. У позвоночных хорда является той осью, вокруг которой собираются мезодермальные клетки и образуют позвоночник. Таким образом, хорда служит предшествен-

ником позвоночного столба не только в процессе эволюции, но и в онтогенезе.

Мезодерма в основном дает начало соединительным тканям - сначала *мезенхиме,* клетки которой образуют рыхлую сеть, заполняющую промежутки между другими тканями (см. рис. 14-20), а затем кости, хрящу, мышцам и фиброзным тканям, в том числе внутреннему слою кожи (дерме). Мышечные клетки также возникают из мезодермы. Из нее формируется большая часть протоков мочеполовой системы, а также сердечно-сосудистая система, включая сердце и клетки крови.

16.1.9. Из эктодермы образуется эпидермис и нервная система [9, 11]

Наружная стенка зародыша после гаструляции представлена листком эктодермы, из которой позже образуется наружный слой кожи - эпидермис. Однако этим будущее эктодермы не исчерпывается: из эктодермы формируется также вся нервная система. Процесс образования этой системы называется **нейруляцией;** он начинается с утолщения широкого дорсального участка эктодермы, который затем сворачивается в трубку и отделяется от остальной части клеточного слоя. Такое преобразование индуцируется хордой и мезодермой, лежащими под этой областью эктодермы (см. разд. 16.6.3). Трубка, образовавшаяся из эктодермы, носит название **нервной трубки;** в процессе дальнейшего развития из нее возникнет головной и спинной мозг. Вдоль линии, по которой нервная трубка отделяется от будущего эпидермиса, от него обособляется еще некоторое число эктодермальных клеток; позже эти клетки поодиночке мигрируют через мезодерму. Это клетки **нервного гребня,** из которых образуются практически все компоненты периферической нервной системы (в том числе сенсорные и симпатические ганглии, шванновские клетки, образующие миелиновую оболочку периферических нервов) (см. разд. 19.1.1), а также клетки надпочечников, секретирующие адреналин, и пигментные клетки кожи. В области головы многие клетки нервного гребня дифференцируются в хрящ, кость и иные типы соединительной ткани, которые в других частях тела формируются из мезодермы. Это один из немногих случаев, не укладывающийся в общее представление о соответствии трех зародышевых листков трем «концентрическим» слоям взрослого организма. Органы чувств, передающие нервной системе информацию о зрительных, звуковых, обонятельных и иных стимулах, также развиваются из эктодермальных закладок - одни из нервной трубки, другие - из нервного гребня, третьи - из наружного слоя эктодермы (см. рис. 19-55, разд. 19.7.1). Например, сетчатка образуется как вырост мозга и, следовательно, является производным нервной трубки, тогда как обонятельные клетки дифференцируются прямо из эктодермального эпителия носовой полости.

16.1.10. Нервная трубка образуется в результате координированных изменений формы клеток [6, 12]

Образование нервной трубки - это событие, весьма достойное нашего внимания (рис. 16-13). Сначала поверхность гаструлы представляется довольно однородной, но некоторые изменения здесь уже происходят: эктодерма возле средней линии начинает приподниматься, образуя *нервную пластинку.* Боковые края нервной пластинки утолщаются; эти утолщения, называемые *нервными валиками,* постепенно сближаются, а в самой пластинке вдоль средней линии образуется желобок. В конце концов валики сходятся над ним и сливаются, в результате чего

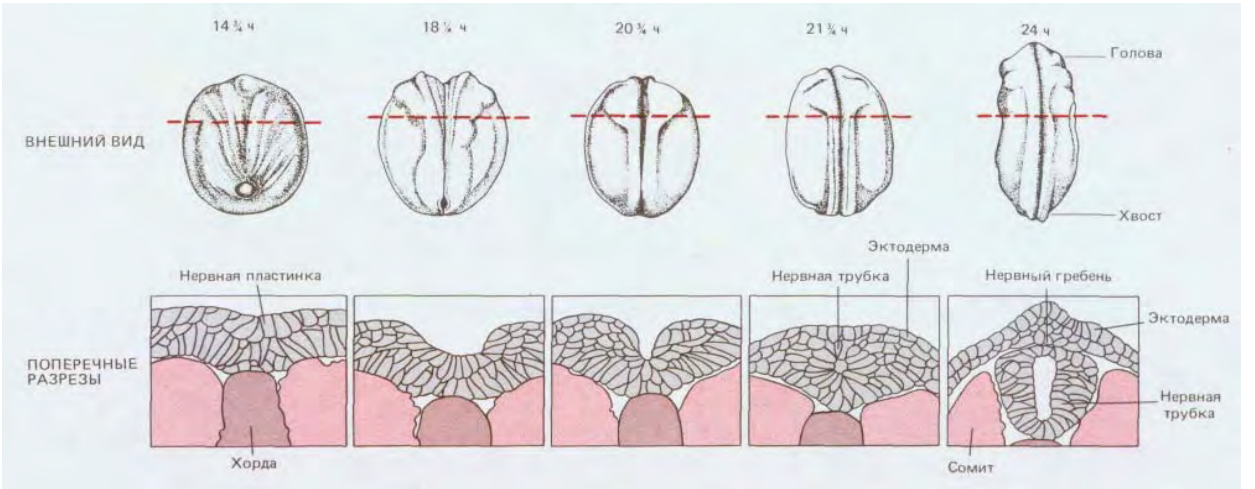


Рис. 16-13. Образование нервной трубки у *Xenopus.* Вид снаружи с дорсальной стороны. Разрезы проходят в плоскости, указанной прерывистой линией. (T. E. Schroeder, J. Embryol, Exp. Morphol., 23, 427-462, 1970.)

возникает полая нервная трубка, покрытая сверху сплошным слоем эктодермы. Как и в случае гаструляции, все эти процессы обусловлены вытягиванием, адгезией и сокращением отдельных клеток эпителиального слоя. Клетки нервной пластинки связаны между собой прочными латеральными соединениями. Вначале клетки удлиняются в направлении, перпендикулярном клеточному слою. Такое удлинение формы клеток связано с удлинением микротрубочек и необходимо для продолжения нейруляции: при воздействии колхицина - вещества, вызывающего разрушение микротрубочек, нервные валики не образуются вовсе или же - коль скоро они возникли - исчезают. Удлинившиеся клетки приобретают затем клиновидную форму с узкими концами, направленными к верхней (апикальной) поверхности клеточного слоя. Так как клетки прочно соединены между собой боковыми поверхностями, а ширина их у основания остается прежней, клеточный пласт в целом прогибается (рис. 16-14). Сужение клеток на верхушке происходит вследствие сокращения пучков актиновых филаментов, которые проходят под апикальной поверхностью клеток, там, где клетки соединяются поясами адгезии (см. разд. 14.1.3).

16.1.11. Скопление клеток мезодермы делится, образуя сомиты по обе стороны от продольной оси тела [13]

По бокам от вновь образованной нервной трубки лежат обширные участки мезодермы (рис. 16-15). Из утолщенной медиальной области мезодермы образуются позвонки, ребра, скелетные мышцы, а также соединительнотканный слой кожи. Вначале мезодерма на каждой из сторон представлена единой массой ткани, но вскоре она делится на «блоки», называемые сомитами (рис. 16-16). Каждый сомит соответствует одному элементу в возникающем в результате дифференцировки скелете и будет делиться впоследствии на три части. Часть сомита, обращенная к хорде, называется *склеротомом* и является источником клеток, образующих ребра и позвонки; часть, обращенная наружу и прилежащая к дорсальной поверхности эмбриона, называется *дерматомом* и является источником клеток, формирующих соединительнотканный слой кожи, или дерму; оставшаяся часть сомита именуется *миотомом* (между склеротомом и дерматомом) и является источником клеток скелетных мышц.

Сомиты обособляются не все сразу, а последовательно один за

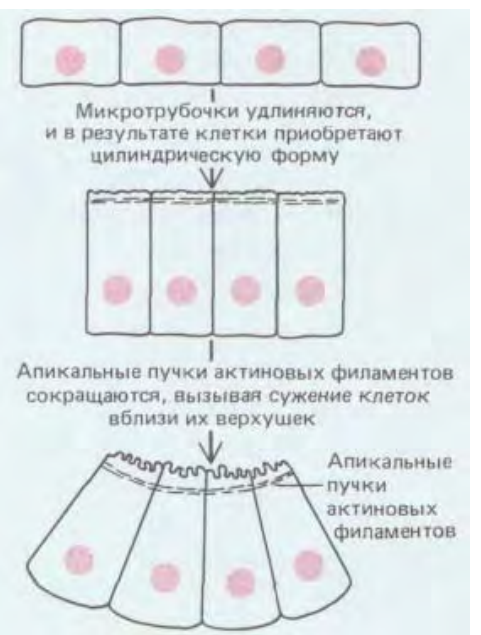
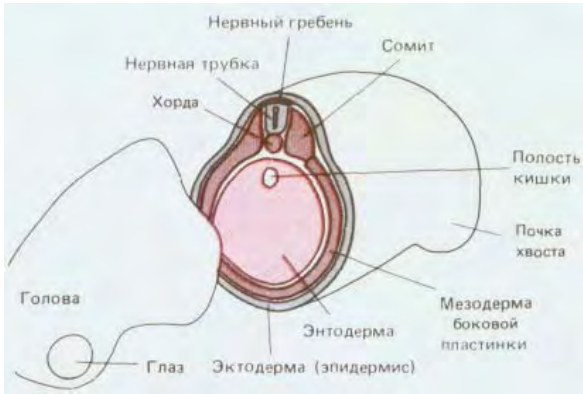


Рис. 16-14. Изгибание клеточного пласта вследствие изменений формы клеток, опосредованных взаимодействием микротрубочек и актиновых филаментов. По мере сужения апикальных концов клеток мембраны их наружных поверхностей становятся вогнутыми. Это может являться симптомом быстрого изменения формы вследствие сокращений, которые имеют место в условиях плотного соприкосновения боковых поверхностей соседних клеток, где тормозится перетекание избытка мембраны вдоль контактирующих комплексов по бокам клеток.

Рис. 16-15. Схематическое изображение поперечного разреза через туловищную область эмбриона лягушки после замыкания нервной трубки. (T. Mohun, R. Tilly, R. Mohun and J. M. W. Slack, Cell, 22, 9-15, 1980.)



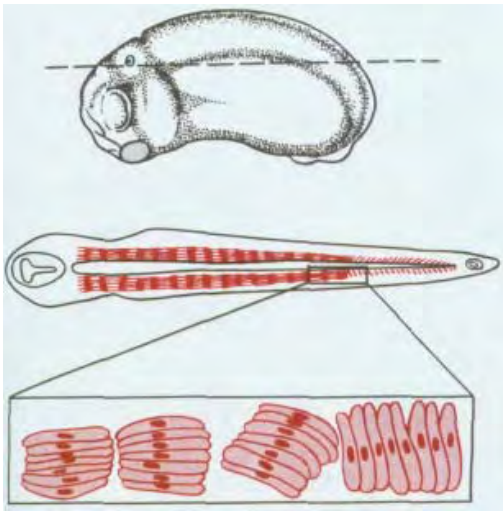


Рис. 16-16. Образование сомитов у *Xenopus. Вверху*- внешний вид зародыша при наблюдении сбоку. Прерывистой линией показана плоскость горизонтального разреза, изображение которого представлено в середине. *Внизу* схема перегруппировки клеток мезодермы в процессе формирования сомитов (при большом увеличении). У *Xenopus* все клетки, из которых потом образуются сомиты, исходно ориентированы под прямым углом к оси тела. В процессе формирования сомитов все клетки каждой группы поворачиваются одновременно.

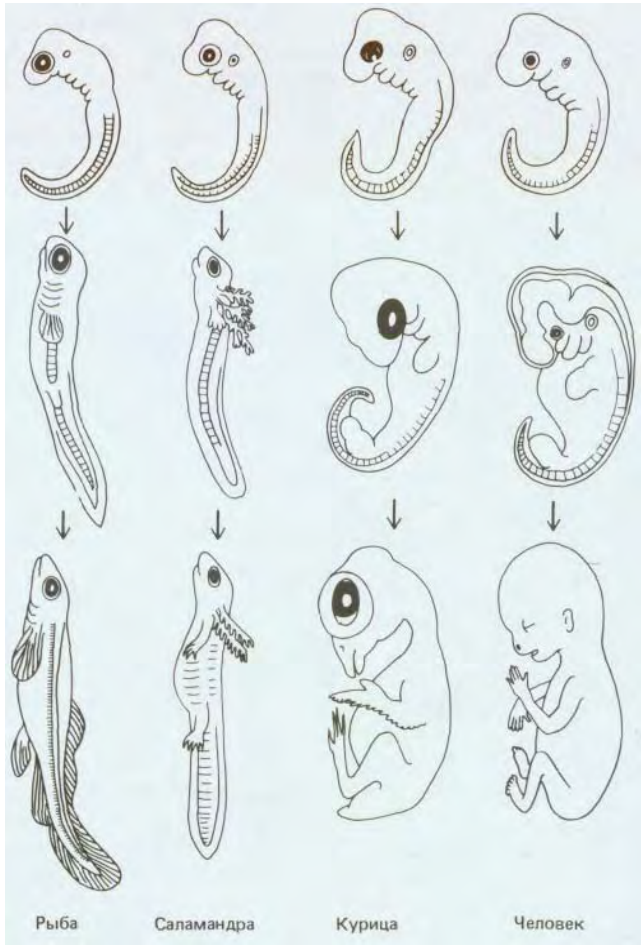


Рис. 16-17. Сравнение эмбриогенеза рыб, амфибий, птиц и млекопитающих. Ранние стадии развития *(вверху)* очень сходны; поздние стадии *(внизу)* различаются значительно сильнее. Самые ранние стадии изображены примерно в одинаковом масштабе, а более поздние стадии - в разном. (E. Haeckel, Anthropogenic, oder Entwickelungsgechichte des Menschen. Leipzig, Engelmann, 1874.)

другим по направлению от головы к хвосту. Сегментация сопровождается изменением взаимных связей между клетками мезодермы. В ранней, несегментированной мезодерме сохраняется электрическое сопряжение клеток через щелевые контакты, исчезающие непосредственно перед или во время формирования сомитов. Очевидно, сначала изменяется характер взаимосвязи между клетками, затем они собираются в компактные группы и образуют сомиты (см. рис. 16-16). Позже мы увидим, что физическая сегментация коррелирует с появлением химических различий между соседними группами клеток сомитов (см. разд. 16.5.20), сегментирование которых напоминает расположение полосок у зебры. По всей вероятности, селективное сцепление, основанное на различиях в химизме поверхности клеток, является причиной разделения массива клеток на физически обособленные сомиты.

16.1.12. План строения тела позвоночного животного складывается в миниатюре на ранней стадии и сохраняется в период роста эмбриона [9]

Длина эмбриона на стадии формирования сомитов не превышает нескольких миллиметров, он обычно состоит из 10^5 клеток. До сих пор мы имели в виду *Xenopus,* но форма и размеры эмбриона примерно одинаковы и у саламандры, и у рыбы, и у курицы и у человека (рис. 16-17). На более поздних стадиях эмбрионы будут значительно различаться по величине и форме, но на этой стадии хорошо видно, что план строения у них один и тот же. Детали будут добавляться позже по мере роста зародыша. А пока центральная нервная система представлена нервной трубкой с утолщенным концом, из которого впоследствии разовьется головной мозг; кишечник и его производные заложены в виде энтодермальной трубки, сегментам туловища соответствуют сомиты. Некоторые типы соединительной ткани сердечно-сосудистой системы представлены более периферической несегментированной мезодермой, а эпидермальный слой кожи - эктодермой. В ходе последующего развития линейные размеры всех этих компонентов могут увеличиваться в 10, 100 и более раз, а суммарный объем и число клеток - в миллионы раз, но общий план строения тела остается прежним.

Заключение

Яйца большинства видов животных представляют собой довольно крупные клетки, содержащие запасы питательных веществ и других клеточных компонентов, синтез которых регулируется материнским геномом. У амфибий первым и весьма важным движением после оплодотворения является поворот кортекса яйца по отношению к его внутреннему содержимому. Асимметрия, создаваемая этим поворотом, равно как и исходная асимметрия в распределении содержимого в яйце перед оплодотворением, определяет будущие передне-заднюю и дорсовентральную оси тела. В ходе последующих делений дробления яйцо делится на множество более мелких клеток, однако общий объем зародыша не увеличивается. Клетки наружных слоев эмбриона формируют между собой плотные контакты, изолируя внутреннее содержимое эмбриона от окружающей среды. Внутрь эмбриона проникает жидкость, в результате чего в нем формируется полость (бластоцель). Стенка такого зародыша называется бластодермой, а сам зародыш носит название бластулы.

В процессе гаструляции бластодерма на одном конце зародыша начинает втягиваться внутрь вследствие изменения формы ее клеток. Полагают, что движущей силой последних этапов гаструляции является

конвергентное расширение впячиваемого эпителия за счет изменения упаковки его клеток, что трансформирует эмбрион в трехслойную структуру с внутренней трубкой (энтодермой), наружным покровом (эктодермой) и промежуточным слоем клеток, который отделился от этой эктодермы (мезодермой). Из энтодермы в дальнейшем сформируется выстилка кишки и ее производных, из эктодермы - главным образом эпидермис и нервная система, а из мезодермы - большая часть мышц и соединительной ткани, сердечно-сосудистая система и мочеполовой тракт. В результате гаструляции сближаются и взаимодействуют между собой группы клеток, находившиеся ранее вдали друг от друга. Например, дорсальная мезодерма вызывает утолщение эктодермы, теперь лежащей над нею; данный участок сворачивается и отделяется, формируя нервную трубку и нервный гребень. Этот процесс, именуемый нейруляцией, также зависит от изменения формы эктодермальных клеток. В средней части дорсальной мезодермы расположен тяж специализированных клеток, именуемый хордой; этот тяж образует центральную ось эмбриона. Удлиненные массы мезодермы, лежащие по бокам от хорды, фрагментируются и дают начало сомитам, из которых возникают позвонки и скелетная мускулатура.

16.2. Клеточная память и возникновение разнообразия клеток [14]

Из оплодотворенного яйца может развиться самец или самка, морской еж, лягушка или человек. Результат развития определяется геномом: линейная последовательность A-, G-, C- и T-нуклеотидов в ДНК организма должна направлять создание множества различающихся химически клеточных типов, которые организованы в пространстве определенным образом. Задача биологии развития состоит в объяснении этого процесса. Прежде всего необходимо ответить на вопрос, каким образом в эмбриогенезе возникают различия между исходно одинаковыми клетками. Для иллюстрации основных законов развития обратимся сначала к земноводным, а затем к млекопитающим.

16.2.1. В ходе развития геном сохраняет постоянство, но меняется экспрессия генов [15]

Клетки различных типов отличаются друг от друга главным образом потому, что помимо многочисленных белков, необходимых всем им без исключения для поддержания жизнедеятельности, клетки каждого типа синтезируют свой собственный набор специализированных белков. Например, в клетках эпидермиса синтезируется кератин, в эритроцитах - гемоглобин, в клетках кишечника - пищеварительные ферменты, в клетках хрусталика - кристаллины и т.д. Поскольку для клеток каждого типа характерны специфические наборы генных продуктов, может возникнуть вопрос: не объясняется ли это просто тем, что клетки обладают различными наборами генов? Клетки хрусталика, например, утратили гены кератина, гемоглобина и т.д., но сохранили гены кристаллитов; или же в них за счет амплификации избирательно увеличилось число копий кристаллиновых генов. Однако целый ряд данных показывает, что это не так: клетки почти всех типов содержат одинаковый полный геном, имевшийся первоначально в оплодотворенном яйце. Причина различия в свойствах клеток заключена не в обладании разными наборами генов, а в их *дифференциальной экспрессии.* Иными словами, активность генов регулируется: они могут включаться и выключаться (см. гл. 10).

Наиболее убедительные данные о том, что, несмотря на видимые

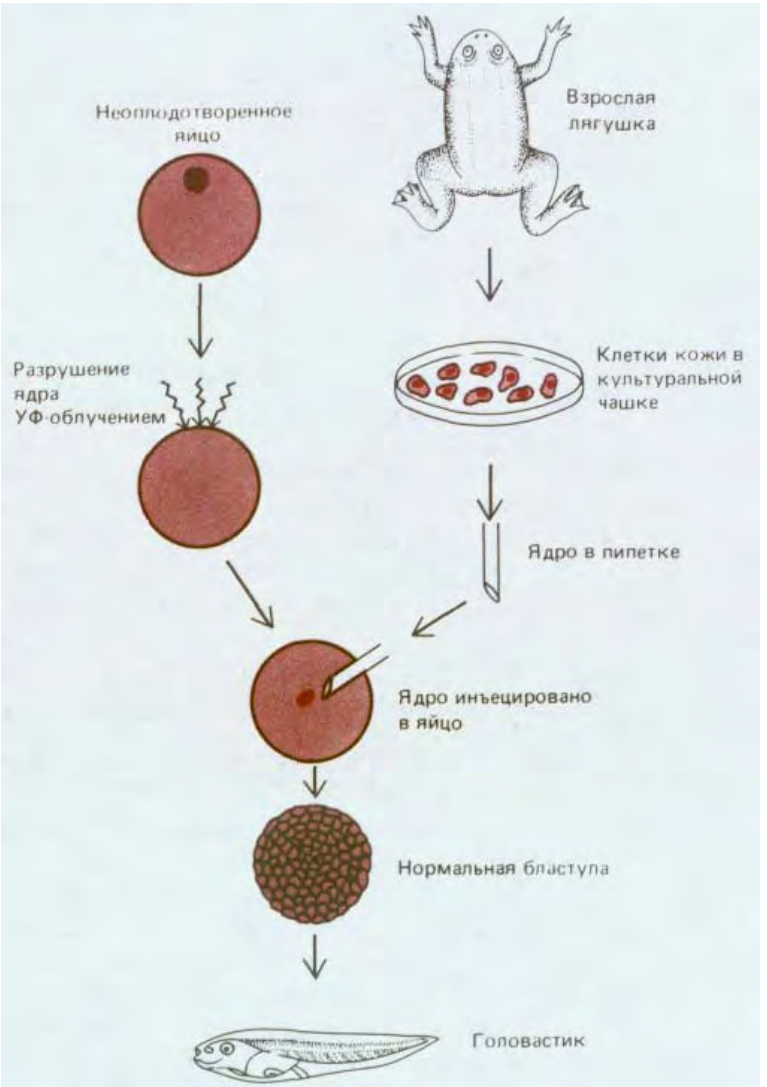


Рис. 16-18. Схема опыта, демонстрирующего, что ядро дифференцированной клетки кожи лягушки содержит весь необходимый генетический материал, обеспечивающий развитие нормального головастика. (J. B. Gurdon, Gene Expression During Cell Differentiation. Oxford, U.K, Oxford University Press, 1973; с изменениями.)

изменения в клетках при дифференцировке, собственно геном остается в них неизменным, были получены в опытах с пересадкой ядер в яйцеклетки амфибий (рис. 16-18). Как правило, размеры яйцеклеток амфибий позволяют с помощью стеклянной микропипетки инъецировать в них ядра, полученные из других клеток. Ядро самого яйца предварительно разрушают, облучая ультрафиолетом. Укол микропипеткой побуждает яйцеклетку к началу развития (см. разд. 15.4.3). Таким образом можно определить, содержит ли ядро дифференцированной соматической клетки полный геном, эквивалентный геному нормальных оплодотворенных яйцеклеток и способный обеспечить развитие. Ответ оказался утвердительным: при замене ядра яйцеклетки ядром кератиноцита из кожи взрослой лягушки или ядром эритроцита были получены нормальные плавающие головастики. Такие эксперименты имеют ряд ограничений: они успешны при использовании ядер лишь некоторых дифференцированных клеток и яйцеклеток определенных видов. Тем не менее результаты и других исследований позволяют прийти к заключению о том, что в процессе развития постоянство генома сохраняется.

Из этого правила известно несколько исключений. Например, у некоторых беспозвоночных в *соматических* (не половых) клетках часть хромосом, представленных в клетках *зародышевой линии* (предшественниках гамет), утрачивается уже на ранних стадиях развития. В ооцитах некоторых других животных (в том числе и у *Xenopus laevis)* происходит избирательная репликация генов рибосомной РНК, а у личинок не-

которых насекомых имеет место неравная политенизация хромосом, в результате чего происходит усиленная амплификация каких-то одних определенных генов (см. разд. 9.2.6). Синтез антител и антиген - специфических рецепторов лимфоцитами у позвоночных включает сплайсинг фрагментов ДНК, расположенных в геноме этих специализированных клеток в разных местах. Сплайсинг происходит по мере дифференцировки данных клеток (см. гл. 18).

16.2.2 Различия между бластомерами часто являются следствием асимметрии, присущей яйцеклетке (за исключением млекопитающих) [16]

При трансплантации ядра недифференцированной клетки в энуклеированную яйцеклетку *Xenopus* меняется характер экспрессии генов и такое ядро начинает походить на нормальное ядро яйцеклетки. Следовательно, поведение ядра может контролироваться цитоплазматическим окружением, в котором оно находится. Яйцеклетка *Xenopus* и многих других видов химически асимметрична, т. е. концентрация некоторых компонентов яйца различна в разных участках цитоплазмы. Вследствие этого с самого начала развития образующиеся эмбриональные клетки по некоторым свойствам отличаются друг от друга, поскольку их цитоплазма наследует неравное количество таких заранее синтезированных веществ. У разных видов значение *локализованных в яйце детерминантов* варьирует. Например, яйцеклетки млекопитающих симметричны и поэтому все ранние бластомеры совершенно одинаковые. Вместе с тем хорошо известен феномен *«мозаичных» яиц у* моллюсков, асцидий, морских нематод (см. разд. 13.5.17) и животных некоторых других групп. Такие яйца содержат определенный набор локализованных детерминантов. Плоскости первых делений дробления ориентированы в зависимости от расположения определенных веществ в яйце и поэтому каждый из бластомеров наследует предсказуемый набор молекул (рис. 16-19). После разделения ранних бластомеров, которые развиваются в этом случае вне связи между собой, большая часть таких изолированных бластомеров явится источником именно тех типов клеток, что и должны были образоваться из этих бластомеров в нормальном эмбрионе. Эта контролирующая функция содержимого яйцеклетки может быть продемонстрирована при искусственном изменении распределения веществ яйцеклетки по отношению к плоскостям делений дробления. Такие опыты можно поставить на яйцеклетках асцидий *Styela* (рис. 16-19), где различные участки цитоплазмы легко различимы, поскольку содержат разные пигменты. При нарушении распределения

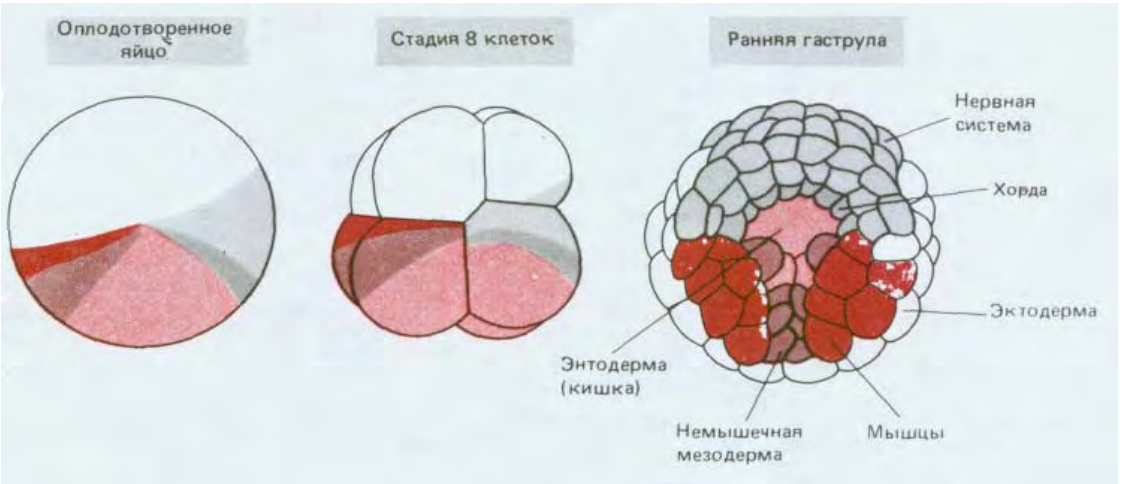


Рис. 16-19. Три последовательные стадии раннего развития асцидий *Styela.* Справа изображение ранней гаструлы *(вид снизу),* где можно видеть образующуюся полость кишки. Различные области цитоплазмы яйца пигментированы по-разному. Пигментация носит постоянный характер и связана с определенным типом делений дробления. Судьба каждого бластмера может быть представлена на основе того, какую часть цитоплазмы яйца унаследовали бластомеры (см. также рис. 16-29). (P. P. Grasse, Traite de Zoologie. Paris, Masson, 1966.)

этих веществ в эмбрионе можно, исходя из типа наследованной каждым из бластомеров цитоплазмы, легко предсказать характер развития данного бластомера.

Исследование мозаичных яиц ставит интересный для клеточной биологии вопрос: каким образом столь точно коррелированы характер дробления и распределение химических веществ? Возможно, что и то, и другое определяется строением цитоскелета. Некоторые факты свидетельствуют в пользу того, что локализованные химические детерминанты соединены с цитоскелетом и именно цитоскелет контролирует прохождение плоскостей делений дробления (см. разд. 13.5.13).

16.2.3. Химические взаимодействия между бластомерами приводят к возникновению новых типов клеток, расположение которых более детализировано: индукция мезодермы у *Xenopus* [17]

Яйцеклетка *Xenopus* представляет собой некое усреднение крайностей, примерами которых являются мозаичные яйца и яйца млекопитающих. Асимметричное расположение компонентов в цитоплазме яйцеклетки *Xenopus* обусловливает различия бластомеров анимального и вегетативного полюсов, что можно рассматривать в качестве характеристики начальных этапов пространственной организации эмбриона. Создание всего набора типов клеток определяется взаимодействиями между бластомерами. Если ранние эмбрионы *Xenopus* поместить в среду, лишенную ионов Ca^{2+} или Mg^{2+}, то бластомеры теряют липкость и легко отделяются друг от друга, причем каждый отделившийся бластомер способен развиваться независимо; в этой ситуации у некоторых бластомеров возникнут признаки, характерные для эктодермы, иные приобретут признаки энтодермы, но экспрессии генов актина (специфического для мышц), являющихся маркером мезодермальной дифференцировки, наблюдаться не будет. Обратный эксперимент подтверждает, что приобретение клетками мезодермальной природы определяется (по крайней мере частично) межклеточными взаимодействиями: при помещении клеток анимального полюса бластулы вблизи клеток вегетативного полюса первые переходят с эктодермального на мезодермальный путь развития (рис. 16-20). Переключение путей развития клеток под влиянием соседней группы

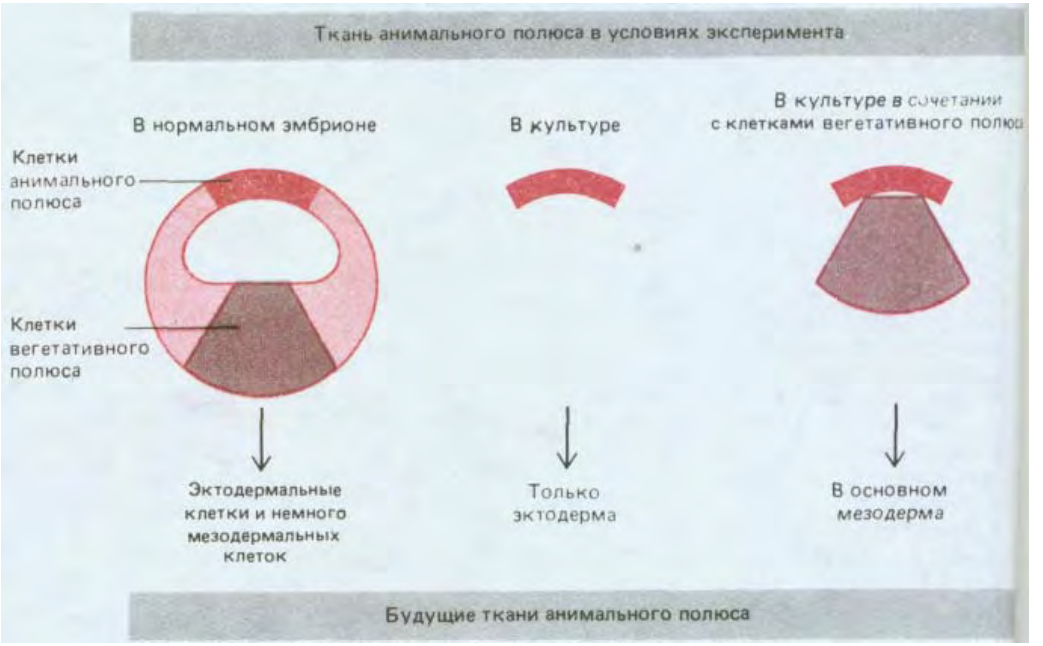


Рис. 16-20. Индукция мезодермы у *Xenopus*. Клетки анимального полюса бластулы, которые в норме формируют только эктодерму, при помещении их в культуру вместе с клетками вегетативного полюса, принимают участие в формировании мезодермы. При нормальном развитии такие индукционные взаимодействия происходят на более ранней стадии; к этому времени экваториальный участок бластулы уже приобретает способность формировать мезодерму в условиях изоляции в культуре.

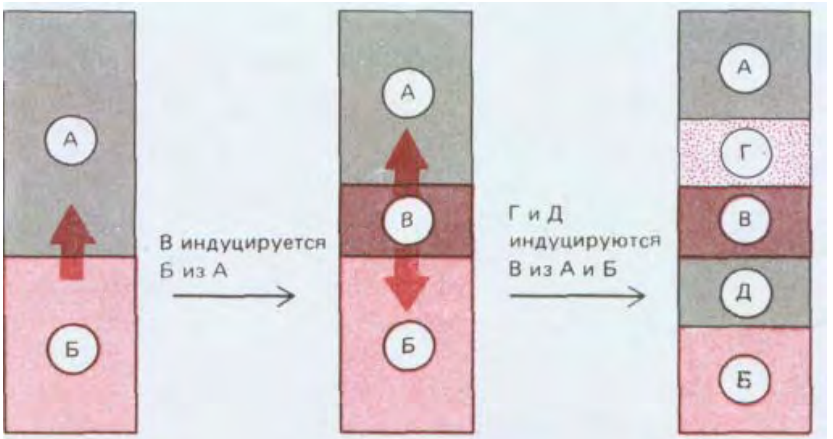


Рис. 16-21. В результате серии индукционных взаимодействий из нескольких исходных может возникать множество различных типов клеток.

клеток называется **индукцией;** в процессе нормального развития индукционные взаимодействия могут происходить как между клетками, исходно прилежащими друг к другу (индукция мезодермы), так и между клетками, сближающимися в результате морфогенетических движений, например при гаструляции. Взаимодействие нескольких типов клеток, реализуемое в результате серии последовательных индукций, позволяет создать множество разнообразных типов клеток (рис. 16-21).

При индукции мезодермы у *Xenopus* непосредственный контакт между клетками необязателен, они могут располагаться на некотором расстоянии друг от друга. Отсюда следует, что индуцирующим агентом является диффундирующее вещество. Оказалось, что вместо бластомеров вегетативного полушария можно использовать *фактор роста фибробластов* (ФРФ) (см. табл. 13-1), который индуцирует клетки из области анимального полюса к развитию по мезодермальному пути; образование мезодермы можно также индуцировать *трансформирующим фактором* (β2 (ТФ-β2), одним из двух вариантов ТФ-β (см. табл. 13-1). Действие ФРФ, как правило, вызывает развитие вентральных производных мезодермы (например, клеток крови), а ТФ-β2 в основном индуцирует дорсальные производные (например, мышцы). Нормальные эмбрионы *Xenopus* содержат мРНК, кодирующую ФРФ. мРНК белка Vgl, обладающего частичной гомологией к ТФ-β, не только присутствует в яйцеклетке, но, как было показано, локализована в области вегетативного полюса яйцеклетки и ранних эмбрионов (рис. 16-22). Эти наблюдения свидетельствуют о том, что ФРФ, ТФ-β2 или родственные им молекулы, опосредуют индукцию мезодермы. Этот и другие примеры, число которых быстро увеличивается, позволяют прийти к выводу, что в регуляции путей развития важную роль играют несколько десятков белков, именуемых факторами роста, которые в организме взрослых животных регулируют клеточные деления и дифференцировку, а также восстановление тканей (см. гл. 17). Подобно нейромедиаторам в нервной системе, такие факторы, по-видимому, используются в разных обстоятельствах для передачи различных сигналов между клетками.

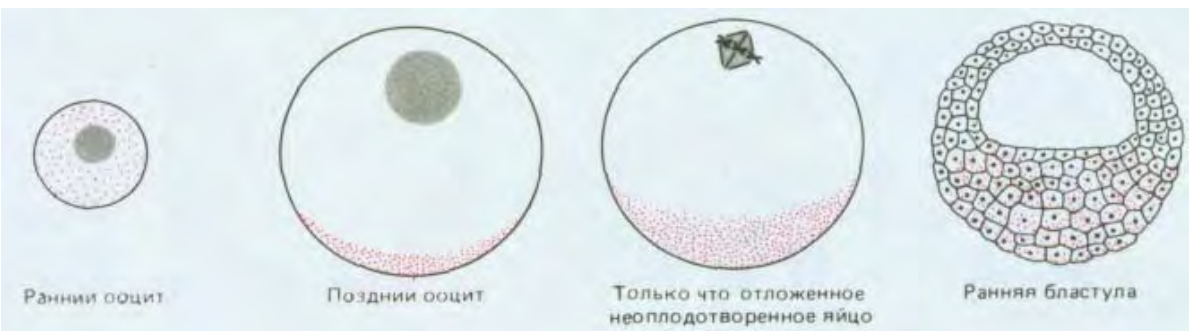


Рис. 16-22. Окрашенные точки указывают на расположение мРНК, кодирующей белок Vgl, в вегетативном полушарии яйцеклетки *Xenopus* на различных стадиях развития. Это было продемонстрировано методом гибридизации in situ. Белок Vgl частично гомологичен фактору роста ТФ-β и может быть составным элементом сигнала, индуцирующего мезодерму, который создается клетками вегетативного полюса на ранней стадии развития эмбриона. Механизм, контролирующий изменение локализации Vgl-мРНК, не изучен.

16.2.4. Эмбрионы млекопитающих развиваются в матке, обеспечивающей их защиту [18]

Развитие млекопитающих имеет ряд особенностей. Важнейшая из них состоит в том, что оно происходит в матке, которая защищает эмбрион и освобождает его от необходимости развиваться быстро. Кроме того, поскольку плацента обеспечивает эмбрион питательными веществами за счет материнского организма, яйцеклетке млекопитающих не нужны большие запасы этих веществ в виде желтка. В связи с этим диаметр яйца мыши составляет 80 мкм, и по объему оно примерно в 2000 раз меньше типичного яйца земноводных. Деления дробления происходят не быстрее делений обычных соматических клеток и транскрипция начинается уже на стадии 2-клеточного зародыша. Поздние стадии развития млекопитающих в основных чертах схожи с такими же стадиями развития других позвоночных, например *Xenopus.* Однако в ходе развития млекопитающих наблюдается большой «крюк», имеющий целью создание сложных структур, прежде всего амниона и плаценты, которые замыкаются вокруг собственно зародыша, защищают его и обеспечивают обмен метаболитами с материнским организмом. Эти структуры, как и остальные органы, образуются из оплодотворенного яйца, но их называют *внезародышевыми,* так как при рождении они отбрасываются и не участвуют в построении взрослого организма.

Этапы раннего развития мыши изображены на рис. 16-23. Вначале яйцо покрыто прозрачной оболочкой - *zona pellucida.* Оплодотворенное яйцо дробится внутри этой оболочки и из него образуется **морула,** представляющая собой группу клеток, по форме напоминающую ягоду малины (рис. 16-23). При переходе от 8-клеточной к 16-клеточной стадии поверхность морулы становится более гладкой, а форма более округлой, так как в результате изменения взаимной адгезивности клеток они укладываются более компактно (рис. 16-24). Между клетками наружного слоя образуются плотные контакты, и таким образом внутренние участки морулы изолируются от внешней среды. Затем внутренние межклеточные пространства расширяются и возникает бластоцель - полость, заполненная жидкостью. Морула превращается в **бластоцисту.** Клетки, окружающие бластоцель, образуют на этой стадии сферический

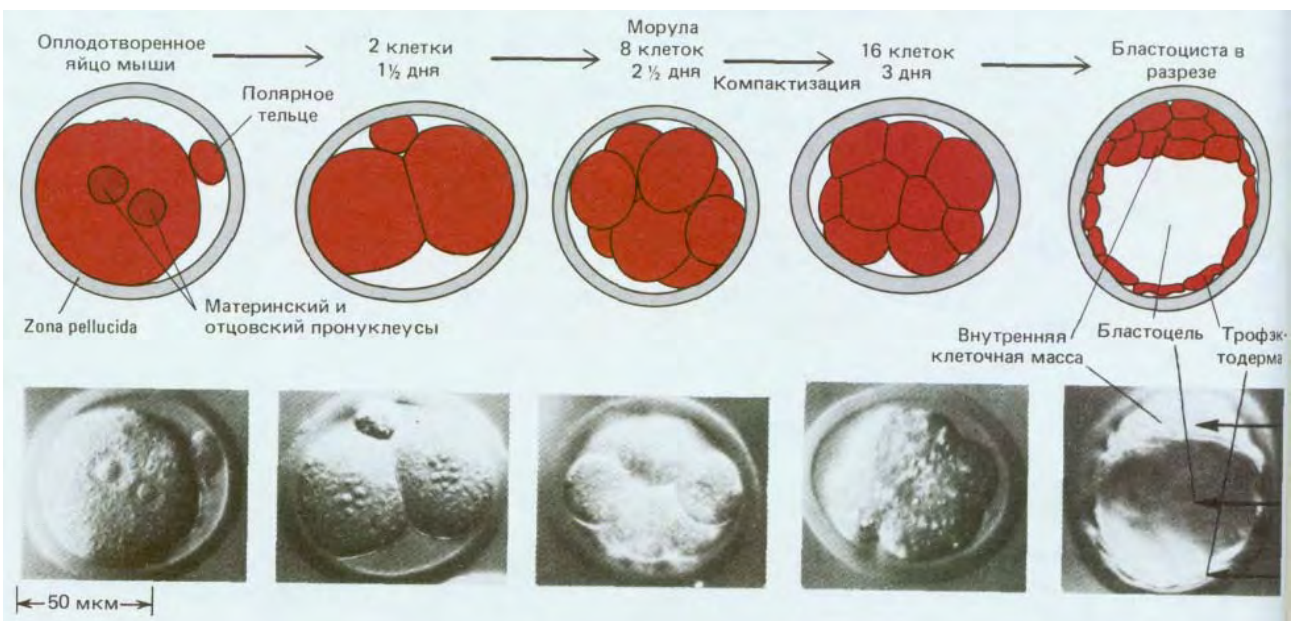


Рис. 16-23. Ранние стадии развития мыши. (Фотографии с любезного разрешения Patricia Calarco, из G. Martin, Science, 209, 768-776, 1980.Copyright 1980, American Association for the Advancement of Science.)

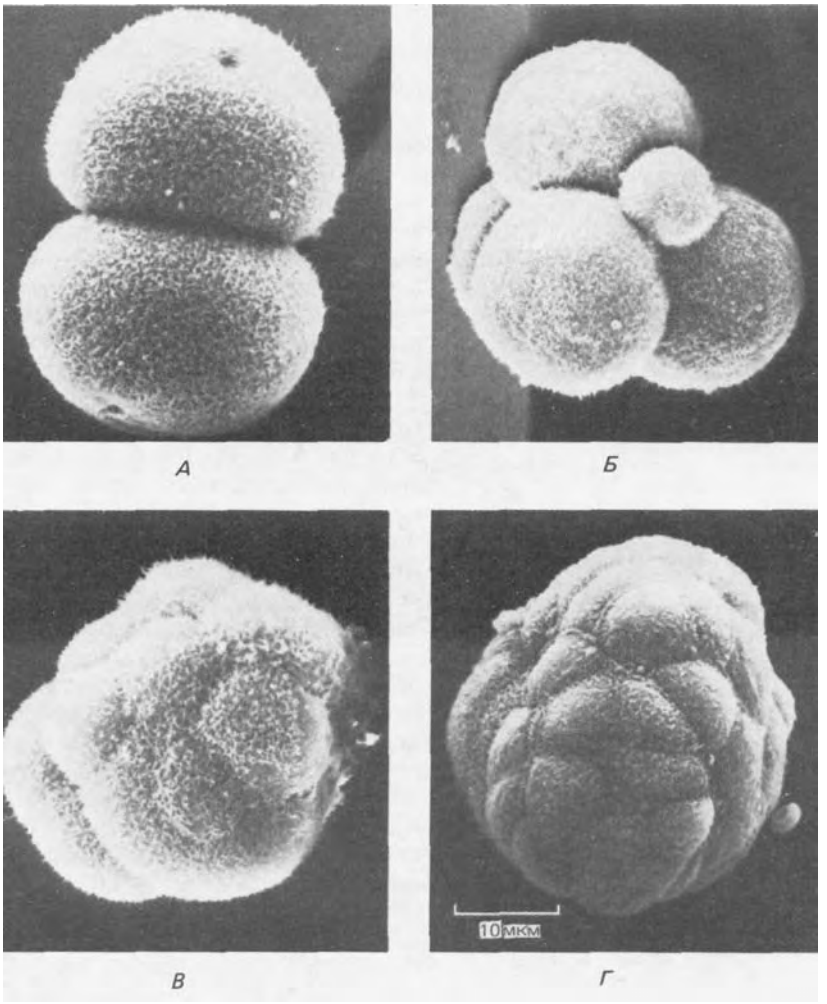


Рис. 16-24. Мышиный эмбрион на ранних стадиях развития. Микрофотографии получены с помощью сканирующего электронного микроскопа. Zona pellucida удалена. *А.* Стадия двух клеток. *Б.* Стадия четырех клеток (наряду с четырьмя бластомерами видно полярное тельце, см. разд. 15.3.3). *В.* Стадия морулы - 8 — 16 клеток; происходит компактизация зародыша. *Г.* Бластоциста. (С любезного разрешения Patrica Calarco; Г - из P. Calarco, C. J. Epstein. Dev. Biol., 32, 208-213, 1973.)

пузырек, на одном из полюсов которого имеется более массивное скопление клеток. Наружный слой клеток называют **трофэктодермой,** а скопление клеток внутри трофэктодермы на одном из полюсов бластоцисты - внутренней **клеточной массой** (рис. 16-23).

Собственно зародыш формируется только из внутренней клеточной массы. Трофэктодерма служит предшественником плаценты и образуется ранее других внезародышевых структур. После исчезновения zona pellucida клетки трофэктодермы вступают в контакт со стенкой матки, в которую имплантируется эмбрион. Тем временем внутренняя клеточная масса растет и начинает дифференцироваться: часть ее также *образует внезародышевые структуры,* например *желточный* мешок, а из другой части формируется собственно зародыш. Здесь, подобно соответствующим этапам развития других видов позвоночных, также происходят процессы гаструляции, нейруляции и т.д., хотя в ряде случаев эта гомология внешне далеко не столь очевидна из-за особенностей геометрии зародышей млекопитающих.

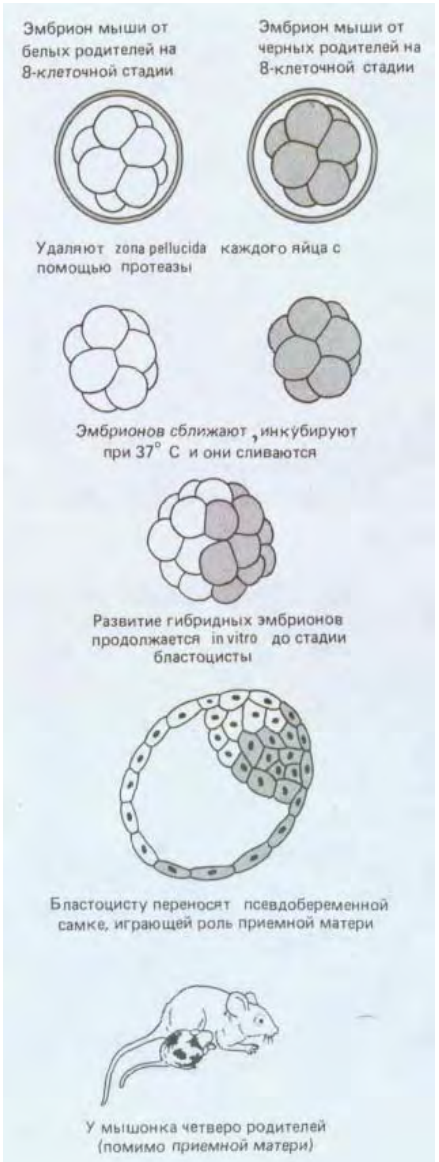


Рис. 16-25. Метод получения химерных мышей путем объединения двух морул с разными генотипами.

16.2.5. Дифференцировка клеток раннего эмбриона млекопитающих зависит от межклеточных взаимодействий [19, 20]

Ранний зародыш млекопитающих вплоть до 8-клеточной стадии обладает поразительной способностью к регуляции развития и каждая из его клеток может образовать в дальнейшем любую из частей более позднего зародыша или даже взрослого организма. Примером тому может служить образование идентичных близнецов из одной оплодотворенной яйцеклетки. В данном случае возникают два вполне нормальных индивидуума, каждый из которых сформирован из части нормального зародыша. Если, например, одну из клеток 2-клеточного эмбриона мыши разрушить иглой, а оставшийся неполный эмбрион имплантировать в матку для дальнейшего развития, то в большом числе случаев на свет появится вполне нормальная мышь.

Вместе с тем можно объединить два восьмиклеточных эмбриона мыши в одну гигантскую морулу, которая в результате развития образует мышь нормального размера (рис. 16-25). Животных, возникающих вследствие развития агрегатов генетически различных клеток, называют **химерами.** Химер можно получать также в результате инъекции клеток ранних эмбрионов в бластоцисты иного генотипа. Введенные чужеродные клетки включаются в состав внутренней клеточной массы эмбриона-реципиента и в результате образуется химерное животное. Химер можно получить даже после инъекции одной клетки; это позволяет выяснить, насколько та или иная клетка сохраняет потенции к развитию. Из результатов подобных экспериментов следует важный вывод: клетки очень ранних эмбрионов млекопитающих (вплоть до 8-клеточной стадии) идентичны и обладают неограниченными потенциями, т. е. они *тотипотентны*.

Клетки становятся различными вследствие их взаимодействия друг с другом. У эмбриона мыши первые различия между клетками внутренней клеточной массы и трофэктодермы обусловливаются расположением межклеточных контактов. На 8-клеточной стадии все бластомеры занимают примерно одинаковое положение, их внутренняя поверхность контактирует с другими бластомерами, а внешняя поверхность обращена наружу. Каждый из бластомеров обладает полярностью, характеризуемой присутствием микроворсинок на наружной поверхности и асимметричным расположением внутриклеточных компонентов. Результаты экспериментов на бластомерах in vitro показывают, что такая полярность определяется характером межклеточных контактов: сборка микроворсинок и ассоциированных с ними компонентов осуществляется при условии, что этот участок поверхности не имеет контакта с другими бластомерами. Плоскость следующего деления ориентирована так. чтобы использовать эту асимметрию для создания двух различных потомков, один из которых (клетка внутренней клеточной массы) обращен внутрь и лишен компонентов, ассоциированных с микроворсинками, а другой (клетка трофэктодермы) обращен наружу и наследует эти компоненты. Таким образом, расположение межклеточных контактов, вероятно, контролирует возникновение первых различий между клетками (рис. 16-26).

16.2.6. Поведение клеток тератокарциномы демонстрирует значение сигналов окружающей среды [21]

В раннем развитии млекопитающих судьба каждой из клеток зависит от взаимодействия с соседями, и такой зародыш можно отнести по характеру развития к *регуляционным* системам. Эксперименты на мышах, описанные ранее, являются хорошим примером этому: клетки

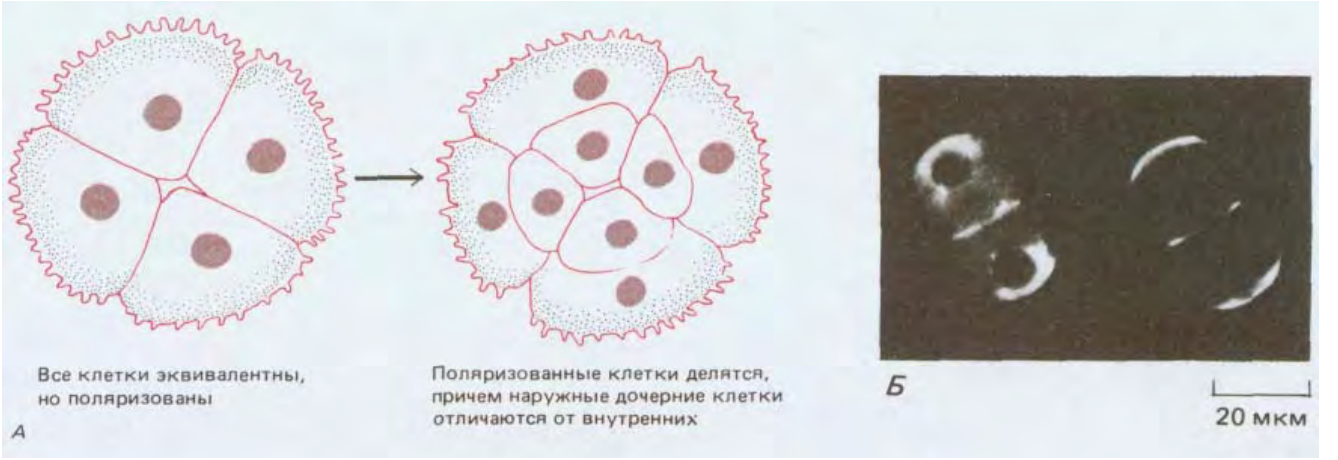


Рис. 16-26. *А.* Поляризация бластомеров мыши на стадии 8-клеточно-го зародыша приводит к тому, что на стадии 16 клеток наружные и внутренние клетки различаются по химическим свойствам. *Б.* Два бластомера из эмбриона мыши в конце 8-клеточной стадии, меченные флуоресцирующими антителами против клатрина *(слева),* или флуоресцирующим конканавалином А *(справа).* На рисунке видно, что имеет место поляризация внутренних компонентов клетки, а также свойств клеточной поверхности. (Б-из B. Maro, M.H. Johnson, S. J. Pickering, D. Louvard, J. Embryol. Exp. Morphol., **90,** 287-309, 1985.)

половинных или удвоенных химерных эмбрионов подстраивают свое поведение так, чтобы в результате развития возникло животное, не отличающееся от нормы ни по размерам, ни по строению. Однако в сильно отклоняющихся от нормы условиях развития эмбриональные клетки выходят из-под контроля. Отсюда следует несколько важных выводов.

При трансплантации нормальных ранних эмбрионов в почки или семенники взрослых животных происходит дезорганизация эмбрионов и нарушается нормальный контроль клеточной пролиферации. В результате аномального роста возникает тератома - дезорганизованная масса клеток, содержащая многие дифференцированные ткани (кожу, кости, железистый эпителий и т. д.) вперемешку с недифференцированными стволовыми клетками, которые продолжают делиться и создавать эти дифференцированные ткани. Тератома может возникать и спонтанно в результате случайного нарушения развития. В нормальных условиях дробление и эмбриогенез начинаются только после того, как произойдет оплодотворение яйцеклетки спермием. Это событие служит сигналом к развитию. Но в некоторых случаях ооцит приступает к развитию спонтанно. Такое спонтанное (без оплодотворения) развитие носит название *партеногенетического* (см. разд. 15.4.3). Если это происходит до высвобождения ооцита из яичника, то до стадии бластоцисты эмбрион развивается практически нормально, но затем возникает тератома. Тератома может возникать и у самцов из первичных половых клеток в семенниках; у грызунов образование тератомы можно спровоцировать искусственно путем пересадки взрослому животному развивающихся семенников эмбриона, содержащих первичные половые клетки.

Во всех этих случаях возникают весьма сходные тератомы и все они могут быть использованы для получения перевиваемых злокачественных опухолей *тератокарцином.* Тератокарцинома способна расти до тех пор, пока не вызовет гибели хозяина. Трансплантируя раковые клетки от одной особи к другой, тератокарциному можно поддерживать неопределенно долго. Тератокарцинома содержит часть недифференцированных стволовых клеток и часть дифференцированных клеток, образующихся из стволовых. Стволовые клетки тератокарциномы можно культивировать in vitro в виде постоянных клеточных линий. В подходящей среде они продолжают пролиферировать без дифференцировки неопределенно долго. Но если среду изменить, добавив индуктор дифференцировки, например ретиноевую кислоту, или создать условия, в которых клетки агрегируют, то стволовые клетки получают импульс к дифференцировке и образуют множество нормальных специализированных типов клеток.

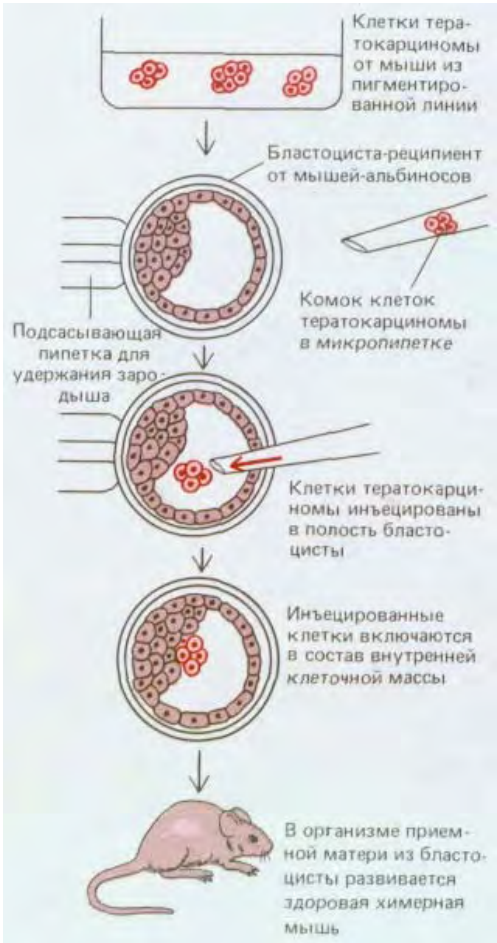


Рис. 16-27. Эксперимент, который, показывает, что в результате объединения клеток тератокарцином с клетками нормальной бластоцисты может получиться здоровая химерная мышь.

Можно думать, что любопытные свойства стволовых клеток тератокарциномы, как и в случае других видов опухолей, являются следствием мутации генов, ответственных за нормальный контроль поведения клеток (см. разд. 21.1.2). Однако дальнейшие наблюдения показали, что это не так. Оказалось, что очень похожие клетки можно получить, поместив клетки внутренней клеточной массы в культуральную среду и как только они начнут делиться, создать условия для их разобщения. Некоторые диспергированные клетки продолжают делиться неопределенно долго без изменения своих свойств; их можно использовать для создания постоянных клонов, обладающих многими свойствами нормальных клеток внутренней клеточной массы. Эти клеточные линии почти неотличимы от линий клеток, полученных из тератокарциномы, но их можно получать из нормальных эмбрионов со столь высокой частотой, которая опровергает предположение об их мутационной природе. Вероятно, разобщение клеток и лишение их нормального окружения мешает восприятию сигналов, ограничивающих их пролиферацию в норме и содействующих последовательной дифференцировке.

Более того, аномальное поведение таких *стволовых клеток* (независимо от того были ли они получены из тератокарциномы или как культура нормальных эмбриональных клеток) может измениться при их помещении в нормальное окружение. Для этого клетки следует инъецировать в полость нормальной бластоцисты (рис. 16-27). Инъецированные клетки включаются во внутреннюю клеточную массу нормальной бластоцисты и участвуют в образовании внешне нормальной химерной мыши: потомки инъецированных эмбриональных стволовых клеток могут быть обнаружены практически во всех тканях этого животного, где они дифференцируются в строгом соответствии с местоположением и даже способны принимать участие в формировании жизнеспособных половых клеток. Эти эксперименты убедительно свидетельствуют о том. что сигналы, воспринимаемые ранними эмбриональными клетками от соседних бластомеров, играют исключительную роль в определении их дальнейшей судьбы.

16.2.7. Поведение клеток многоклеточных животных определяется не только геномом и окружающей средой, но и их предысторией

В процессе развития организма определенные группы клеток должны не только приобрести некоторые характерные признаки, отличающие их друг от друга, но, кроме того, они должны *сохранить* приобретенные ими различия и после исчезновения внешних сигналов, инициировавших такие изменения, а также передать свои особенности клеткам-потомкам. Так, при делении пигментной клетки должны возникать пигментные клетки, при делении клетки печени ее потомки должны оставаться клетками печени и т. д. Отличительные черты клеток возникают вследствие восприятия ими различных воздействий, которым они подверглись в период эмбриогенеза; сохранение этих различий обусловлено способностью клеток каким-то образом закреплять влияние этих прошлых воздействий и передавать их своим потомкам. Даже самые примитивные бактерии в ответ на изменение окружающей среды способны к быстрому изменению своей химической активности. Но клетки высших животных устроены значительно сложнее; их поведение определяется не только геномом и нынешним окружением, но также их прошлой историей.

16.2.8. Будущая специализация клеток определяется задолго до появления внешних признаков дифференцировки [14, 22]

Наиболее известное доказательство существования клеточной памятистойкое сохранение дифференцированного состояния клеток во взрослом организме (см. разд. 13.4.1). Благодаря клеточной памяти стимул, направивший клетку на тот или иной путь дифференцировки, может оказывать свое действие на ее потомков. Некоторые клетки сомитов позвоночных специализируются как предшественники мышечных клеток на очень ранних стадиях развития и мигрируют из сомитов в различные части тела, в том числе в области формирования конечностей; все это сложное поведение определяется серией решений, принятых клетками значительно раньше, а именно до и во время гаструляции (см. разд. 16.6.5). Эти клетки-предшественники еще не содержат большого количества сократительных белков, характерных для зрелых мышечных волокон; они даже внешне не отличаются от других клеток зачатка конечности, имеющих иное происхождение. Только через несколько дней они приобретают внешние признаки, характерные для дифференцированных мышечных клеток и начинают интенсивно синтезировать специфические для этих клеток белки. Остальные клетки будущей конечности, расположенные здесь же, дифференцируются в элементы соединительной ткани. Следовательно, выбор программы развития (т.е. станет ли клетка мышечной или клеткой соединительной ткани) происходит задолго до того, как проявляются внешние признаки дифференцировки. Вероятно, эта программа записана в клетках в виде трудно уловимых химических модификаций (в данном случае, по-видимому, происходит активация первичного специфического для мышиных клеток регуляторного гена - см. разд. 10.1.8).

Детерминированными называют клетки, которые выбрали программу развития. В эмбриологии «детерминация»-настолько важное и тонкое понятие, что мы должны дать ему более строгое определение. Клетку считают детерминированной, если в ней произошло стойкое внутреннее изменение, которое делает ее и ее потомков отличными от других клеток эмбриона и предопределяет развитие по специализированному пути.

Рассмотрим некоторые пункты этого определения.

1. Изменение должно сделать клетку и ее потомков отличными от других клеток и направить эти клетки по определенному пути развития: клетка не считается детерминированной только потому, что обгоняет другие клетки в процессе своего созревания. Детерминация включает выбор определенного пути развития.

2. Изменения, происходящие в дифференцирующихся клетках, должны быть самоподдерживающимися. Детерминация подразумевает установление различий, *наследуемых* в ряду поколений клеток. Клетка не считается детерминированной только на том основании, что она занимает определенное положение в теле животного. Чтобы быть таковой, она должна сохранить свои характерные особенности при исчезновении внешних сигналов, вызвавших появление этих особенностей.

Детерминация иногда определяется, как *необратимое* изменение. Но поскольку мы не в состоянии проверить поведение клетки во всех возможных условиях окружающей среды, нельзя полностью исключить обратимость такого изменения; более того, в некоторых случаях клеточная память может быть нарушена, и тогда детерминированное состояние станет обратимым. Поэтому мы стремимся избегать крайних выражений и говорим о детерминации, как о *самоподдерживающемся* изменении свойств клеток.

Термин **дифференцировка** используется обычно для определения *явно выраженной* специализации, т.е. для определения клеточных свойств, которые ярко выражены. Обычно клетка становится детерминированной до дифференцировки, хотя в некоторых случаях оба процесса осуществляются одновременно. Однако в принципе дифференцировка может осуществляться без детерминации, если явная специализация клетки носит обратимый характер.

16.2.9. Время детерминации клеток можно определять в экспериментах с пересадками [23]

Для доказательства того, что клетка или группа клеток детерминированы, следует выделить у них определенный признак, сохраняющийся даже при экспериментальном изменении условий, в которых он возник. В этом случае обычно используют трансплантацию клетки или клеток, перенося их в необычные условия.

Простейший эксперимент такого рода был проведен на эмбрионах амфибий. Ранее мы уже упоминали, что можно построить карту презумптивных зачатков бластулы или гаструлы, содержащую подробные указания о том, какие органы взрослого организма разовьются из тех или иных областей зародыша. Легко проследить, что при нормальном ходе развития клетки одной области дадут начало эпидермису, а клетки другой - мозгу. Для получения ответа на наш вопрос необходимо поменять местами два кусочка эмбриональной ткани, вырезанные из разных областей, например так, чтобы часть будущего (презумптивного) эпидермиса оказалась на месте будущего мозга и наоборот. Если в момент трансплантации клетки уже детерминированы, то они будут развиваться автономно в соответствии со своим прежним положением, т.е. клетки из области презумптивного эпидермиса, будучи перенесены в область, из которой должен образоваться мозг, образуют эпидермис, а клетки из области будущего мозга после трансплантации в область, дающую начало эпидермису, образуют нервную ткань. Заметим, однако, что на стадии ранней гаструлы клетки еще «не помнят» своего происхождения и дифференцируются в соответствии со своим новым положением. Но если провести такой же эксперимент несколько позже (например, на стадии поздней гаструлы), то клетки презумптивного мозга в области эпидермиса будут дифференцироваться в нервную ткань, а клетки презумптивного эпидермиса, пересаженные в область будущего мозга, - в эпидермис. Следовательно, обе группы клеток стали детерминированными в какой-то момент между ранней и поздней гаструлой.

16.2.10. Состояние детерминации может определяться цитоплазмой или хромосомами [24, 25]

Клеточная память представляет собой одну из наиболее интригующих проблем молекулярной биологии: от чего зависит самоподдерживание определенного характера экспрессии генов? Подробное обсуждение этого вопроса с биохимической точки зрения вы найдете в гл. 10. Здесь же для дальнейшего обсуждения полезно разделить молекулярные механизмы на два класса, которые можно обозначить как *цитоплазматические* и *ядерные.*

Когда мы говорим **о цитоплазматической памяти,** мы подразумеваем, что компоненты, кодируемые определенным набором генов, присутствуют в цитоплазме (либо во внеклеточном окружении) и оказывают прямое или косвенное действие на геном по принципу обратной связи, поддерживая избирательную экспрессию определенного набора генов;

в цитоплазме клеток разных типов содержатся различные контролирующие факторы. Таким образом, при получении ядра из дифференцированных клеток одного типа и инъекции этого ядра в цитоплазму клеток другого типа характер экспрессии генов должен измениться с тем, чтобы соответствовать цитоплазме хозяина. В экспериментах по ядерным пересадкам на яйцеклетках амфибий (см. разд. 16.2.1), равно как и в других экспериментах по искусственному слиянию клеток, были получены данные, свидетельствующие о том, что именно так все и происходит. Это позволяет говорить о важной роли механизмов, обеспечивающих цитоплазматическую память.

Вместе с тем **ядерная память,** известная также как *геномный импринтинг,* определяется самоподдерживающимися изменениями, которые обусловлены изменениями свойств хромосом. В ходе этих изменений последовательность нуклеотидов в ДНК остается постоянной, но происходит выбор генов, которые будут экспрессироваться. Наиболее хорошо изучены примеры ядерной памяти, связанные *с метилированием* ДНК: как объясняется в разд. 10.3.16, существующий характер метилирования цитозинов в ДНК может сохраняться в ряду клеточных поколений и это свойство определяется действием фермента метилазы.

Эмбриональное развитие является как бы экспериментом природы, поставленным ею для изучения ядерной памяти. Спермий и неоплодотворенная яйцеклетка существенно различаются по состоянию клеточной дифференцировки, и тем не менее они содержат практически идентичный набор генов и после оплодотворения их хромосомы объединяются в одной клетке. Сохраняются ли функциональные различия хромосом, происходящих из спермия и яйцеклетки, после их объединения в зиготе? В исследованиях на мышах на этот вопрос был получен положительный ответ.

16.2.11. Наборы хромосом, происходящие из спермия и яйца, несут отпечаток своей истории [25]

Как уже упоминалось, неоплодотворенное яйцо можно стимулировать к дроблению без помощи спермия: независимо от того, происходит активация спонтанно или вызвана искусственно, ее результатом является *партеногенетический* эмбрион (см. разд. 16.2.6). У животных определенных видов, в том числе и позвоночных (например, у некоторых ящериц), такой эмбрион способен развиться в нормальное здоровое взрослое животное. У млекопитающих партеногенетические эмбрионы погибают на ранних стадиях развития; у этих животных до сих пор неизвестны случаи развития без оплодотворения, несмотря на большой интерес к данной проблеме и многочисленные попытки экспериментаторов. Причина этих неудач была выявлена в экспериментах на яйцеклетке мыши.

Известно, что оплодотворенное яйцо (зигота) содержит два пронуклеуса, один из которых получен от отца, а второй - от матери. Используя микропипетку, можно извлечь один из пронуклеусов и заменить его пронуклеусом другого яйца (рис. 16-28). Таким образом мы создаем зиготу, содержащую либо два материнских, либо два отцовских пронуклеуса. В любом случае геном будет одним и тем же (если принять, что отцовский пронуклеус содержал не Y-, а X-хромосому). Оказалось, что зигота с двумя отцовскими пронуклеусами образует эмбрион, у которого нет структур, развивающихся в норме из внутренней клеточной массы, а зигота с двумя материнскими пронуклеусами образует эмбрион, не содержащий структур, возникающих из трофэктодермы. Так как оба типа зигот обладают одинаковой цитоплазмой, эти эксперименты убедительно свидетельствуют о том, что ядерная

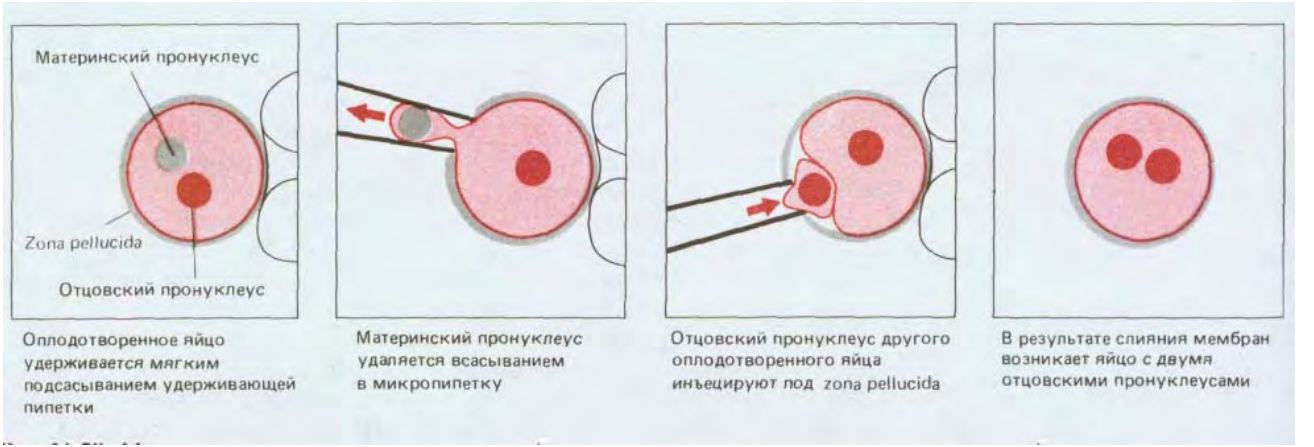


Рис. 16-28. Метод трансплантации пронуклеусов позволяет получать яйцеклетки, оба пронуклеуса которых принадлежат самцу (или самке). Слияние мембран происходит в результате воздействия частично инактивированного вируса Сендай, инъецированного на третьем этапе одновременно с трансплантацией пронуклеуса.

память обусловливает экспрессию различных наборов генов в материнских и отцовских хромосомах; иными словами, одни гены экспрессируются только тогда, когда они наследуются от отца, а другие - когда наследуются от матери.

Наблюдения на трансгенных мышах показали, что в основе явления **геномного импринтинга** лежит метилирование ДНК. Например, можно скрестить трансгенных мышей, несущих последовательности чужеродной ДНК, и получить потомство, наследующее внедрившуюся чужеродную последовательность только от отца или только от матери. У таких мышей интегрированные последовательности могут метилироваться по-разному в зависимости от происхождения из спермия или яйцеклетки. Характер метилирования сохраняется в соматических тканях в течение всей жизни взрослого животного, но может измениться в процессе формирования клетками зародышевой линии следующего поколения гамет. Характер экспрессии одного из генов, о котором известно, что он ведет себя подобным образом, определяется метилированием; если ген наследуется от матери, он метилирован и не экспрессируется у данного животного, тогда как тот же ген, унаследованный от отца, не метилирован и экспрессируется.

Заключение

В процессе развития из оплодотворенной яйцеклетки возникает множество клеток различных типов. За редким исключением геномы дифференцированных клеток сохраняются в неизменном состоянии, изменяется лишь характер экспрессии генов. Различия, возникающие между клетками, могут быть следствием неравного распределения цитоплазматических детерминантов в яйцеклетке до начала деления или следствием последовательного изменения клеточного окружения в эмбрионе. Например, у Xenopus бластомеры анимального и вегетативного полушарий наследуют различные цитоплазматические детерминанты. Бластомеры вегетативного полушария индуцируют анимальные бластомеры к развитию по мезодермальному пути; в отсутствие такого воздействия анимальные бластомеры дают начало эктодерме. Индукция опосредуется сигнальными молекулами (ФРФ и ТФ-β2 или их аналогами), которые в организме взрослых животных участвуют в регуляции роста и дифференцировки клеток.

Яйцеклетки млекопитающих обладают уникальными свойствами, являясь, по сути дела, симметричными. Благодаря этому свойству все бластомеры млекопитающих исходно не отличаются друг от друга; различия возникают как следствие межклеточных взаимодействий. По этой же причине клетки двух различных эмбрионов, объединенные в одно целое, способны скорректировать программу развития и сформировать

химерную мышь. В отсутствие нормального влияния соседних клеток бластомеры раннего зародыша мыши могут, развиваться аномально, образуя тератокарциномы, используемые для получения эмбриональных стволовых клеток. При имплантации нормальным ранним эмбрионам такие клетки восстанавливают нормальное поведение, их потомки дифференцируются в зависимости от окружения и способны участвовать в формировании нормального эмбриона.

В процессе развития эмбриональные клетки приобретают определенные различия, которые они должны сохранить даже после исчезновения воздействия, вызвавшего такую диверсификацию клеток. Для этого необходимо, чтобы клетки обладали памятью, обеспечивающей детерминацию клеток в направлении определенной специализации задолго до проявления внешних признаков дифференцировки. Механизмы клеточной памяти могут быть либо цитоплазматическими, определяемыми как воздействие молекул цитоплазмы на ядро с целью поддержания собственного синтеза, либо ядерными, основанными на модификации хроматина, например метилировании ДНК.

16.3. Программы развития индивидуальных клеток: анализ генеалогии клеток на примере нематод [26]

Клетки, обладая памятью подобно компьютерам, способны реализовать сложные программы развития; в результате реализации таких программ из множества клеток, каждая из которых действует по своей собственной программе, контролируемой в процессе развития, возникает сложное тело взрослого животного. Некоторые типы поведения клеток в процессе развития достаточно автономны, а другие определяются сигналами, идущими от окружающих клеток. Таким образом, клетки эмбриона можно уподобить сети компьютеров, действующих параллельно и обменивающихся информацией. Каждая клетка обладает одинаковым геномом, т.е. содержит одну и ту же программу, но эта программа может существовать во множестве вариантов, направляющих развитие по разным путям в зависимости от сигналов, воспринимаемых клеткой из окружающей среды.

Клеточная память играет чрезвычайно важную роль, и именно по этой причине поведение клеток в определенное время зависит от того выбора, что был сделан ее предками в предыдущих циклах деления. Таким образом, для полного понимания всей программы развития необходимо знать, как осуществлялись клеточные деления, т.е. необходимо знать генеалогию индивидуальных клеток эмбриона. В этом и состоит сущность **генеалогического анализа,** проведение которого, особенно на примере крупных и сложно организованных животных (например, позвоночных), представляет собой довольно трудную задачу. Если на ранних стадиях развития специфически пометить отдельные клетки, то на более поздних стадиях можно идентифицировать сами клетки или их потомки. Один из способов мечения заключается в микроинъекции специфических молекул, за которыми легко следить (например, флуоресцирующие красители или фермент пероксидазу хрена; см. разд.. 19.1.5), в клетки ранних эмбрионов (рис. 16-29). Кроме того, отдельные клетки эмбриона можно пометить генетически, например, создавая условия для их инфекции специально выбранным ретро-вирусом (см. разд. 17.5.4) или подвергая эмбрионы действию ионизирующего излучения, вызывающего случайные соматические мутации (см. разд. 16.5.13). Эти методы генеалогического анализа весьма трудоемки и каждый из экспериментов дает лишь небольшую информацию

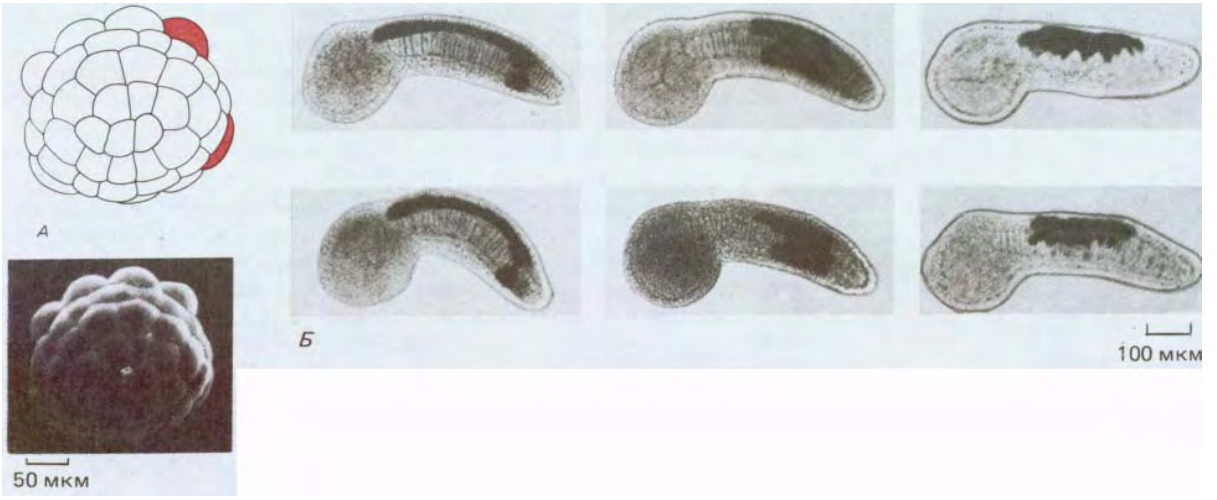


Рис. 16-29. Прослеживание клеточной родословной у асцидии *Halocynthia roretzi. А.* Эмбрион на стадии 64 клеток. На этой стадии в один из бластомеров инъецируют в качестве метки пероксидазу хрена. В результате становится возможным идентифицировать потомки этого бластомера, подобно тому, как это сделано на рисунке под фотографией. *Б.* Личинки, развивающиеся из 6 таких эмбрионов, были подвергнуты специальной обработке для выявления фермента (показано черным цветом) в клетках - потомках инъецированных бластомеров. У двух личинок, изображенных слева *(вверху* и *внизу),* предковым бластомером, в который вводилась метка, был верхний из показанных красным цветом на рис. *А, у* двух личинок, изображенных посередине, нижний из этих бластомеров; для двух личинок, изображенных справа, предковый бластомер на рис. *А* не виден. У данного вида в процессе развития из одних и тех же бластомеров всегда возникают определенные части зародыша (см. фотографии). (H. Nishida, Dev. Biol., **121,** 526-541, 1987.)

о потомках эмбриональных клеток. Ситуация осложняется еще и тем, что у позвоночных и многих других организмов наследственность подвержена случайной изменчивости даже у генетически идентичных животных.

Однако у представителей некоторых низших типов, в том числе у моллюсков, кольчатых и круглых червей, деление и перемещение клеток в высшей степени упорядочены и у всех особей осуществляются одинаково. Столь полная воспроизводимость результатов была использована при изучении крошечной прозрачной нематоды *Caenorhabditis elegans.* Это животное характеризуется простым и практически неизменным строением, и его развитие можно проследить клетка за клеткой на всем пути от яйца до взрослого организма. Здесь можно вычертить полную генеалогию каждой клетки. На этом фоне удается очень точно отметить эффекты мутаций и иных экспериментальных воздействий. Такой метод позволяет связать определенные гены с конкретными этапами в реализации программ, контролирующих развитие клеток. Однако мы увидим, что изучение внутренней логики программы отнюдь не простая задача, даже в таких благоприятных условиях; ее сложность во многом обусловлена наличием межклеточных взаимодействий. Мы закончим этот раздел примером, иллюстрирующим применение экспериментов в культуре для непосредственного анализа небольших фрагментов программы, контролирующей развитие отдельных клеток млекопитающих.

16.3.1. В анатомическом и генетическом отношениях нематода Caenorhabditis elegans устроена очень просто [27]

Длина взрослой особи *C. elegans* около 1 мм. Тело червя состоит приблизительно из 1000 соматических клеток и 1000-2000 половых клеток (рис. 16-30). С помощью электронной микроскопии серийных срезов удалось полностью, клетка за клеткой, реконструировать анатомию животного. Общий план строения этого примитивного червя в основных чертах такой же, как и у большинства высших животных. Удлиненное тело обладает билатеральной симметрией и состоит из обычных тканей (нервы, мышцы, кишечник, кожа), организованных обычным способом (рот и мозг на переднем конце тела, анальное отверстие на заднем). Наружная стенка тела состоит из двух слоев - защитной гиподермы («кожи») и подстилающего ее мышечного слоя. Простая трубка, образованная клетками энтодермы, формирует кишечник. Между кишечником и стенкой тела расположена вторая трубка (гонада), построенная из соматических клеток и содержащая половые клетки. Взрослые особи *C. elegans* представлены двумя формами - гер-



Рис. 16-30. Взрослая гермафродитная особь *Caenorhabditis elegans* (вид сбоку). (J. E. Sulston, H. R. Horvitz, Dev. Biol., **56,** 110-156, 1977.)

мафродитами и самцами. Для простоты гермафродитов можно рассматривать как самок, образующих ограниченное количество спермы: самка может воспроизводиться либо путем самооплодотворения своей собственной спермой, либо путем перекрестного оплодотворения гермафродита самцом при спаривании. При самооплодотворении в основном возникают гомозиготные потомки, что превращает *C. elegans* в исключительно удачный объект для проведения генетических исследований.

Сравнительной простоте анатомии *C. elegans* соответствует такая же простота генетического аппарата. В 6 парах гомологичных хромосом содержится, по-видимому, всего лишь около 3000 жизненно важных генов. Гаплоидный геном содержит 80 x 10^6 пар нуклеотидов, что примерно в 17 раз больше, чем у *E. coli* и в 38 раз меньше, чем у человека. В настоящее время с помощью мутационного анализа идентифицировано примерно 800 генов. Среди них гены, влияющие на такие признаки, как форма и поведение червей, гены, кодирующие такие известные белки, как миозин, и гены, контролирующие характер и направление развития. Кроме того, получена библиотека генома в виде большого набора перекрывающихся фрагментов ДНК (см. разд. 5.6.3).

16.3.2. Для развития нематод характерно удивительное постоянство [28]

Развитие *C. elegans* начинается с одной клетки - оплодотворенного яйца, которое последовательно делится; на стадии 558 клеток под яйцевой оболочкой формируется маленький червячок. После вылупления клеточные деления продолжаются, что приводит к дальнейшему росту и половому созреванию червя, который проходит 4 последовательные личиночные стадии, разделенные линьками. В результате последней линьки образуется взрослая особь - червь-гермафродит, начинающий откладывать собственные яйца. Полный цикл развития от яйца до яйца занимает около 3 суток.

Тело червя прозрачно, поэтому здесь можно прижизненно наблюдать деление, миграцию и дифференцировку клеток (рис. 16-31), а также описать генеалогические отношения и поведение всех клеток, начиная со стадии одноклеточного яйца и кончая взрослым животным. Эти исследования показали, что соматические структуры животного образуются по одной неизменной генеалогической схеме. Каждое из множества клеточных делений происходит в строго определенное время. Это означает, что каждая клетка-предшественница и все ее потомки делятся у всех особей одинаково (за несколькими исключениями). Вот почему,

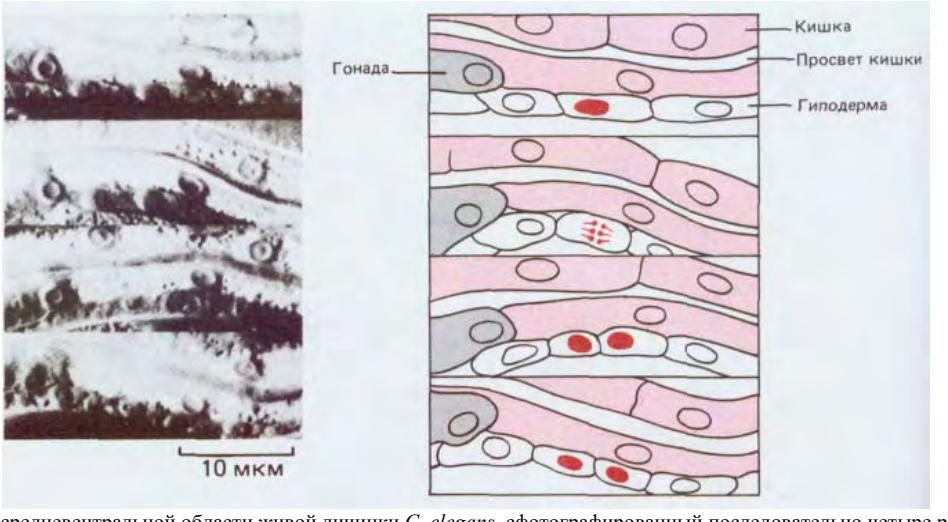


Рис. 16-31. Участок средневентральной области живой личинки *C. elegans,* сфотографированный последовательно четыре раза с интервалом в несколько минут. Видна делящаяся клетка гиподермы. (С любезного разрешения John Sulston, Judith Kimble.)

зная положение данной клетки на родословном древе, можно предсказать ее судьбу (рис. 16-32). В отличие от этого, деление клеток зародышевой линии не запрограммировано столь жестко: после вылупления червя из яйца две клетки-предшественницы первичных половых клеток претерпевают несколько делений, давая начало большому числу потомков, судьба которых определяется положением, занимаемым ими в гонаде.

Полное описание генеалогии *C. elegans* приближает нас к ответу на фундаментальный вопрос. Нематоды, как и большинство животных, состоят из относительно большого числа клеток, которые можно отнести всего лишь к нескольким типам. Зная, что клетки имеют разное происхождение, легко поддаться соблазну и объяснять различия между ними происхождением от разных клонов; иными словами, все клетки данного типа могут быть потомками одной клетки - «основательницы» и предназначаться для развития по определенному пути. Однако генеалогический анализ показывает, что хотя на ранних стадиях развития отдельные клетки детерминируются в качестве предшественников определенного типа клеток, тем не менее это правило в общем не соблюдается ни для нематод, ни для других животных. Таким образом, у *C. elegans* (кроме клеток кишечника и половых клеток) клетки каждого из дифференцированных типов, например клетки гиподермы, нервные, мышечные и клетки гонад, происходят не от одной, а от *нескольких* клеток-«основательниц», которые возникли в независимых ветвях генеалогического древа (см. рис. 16-32). Следовательно, клетки, обладающие сходными признаками, не обязательно должны быть близкородственными. Напротив (хотя и редко), близкородственными могут оказаться клетки, различающиеся по множеству признаков; так, у *C, elegans* некоторые нейроны являются сестринскими по отношению к мышечным клеткам.

Следовательно, наша задача состоит в том, чтобы понять внутренние правила, действующие в каждой из ветвей генеалогического древа, в соответствии с которыми возникает серия клеточных типов, представленных определенным числом клеток.

16.3.3. Гены, контролирующие развитие, детализируют программу, управляющую клеточной генеалогией нематод [29]

В процессе развития клетка, подобно компьютеру, совершает выбор различных возможностей: делиться или не делиться, превратиться

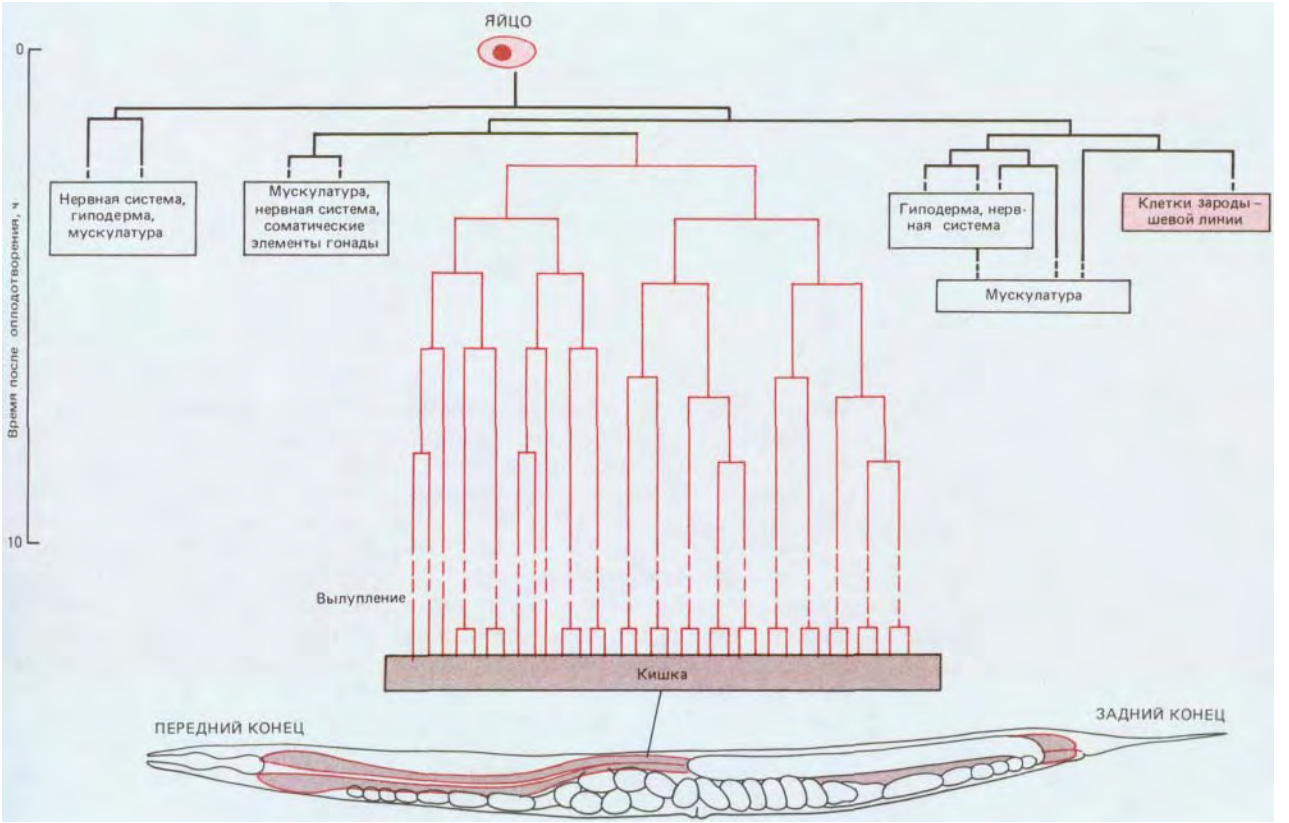


Рис. 16-32. Родословная клеток, формирующих кишечник *C. elegans*. Яйцо *(вверху)* изображено в том же масштабе, что и взрослая особь *(внизу)*. Следует отметить, что клетки кишечника образуют только один клон (как и клетки зародышевой линии), тогда как в большинстве других тканей клетки могут давать начало нескольким клонам.

в нейрон или в мышечную клетку, стать предшественницей той или этой ветви генеалогического древа. Чтобы понять механизм такого выбора необходимо идентифицировать соответствующие гены. Мутации в этих генах обусловливают нарушение развития, но это не единственный вид мутаций, приводящих к подобным последствиям. Так, некоторые мутации жизненно важных генов могут «укоротить» родословное древо, вызвав преждевременную гибель эмбриона. Мутации в генах, определяющих синтез специализированных белков, приводят к тому, что при внешне нормальном строении тела некоторые типы дифференцированных клеток будут функционировать аномально. В отличие от всех вышеперечисленных случаев мутации генов, затрагивающих выбор программ развития, приводят к нарушению общего плана строения тела: в результате нормальные дифференцированные клетки будут располагаться в организме аномально. Нарушение генеалогического древа может выражаться и в появлении аномального количества определенных клеток. Все перечисленные типы мутаций позволяют идентифицировать **гены, контролирующие развитие** (рис. 16-33).

Мутации некоторых контролирующих генов приводят к замене одного типа клеток другим на последних этапах реализации программы развития. В данных случаях происходит изменение выбора, сделанного на более ранних стадиях, так что одна ветвь древа полностью замещается другой. Как показано на рис. 16-34, определенный тип развития может воспроизводиться с высокой частотой на нескольких независимых ветвях родословного древа. Такой феномен предполагает существование некой стандартной схемы, реализуемой в различных условиях. В целом возникает ощущение, что каждая из ветвей генеалогического древа контролируется сложной комбинацией генов,

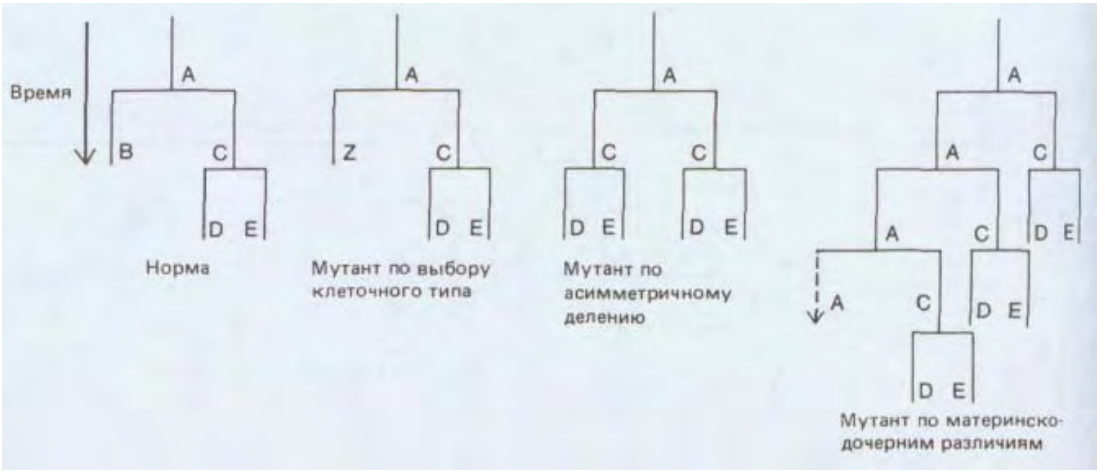


Рис. 16-33. Простой фрагмент родословной клеток и некоторые типы вариаций, которые могут происходить вследствие мутаций генов, контролирующих развитие. Анализ мутантных фенотипов позволяет определить в чем состояла нормальная функция мутировавших генов. Буквенные обозначения указывают внутреннее состояние клетки.

многие из которых задействованы и в контроле других ветвей.

Системным программистам хорошо известно, что даже небольшие изменения программы могут существенно повлиять на результаты ее реализации. Точно также мутация одного контролирующего гена приводит к грубому искажению родословного древа. Это положение хорошо иллюстрируется так называемыми *гетерохронными мутациями,* в результате которых некоторые наборы клеток ведут себя согласно правилам, действующим на ином этапе нормального развития. Например, дочерняя клетка может вести себя подобно материнской или еще более ранним предшественницам, а ее потомки воспроизводят свойственный им фенотип и т. д. Таким образом, фрагмент генеалогического древа воспроизводится несколько раз и развитие всего организма нарушается. Для объяснения этого феномена на рис. 16-35 представлены эффекты серии мутаций гена *lin-14.* Вместо того чтобы следовать нормальной схеме клеточной дифференцировки, характеризующей последовательную смену 1-го, 2-го, 3-го и 4-го личиночных возрастов с последующим торможением делений, многие клетки мутантов по *lin-14* воспроизводят схему, характерную для 1-го личиночного возраста, проходя по 5-6 циклов линьки и продолжая производить кутикулу незрелого типа. Другие мутации этого гена имеют обратный эффект, вынуждая клетки достигать зрелого состояния преждевременно, что сопровождается утратой промежуточных стадий. В результате животное достигает дефинитивной стадии, обладая аномально малым количеством клеток. Такое преждевременное развитие реализуется у мутантов, характеризуемых дефицитом нормальной активности *lin-14;* задержки развития наблюдаются у мутантов с аномально высоким уровнем активности данного гена. Таким образом, эффект продукта гена *lin-14* состоит как бы в поддержании клеток в «молодом» состоянии и, по всей вероятности, нормальное развитие подразумевает постепенное ограничение синтеза этого продукта по мере взросления животных.

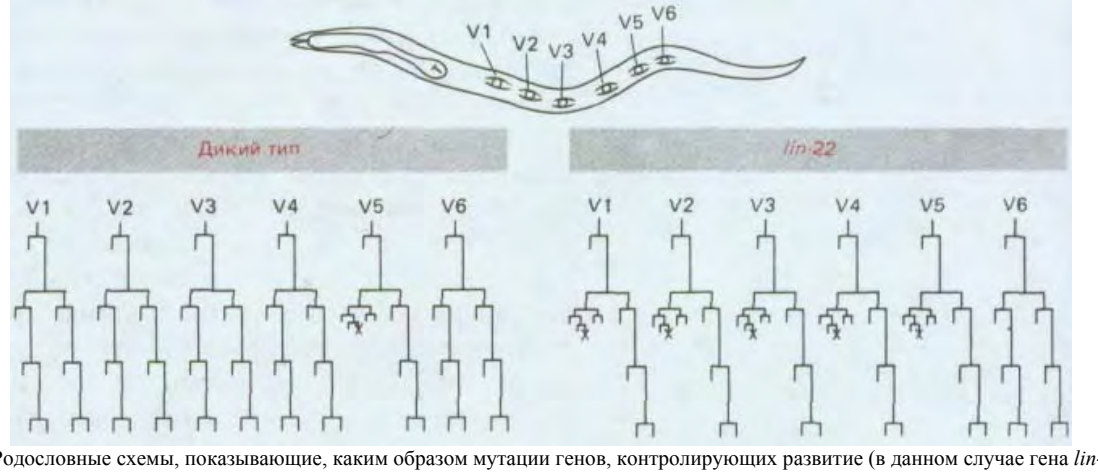


Рис. 16-34. Родословные схемы, показывающие, каким образом мутации генов, контролирующих развитие (в данном случае гена *lin-22),* могут приводить к одинаковым заменам одного варианта родословной на другой в нескольких различных ветвях родословного древа. Показаны линии потомков для каждой из 6 клеток-предшественниц гиподермы личинки *C. elegans;* расположение этих клеток указано вверху на рисунке, изображающем молодую личинку. Крестиками отмечены случаи запрограммированной гибели клеток, что представляет собой довольно обычное явление при нормальном развитии *C. elegans* и других видов. (Y. R. Horvitz et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48,** 453 463, 1983.)

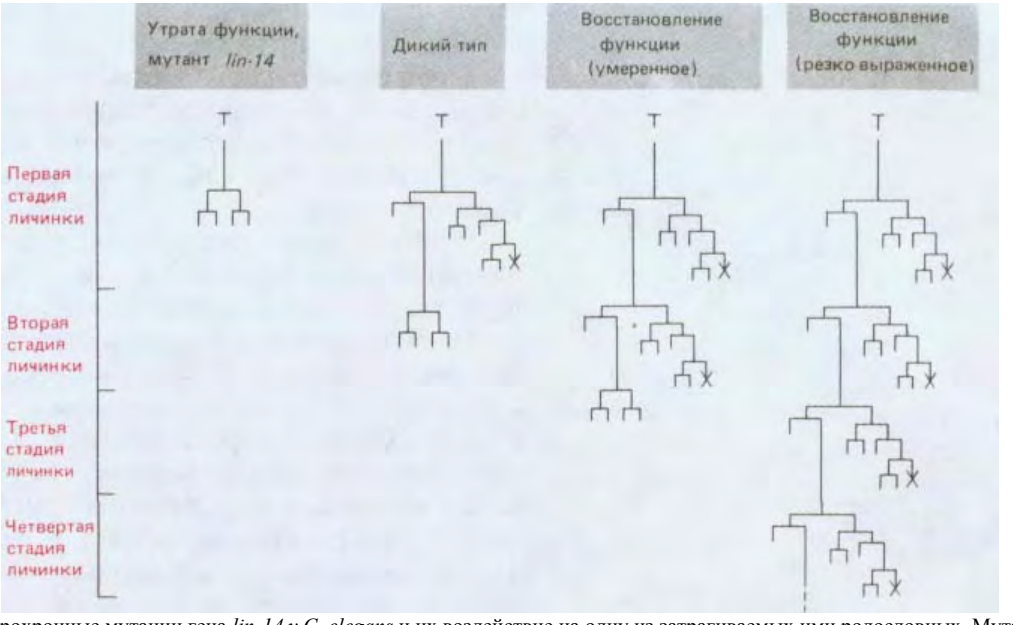


Рис. 16-35. Гетерохронные мутации гена *lin-14 у C. elegans* и их воздействие на одну из затрагиваемых ими родословных. Мутация с потерей функции (рецессивная) этого гена приводит к тому, что клетки начинают делиться и дифференцироваться так же, как у личинок на поздних стадиях развития; мутации с восстановлением функции (доминантные) этого гена обладают обратным эффектом. Крестиками отмечены случаи запрограммированной гибели клеток. (V. Ambros, H. R. Horvitz, Science, **226,** 409-416, 1984.)

16.3.4. Программа дифференцировки согласована с программой клеточных делений [30]

Изучая гетерохронные мутации, исследователи столкнулись с еще одной сложной проблемой. Дело в том, что в процессе развития под контролем генома происходит уточнение программы деления клеток, а также программы клеточной дифференцировки и оба эти проявления клеточного поведения должны быть синхронизированы. У гетерохронных мутантов нарушено и деление, и дифференцировка. Это наводит на мысль о регуляции обоих процессов одним механизмом, поврежденным вследствие мутации.

Можно предположить, что роль такого механизма играет клеточный цикл. Однако факты не подтвержают это предположение: дифференцировка ранних эмбриональных клеток следует установленной схеме и при искусственном ограничении клеточных делений под влиянием химических веществ, ингибирующих цитокинез или синтез ДНК. Клеточные деления не следует уподоблять периоду колебаний маятника биохимических часов, определяющих темп развития; скорее ситуация обратная и именно биохимические часы контролируют темп клеточных делений и продолжительность клеточного цикла у множества видов животных. Изменение химического состояния клетки одновременно влияет на принятие решений о делении клеток, а также на время и направление дифференцировки. Молекулярные механизмы контроля клеточных делений в эмбриогенезе практически не изучены и представляют собой одну из центральных проблем современной биологии развития. Генеалогические мутанты нематод могут сыграть ключевую роль в решении этой проблемы.

16.3.5. Автономное поведение клеток и межклеточные взаимодействия взаимосвязаны и определяют характер развития [31]

Процессы развития плохо поддаются объяснению в отсутствие данных о степени автономности поведения отдельных клеток и вкладе межклеточных взаимодействий. Наблюдая последствия удаления клеток у нематод, можно оценить важность обмена сигналами между клетками. Для этого лазерный луч фокусируют в пятнышко диаметром 0,5 мкм

(средний диаметр ядра C. *elegans* составляет около 2 мкм) и повторяющимися импульсами разрушают ядро какой-либо клетки. Клетка с разрушенным ядром погибает, а окружающие ее соседние клетки продолжают развиваться. Напрашивается вывод: большая часть клеток нематод в течение длительного периода своего жизненного цикла следует собственным программам развития и не зависит от сигналов соседних клеток.

И тем не менее межклеточные сигналы играют в развитии *C. elegans* и других животных очень важную роль. Хороший пример тому представляет развитие влагалища, или вульвы, - отверстия в гиподерме (коже) у гермафродитов для откладки яиц. Вульва располагается на брюшной стороне тела и сформирована из 22 клеток, возникших из трех клеток-предшественниц гиподермы по особой родословной. Одна из клеток гонады, так называемая *якорная клетка,* прикрепляет, или «заякоривает», расположенную над ней гонаду (матку) к развивающейся вульве для формирования пути выхода яиц из матки в окружающую среду. Результаты опытов с разрушением этой клетки лазерным лучом показывают, что именно она индуцирует развитие вульвы из трех ближайших клеток гиподермы. После уничтожения якорной клетки из этих клеток вместо вульвы возникает участок обычной гиподермы. Таким образом, якорная клетка индуцирует дифференцировку вульвы у *C. elegans* подобно тому, как вегетативные бластомеры индуцируют дифференцировку мезодермы у ранних эмбрионов *Xenopus.* Для этой индукции достаточно единственной якорной клетки: нормальное развитие вульвы происходит даже при уничтожении всех клеток гонады, за исключением якорной клетки (см. рис. 16-36, *А).*

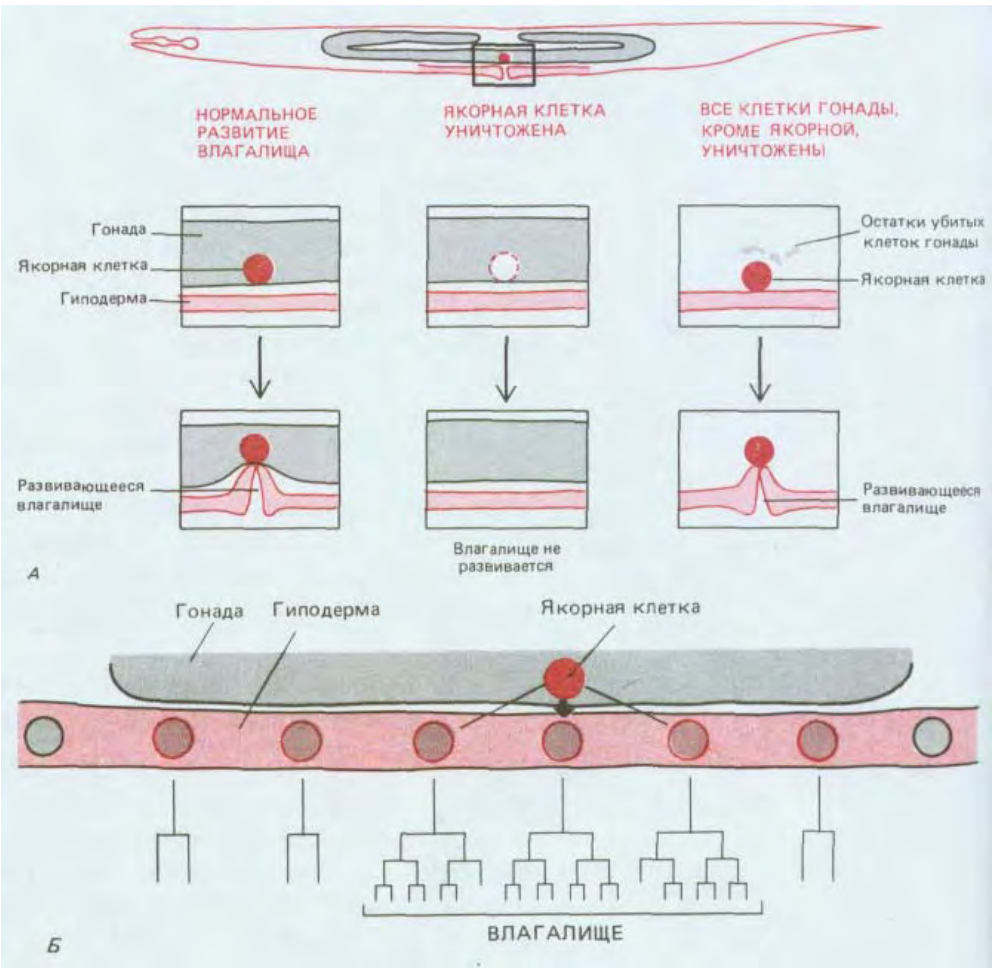


Рис. 16-36. *А.* Схема экспериментов, в которых было показано, что для развития вульвы необходимо индуктивное влияние якорной клетки. *Б.* Увеличенное изображение шести клеток группы эквивалентности вульвы (показаны в цвете) в вентральной гиподерме и нормальная родословная их потомков, приведенная внизу. Все эти 6 клеток (и только они) способны реагировать на индуцирующее воздействие вульвы, но в норме на это воздействие реагируют только 3 из них.

Индуцирующий сигнал якорной клетки обеспечивает пространственно согласованное с расположением гонады развитие вульвы, но эта система обладает определенным запасом гибкости. Три клетки гиподермы, в норме участвующие в формировании вульвы, соседствуют с тремя другими клетками, которые также способны выполнить эту задачу, если они попадают под влияние якорной клетки. При уничтожении лазерным лучом клеток-предшественниц вульвы эти соседние клетки сворачивают с пути своего нормального развития, вероятно, в связи с изменением местоположения, и вместо гиподермы формируют вульву. Другие клетки не способны реагировать на индуцирующий сигнал и не могут участвовать в формировании вульвы ни при каких обстоятельствах. Мы можем ввести понятие **группы эквивалентности,** примером которой на модели *C. elegans* (рис. 16-36, *Б)* могут служить три нормальные клетки-предшественницы вульвы и три соседние клетки, которые индуцируются сходным образом, поскольку эти клетки функционально взаимозаменяемы. Все участники группы эквивалентности отличаются от окружающих клеток тем, что они характеризуются иной предысторией развития. Именно это обстоятельство обеспечивает таким клеткам уникальную возможность реагировать на индуцирующий сигнал. Клетки этой группы приобретают различия под воздействием индуцирующего сигнала. Здесь мы имеем дело с особым примером того, как клеточная программа развития зависит от взаимодействия клеточной памяти (автономного свойства клеток) и сигналов, поступающих от других клеток (внешний контроль).

16.3.6. Эксперименты позволяют уточнить роль генов, контролирующих развитие [32]

Эксперименты, описанные в предыдущем разделе, помогают интерпретировать данные генетических исследований. Мутации любого из 5 различных генов могут приводить к образованию фенотипа *multivulva,* где все 6 клеток группы эквивалентности вступают на путь развития вульвы и вместо 22 клеток вульвы возникают 48 клеток и, как результат, несколько вульв. У этих мутантов все 6 клеток ведут себя, как если бы они застыли в состоянии активации якорной клеткой и разрушение последней не изменяет ход развития вульвы. В данном случае, вероятно, мутации затрагивают гены, которые в норме действуют в клетках группы эквивалентности вульвы, определяя их ответ на сигнал якорной клетки. Мутации другого небольшого набора генов приводят к образованию иного, противоположного фенотипа *(vulvaless).* И здесь, по всей вероятности, меняется способность клеток группы эквивалентности реагировать на индукцию.

Мутации гена *lin-12* (вызывающего образование нескольких вульв) оказывают плейотропное действие: они могут обусловливать либо отсутствие, либо удвоение якорной клетки, меняя таким образом распределение индуцирующего сигнала и правила, согласно которым клетки группы эквивалентности вульвы реагируют на сигнал. Мутации гена *lin-12* воздействуют и на иные группы эквивалентности, что наводит на мысль о некоем общем значении гена *lin-12* в межклеточных взаимодействиях, посредством которых клетки какой-либо одной группы эквивалентности направляются по различным путям развития. Была определена последовательность нуклеотидов гена *lin-12* и оказалось, что белок, кодируемый этим геном обладает гомологией с семейством белков, которые, как полагают, принимают участие в межклеточном общении у позвоночных и насекомых (см. разд. 12.3.12). К этому семейству относятся фактор роста эпидермиса у млекопитающих (ФРЭ), некоторые поверхностные рецепторы клеток млеко-

питающих, такие, как рецептор липопротеинов низкой плотности (ЛНП) (см. разд. 6.5.8), и продукт гена *Notch,* содействующий выбору пути развития эктодермы у дрозофилы: дифференцировка нервной ткани или дифференцировка эпидермиса. Такие находки дают основание полагать, что молекулярные уроки, усвоенные при изучении развития нематод, могут найти применение при изучении развития многих других видов.

16.3.7. Программу развития индивидуальных клеток млекопитающих можно анализировать в клеточной культуре: дифференцировка глиальных элементов зрительного нерва крысы [33]

Самый прямой способ отличить автономное поведение клетки от ее поведения под контролем межклеточных взаимодействий состоит в изучении того, как перемещение клеток в другой участок тела или их выделение с целью искусственного изменения среды обитания сказывается на их поведении. Эти вопросы трудно поддаются изучению у *C. elegans,* поскольку разрушение клеток лазерным лучом не позволяет решить эту задачу. Отсутствие информации о межклеточных взаимодействиях в процессе развития этой нематоды осложняет изучение базовых программ клеточного контроля, даже несмотря на хорошо изученную родословную всех клеток и характеристику многих мутантов по генам, контролирующим развитие. Среду, в которой находится клетка, проще изменять в культуре. Здесь появляется возможность непосредственного анализа как программ, контролирующих поведение клетки, так и межклеточных взаимодействий, управляющих клеточными делениями и дифференцировкой в процессе развития некоторых частей тела позвоночных.

Зрительный нерв является одним из простейших элементов центральной нервной системы млекопитающих и широко известен, как модельная система для таких исследований. Он содержит длинные аксоны нервных клеток сетчатки, направляющихся от глаза к мозгу. Структурную и функциональную опору аксонов в нервах обеспечивают три типа глиальных клеток (см. разд. 19.1.6): олигодендроциты и два типа астроцитов, известных просто как астроциты типов 1 и 2 (рис. 16-37). Все три типа глиальных клеток различают с помощью антител; с помощью такого же метода различают глиальные клетки и клетки-предшественницы. При исследовании клеток, выделенных из зрительного нерва на различных стадиях развития и помещенных в культуру, было показано, что три типа глиальных клеток (которые в норме делятся редко, если вообще делятся) возникают в различное время и происходят из двух ветвей генеалогического древа. *Астроциты типа 1* возникают до рождения из клеток-предшественниц одного типа, а *олигодендроциты* и *астроциты типа 2* образуются после рождения из другого типа клеток-предшественниц, именуемых *«клетки-предшественницы 02А».*



Рис. 16-37. Зрительный нерв крысы содержит аксоны нейронов сетчатки (указана только одна такая клетка) и 3 типа глиальных клеток. *Астроциты типа 1* обеспечивают структурную опору нерва, выполняя роль, аналогичную роли клеток соединительной ткани в конечности. *Олигодендроциты* и *астроциты типа* 2 вместе участвуют в образовании оболочки вокруг каждого аксона: олигодендроциты обворачиваются вокруг аксона, формируя изолирующий миелиновый слой (см. разд. 19.2.11), а астроциты типа 2 выпускают тонкие отростки, контактирующие с аксонами в местах, где миелиновая оболочка прерывается, образуя перехват Ранвье. Нервный импульс по мере прохождения по аксону распространяется от одного перехвата Ранвье к другому (см. разд. 19.2.4).

Олигодендроциты в норме возникают в момент рождения, астроциты типа 2 через неделю после рождения.

После выяснения родословной этих клеток и времени их появления усилия исследователей были сконцентрированы на вопросе о том, какими правилами руководствуются клетки в своем поведении. Например, что вынуждает дифференцироваться клетки-предшественницы 02А и почему, если они дифференцируются в одно время, то становятся олигодендроцитами, а если в другое, то астроцитами типа 2? В какой степени эти события управляются неким собственным автономным часовым механизмом клетки и в какой степени дифференцировка зависит от поступления в определенное время внешних сигналов?

Если из эмбрионального зрительного нерва выделить клетки-предшественницы 02А и культивировать в отсутствие астроцитов типа 1, которые в норме являются соседями клеток 02А, то клетки 02А прекращают делиться и досрочно начинают дифференцироваться; при помещении в эту же культуру астроцитов типа 1 клетки 02А прекращают деление, и их дифференцировка задерживается до срока, соответствующего in vivo дню рождения. Оказалось, что действие астроцитов типа 1 связано с секретируемым ими фактором роста. Полагают, что этот фактор роста соответствует *тромбоцитарному фактору роста* (ТФР, или PDGF-platelet-derived growth factor; см. разд. 13.3.4). Присутствие такого фактора приводит к предотвращению преждевременной дифференцировки клеток-предшественниц 02А; однако повышение концентрации этого фактора не затягивает дифференцировку по сравнению с нормой. Вероятно, клетки-предшественниц 02А эмбрионального зрительного нерва еще раньше принимают определенную программу развития, согласно которой по истечении определенного времени или через определенное число клеточных делений клетки теряют чувствительность к фактору роста и дифференцируются независимо от его наличия. Отдельные клетки-предшественницы 02А принимают такую программу в разное время и первые из них в норме начинают дифференцироваться в момент рождения.

Чем же определяется конкретное направление дифференцировки клетки в олигодендроцит или в астроцит типа 2? Клетки 02А в культуре, развиваясь в условиях бессывороточной среды, дифференцируются только в олигодендроциты: для них это *конститутивный* путь развития или в терминах информатики *развитие «по умолчанию».* В противоположность этому, дифференцировка астроцитов типа 2 выглядит, как *индуцируемый путь развития:* клетки начинают такую дифференцировку под действием специфического белка, который можно выделить из зрительного нерва крысы. В значительных количествах этот белок синтезируется со второй недели развития, т.е. именно тогда, когда начинается дифференцировка астроцитов типа 2. Оказалось, что этот белок идентичен фактору роста нервов (ФРН, или CNTF-ciliary neurotrophic factor). Это позволяет предположить, что время синтеза ФРН определяет время дифференцировки астроцитов типа 2 в развивающемся нерве. До сих пор неясно, какие именно клетки синтезируют ФРН in vivo и какие факторы контролируют точное время начала его синтеза, однако известно, что в культуре этот фактор могут синтезировать астроциты типа 1.

Данные этих исследований еще раз подтверждают предположение о том, что развитие клеток представляет собой результат взаимодействия автономных процессов и поведения, контролируемого сигналами окружающей среды. Здесь были показаны преимущества метода культуры клеток для изучения молекулярных основ этих процессов. Можно попытаться суммировать эти находки в схеме потока информации, которая, в терминах информатики, представляет собой внутреннюю

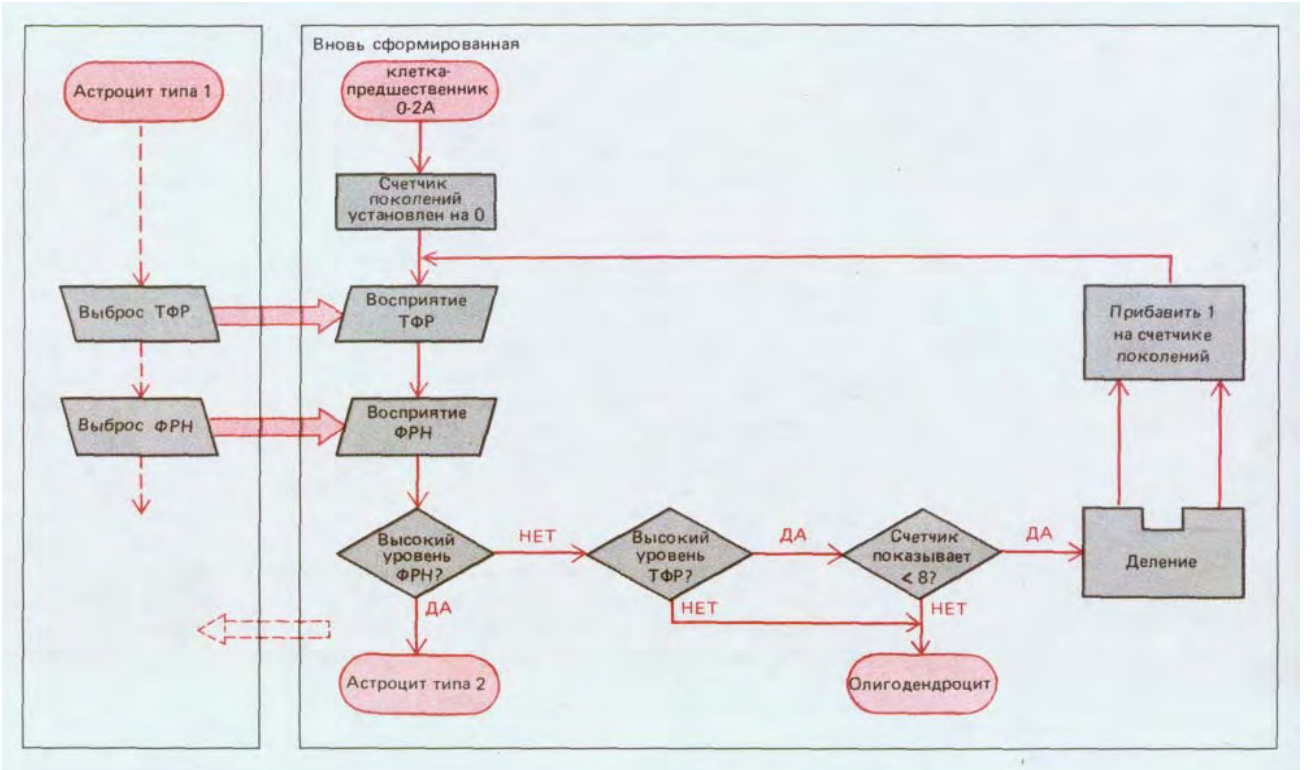


Рис. 16-38. Схема, в которой упрощенная модель программы межклеточного контроля представлена в виде программы компьютера. Вероятно, эта программа участвует в регуляции клеточных делений и дифференцировки у клеток-предшественниц олигодендроцитов и астроцитов типа 2 (02А) в развивающемся зрительном нерве млекопитающих. Широкие стрелки изображают «вход-выход» данных, т. е. внеклеточные сигналы принимаемые или испускаемые клеткой. Неполные или предполагаемые участки этой схемы указаны прерывистыми линиями; соответствующая широкая стрелка, указывающая налево, демонстрирует возможность обратной связи от клеток-предшественниц 02А, которая могла бы содействовать регулировке сигналов, поступающих от клеток-предшественниц астроцитов типа 1. Считают, что клетки-предшественницы 02А постоянно возобновляются в условиях in vivo, начиная примерно с последней недели перед рождением (не показано).

программу клеток-предшественниц 02А, т.е. набор правил, согласно которым клетки прочитывают сигналы окружающей среды и выбирают время и место дифференцировки (рис. 16-38). Такая информация о поведении отдельных клеток особенно важна, если мы действительно пытаемся разобраться в закономерностях эмбрионального развития. Мы пока не в состоянии дать ответ на фундаментальный вопрос, каким образом возникает пространственное распределение множества клеток во всем организме, но к этой проблеме мы вернемся в следующем разделе.

Заключение

Для понимания программ развития индивидуальных клеток эмбриона необходимо проследить их историю, проведя анализ клеточной родословной. Для генеалогии позвоночных характерна случайная изменчивость. Но у определенных нематод и некоторых других групп беспозвоночных схема клеточных делений в процессе развития контролируется настолько точно и настолько предсказуемо, что клетки, занимающие в теле животного определенное положение, у всех особей данного вида развиваются по одному и тому же пути. Была прослежена нормальная судьба всех клеток нематоды Caenorhabditis elegans *в течение всего периода развития и изучены последствия экспериментального воздействия на уровне индивидуальных идентифицируемых клеток. Идентифицированы многие гены, определяющие реализацию программы, контролирующей развитие клеток. Для этого были изучены изменения клеточных родословных, возникающие вследствие мутации данных генов. В общем можно отметить, что мутации генов, контролирующих развитие, координированно влияют на дифференцировку и деление клеток. Эти наблюдения позволяют предположить, что контроль указанных клеточных процессов обеспечивается неким общим базовым ме-*

ханизмом. При разрушении клеток лазерным лучом было выявлено, что постоянство развития C. elegans является результатом точной взаимосвязи межклеточных взаимодействий и автономных процессов, реализуемых в отдельных клетках. Например, наблюдая за процессом развития вульвы, можно установить индукционные взаимодействия, которые могут быть связаны с действием определенных генов, контролирующих развитие.

Другим методом анализа программ, контролирующих развитие индивидуальных клеток, является изучение поведения клеток в культуре. Этот подход был использован с целью выявить правила, определяющие клеточную дифференцировку и деление в процессе развития глиальных клеток зрительного нерва млекопитающих. Здесь было получено еще одно подтверждение того, что поведение клеток регулируется не только межклеточными сигналами, но и автономными программами развития отдельных клеток.

16.4. Принципы образования пространственных структур [34]

Различные органы животного возникают не из хаотического скопления клеток; пространственная организация разных типов клеток исходно предопределена. Взаимодействия, координирующие процесс **становления пространственной организации,** могут быть чрезвычайно разнообразными. В некоторых случаях, например в мозаичных яйцах, пространственная организация может быть заложена в одной клетке, и возникающее внутриклеточное распределение цитоплазматических детерминантов воспроизводится в расположении дочерних клеток эмбриона. В других случаях, например при индукции мезодермы у *Xenopus* или вульвы у нематод, определенная структура возникает как результат взаимодействия отдельных клеток. Следовательно, в формировании пространственной организации важная роль принадлежит всем видам пространственных сигналов, как внутриклеточных, так и межклеточных. Можно сказать, что эти сигналы обеспечивают клетки **позиционной информацией,** направляя их дальнейшую специализацию.

В этом разделе мы рассмотрим различные пути создания и использования позиционной информации. Здесь же мы увидим, как в процессе развития многих организмов происходит приобретение отдельными клетками точных молекулярных «адресов» или *позиционных значений.* Так, клетка раннего эмбриона может «знать» сравнительно немного, например, насколько близко она расположена по отношению к голове или к хвосту. Что же касается ее потомков, существующих в теле взрослого животного, то многие клеточные поколения спустя они могут «знать» о том, что являются костными клетками, расположенными на конце третьего сустава передней конечности. Такая специализация выстраивается постепенно за счет механизмов, основанных на клеточной памяти: ранние пространственные сигналы лишь довольно приблизительно определяют общие координаты, а последующие сигналы местного значения обеспечивают клетки дополнительными уточнениями адреса, привязанными к местным координатам.

16.4.1. Асимметрия, определяемая пространственной организацией среды, может нарастать за счет положительной обратной связи [34, 35]

Формирование пространственной организации начинается с создания асимметрии: будущая голова должна отличаться от хвоста, спина от живота. Мы уже видели, что у животных большинства видов яйцеклетки

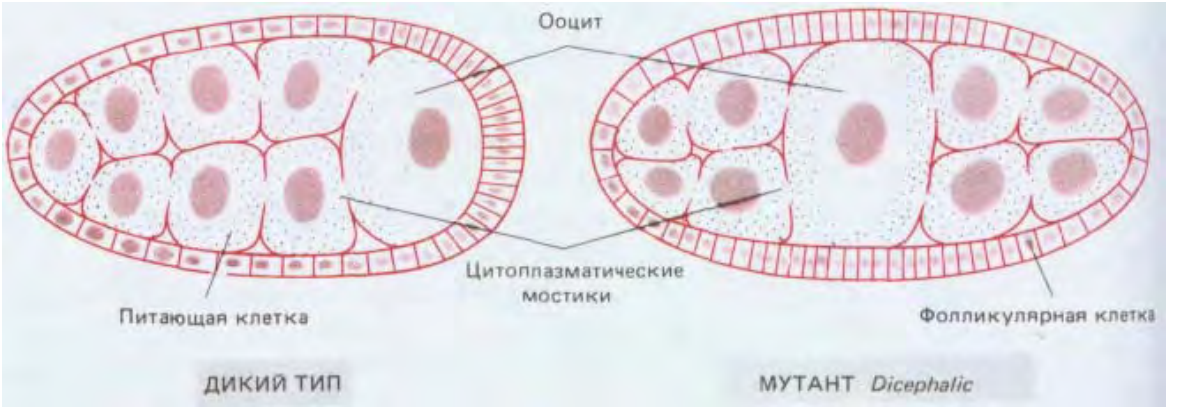


Рис. 16-39. Контроль полярности яйца дрозофилы со стороны среды, окружающей ооцит в яичнике. В норме питающие клетки поставляют запасаемые вещества на один из полюсов ооцита, который соответствует будущей голове. У мутантов *Dicephalic* ооцит расположен в центре фолликула и симметричен по отношению к питающим клеткам. Вследствие этого возникает симметричное яйцо, дающее начало эмбриону с головами на обоих концах.

асимметричны (см. разд. 16.2.2). Асимметрия зачастую возникает в яйцеклетке в процессе ее развития в яичнике. У насекомых, например, ооцит (будущая яйцеклетка) расположен в одном из концов фолликула, где одной стороной он соприкасается с питающими клетками, передающими ему запасаемые вещества по цитоплазматическим мостикам (см. разд. 15.3.4). По всей вероятности, асимметрическое поступление запасаемых веществ в ооцит создает химические различия между разными участками цитоплазмы яйца, которые соответствуют в будущем голове и хвосту эмбриона (см. рис. 16-39).

Исходно асимметрия может быть не слишком выражена: далее клетки воспользуются своими собственными внутренними механизмами для усиления слабой асимметрии и превратятся в поляризованные. Например, у яйцеклетки морской водоросли *Fucus* ризоид, или корешок, образуется только на одном конце. В норме ризоид растет вниз и от света. Таким образом, сила тяготения и освещенность вместе определяют, на какой стороне он образуется. Такая полярность обусловлена потоком ионов Ca^{2+} через клетку (см. разд. 20.5.6): полагают, что случайный свет или сила тяготения вызывают появление небольшой асимметрии в распределении белков, участвующих в транспорте ионов Ca^{2+} через плазматическую мембрану. Эта асимметрия позже усиливается за счет механизмов положительной обратной связи (см. рис. 20-66, разд. 20.5.7).

Таким же образом положительная обратная связь может действовать и на других стадиях развития многоклеточных организмов. Например, при делении поляризованной клетки дочерние клетки наследуют слабо выраженную асимметрию и, усилив ее, становятся более поляризованными. Так происходит усиление поляризации в ряду клеточных поколений. Поэтому в принципе для возникновения сложной структуры многоклеточных организмов межклеточный обмен сигналами не обязателен (рис. 16-40). Возможно, что некоторые процессы формирования пространственной организации, зависящие от автономного поведения клетки, можно объяснить действием такого механизма.

Однако, как правило, формирование пространственной организации у многоклеточных организмов зависит и от межклеточных сигналов. И здесь положительная обратная связь также выполняет важную роль усиления исходно слабых асимметрий, создавая локализованные группы клеток, свойства которых очень различны. Такие группы клеток могут в свою очередь испускать сигналы, влияющие на развитие соседних клеток. Простейшим примером может служить примитивный организм *Hydra.* Тело гидры имеет форму трубки, на одном конце которой расположена «голова», снабженная щупальцами, и на другом конце - «нога» (см. рис. 1-33). Гидра известна способностью восстанавливать целостность организма после удаления какой-либо из его частей. Множество экспериментов по ампутации «головы», выполненных на гидре, позволяют предположить, что процесс регенерации осуществля-

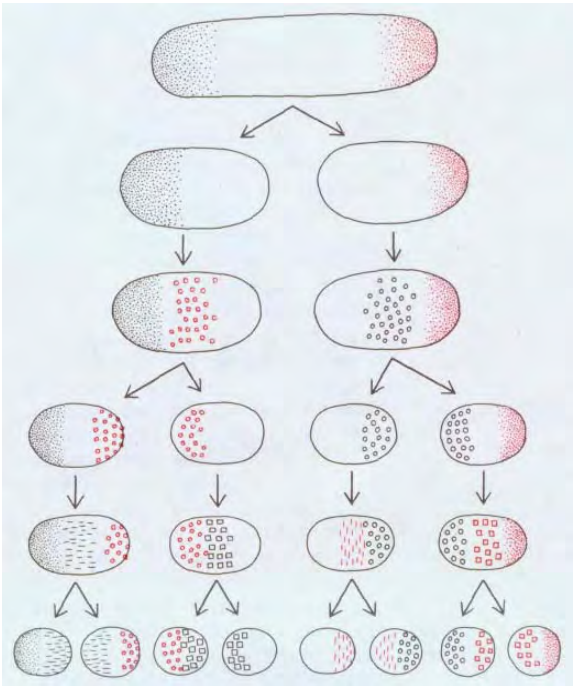


Рис. 16-40. Сложная многоклеточная структура в принципе может возникнуть в результате серии асимметричных клеточных делений без каких-либо межклеточных взаимодействий (помимо обеспечивающих соединение клеток). Внутренней полярности, наследуемой каждой из дочерних клеток в результате последовательных клеточных делений, может оказаться вполне достаточно для управления следующим циклом внутриклеточного структурообразования. Возникающие при последующих делениях дочерние клетки будут опять-таки весьма различными и внутренняя поляризация этих клеток не будет уменьшаться.

ется благодаря локальному аутокаталитическому процессу, усиливающему слабую тенденцию клеток к приобретению свойств клеток «головы». В создании данной утраченной структуры принимают участие все клетки тела; они создают ингибирующий сигнал, диффундирующий вдоль продольной оси тела, и исключающий условия формирования «головы» в иных участках организма (рис. 16-41).

16.4.2. Локализованный участок, испускающий сигнал, может часто создавать градиент морфогена [36]

Влияние головы на остальную часть тела гидры, которое характеризуется значительным радиусом действия, представляет собой весьма распространенное явление. Во многих развивающихся системах небольшие участки ткани способны приобретать какие-либо особые свойства, превращающие их в источник сигнала, который распространяется через прилежащие участки ткани, и может контролировать их поведение. В частности, сигналом могут служить диффундирующие молекулы, секретируемые сигнализирующим участком. Предположим, что по мере диффузии сигнального вещества через соседние ткани происходит его разрушение. В этом случае наивысшая концентрация сигнального вещества будет вблизи источника. С увеличением расстояния от источника количество этого вещества будет уменьшаться, вследствие чего в ткани возникнет концентрационный градиент (см. рис. 16-42). На разных расстояниях от источника сигнала клетки будут подвергаться различному действию этого вещества в зависимости от его концентрации и благодаря этому приобретут разные свойства. Гипотетическое вещество, подобное вышеупомянутому, концентрация которого прочитывается клетками и позволяет последним определить расстояние



Рис. 16-41. Механизм создания пространственной структуры вследствие автокаталитического процесса. Вещество «активатор» в результате автокаталитического процесса накапливается до весьма высокого уровня в небольшом участке, расположение которого определяется слабовыраженной исходной асимметрией системы; высокая концентрация активатора в этом участке вызывает образование ингибитора, диффундирующего на значительные расстояния и подавляющего синтез активатора в других участках. Например, при декапитации гидры оставшаяся ткань в норме регенерирует голову, но если на место ампутированной головы или на некотором расстоянии от него пересадить голову другой гидры, то новой дополнительной головы не образуется.

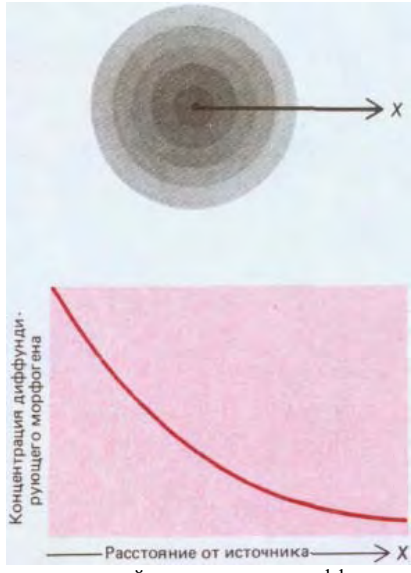


Рис. 16-42. Если какое-то вещество образуется в определенной точке и по мере диффузии из этой точки разрушается, то создается градиент концентрации этого вещества с максимумом в исходной точке. Такое вещество может служить морфогеном, локальная концентрация которого контролирует поведение клеток в соответствии с их расстоянием от источника вещества.

относительно неких ориентиров или «маяков», называется **морфогеном.** Сигнализирующий участок способен с помощью морфогена контролировать формирование пространственной организации больших полей прилежащей ткани. Градиенты морфогена представляют собой простое и эффективное средство обеспечения клеток позиционной информацией. Именно поэтому морфогены и оказались в центре нашего внимания. Здесь необходимо добавить, что клетки эмбриона способны приобретать позиционную информацию иными способами. Рис. 16-21 иллюстрирует одну из таких альтернатив: здесь в основе механизма лежат индукционные взаимодействия короткого радиуса действия.

И хотя известно множество примеров сигнализирующих участков, которые (с нашей точки зрения) через градиент морфогена могли бы оказывать воздействие на значительном расстоянии, на практике в настоящее время мы имеем дело всего лишь с несколькими случаями непосредственной химической идентификации морфогена. Как правило, известно лишь, что при изменении местоположения предполагаемого сигнализирующего участка после пересадки или иным способом, происходит изменение структуры прилежащих участков ткани. Наблюдения такого рода не позволяют выяснить, насколько изменения структуры отдельных клеток определяются прямым ответом на действие морфогена и каков вклад от взаимодействия реагирующих клеток. Вероятно, в большинстве случаев исходный градиент морфогена вызывает импульс, обеспечивающий формирование пространственной организации, широкого спектра действия, а локальные межклеточные взаимодействия участвуют в проработке деталей. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что именно таким образом возникает пространственная организация тела насекомых; это будет обсуждаться ниже. Здесь же мы рассмотрим, какой тип пространственной организации может быть обусловлен действием градиента морфогена в поле клеток, каждая из которых реагирует независимо.

16.4.3. Порог реакции клетки обусловливает строго определенный характер ее детерминации, несмотря на плавный градиент морфогена [37]

При наличии плавного градиента концентрации морфогена можно ожидать, что и свойства клеток в разных участках будут изменяться постепенно. Такие слабо выраженные различия действительно встречаются в некоторых тканях. Но наибольший интерес вызывает возникновение резких качественных различий - таких, например, как различия между хрящевыми и мышечными клетками, не имеющими переходных форм. В популяции исходно однородных клеток благодаря *порогу* реакции на плавно изменяющийся сигнал могут возникать резкие различия между клетками: в каждой из реагирующих клеток эффект небольшого приращения сигнала может быть усилен по принципу положительной обратной связи так, что клетки, подвергающиеся действию сигнала, интенсивность которого изменяется слабо, выберут различные пути развития в зависимости от того, подверглись ли они действию сигнала над- или подпороговой интенсивности. При этом для каждого из сигналов могут существовать несколько порогов интенсивности, и одна переменная может контролировать несколько выборов. Если под влиянием какого-то фактора клетка определенно вступила на путь, ведущий к одному из стабильных состояний, то она будет развиваться в выбранном направлении даже в отсутствие фактора, исходно контролировавшего выбор. На этом пути временные, зависящие от положения клетки воздействия могут вызывать эффект «запоминания» воздействий, которые претерпела клетка. Выбор клеткой опре-

деленного состояния зависит от того, какая позиционная информация сохранилась в ее клеточной *памяти.* Такую запись, воплощенную в виде определенного свойства клетки, можно назвать ее **«позиционным значением».**

16.4.4. Эмбриональные поля очень малы, поэтому основные черты строения взрослого животного должны детерминироваться достаточно рано с участием клеточной памяти [38]

Независимо от природы механизмов, обеспечивающих клетки позиционной информацией, зона их действия довольно ограниченна: они обычно эффективны лишь в пределах небольших областей *(морфогенетических полей),* длина которых составляет около 1 мм, что соответствует примерно 100 или менее клеточным диаметрам. Отсюда следует, что существует предел количества деталей, которые могут быть заложены на столь ограниченном пространстве. Именно поэтому конечное позиционное значение клетки приходится фиксировать в виде последовательных элементов позиционной информации, записываемых на разных стадиях развития. В связи с этим механизм детерминации, основанный на клеточной памяти, совершенно необходим для развития крупных, сложно устроенных животных. Различие между головой и хвостом должно закладываться еще тогда, когда длина соответствующих зачатков не превышает 1 мм. К тому времени, когда длина животного достигнет сантиметра или метра, события, в результате которых возникли эти различия, будут уже «древней историей»; и для того, чтобы данные различия сохранялись, клетки должны обладать хорошей памятью.

Таким образом, общий план строения тела определяется очень рано, а детали, все более и более тонкие, добавляются позже, по мере того, как зачатки отдельных органов достигают размеров, подходящих для записи дополнительной позиционной информации (рис. 16-43).

Как это происходит, мы рассмотрим более подробно на примере развития конечности.

16.4.5. В процессе развития конечности позиционная информация постепенно уточняется [39]

Развитие конечностей и многих других органов (например, зубов, позвонков или кожи) обеспечивается весьма ограниченным числом

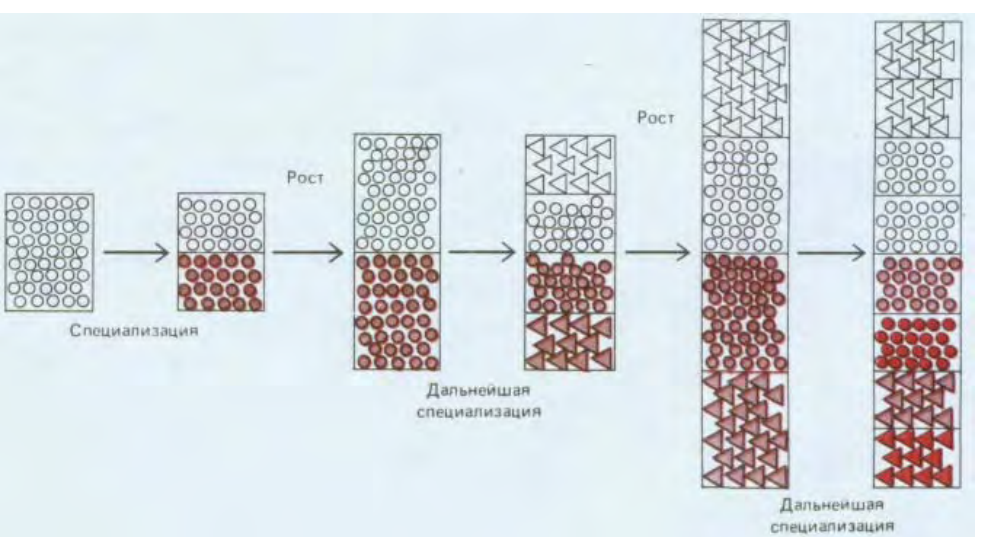


Рис. 16-43. Когда эмбрион мал, он начинает подразделяться на несколько отличных друг от друга по своим свойствам областей, соответствующих основным частям тела взрослого организма. Клетки каждого такого участка, границы которого установить довольно трудно, приобретают достаточно широкие позиционные значения (представленные здесь в виде треугольников или кружочков). По, мере роста эмбриона эти области также растут и в свою очередь в них начинают обособляться подобласти, в результате чего возникает все более детализованная картина позиционных значений.

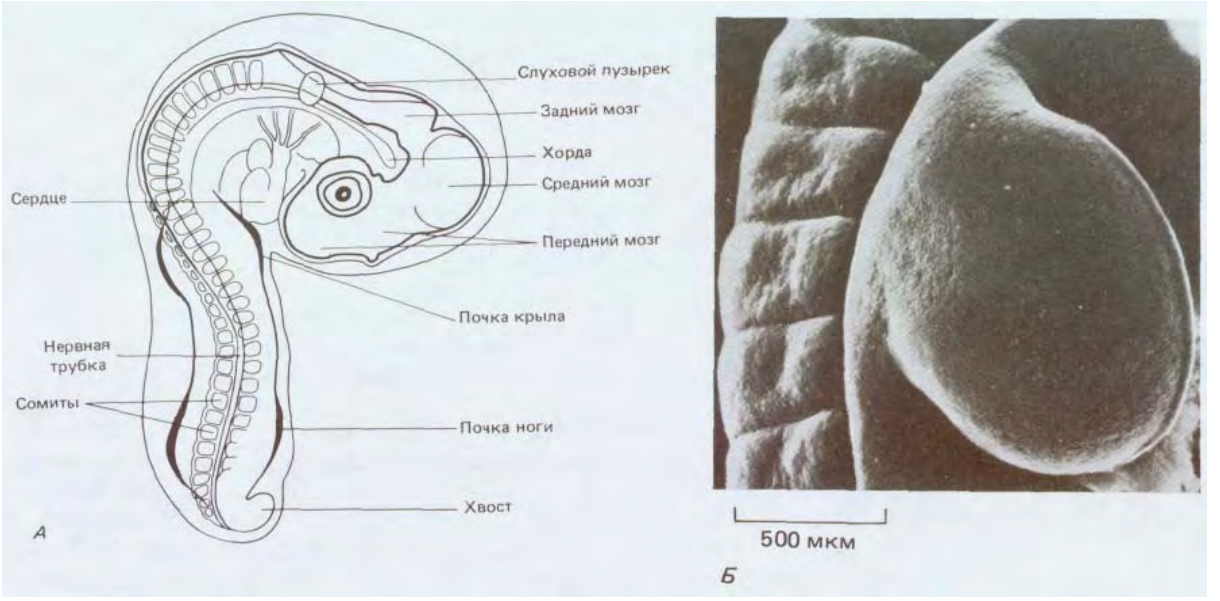


Рис. 16-44. *А*. Куриный эмбрион после трех дней инкубации. Показано расположение ранних зачатков (почек) конечностей. *Б.* Зачаток крыла и прилежащие к нему сомиты после еще одного дня развития; зачаток растет, превращаясь в язычкообразный вырост (примерно I мм в длину, 1 мм в ширину и 0,5 мм в толщину). Микрофотография дорсальной стороны крыла, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. *(А* - по W. H. Freeman, B. Bracegirdle. An Atlas of Embryology. London, Heinemann, 1967; *Б-с* любезного разрешения Paul Martin.)

различных способов дифференцировки. Конечность, например, образована клетками нескольких типов, а именно мышечными, хрящевыми, костными и клетками соединительной ткани. Но эти немногочисленные типы дифференцированных клеток организованы в пространстве весьма сложным образом. При этом различия между передней и задней конечностями не связаны с появлением дополнительных типов тканей; каждая конечность характеризуется иным способом расположения тканей в пространстве. Эксперименты по трансплантации развивающихся конечностей у цыпленка показали, что внутренние различия клеток конечностей, связанные с возникающими структурами, определяются задолго до начала дифференцировки.

Ноги и крылья у куриного эмбриона возникают почти одновременно в виде небольших вытянутых зачатков, выступающих на боковых поверхностях зародыша (рис. 16-44). Клетки двух пар зачатков конечностей внешне не различаются и в это время не дифференцированы; ни в чем не проявляется также и характер будущего скелета (рис. 14-20, разд. 14.2). На этой стадии из основания зачатка ноги можно вырезать небольшой участок недифференцированной ткани (в норме этот участок образует голень) и пересадить его на верхушку зачатка крыла. В процессе развития трансплантата формируется не голень и не соответствующая часть кончика крыла, а палец (рис. 16-45). Из этого опыта следует, во-первых, что клетки раннего зачатка ноги детерминированы в качестве клеток ноги, и во-вторых, что, будучи детерминированы в этом качестве, они еще не восприняли детализованное позиционное значение вдоль оси зачатка и могут отвечать на информационные сигналы крыла формированием структур, соответствующих не основанию конечности, а ее концу. Можно заключить, что окончательная дифференцировка клеток у позвоночных детерминируется серией последовательных сигналов позиционной информации, регистрируемых клеточной памятью в разное время. Конечное состояние клетки возникает как результат определенной последовательности решений.



Рис. 16-45. Ткань будущего бедра после пересадки на край почки крыла (у куриного эмбриона) образует пальцы. (J. W. Saunders et al., Dev. Biol., 1, 281-301, 1959.)

16.4.6. После приобретения позиционных значений сходные клетки становятся неэквивалентными [40]

Хотя зачатки передней и задней конечности образованы дифференцированными клетками одинаковых типов, совершенно очевидно, что эти клетки *неэквивалентны.* Они различаются по своему внутреннему состоянию, определяемому разными позиционными значениями. Клетки зачатков конечностей способны сохранять позиционное значение, отличающее ногу от крыла, даже после дифференцировки; и если это так, то дифференцированные клетки одного и того же типа (например, хрящевые) будут неэквивалентны. Отсюда следует, что на самом деле клетки взрослого организма значительно более разнообразны, чем это учитывает традиционная классификация клеток позвоночных (см. гл. 17, дополнение).

В распоряжении исследователей имеются данные, свидетельствующие в пользу существования таких слабых различий между дифференцированными клетками одного и того же типа, расположенными в разных участках тела позвоночных. Примеры неэквивалентности клеток кожи и нервной системы будут рассмотрены в этой главе ниже (разд. 16.6.4) и в гл. 19 (разд. 19.7.9). Один из наиболее ярких примеров получен при изучении регенерации конечностей у хвостатых амфибий (Urodeles); в этих исследованиях было показано, что неэквивалентность характерна не только для клеток передних и задних конечностей, но и для клеток, расположенных по оси конечности на разных уровнях.

Если у тритона или аксолотля удалить конечность на любом расстоянии от ее основания, то утраченная часть восстанавливается. На конце культи образуется бугорок из внешне недифференцированных клеток, покрытый эпидермисом; это - так называемая *регенерационная бластема.* В результате роста и дифференцировки бластемы из нее образуются именно те части конечности, которые должны быть расположены дистально от места ампутации. Если удалена кисть, то образуется кисть, если удалены предплечья и кисть, то - недостающие предплечье и кисть. В данном случае не имеет значения, где развивается бластема: как обычно - на проксимальном конце культи, или (в условиях эксперимента) на конце *дистального* участка ампутированной конечности (рис. 16-46). В любом случае из клеток бластемы возникают только те части, которые в норме расположены *дистально* по отношению к уровню разреза; при этом во втором случае возникает зеркальный дубликат имеющегося участка. Вероятно, клетки, расположенные вдоль оси конечности на разных уровнях, запомнили различные позиционные значения и именно этими значениями они руководствуются в выполнении программы, восстанавливающей утраченные части конечности.

16.4.7. Клетки различных областей обеспечиваются одинаковой позиционной информацией, но интерпретируют ее по-разному [36, 41]

Эксперимент, схематически представленный на рис. 16-45, позволяет приблизиться к пониманию процесса возникновения сложной позиционной детализированной информации в клетках конечности цыпленка. Из этого эксперимента следует, что у птиц сигналы, обеспечивающие клетки информацией о положении вдоль оси конечности, в крыле и ноге, принципиально не различаются. Клетки будущей ноги после трансплантации на кончик зачатка крыла точно прочитывают сообщения, указывающие на их дистальное положение, и поэтому участвуют в формировании пальцев. Но Интерпретируя эту информацию по-своему,



На обеих поверхностях образуется регенерационная бластема; из клеток бластемы в обоих случаях формируются те части конечности, которые в норме расположены дистально от места разреза

Рис. 16-46. Как показывают результаты эксперимента, схема которого приведена на этом рисунке, характер структур (в данном случае у саламандры), образующихся при регенерации бластемы, определяется тем, на каком уровне была отсечена конечность, а не тем, какие из структур в ней сохранились. Предплечье и кисть образуются как из дистального, так и из проксимального отдела исходной конечности.



Рис. 16-47. Проксимодистальная и переднезадняя оси конечности позвоночных.

они вместо пальцев передней конечности образуют пальцы задней конечности. Механизмы, основанные на явлении клеточной памяти, могут быть использованы для обеспечения позиционной информацией клеток различных участков, или полей. Поэтому в каждом из полей возникнет определенная структура, как результат сочетания информации, закодированной в различной предыстории клеток, и информации определенного межклеточного сигнала.

Эти замечания относятся не только к сигналам, кодирующим формирование пространственной организации вдоль длинной (проксимодистальной) оси конечности, но по оси от большого пальца к мизинцу (переднезадней оси). Две этих оси (рис. 16-47) соответствуют различным компонентам позиционных значений, подобно декартовой системе координат, которые в свою очередь определяются за счет различных способов детализации позиционной информации. Регуляция формирования переднезадней оси имеет особое значение, поскольку это один из немногих примеров, где удалось химически идентифицировать морфоген.

16.4.8 Ретиноевая кислота - вероятный морфоген в зачатке конечности позвоночных [42]

На заднем крае зачатка конечности куриного эмбриона расположена группа клеток, обладающих уникальными свойствами, которые выявляются при пересадке этих клеток в переднюю область зачатка другой конечности (рис. 16-48). Под влиянием трансплантата зачаток-реципиент уже в первые сутки начинает разрастаться вширь и в результате формирует конечность, строение которой очень сильно изменено. В данном случае происходит удвоение всех частей скелета и всех соответствующих этим частям мягких тканей; формируется второй набор элементов, организованный по принципу зеркальной симметрии по отношению к срединной плоскости конечности. Второй набор элементов конечности формируется не из тканей трансплантата, а практически полностью за счет клеток зачатка-реципиента. Можно предположить, что образование второго набора элементов конечности хозяина, расположенных в обратной последовательности, определяется клетками трансплантата. Область зачатка конечности, послужившая источником трансплантата, получила название **зоны поляризующей активности или поляризующей области.**

Поляризующая область присутствует и в зачатке ноги, и в зачатке крыла; необходимо отметить, что поляризующие области двух пар конечностей и даже конечностей разных видов функционально взаимозаменяемы. Независимо от происхождения трансплантата (нога или крыло, куриный это зародыш или зародыш мыши) он во всех случаях приводит к образованию в крыле цыпленка дополнительного зачатка крыла, возникающего из тканей куриного зародыша, и из этого зачатка крыла формируются дополнительные «пальцы» цыпленка. Следовательно, сигнал, испускаемый поляризующими областями разных конечностей у разных видов, один и тот же. Клетки конечности интерпретируют сигнал согласно своему геному и предыстории.

В нормальном крыле три «пальца» соответствуют трем средним пальцам пятипалой руки и могут быть обозначены цифрами 2, 3, 4. Палец 4 образуется вблизи поляризующей области, палец 3-несколько дальше, а палец 2-еще дальше. Такое же правило справедливо в отношении тканей, расположенных в непосредственной близости к трансплантату поляризующей области, как если бы характер формирующихся пальцев соответствовал характеру некоего морфогена, секретируемого поляризующей тканью (рис. 16-49). Градуальный характер сигнала,

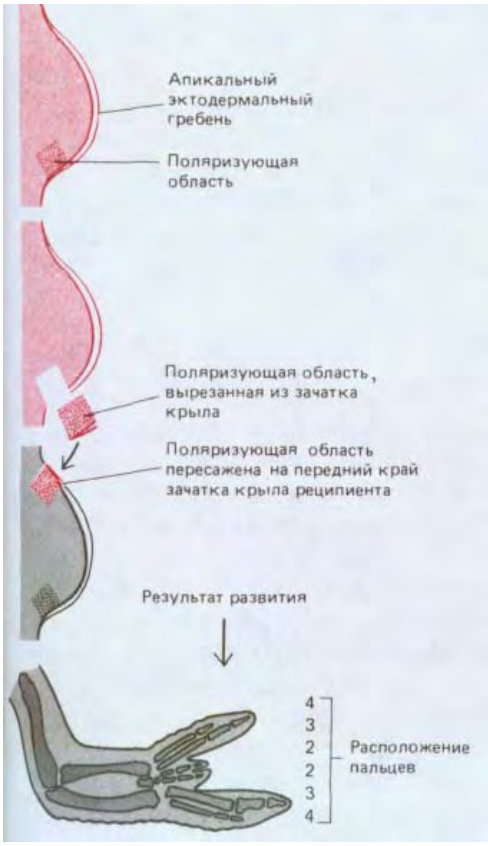


Рис. 16-48. Трансплантат из зоны поляризующей активности вызывает зеркальное удвоение структур крыла у реципиента.

исходящего от клеток поляризующей области, можно продемонстрировать, пересаживая меньшее число клеток. При пересадке примерно 30 клеток образуется дополнительный палец 2, при пересадке 80 клеток - дополнительный палец 3 и при пересадке 130 клеток - дополнительный палец 4.

Действие пересаженных клеток поляризующей области можно воспроизвести путем имплантации инертного носителя, пропитанного *ретиноевой кислотой.* Ретиноевая кислота диффундирует из носителя, и при этом вдоль зачатка конечности создается градиент концентрации, высшая точка которого по крайней мере в три раза превышает минимальную концентрацию; дополнительные пальцы начинают возникать при концентрации около 20 нМ. Благодаря применению высокочувствительных методов хроматографии удалось показать, что в нормальном зачатке конечности существует естественный градиент ретиноевой кислоты именно такого порядка, причем высшая концентрация характерна для клеток поляризующей области. Весьма вероятно,

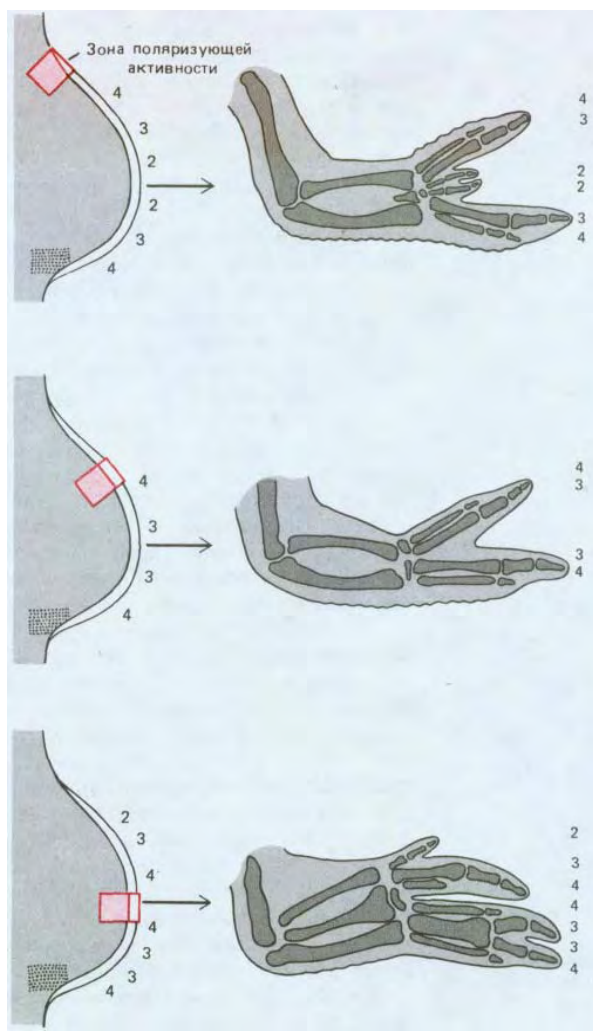


Рис. 16-49. Расстояние между трансплантированным участком зоны поляризующей активности и участком такой же зоны хозяина определяет тип структур, формируемых клетками зачатка крыла. Числа 2, 3 и 4 показывают, какой палец развивается из каждой части зачатка.

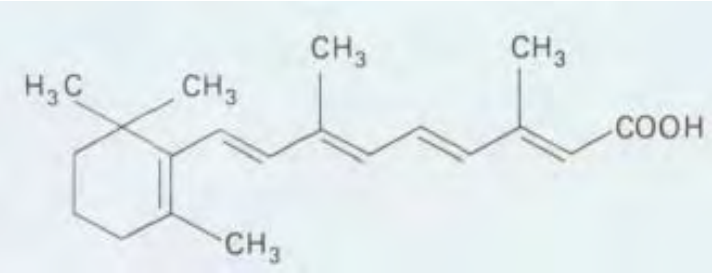


Рис. 16-50. Химическая структура ретиноевой кислоты.

что природным морфогеном является именно ретиноевая кислота (рис. 16-50).

Недавно удалось идентифицировать рецептор ретиноевой кислоты. Им оказался белок, гомологичный рецепторам стероидных и тиреоидных гормонов; он связывается с определенными последовательностями ДНК и регулирует транскрипцию определенных генов. Была выделена и секвенирована кДНК, кодирующая рецептор. В настоящее время для выявления рецепторов в тканях, подобных зачаткам конечностей, используются как ДНК-зонды, так и соответствующие антитела.

16.4.9. Процесс роста контролируется характером позиционных значений, которые могут изменяться при интеркаляции [43]

До сих пор при обсуждении механизмов формирования пространственной организации и позиционных значений мы пренебрегали одним важным аспектом этого процесса: мы не обсуждали регуляцию роста, которая исключительно важна для приобретения различными частями и органами зародыша соответствующих размеров. В некоторых случаях эти механизмы основаны на автономных клеточных программах, запускаемых на ранних стадиях закладки зачатков определенных органов. Однако во многих других случаях рост и структура позиционных значений определяются как результат постоянных межклеточных взаимодействий и тесно связаны с ними. Изучая процессы регуляции, происходящие у многих организмов при замене фрагментов ткани, обладающих различными позиционными значениями, исследователи обнаружили, что клетки этих фрагментов растут и приспосабливаются к локальным условиям. Из этих экспериментов следует простое правило общего характера. Его лучшей иллюстрацией являются результаты исследований по регенерации конечностей у тараканов.

Тараканы относятся к насекомым, у которых в процессе развития от личинки до взрослой формы не наблюдается радикального метаморфоза; развитие протекает постепенно путем смены нескольких ювенильных форм. Конечности молодых тараканов хорошо дифференцированы, но в отличие от клеток конечностей человека здесь дифференцированные клетки способны реагировать на сигналы, управляющие формированием пространственной организации конечности. При нарушении такой организации происходит ее восстановление. Благодаря этим особенностям объекта можно исследовать деятельность систем, контролирующих становление пространственной организации. Для этого по завершении процесса эмбрионального развития на молодых особях проводят необходимые операции.

Мы опишем эксперименты, в которых изучалось поведение клеток эпидермального слоя и кутикулы, покрывающей тело таракана и образующей наружную поверхность конечности. Рост наружного покрова связан с последовательными линьками, когда молодая особь сбрасывает старую кутикулу и вместо нее возникает новая, более просторная. Материал для построения кутикулы выделяют лежащие под ней клетки эпидермиса, образующие один клеточный слой. Позиционные значения этих клеток определяют структуру образуемой ими кутикулы, и если эти значения в результате экспериментального воздействия изменяются, то такой результат можно выявить, исследовав кутикулу после линьки. Регенерация наблюдается только у молодых особей, так как взрослые насекомые не растут и не линяют.

Нога таракана состоит из нескольких частей, расположенных (от основания к концу) в следующем порядке: тазик, вертлуг, бедро, голень, лапка. Лапка в свою очередь состоит из нескольких мелких члеников и оканчивается парой коготков (рис. 16-51). Если удалить две ноги,

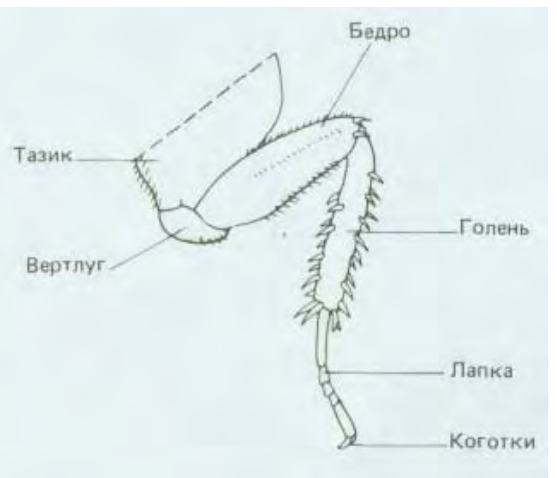


Рис. 16-51. Нога таракана. При каждой из последовательных линек нога растет, но ее строение не меняется.

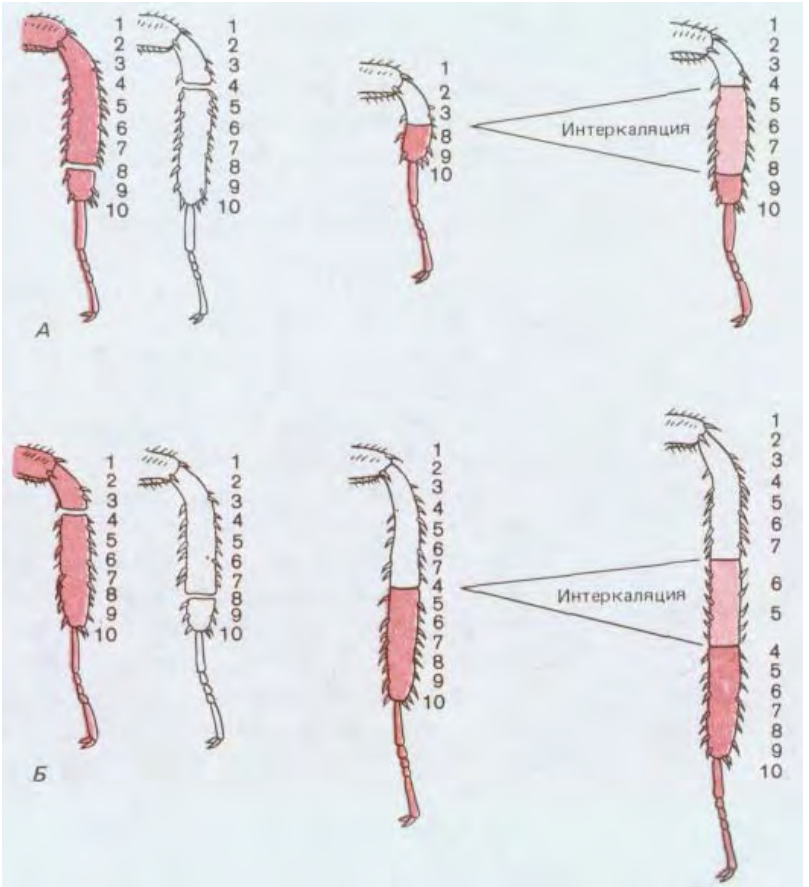


Рис. 16-52. После соединения несовпадающих частей голени таракана происходит интеркаляция новой ткани (показана светлой краской), заполняющей разрыв в ряду позиционных значений (числа от 1 до 10). В первом случае *(А) в* результате интеркаляции восстанавливается недостающий участок, а во втором *(Б)* образуется третья, средняя часть голени между двумя уже имеющимися. Направление щетинок указывает на полярность интеркалирующей ткани. В обоих случаях восстанавливается непрерывность ряда позиционных значений.

перерезанные в голени на разных уровнях, то можно трансплантировать дистальную часть одной ноги на проксимальную культю другой. В результате получается «составная» нога без средней части голени. Тем не менее после линьки насекомого образуется внешне нормальная конечность: утраченная средняя часть голени регенерирует (рис. 16-52, *А).* Операцию можно видоизменить, так что ее результат будет еще более удивительным. Голень одной ноги перерезают около проксимального конца, а голень другой - около дистального. Длинную отрезанную голень одной ноги присоединяют к длинной культе другой, в результате чего образуется удлиненная конечность с удвоенной средней частью (рис. 16-52, *Б).* После линьки оказывается, что эта нога удлинилась еще больше: между двумя имевшимися срединными частями голени образовалась третья срединная часть. Как показано на рис. 16-52, *Б,* щетинки на этом вновь образовавшемся участке направлены противоположно по отношению к щетинкам на остальных частях голени.

Было проведено много операций такого типа. Все они указывают на существование системы позиционных значений, наличие которых делает клетки, расположенные в различных участках, неэквивалентными. Характеристика позиционного значения тесно связана с контролем пролиферации клеток. Принято определять позиционное значение числом, изменяющимся от максимума на одном конце участка конечности до минимума на другом. При описанных выше операциях рядом оказывались эпидермальные клетки, резко различающиеся по своим позиционным значениям. Поэтому в месте соединения двух отрезков начиналась пролиферация клеток и новые клетки при этом приобретали значения, которые плавно, без скачков, заполняли разрыв между позиционными значениями клеток, сближенных при операции (рис. 16-52). Такой результат можно обобщить, сформулировав **правило интеркаляции:** *разрывы в плавном ряду позиционных значений вызывают*

местную пролиферацию клеток и вновь образующиеся клетки приобретают промежуточные позиционные значения, восстанавливая таким образом непрерывность структуры. Пролиферация прекращается только после заполнения промежутка клетками, обладающими всеми утраченными позиционными значениями. При этом восстанавливается нормальное распределение клеток в пространстве. Весь этот процесс получил название **интеркалярной** (или **вставочной) регенерации.**

Правило интеркаляции и вытекающее из него следствие, согласно которому рост продолжается до приобретения определенного распределения позиционных значений, - это важный организующий принцип для систем, где он действует. Начиная со структуры, определяемой приблизительно и в миниатюрном масштабе (например, за счет градиента морфогена), это правило предопределяет создание полного набора позиционных значений и регулирует рост каждой из частей данной структуры до определенных размеров. Все это необходимо для того, чтобы возникающая структура качественно, а следовательно, топологически, была верна. Если применить правило интеркаляции к двух- и трехмерным структурам, то оно окажется справедливым для широкого спектра явлений, включая как нормальную регенерацию ампутированных частей тела, так и аномальные эффекты (возникновение дополнительных конечностей при некоторых трансплантациях). По всей вероятности, это правило справедливо по отношению ко многим процессам органогенеза и регенерации не только у насекомых, но и у ракообразных и амфибий. Например, у дрозофилы в соответствии с этим правилом происходит коррекция ранних ошибок спецификации структуры (рис. 16-60). Даже у млекопитающих, утраченные структуры которых во взрослом состоянии не регенерируют, правилу интеркаляции может подчиняться регуляция роста и пространственной организации в эмбриональный период. Молекулярные механизмы, лежащие в основе этого важного способа контроля роста, пока неизвестны.

Заключение

Возникновение различных типов клеток эмбриона строго упорядочено в пространстве. Этот процесс обычно начинается с возникновения асимметрии яйцеклетки и продолжается благодаря межклеточным взаимодействиям в эмбриогенезе. На каждом из этапов этого процесса асимметрия, изначально выраженная очень слабо, усиливается положительной обратной связью и приводит к появлению четко выраженной пространственной организации. Можно сказать, что сигналы, координирующие формирование пространственной организации, снабжают клетки позиционной информацией. В простейшем случае градуальная концентрация диффундирующего морфогена может контролировать свойства клеток в зависимости от их расстояния по отношению к источнику морфогена; вероятно, при развитии конечности у куриного зародыша роль морфогена выполняет ретиноевая кислота, контролирующая возникновение элементов по оси «большой палец-мизинец». Дискретные различия клеток по своим свойствам могут соответствовать пороговым значениям реакции на морфоген.

Пространственная характеристика клетки определяется позиционной информацией, поступившей к ней в разное время. Пока эмбрион мал, эта характеристика весьма приблизительна, однако по мере роста эмбриона к ней добавляются уточняющие детали. Клетки ранних зачатков передней и задней конечностей эмбрионов позвоночных приобретают различные позиционные значения, вследствие чего свойства клеток разных конечностей становятся неэквивалентными задолго до дифференцировки. Уточнения структуры каждого органа возникают

после появления в каждом из зачатков этих органов более детализированной внутренней сети позиционной информации. Вероятно, эта система детализированной позиционной информации в гомологичных органах, каковыми являются передние и задние конечности, может быть весьма сходной. Обладая памятью, клетки различных полей интерпретируют уточняющую позиционную информацию по-разному, в соответствии со своей предысторией.

Структура позиционных значений у многих животных тесно связана с контролем клеточной пролиферации по простому правилу интеркаляции. Это правило было сформулировано при изучении регенерации конечностей у насекомых и амфибий. Оно гласит, что нарушение непрерывности позиционных значений вызывает местную пролиферацию клеток, и вновь возникающие клетки приобретают промежуточные позиционные значения, восстанавливающие непрерывность нарушенной структуры. Этот же механизм может функционировать при нормальном развитии зародыша, восстанавливая неточности исходных характеристик позиционной информации.

16.5. Дрозофила и молекулярная генетика формирования пространственной организации [44]

Вся классическая генетика основана на предположении о том, что строение любого организма контролируется его генами. Роль ДНК в обеспечении наследственности известна уже более ста лет, однако механизмы генетического контроля, которые отвечают за образование нормальной структуры тела взрослых животных, до сих пор остаются неразгаданными. Однако в последние годы этот пробел в наших знаниях начал заполняться. Новые открытия были сделаны главным образом при изучении развития плодовой мушки-дрозофилы. Опыты на дрозофиле привели к открытию класса контролирующих развитие генов, специфическая функция которых состоит в формировании пространственной организации тела. Сочетание подходов классической и молекулярной генетики помогло установить функции этих генов. Далее мы покажем, что общая стратегия формирования пространственной организации тела у позвоночных близка к таковой у дрозофилы, и более того, у позвоночных имеются близкие аналоги генов, контролирующих этот процесс у дрозофилы.

Первые представления о существовании такой генетической системы сформировались под влиянием открытия мутаций, вызывающих причудливые нарушения плана строения тела взрослой дрозофилы. Например, мутация *Antennapedia* приводит к тому, что на голове вместо антенн растут ноги (рис. 16-53); в результате мутации *bithorax* вместо придатков, именуемых жужжальцами, появляется дополнительная пара крыльев. Такие мутации, превращающие те или иные части тела в структуры, которые в норме должны находиться в других местах, были названы *гомеозисными;* нормальные гены, подверженные таким му-

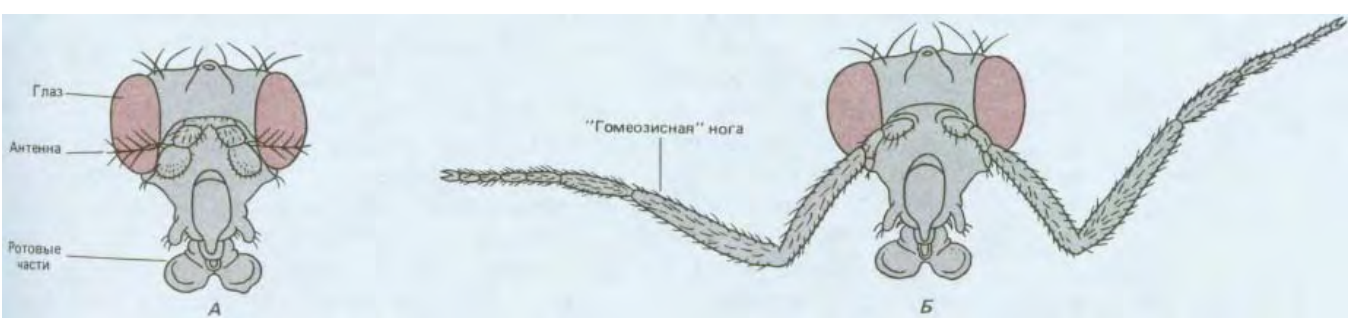


Рис. 16-53. Голова нормальной взрослой дрозофилы *(А)* и дрозофилы, несущей гомеозисную мутацию *Antennapedia. Б.* Крайняя форма такой мутации; обычно в структуры ноги превращается только часть антенны. (Рисунок мутанта *Antennapedia* выполнен по фотографии, предоставленной Peter Lawrence.)



Рис. 16-54. Схема развития дрозофилы от яйца до взрослой мухи.

тациям, называют *гомеозисными селекторными генами.* Открытие гомеозисных мутантов подтолкнуло к проведению весьма искусных экспериментов, показавших, что тело нормальной мухи формируется наподобие лоскутного одеяла, в каждом из лоскутов-участков которого экспрессируется разный набор гомеозисных селекторных генов. Продукты этих генов служат молекулярными адресами, в первом приближении обеспечивающими клетки позиционными значениями. Гомеозисная мутация, таким образом, нарушает нормальное обеспечение информацией всех клеток данного участка: клетки дезинформируются в отношении своего местоположения и из них формируются структуры. которые в норме располагаются в иных участках тела.

Гомеозисные селекторные гены являются лишь одной из частей сложной генетической системы, ответственной за создание нормальной мозаичной структуры тела насекомого. В этом разделе мы опишем систему в целом и вкратце рассмотрим некоторые из ее молекулярных механизмов. Воспользуемся для этого концепцией формирования пространственной организации, которая обсуждалась в предыдущем разделе. Мы увидим, что эта система состоит из трех классов генов, контролирующих становление пространственной организации:

1) вначале действуют *гены полярности яйца,* продукты которых определяют пространственные координаты эмбриона, устанавливая градиент морфогена в яйце;

2) *гены сегментации* интерпретируют позиционную информацию, обеспечиваемую первичными градиентами морфогенов: эти гены размечают зародыш на серию *сегментов* - основных модулей, из которых состоит тело у всех насекомых;

3) гены сегментации посредством своих продуктов влияют на экспрессию *гомеозисных селекторных генов,* которые создают различия между сегментами; в результате сочетания активности гомеозисных селекторных генов и генов сегментации клетки каждого сегмента посредством импринтинга запоминают определенные позиционные значения, которые обусловливают их дальнейшее поведение. И, наконец, внутри каждого сегментированного отдела тела возникают межклеточные коммуникации, определяющие самые мелкие детали взрослого организма. В этом клетки руководствуются, по всей вероятности, правилом интеркаляции.

16.5.1. Тело насекомого формируется путем видоизменения основного плана строения, предусматривающего наличие повторяющихся сегментов [45]

Развитие дрозофилы от яйца до взрослой особи представлено на рис. 16-54. Период эмбрионального развития начинается с момента оплодотворения и занимает примерно сутки, в конце которых зародыш вылупляется из яйца и превращается в личинку. Развитие личинки протекает в три стадии, каждую из которых называют *возрастом* с соответствующим порядковым номером; возраст заканчивается линькой, когда сбрасывается старая кутикула и образуется новая, более просторная. В конце третьего возраста личинка окукливается. Внутри куколки происходит существенная перестройка всех структур и через 9 дней после оплодотворения появляется взрослая муха, или *имаго.*

Тело мухи состоит из головы, трех грудных (торакальных) сегментов, обозначаемых Т1-Т3, и девяти брюшных (абдоминальных) сегментов, обозначаемых А1-А9. Каждый сегмент характеризуется неким общим планом строения, обладая при этом отдельными только ему присущими чертами. Сегмент Т1, например, снабжен парой ног, Т2 - парой ног и парой крыльев, Т3 - парой ног и парой жужжальцев – небольших

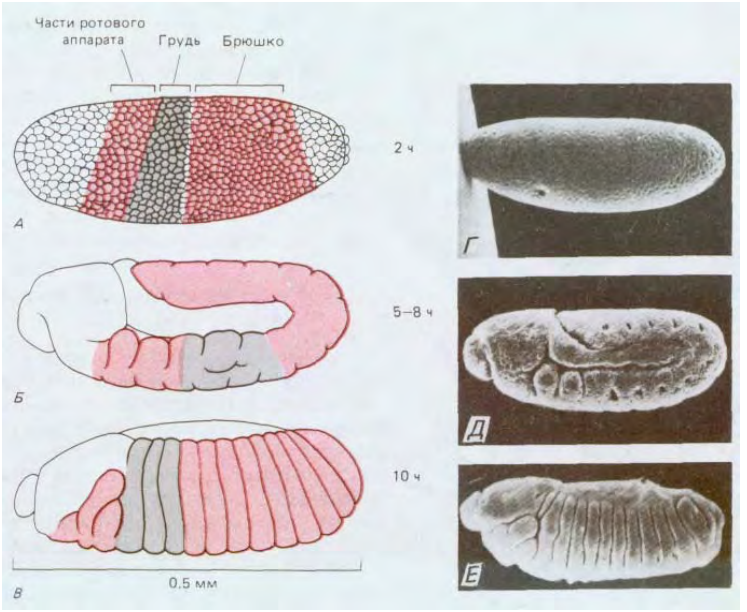


Рис. 16-55. Возникновение сегментов тела дрозофилы в процессе эмбрионального развития. Представлено на рисунках *(вид сбоку) (А-В)* и на соответствующих микрофотографиях, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа *(Г-Е). А, Г* - после двухчасового развития эмбрион находится на стадии синцитиальной бластодермы (см. рис. 16-57). Сегментации не наблюдается, хотя уже можно нарисовать *(окрашенные участки)* карту презумптивных зачатков с расположением будущих сегментов. *Б, Д* - после 5-8 ч развития эмбрион находится на стадии удлинения зародышевой полоски: произошла гаструляция, начинают появляться сегменты и сегментированная ось тела удлиняется, изгибаясь на хвостовом конце и как-будто принимая форму яйцевой оболочки. *В, Е* - после 10 ч развития зародыша ось тела сокращается и вновь выпрямляется, все сегменты четко определены; структуры головы, видимые на этой стадии на поверхности личинки, начинают погружаться вглубь последней с тем, чтобы появиться вновь только после окукливания. *(Г, Д - с* любезного разрешения Rudi Turner, Anthony Mahowald; *Е - с* любезного разрешения Jane Petschek.)

булавовидных балансёров, необходимых для обеспечения полета (они образовались в результате эволюции второй пары крыльев, существовавших у более примитивных насекомых). Такая квазиповторяющаяся сегментация более выражена у личинки, у которой сегменты выглядят более унифицированными; на более ранних стадиях (у зародышей) можно видеть, что зачатки головы и участки, формирующие рост взрослого насекомого, также выглядят сегментированными (рис. 16-55). Границы сегментов в данном случае носят несколько условный характер,

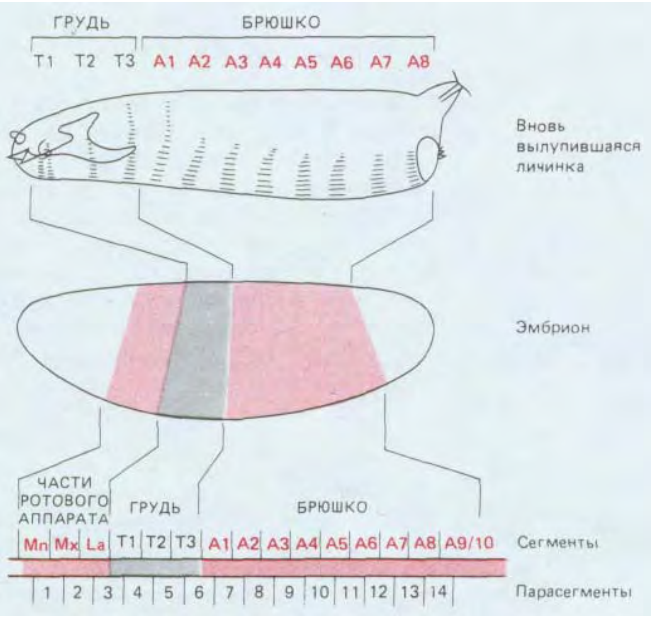


Рис. 16-56. Сегменты личинки дрозофилы и их соответствие участкам бластодермы. Обратите внимание, что концевые области бластодермы соответствуют несегментированным структурам, которые формируют в основном внутренние части личинки, а также сегментированные зачатки ротового аппарата взрослой мухи. Сегментацию у дрозофилы можно описать, используя термины «сегменты» или «парасегменты»; их взаимосвязь указана в нижней части рисунка. До сих пор не установлено точное число сегментов брюшка: наличие восьми доказано, однако, вероятно, имеется и девятый. Mn-мандибула; Mx-максилла; La-губа

и на этот счет имеются особые соглашения. При обсуждении характера экспрессии генов мы увидим, что в целом принято говорить о существовании 14 *парасегментов* (обозначаемых P1-P14); это составляет половину числа традиционно определяемых сегментов (рис. 16-56). И, наконец, на обоих концах тела животного расположены высокоспециализированные структуры, не имеющие сегментарного происхождения.

Общий план строения всего тела, где представлены два специализированных конца и набор модулируемых повторений основной единицы, возникает в результате процессов, которые происходят в яйце и раннем эмбрионе в первые часы после оплодотворения.

16.5.2. Развитие дрозофилы начинается с образования синцития [46]

Длина яйца дрозофилы составляет около 400 мкм, а диаметр около 160 мкм; яйцо обладает ярко выраженной полярностью. Как и у других насекомых, развитие яйца в данном случае происходит достаточно необычно: в результате последовательных делений ядра, не сопровождающихся делением цитоплазмы, возникает синцитий. Ранние деления ядер синхронны и происходят в быстром темпе - через каждые 8 мин. В результате первых 9 делений возникает группа ядер, большая часть которых мигрирует из центра яйца к поверхности, где и формируется монослой, именуемый *синцитиальной бластодермой.* После следующих 4 делений ядер плазматические мембраны прорастают внутрь от поверхности яйцеклетки и окружают каждое из ядер. Так синцитиальная бластодерма превращается в *клеточную бластодерму,* которая содержит около 5000 отдельных клеток (рис. 16-57). Небольшая группа ядер, расположенных на самом заднем конце яйца, образует клетки на несколько циклов деления раньше. Эти *полярные клетки* представляют собой первичные половые клетки, которые положат начало поколениям яйцеклеток или спермиев. Как и в процессе деления у амфибий, высокая скорость репликации ДНК тормозит транскрипцию, так что до стадии клеточной бластодермы развитие в основном (хотя и не полностью) зависит от запасов материнской мРНК и белка, накапливающихся в яйцеклетке до оплодотворения. После образования клеток их деления приобретают более привычный характер, становятся асинхронными, скорость деления замедляется и резко повышается скорость транскрипции.

Зародыш дрозофилы на стадии клеточной бластодермы соответствует полой бластуле амфибий или морских ежей; отличие же состоит в том, что бластула амфибий и морских ежей заполнена жидкостью, а в центре зародыша на этой стадии у насекомых располагается желток. Гаструляция начинается после образования клеток. Хотя у насекомых геометрия этого процесса носит крайне специфические черты, общий результат сходен: благодаря координированным движениям клеток вдоль оси эмбриона возникает кишечная трубка из энтодермальных клеток; трубка окружена мезодермой, которая занимает пространство между этой трубкой и наружным листком эктодермы. В ходе гаструляции длинная ось эмбриона сначала вытягивается («удлинение



Рис. 16-57. Развитие яйца дрозофилы от момента оплодотворения до стадии клеточной бластодермы. [H.A. Schneiderman, in Insect Development (P. A. Lawrence, ed.), pp. 3-34, Oxford, U.K., Blackwell, 1976.]

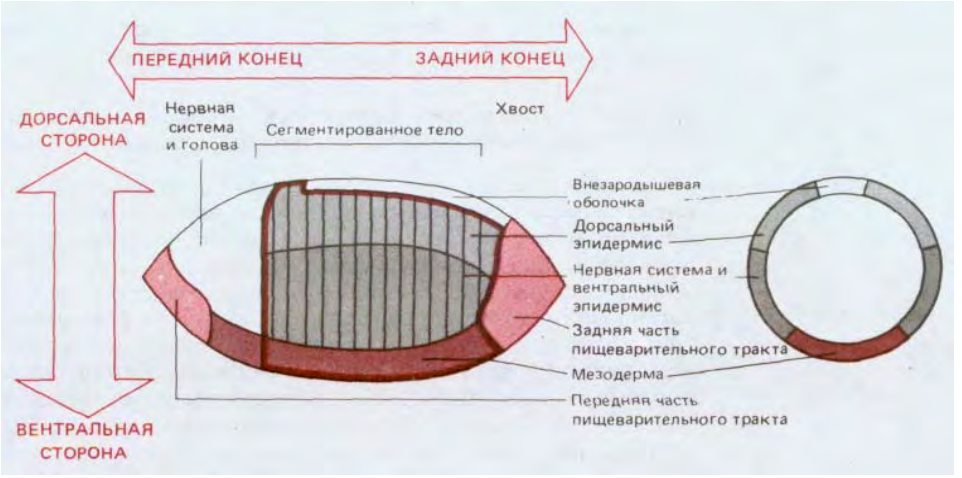


Рис. 16-58. Карта презумптивных зачатков эмбриона дрозофилы на стадии клеточной бластодермы (вид сбоку и поперечный разрез), раскрывающая связь между дифференцировкой важнейших типов тканей в дорсовентральном направлении и расположением сегментов вдоль переднезадней оси. Утолщенная линия окружает участок, где формируются сегментированные структуры. В процессе гаструляции клетки, расположенные вдоль вентральной срединной линии, инвагинируют, образуя мезодерму, а клетки, которые позже сформируют пищеварительный тракт, инвагинируют вблизи обоих концов эмбриона. (V. Hartestein, G. M. Technau, J. A. Campos-Ortega, Wilhelm Roux Archiv Dev. Biol., **194,** 213-216, 1985.)

зародышевой полоски») и затем вновь укорачивается («сокращение зародышевой полоски»); в результате удлинения ось тела изгибается в соответствии с упаковкой эмбриона под яйцевой оболочкой (рис. 16-55).

Наблюдая за поведением клеток в ходе сложных гаструляционных движений, можно нарисовать карту презумптивных зачатков для монослоя клеток, расположенных на поверхности бластодермы (рис. 16-58). Карта презумптивных зачатков выглядит наиболее просто на поперечных срезах через среднюю часть эмбриона; здесь будущая мезодерма расположена вентрально, а будущая эктодерма находится по обе стороны от нее. В данном случае как и у позвоночных вдоль всего тела проходит вытянутое скопление нервных клеток, возникающих из части эктодермы. В развитии насекомых мы находим этапы, соответствующие не только гаструляции и нейруляции, но и образованию сомитов: по завершении гаструляции на поверхности эмбриона наблюдаются бороздки и выступы, отмечающие подразделение тела на парасегменты вдоль переднезадней оси (рис. 16-55). Более точные тесты показывают, что основные черты такой сегментарной структуры определяются уже на стадии клеточной бластодермы до начала гаструляции.

16.5.3. План строения эмбриона контролируется в двух прямоугольных системах координат [47]

Для упрощения ориентации на бластодерме принято пользоваться двумя координатами - условными широтой и долготой. Было также показано, что, согласно генетическим тестам, формирование пространственной организации происходит за счет двух механизмов, один из которых определяет организацию по дорсовентральной оси, а другой - по переднезадней. Дорсовентральная ось контролируется группой, состоящей примерно из 20 генов: мутации любого из них приводят к развитию эмбрионов, которые как бы «дорсализованы», т. е. лишены вентральных структур, или «вентрализованы», т. е. лишены дорсальных структур. Другая группа, состоящая примерно из 50 генов, куда входят гены сегментации и гомеозисные селекторные гены, уже упоминавшиеся ранее, контролирует пространственную организацию вдоль переднезадней оси. Мутации этих генов приводят к развитию эмбрионов, у которых либо отсутствуют какие-либо элементы вдоль переднезадней оси, либо эти элементы дуплицированы. Хотя к настоящему времени многие гены из обеих групп клонированы и даже определены их белковые продукты,

тем не менее мы ограничимся рассмотрением пространственной организации зародыша только вдоль переднезадней оси.

16.5.4. Переднезадняя полярность эмбриона контролируется сигналами с обоих концов яйца дрозофилы [48]

Исходная полярность яйцеклетки контролируется распределением веществ, запасенных до оплодотворения в период нахождения ооцитов в яичнике (рис. 16-39). Если на переднем конце яйцеклетки дрозофилы проделать маленькое отверстие с тем, чтобы вытекло небольшое количество цитоплазмы, расположенной в самой передней части клетки, то эмбрионы теряют способность формировать структуры головы. Более того, если вместо утраченной цитоплазмы переднего конца инъецировать цитоплазму заднего конца из другой яйцеклетки, то в передней половине яйцеклетки-реципиента возникнет второй набор брюшных сегментов с обратной полярностью (рис. 16-59).

Были идентифицированы мутации, приводящие к подобным нарушениям структуры передней или задней частей эмбриона. **Гены полярности яйца,** которые были обнаружены с помощью таких мутантов, являются первыми элементами иерархической генетической системы, участвующей в формировании пространственной организации вдоль переднезадней оси. Гены полярности яйца относятся к числу генов, транскрибируемых в материнском геноме в ходе оогенеза; их запасенные продукты начинают действовать вскоре после оплодотворения. По этой причине фенотип эмбриона определяется аллелями матери, а не сочетанием отцовских и материнских аллелей, представленных в самом эмбрионе. Гены, экспрессируемые таким образом, называют **генами материнского эффекта.**

У матерей-гомозигот по мутации полярности яйца *bicoid* образуются эмбрионы без головы и торакальных (грудных) структур и за счет этого абдоминальные (брюшные) структуры занимают необычно большую часть всего тела; в свою очередь мутация полярности яйца *oskar* приводит к образованию зародышей, полностью лишенных абдоминальных сегментов. (Несегментированные структуры обоих концов тела находятся на особом положении: они не затрагиваются этими мутациями, но могут исчезнуть вследствие мутаций *torso* и некоторых других.)

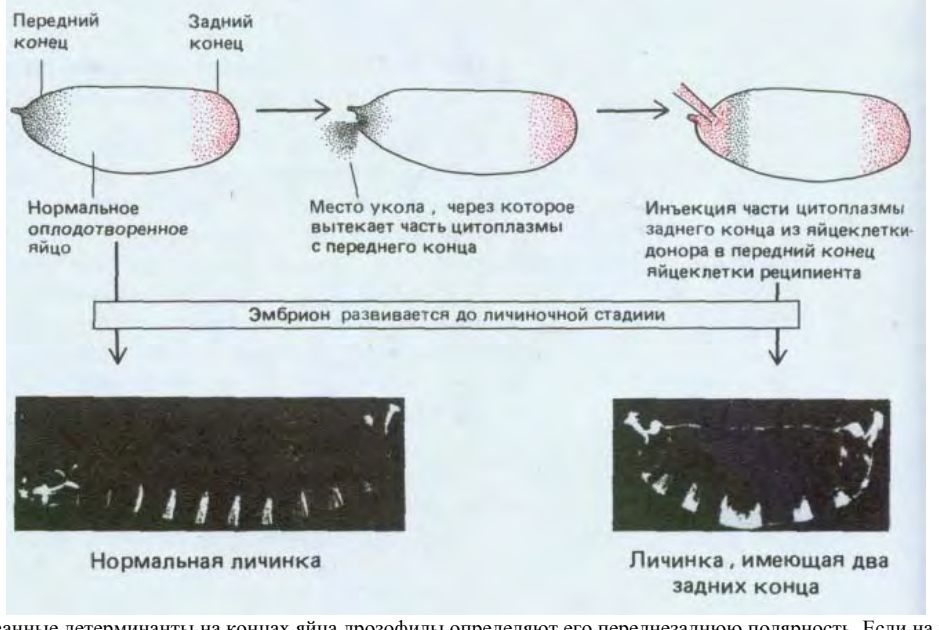


Рис. 16-59. Локализованные детерминанты на концах яйца дрозофилы определяют его переднезаднюю полярность. Если на переднем конце яйца удалить небольшой участок цитоплазмы и заменить его цитоплазмой с заднего конца, то возникает аномальная личинка, имеющая два задних конца *(фото справа);* на фото слева представлена нормальная личинка. Личинки сфотографированы в темном поле. [H.J. Frohnhofer, R. Lehmann, C. Nusslein-Volhard, J. Embryol. Exp. Morphol, 97 (suppl.): 169-179, 1986.]

Мутации *bicoid* и *oskar* приводят к отсутствию соответствующих генных продуктов. Эти мутации можно устранить посредством инъекции мутантным эмбрионам нормальной цитоплазмы. Мутанты *bicoid* развиваются сравнительно нормально после инъекции цитоплазмы переднего конца нормальных эмбрионов в передний конец мутантного яйца, а мутант *oskar* нормализуется вследствие инъекции цитоплазмы заднего конца нормального эмбриона в будущий брюшной отдел мутанта. В обоих случаях нормальный генный продукт локализован на одном из концов яйца и действует как источник определенного сигнала, контролируя возникновение позиционных значений вдоль переднезадней оси.

Молекулярно-генетические эксперименты позволили прояснить ситуацию. С помощью гибридизации in situ клонированных кДНК-зондов *bicoid* было показано, что мРНК, соответствующая гену *bicoid,* концентрируется на переднем конце яйца. Исходно эта мРНК синтезируется в яичнике питающими клетками, связанными с ооцитами (см. разд. 16.4.1, рис. 16-39). По мере перемещения *bicoid-мРНК* по цитоплазматическим мостикам в ооцит она прикрепляется к некоторым компонентам цитоплазмы (вероятно, к элементам цитоскелета) на переднем конце ооцита. Трансляция начинается только после откладки яйца. В результате возникает градиент концентрации белка bicoid с максимумом на переднем конце эмбриона. Градиент концентрации можно изменить генетически, создав мутанты, несущие множественные копии нормального гена *bicoid: с* увеличением дозы гена у матери увеличивается концентрация белка в яйце. Соответственно происходит смешение сегментов эмбриона по направлению к заднему концу, даже несмотря на то, что их расположение определяется позиционной информацией, возни-

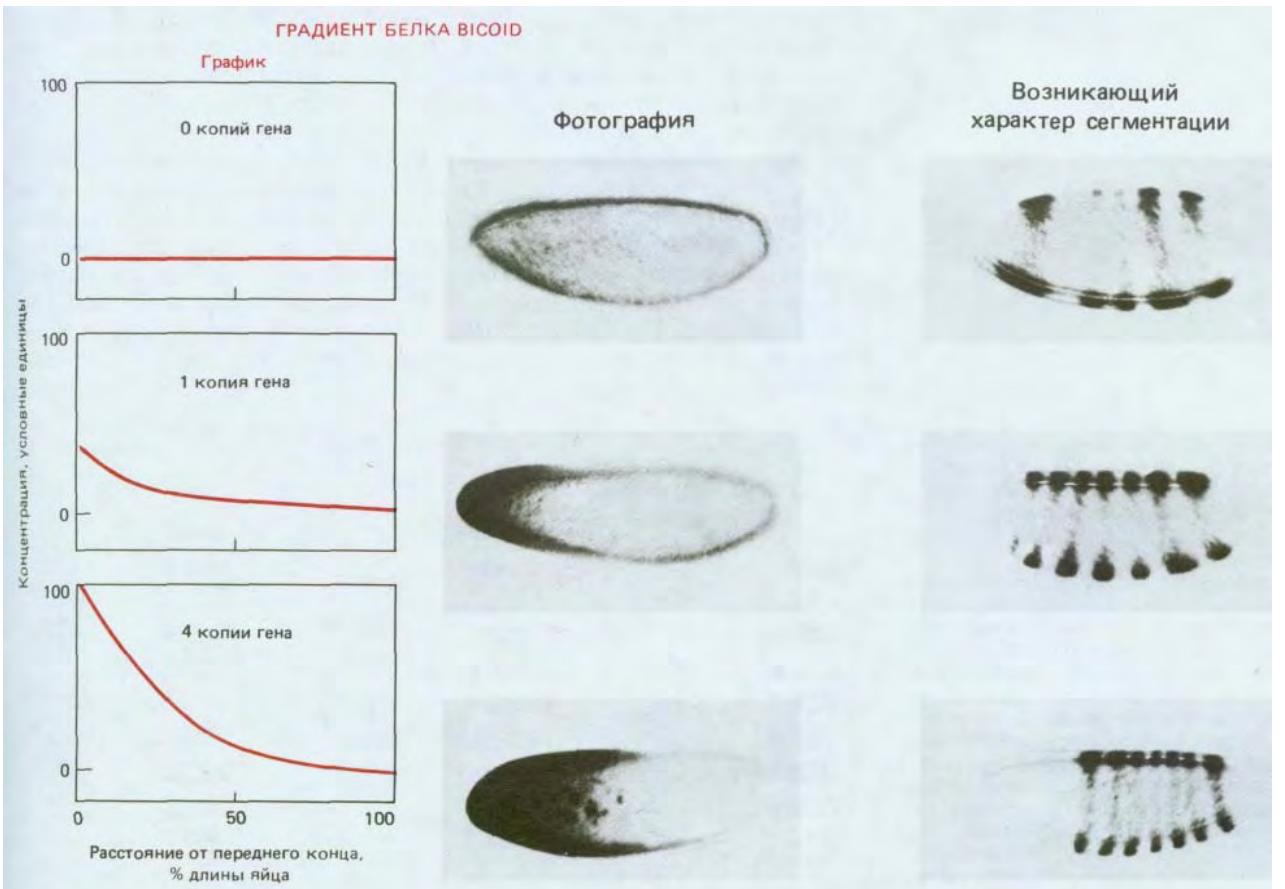


Рис. 16-60. Градиент белка bicoid в яйцеклетке дрозофилы и его влияние на структуру сегментов. Градиент обнаруживается при обработке антителами против белка bicoid; характер сегментации выявляется при окрашивании антителами к продукту гена группы pair-rule, именуемого *even-skipped* (см. разд. 16.5.5). Сравниваются три эмбриона: не имеющий гена *bicoid,* имеющий одну копию этого гена и имеющий 4 копии. В отсутствие гена *bicoid* сегменты на переднем конце не формируются; с увеличением дозы гена они формируются все дальше от переднего конца зародыша, как если бы их расположение определялось концентрацией белка bicoid в данном участке. Изменение этой концентрации, как следует из интенсивности окраски, может быть представлено в виде графика. Несмотря на значительные различия в расположении зачатков сегментов, которые обнаруживаются между эмбрионами с одной и с четырьмя копиями гена, и те, и другие образуют вполне нормальные личинки и взрослых особей. Механизмы такой регуляции обсуждаются в разд. 16.4.9.

кающей под действием концентрации белка bicoid в данном участке (рис. 16-60). Эти соображения позволяют отнести данный белок к морфогенам (см. разд. 16.4.2).

16.5.5. Действие трех классов генов сегментации приводит к подразделению эмбриона на сегменты [49]

Продукты генов полярности яйца обеспечивают появление универсальных градуальных сигналов, определяющих возникновение системы отдельных сегментов. Этот процесс зависит от действия **генов сегментации,** образующих группу примерно из 20 генов. Мутации этих генов способны изменять число сегментов или их основные внутренние свойства, не затрагивая общую полярность яйца. Гены сегментации по сравнению с генами полярности яйца действуют на более поздних стадиях. С учетом действия этих генов фенотип эмбриона будет полностью или частично определяться генотипом эмбриона, а не только матери. Таким образом, эти гены следует отнести к группе генов **эффекта зиготы.**

Большинство мутаций генов сегментации летальны; их эффект не проявляется у взрослых мух, поскольку мутанты погибают, не достигнув продвинутых стадий развития. Однако такие летальные мутации могут распространяться в рецессивном состоянии (как это обычно и бывает). Следовательно, жизнеспособными оказываются гетерозиготы, обладающие двумя копиями гена: одной нормальной и другой мутантной. При скрещивании гетерозиготных родителей четвертую часть потомства составляют гомозиготы, несущие две копии мутантного гена. Такие потомки погибают преждевременно на поздних эмбриональных или ранних личиночных стадиях, но они живут достаточно долго, чтобы мог проявиться измененный фенотип. Почти все гены сегментации были обнаружены в результате воздействия на мух мутагенами и последующего изучения десятков тысяч погибающих личинок, которые были получены в результате скрещивания мутантных форм.

Гены сегментации подразделяют на три класса (рис. 16-61). Первыми в действие вступают по меньшей мере три **gap-гена,** действие продуктов которых приводит к появлению наиболее грубого подразделения эмбриона. Мутации любого *gap-гена* сопровождаются исчезновением обширных участков последовательных сегментов, а мутации различных *gap-генов* приводят к появлению различных, но частично перекрывающихся дефектов. Например, личинка мутантная по гену *Krűppel* лишена 8 сегментов от T1 до A5 включительно (соответственно парасегменты P3-P10).

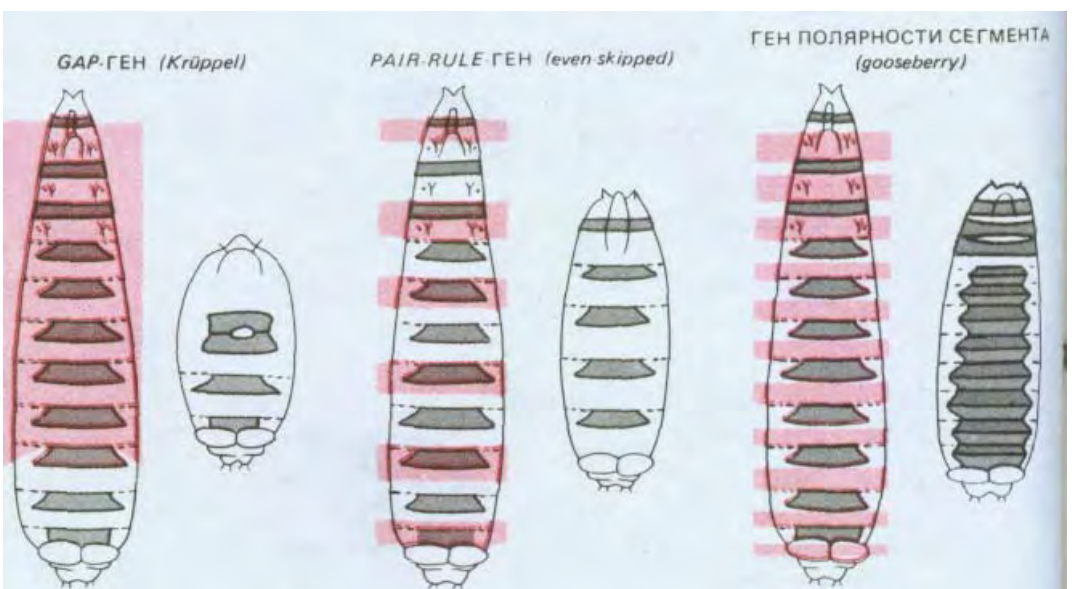


Рис. 16-61. Фенотипическое проявление мутаций, затрагивающих три типа генов сегментации. В каждом случае участки, выделенные цветом у нормальных личинок *(слева),* у мутанта делетированы или заменены зеркальными повторами не затронутых участков. Доминантные мутации принято обозначать прописными буквами, а рецессивные - строчными. Несколько мутаций, затрагивающих строение тела дрозофилы, относят к доминантным вследствие их выраженного влияния на фенотип гетерозигот, хотя по основной характеристике (летальному эффекту) они рецессивны, т.е. проявляются только у гомозигот. (C. N*ű*sslein-Volhard, E. Wieschaus, Nature, 287, 795-801, 1980; с небольшими изменениями.)

Следующими генами сегментации, вступающими в действие, являются 8 **генов pair-rule.** Мутации этих генов вызывают серию делеций, повреждающих чередующиеся сегменты, что приводит к сохранению только половины сегментов. Такая парно-сегментарная периодичность характерна для всех мутантов по генам *pair-rule,* но они отличаются по локализации мутаций в границах сегментов или парасегментов. Например, один из мутантов *pair-rule,* именуемый *even-skipped,* теряет все четные парасегменты, а другой *-fushi tarazu (ftz)* - теряет все нечетные парасегменты. Мутация этого же класса, названная *hairy,* приводит к исчезновению серии участков одинаковой ширины, которые не совпадают с парасегментами. Наконец, существует около 10 **генов полярности сегментов.** Мутации этих генов приводят к утрате части сегмента и ее замещению зеркальной копией всего сегмента либо его части. Например, у мутантов *gooseberry* задняя половина каждого сегмента, т. е. передняя половина каждого парасегмента, заменяется почти **зеркально** перевернутой передней половиной соответствующего сегмента (см. рис. 16-61).

Анализ фенотипа различных мутантов по генам сегментации приводит к предположению, что гены сегментации формируют координированную систему, которая делит развивающийся эмбрион на все более мелкие домены, различающиеся по характеру генной экспрессии. И здесь молекулярная генетика также позволяет изучать механизмы, лежащие в основе действия этой системы.

16.5.6. Локализованная экспрессия генов сегментации регулируется иерархической системой позиционных сигналов [44, 50]

Несколько генов из каждой группы генов сегментации было клонировано и соответствующие зонды использованы для локализации транскриптов в нормальных эмбрионах по методу гибридизации in situ (см. разд. 4.6.11). Мы уже обсуждали ранее, как этот метод был использован для демонстрации того, что транскрипты гена *bicoid* являются источником позиционного сигнала: транскрипты локализуются на одном из концов яйца, хотя эффекты мутации гена распространяются на большую часть эмбриона. Подобным образом было показано, что некоторые гены сегментации (а именно *gap-гены)* в свою очередь прямо или косвенно участвуют в формировании позиционных сигналов, которые позволяют контролировать характер развития в ближайшем окружении. Например, мутанты, дефектные по *gap-гену Krűppel,* обладают выраженной аномалией, распространяющейся через участок, где были выявлены транскрипты данного гена в нормальном эмбрионе, а также на несколько сегментов за его пределами (рис. 16-62). Ген *Krűppel* был секвенирован и оказался гомологичен (равно, как и другой *gap-ген-hunchback)* семейству генов, о которых известно, что у позвоночных они кодируют

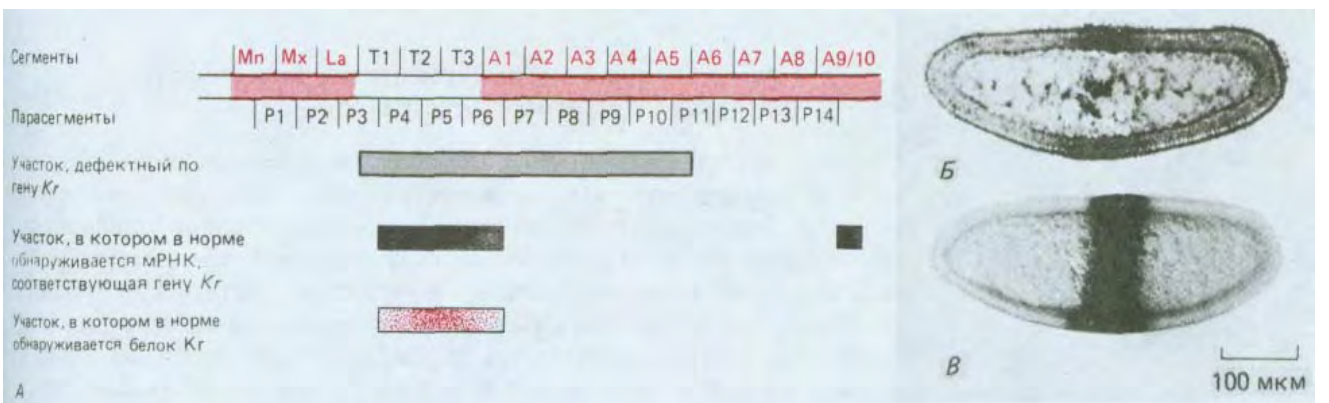


Рис. 16-62. Пространственные домены, в которых действует *дар-ген Krűppel,* картированный на бластодерме дрозофилы. *А.* На рисунке показано, как дефект, вызванный отсутствием функционального продукта Krűppel, простирается за пределы участка, в котором в норме локализованы транскрипты *Krűppel. Б.* Нормальное распределение транскриптов *Krűppel* согласно результатам гибридизации in situ на стадии бластодермы. *В.* Нормальное распределение белка Krűppel, выявляемое с помощью окрашивания антителами на этой же стадии. На других стадиях белок может быть распространен более широко. Фенотип мутанта, у которого отсутствует функциональный продукт Krűppel, указан на рис. 16-61, *А. (Б - из* H. Jackele, D. Tautz, R. Schuh, E. Seifert, E. Lehmann, Nature, **324,** 668-670, 1986; B - из U. Gaul, E. Seifert, R. Shuh, H. Jackle, Cell, **50,** 639-647, 1987, copyright Cell Press.)



Рис. 16-63. При гибридизации in situ радиоактивного ДНК-зонда для гена *ftz c* бластодермой дрозофилы среди продуктов транскрипции данного гена обнаруживается семь полос, что соответствует проявлению дефектов у мутантов *no ftz.* На радиоавтографе полосы экспрессии *ftz* выявляются на продольном срезе в виде черных точек, образованных зернами серебра. (С любезного разрешения Philip Ingham.)

ДНК-связывающие регуляторные белки, включая фактор транскрипции TFIIIA у *Xenopus* (см. разд. 9.1.9). Возникает соблазн предположить по аналогии с *bicoid,* что белок Krűppel в роли диффундирующего морфогена распространяется из участка транскрипции *Krűppel,* хотя наблюдаемое распространение белка не столь обширно, как требуется в соответствии с этой гипотезой.

Некоторые гены группы *pair-rule* участвуют в передаче сигналов на более короткие расстояния, оказывая воздействие на клетки, соседствующие с участками транскрипции этих генов; другие гены, напротив, оказывают воздействие на развитие только в тех участках, где они транскрибируются. Например, транскрипты нормального гена *ftz* на стадии бластодермы проявляются в виде семи кольцевых полосок, наподобие полос у зебры (рис. 16-63), отмечающих ширину и расположение зачатков четных парасегментов, которые утрачиваются у мутантов *ftz.*

Подводя итоги этих наблюдений, можно предположить, что продукты генов полярности яйца обеспечивают эмбрионы универсальными позиционными сигналами, вынуждающими экспрессироваться определенные g*ap-гены* в определенных местах. В свою очередь продукты *gap-генов* представляют как бы второй ярус позиционных сигналов, действующих более локализованно и используемых для регуляции более тонких деталей пространственной организации эмбриона, и оказывающих в свою очередь влияние на экспрессию еще одной группы генов, куда входят и гены группы *pair-rule.* Таким образом, универсальные градиенты, создаваемые генами полярности яйца, принимают участие в формировании более мелких деталей пространственной организации путем постепенного подразделения по принципу иерархии последовательных позиционных контролей. Это весьма надежная стратегия: поскольку позиционные сигналы не определяют подробных деталей, отдельные ядра, отвечающие на них, не должны реагировать с высокой точностью на минимальное изменение величины таких сигналов.

16.5.7. Продукты одного гена сегментации контролируют экспрессию другого [44, 50, 51]

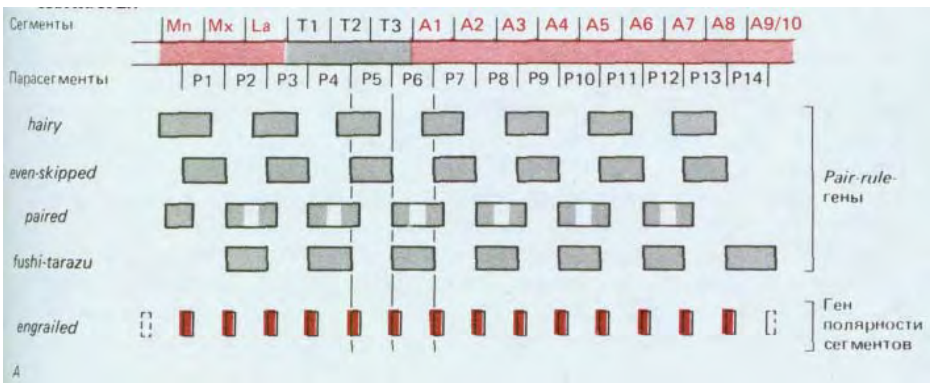
Согласно представленной выше схеме, иерархия позиционных сигналов должна соответствовать иерархии регулярных взаимодействий между генами, управляющими формированием пространственной организации. Это положение можно проверить при изучении влияния мутации одного гена на экспрессию другого. Оказалось, что гены, участвующие в процессе формирования пространственной организации вдоль переднезадней оси, формируют иерархическую пирамиду в пяти основных ярусах, причем продукты генов каждого яруса регулируют экспрессию генов

нижележащих ярусов. На вершине этой пирамиды находятся гены полярности яйца, за ними gap-гены, затем гены *pair-rule,* затем гены полярности сегментов и, наконец, гомеозисные селекторные гены.

Можно получить мутантные эмбрионы, лишенные нормальных продуктов гена *Krűppel,* и определить методом гибридизации in situ экспрессию нормального гена ftz, используя клонированный зонд комплементарный последнему. Характерные полоски *ftz* не образуются именно в тех участках бластодермы, которые затронуты мутацией *Krűppel.* Следовательно, продукт гена *Krűppel* прямо или косвенно регулирует экспрессию гена ftz. Вместе с тем, у мутантов *ftz* распределение нормального продукта Krűppel не нарушено: подукт ftz не регулирует экспрессию гена *Krűppel.*

Иногда наблюдается взаимодействие между генами одного яруса иерархической пирамиды; в отличие от взаимодействия генов *Krűppel* и *ftz* некоторые из этих взаимодействий могут иметь реципрокный (т. е. перекрестный) характер. Например, *gap-гены Krűppel* и *hunchback* взаимно ингибируют друг друга, что не позволяет экспрессироваться их продуктам в ядрах эмбриона одновременно. Поэтому в норме они экспрессируются в соседних участках бластодермы с четкой границей между областью экспрессии гена *hunchback,* расположенной спереди, и областью экспрессии гена *Krűppel,* расположенной сзади. Но в отсутствие одного из продуктов этой пары генов область другого продукта расширяется за пределы обычной демаркационной линии. Явление взаимного ингибирования, проявляемое этими двумя генами, которое вынуждает ядро каждой из клеток совершать выбор между тем или иным направлением специализации, может быть использовано для объяснения того, каким образом в ответ на непрерывный градиент морфогена возникает набор строго определенных неперекрывающихся областей экспрессии.

Рис. 16-64. *А.* Характер транскрипции четырех из восьми известных генов группы *pair-rule* и одного гена полярности сегмента *engrailed в* бластодерме дрозофилы. Хотя каждый из генов группы pair-rule сам по себе определяет только простое чередование с шагом в два сегмента, деятельность всего набора генов *pair-rule* в сочетании приводит к определению соседствующих и перекрывающихся структур и может вызывать значительно более тонкое и сложное разбиение всей бластодермы на полосы шириной всего в одну клетку, в которых и экспрессируется ген *engrailed. Б.* Проявление экспрессии гена *engrailed у* пятичасового эмбриона (стадия удлинения зародышевой полоски), десятичасового эмбриона и у взрослой мухи, крылья которой на этом препарате были удалены. Данная картина экспрессии выявляется с помощью антител против белка engrailed (для пятичасового) или (для двух других образцов) путем создания линии мух, несущих регуляторные последовательности гена *engrailed,* связанные с кодирующей последовательностью гена фермента-репортера, чье присутствие легко выявляется гистохимически по образованию окрашенного продукта в процессе реакции, катализируемой этим ферментом. Обратите внимание, что распределение белка engrailed после его появления сохраняется в течение всей жизни животного. *(А* -по M. Akam, Development, **101,** 1-22, 1987; *Б - с* любезного разрешения Tot Kornberg.)





Вероятно, регулярная периодическая картина экспрессии генов *pair-rule* устанавливается сходным образом. Здесь градуальные позиционные сигналы, определяемые экспрессией генов *dap,* задают примерное направление развития, а взаимодействие генов *pair-rule* (например, генов *hairy* и *runt)* приводит к более строгой и точной детализации. Таким образом, области экспрессии различных генов группы *pair-rule* формируют точно воспроизводимое распределение взаимных исключений и перекрываний в каждом из двусегментных модулей бластодермы нормального эмбриона (рис. 16-64). Различные полоски клеток бластодермы, опоясывающих зародыш, характеризуются различной комбинацией экспрессии генов *pair-rule,* которая, будучи организована по принципу иерархии, спускается до минимально возможного уровня детализации-до ширины одиночной клетки, что соответствует примерно 1/4 ширины будущего сегмента или парасегмента.

16.5.8. Гены полярности яйца, *gap-гены* и pair-rule-гены создают временную пространственную организацию; гены полярности сегментов и гомеозисные селекторные гены обеспечивают постоянную запись [44, 52]

События, описанные в предыдущем разделе, происходят в течение первых нескольких часов после оплодотворения. *Gap-гены* и гены *pair-rule* активируются один за другим и кодируемые ими мРНК (наблюдаемые с помощью гибридизации in situ) создают усредненную и сильно огрубленную (по сравнению с конечным результатом) картину. Вновь синтезируемые продукты сами регулируют экспрессию генов до тех пор, пока вследствие реализации серии взаимных приспособлений, исходное распределение генных продуктов не выявляется в виде четко определенной системы повторяющихся полос. Но и эта система нестабильна и носит временный характер. По мере развития эмбриона от стадии гаструлы и далее регулярное посегментное расположение продуктов генов групп *dap* и *pair-rule* исчезает. Но их действие привело к возникновению временного набора позиционных значений, т. е. молекулярных адресов клеток бластодермы, которые будут поддерживать сегментарную организацию личинки и взрослого животного. Эти позиционные значения записаны с помощью сохраняющейся активации генов полярности сегментов и гомеозисных селекторных генов.

16.5.9. Гены полярности сегментов контролируют основные подразделения каждого из парасегментов [44, 53]

В отдельных участках всех парасегментов наблюдается сходная картина экспрессии генов полярности сегментов. Хорошим примером тому является ген *engrailed.* Присутствие его мРНК можно продемонстрировать с помощью гибридизации in situ на стадии клеточной бластодермы, где эта мРНК формирует серию из 14 полос шириной в одну клетку, расположенных в самых передних частях будущих парасегментов. Появление этих полос тесно связано с экспрессией полос, соответствующих генам *pair-rule* (см. рис. 16-64); наблюдая за нарушениями распределения полос *engrailed* у мутантов *pair-rule,* можно сформулировать правила включения генов *engrailed.* По всей вероятности, ключевую роль здесь выполняет одно из двух специфических сочетаний продуктов генов *pair-rule:* в четных парасегментах ген *engrailed* проявляется только после экспрессии генов *ftz* и *odd-paired,* а в нечетных - после экспрессии сочетания *even-skipped* и *paired.* Иные сочетания продуктов генов *pair-rule*

активируют или подавляют другие гены полярности сегментов: транскрипция гена *wingless* включается в полосах шириной в одну клетку, которые расположены в наиболее близких к хвостовому концу областях парасегментов. Таким образом, каждый будущий парасегмент уже на стадии клеточной бластодермы подразделен по крайней мере на три различных области. Химические различия будут сохраняться и поддерживаться постоянной транскрипцией по меньшей мере некоторых генов полярности сегментов и после того, как продукты генов *pair-rule* в основном исчезнут (см. рис. 16-61, *Б).* Некоторые из экспрессируемых таким образом генов полярности сегментов (включая, например, *wingless)* создают продукты, которые в последующем развитии действуют в качестве локальных морфогенов внутри сегментов, регулируя более тонкие детали внутренней пространственной организации парасегмента и его рост.

Продукты генов *pair-rule* не только регулируют активность генов полярности сегментов, но также взаимодействуют с продуктами генов *dap* (и, очевидно, генами полярности яйца) и вызывают точно локализованную дифференциальную активацию генов, формирующих пятый и последний ярус иерархической пирамиды - гомеозисных селекторных генов, в результате деятельности которых и сохраняются постоянные различия между разными парасегментами. Далее мы более детально рассмотрим проявление активности этих селекторных генов и тщательно обсудим их роль в обеспечении механизмов клеточной памяти.

16.5.10. Гомеозисные селекторные гены комплекса bithorax и комплекса Antennapedia обусловливают возникновение различий между парасегментами [54]

У дрозофилы изучено множество различных гомеозисных мутаций и каждая из них приводит к замене одной части тела другой; например, вместо глаз возникают крылья, вместо антенн-ноги и т.д. (см. рис. 16-53). Особенно важные наборы мутаций могут возникать в пределах двух кластеров генов, известных как **комплекс bithorax и комплекс Antennapedia.** Каждый из комплексов содержит несколько генов, обладающих различными функциями: гены комплекса bithorax контролируют возникновение различий между абдоминальными и торакальными сегментами тела, а гены комплекса Antennapedia контролируют возникновение различий между торакальными сегментами и сегментами головы. Гены этих двух комплексов именуются **гомеозисными селекторными генами,** поскольку они осуществляют выбор между состояниями детерминации, соответствующими различным, но гомологичным, или гомеоморфологичным, структурам. Каждый гомеозисный селекторный ген ограничен в своем действии специфическим доменом, или областью тела, которая трансформируется в результате мутации данного гена. Обычно такие домены обладают четко очерченными границами, которые приблизительно соответствуют половине «сегмента», не совпадающего с границами сегмента, но совпадающими с границами парасегмента (рис. 16-56).

Гомеозисные селекторные гены идентифицированы, как было показано в разд. 16.5, благодаря открытию мутантных взрослых мух; многие мутации этой группы являются рецессивными леталями. Такие мутации приводят к гибели особи практически сразу же после вылупления. Таким образом, как и в случае рецессивных летальных мутаций генов сегментации (см. разд. 16.5.5), эффект этих генов никогда не проявляется у взрослых мух, но может наблюдаться у эмбрионов или ранних личинок. Следовательно, анализ этих ранних стадий позволяет получить наиболее четкую и в некоторых отношениях наиболее полную картину,

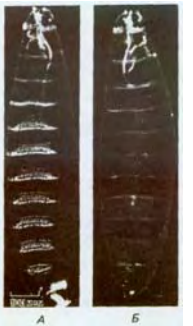


Рис. 16-65. Нормальный эмбрион дрозофилы *(А)* и мутантный эмбрион (Б), у которого утрачена большая часть генов комплекса bithorax. У мутантов все парасегменты, расположенные сзади от Р5, сходны с Р5. [С любезного разрешения Gary Struhl; *А* - перепечатано (с разрешения) из Nature, **293,** 36-41, Copyright 1981, Macmillan Journals Limited.]

дающую представление о роли гомеозисных селекторных генов.

Личинки, дефектные по всем генам комплекса bithorax, обладают относительно простым строением: голова и передняя часть груди до парасегмента Р4 нормальны, но все остальные 10 парасегментов приобретают свойства парасегмента Р4. Частичные делеции в комплексе bithorax приводят не к столь серьезным трансформациям: например, Р5 и все остальные парасегменты, расположенные впереди, могут выглядеть нормальными, а парасегменты, расположенные от Р5 сзади, превращаются в Р5 (рис. 16-65). Эти наблюдения, а также аналогичные находки в отношении комплекса Antennapedia иллюстрируют существенную роль гомеозисных селекторных генов в определении различий между парасегментами: при отсутствии этих последних генов такой дифференцировки парасегментов не происходит.

16.5.11. Гомеозисные селекторные гены кодируют систему молекулярных адресов [44, 55]

Как и гены сегментации, гомеозисные селекторные гены впервые активируются на стадии бластодермы. Поскольку вся ДНК комплексов Antennapedia и bithorax была клонирована, в настоящее время с помощью гибридизации in situ и имеющихся ДНК-зондов можно выявить последовательность транскрипции всех гомеозисных селекторных генов. Выводы из этих исследований удивительны: на первый взгляд каждый гомеозисный селекторный ген экспрессируется нормально только в тех участках, которые развиваются аномально, т. е. как будто они находятся не на своем месте, когда этот ген мутирует или отсутствует. Это кажущееся отсутствие логики позволяет рассматривать продукты селекторных генов как молекулярные адреса. Каждый парасегмент обладает собственным набором таких адресов, и если адреса изменены, то парасегмент ведет себя таким образом, как если бы он находился в другом месте. Активация гомеозисных селекторных генов контролируется генами сегментации, и поэтому характер экспрессии гомеозисных селекторных генов совпадает с границами парасегментов, определяемых продуктами генов *pair-rule* и полярности сегментов. Таким образом, сочетание продукта определенного гомеозисного селекторного гена (или набора таких продуктов) с определенными продуктами генов полярности сегментов надежно определяет единственный адрес, которым обладают только клетки одного из участков данного сегмента.

16.5.12. Продукты гомеозисных селекторных генов участвуют в регуляции экспрессии этих генов [56]

Как и в случае генов сегментации, характер экспрессии гомеозисных селекторных генов с момента появления транскриптов в бластодерме претерпевает сложные настройки и с определенного момента в пределах каждого парасегмента приобретает свои строго определенные черты; окончательный характер экспрессии устанавливается только после завершения гаструляции. На рис. 16-66, *А* указывается характер экспрессии на стадии удлинения зародышевой полоски, т. е. примерно через 5 ч после оплодотворения (см. рис. 16-55).

Этот характер частично изменяется в результате взаимодействия нескольких гомеозисных селекторных генов. Если гомеозисные селекторные гены расположены по порядку, начиная с генов, экспрессирующихся на головном конце, и кончая генами хвостового конца, то, следовательно, каждый ген этой серии репрессируется продуктами последующих ее

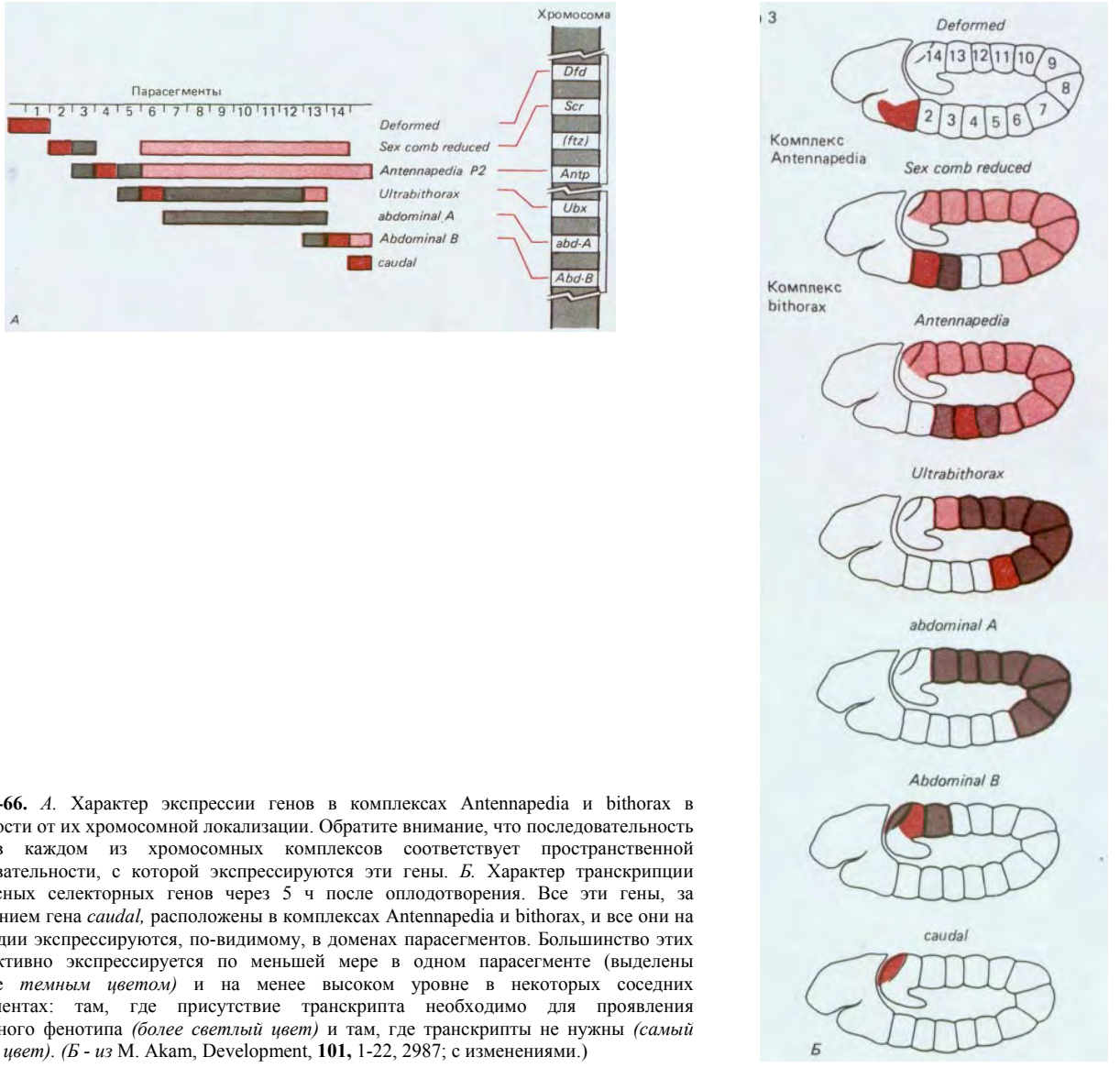


Рис. 16-66. *А.* Характер экспрессии генов в комплексах Antennapedia и bithorax в зависимости от их хромосомной локализации. Обратите внимание, что последовательность генов в каждом из хромосомных комплексов соответствует пространственной последовательности, с которой экспрессируются эти гены. *Б.* Характер транскрипции гомеозисных селекторных генов через 5 ч после оплодотворения. Все эти гены, за исключением гена *caudal,* расположены в комплексах Antennapedia и bithorax, и все они на этой стадии экспрессируются, по-видимому, в доменах парасегментов. Большинство этих генов активно экспрессируется по меньшей мере в одном парасегменте (выделены наиболее *темным цветом)* и на менее высоком уровне в некоторых соседних парасегментах: там, где присутствие транскрипта необходимо для проявления нормального фенотипа *(более светлый цвет)* и там, где транскрипты не нужны *(самый светлый цвет). (Б - из* M. Akam, Development, **101,** 1-22, 2987; с изменениями.)

членов. Таким образом, в отсутствие продуктов последующих генов любой данный ген в этой серии будет характеризоваться высоким уровнем экспрессии как в своем обычном домене, так и в парасегментах, расположенных позади этого домена. Такое расположение генов, соответствующее их пространственной экспрессии и контролируемое взаимосвязями, отражено последовательностью, в которой они расположены вдоль хромосомы в каждом из двух комплексов генов (рис. 16-66, *Б).* Этот вопрос обсуждается в разд. 10.3.19.

16.5.13. Взрослая муха развивается из набора имагинальных дисков, которые запомнили позиционную информацию [57]

Характер экспрессии гомеозисных селекторных генов устанавливается в эмбрионе дрозофилы и определяет строение не только личинки, но и взрослой мухи. Для того чтобы в полной мере оценить роль этих

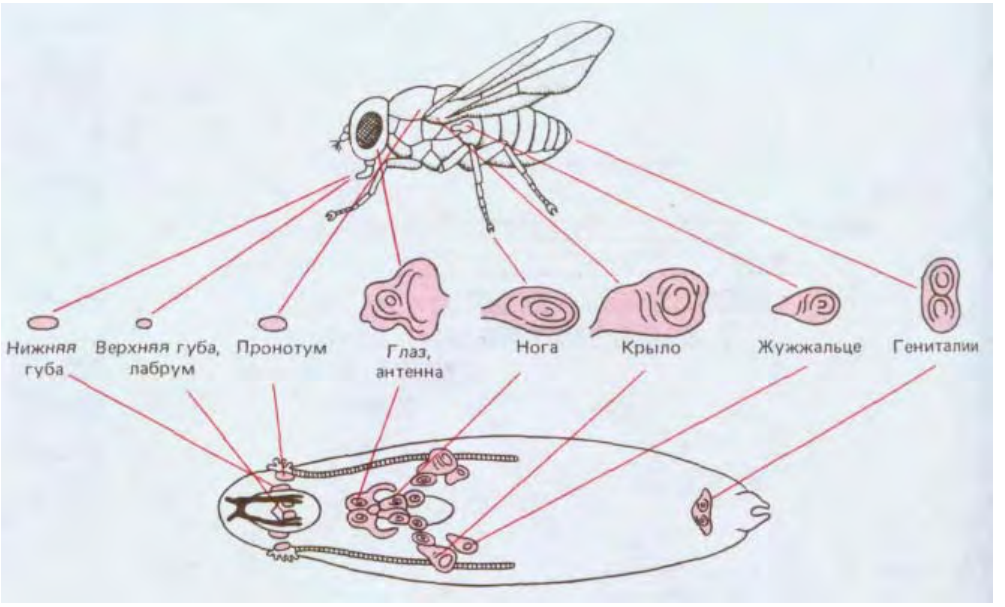


Рис. 16-67. Имагинальные диски у личинки дрозофилы (изображены схематично) и образующиеся из них структуры взрослого организма. Из трех пар дисков ноги показана только одна. [J. W. Fristom et al. Problems in Biology: RNA in Development (E. W. Hanley, ed.), p. 382, Salt Lake Sity, University of Utah Press, 1969.]

генов, необходимо иметь представление о том, каким образом в конце концов развивается взрослая особь, или имаго.

Взрослая муха формируется главным образом за счет недифференцированных так называемых *имагинальных клеток,* собранных в группы, которые расположены по бокам в каждом из сегментов тела личинки. Источником имагинальных клеток является эмбриональный эпителий, который покрывает все тело. Эти клетки сохраняют связь с эпидермисом и в основном участвуют в формировании эпидермальных структур взрослого организма. Имагинальные клетки, из которых возникнет голова, грудь и гениталии, организованы в **Имагинальные диски,** а имагинальные клетки брюшка собраны в кластеры, именуемые *абдоминальными гистобластными гнездами.* Подробно были исследованы в основном клетки дисков. Всего известно 19 дисков, один из которых расположен на средней линии тела, а остальные 18 лежат попарно по бокам личинки (рис. 16-67). Диски представляют собой эпителиальные мешки в виде смятых и расплющенных шариков; в процессе метаморфоза они выпрямляются и дифференцируются. Из одной пары дисков возникают глаза и антенны, из другой - крылья и часть груди, из третьей - первая пара ног и т. д. Внешне клетки разных имагинальных дисков различить невозможно, и в процессе дифференцировки из них возникает сходный набор дифференцированных клеточных типов. Однако результаты экспериментов по трансплантации дисков показывают, что фактически они регионально детерминированы и неэквивалентны.

Если имагинальный диск пересадить в пределах личинки с одного участка на другой и позволить ей развиваться до начала метаморфоза, то трансплантированный диск независимо от нового местоположения будет дифференцироваться автономно в структуру, соответствующую его происхождению. Отсюда следует, что клетки имагинальных дисков в процессе дифференцировки руководствуются памятью о своем исходном местоположении. При использовании более сложных методов трансплантации, когда клетки имагинальных дисков до дифференцировки пролиферируют в течение более длительного времени, можно показать, что состояние клеточной памяти наследуется (за некоторыми исключениями из этого общего правила) в течение неопределенно большого числа клеточных поколений (рис. 16-68).

Гомеозисные селекторные гены являются существенным компонентом механизмов клеточной памяти. Если их элиминировать из клеток имагинального диска на любой стадии длительного периода, приводя-

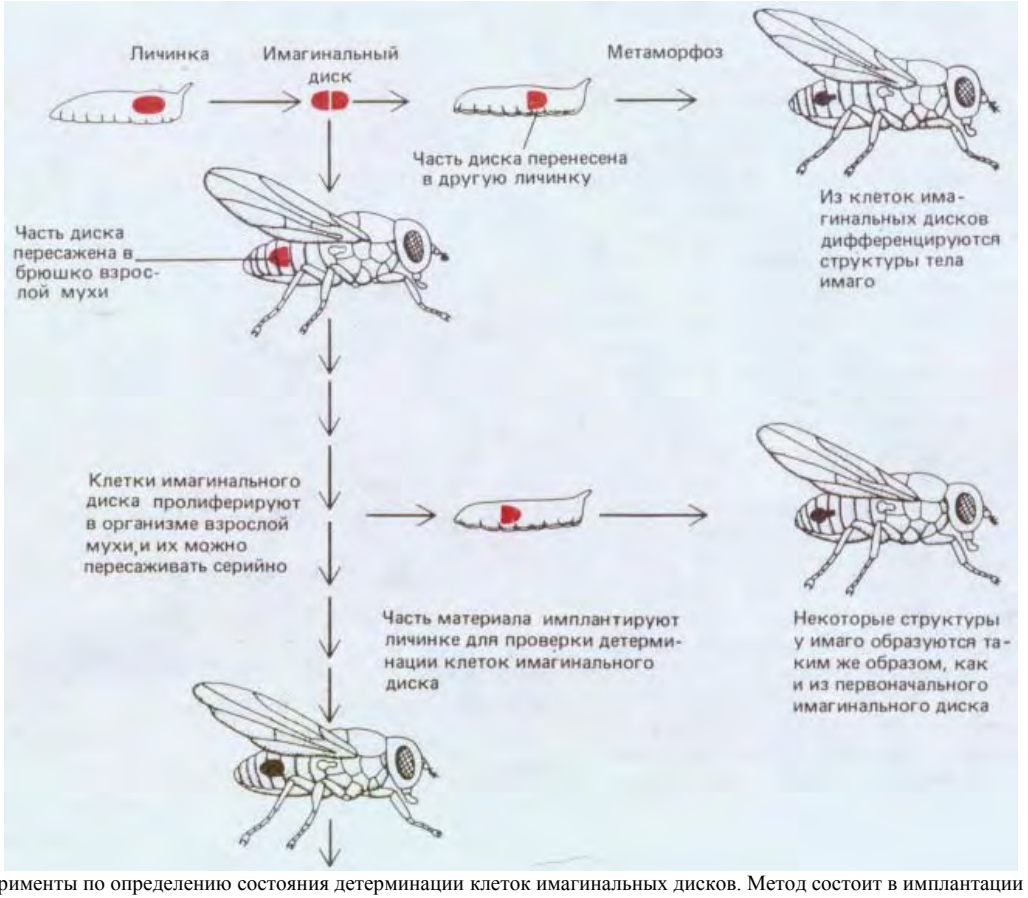


Рис. 16-68. Эксперименты по определению состояния детерминации клеток имагинальных дисков. Метод состоит в имплантации клеток личинкам накануне метаморфоза; клетки дифференцируются, образуя определенные структуры взрослого организма, которые после метаморфоза располагаются в полости тела мухи-реципиента и не интегрированы с ее организмом. Клетки можно тестировать сразу же после извлечения дисков или после имплантации в брюшко взрослой мухи, которое является в этом случае естественной культуральной камерой. Гормональные условия в организме взрослых мух позволяют клеткам, которые, таким образом, не претерпели метаморфоз, размножаться без дифференцировки (до проведения теста на клеточную детерминацию). В обоих случаях клетки после имплантации в личинку, как правило, дифференцируются и образуют структуры, соответствующие назначению исходного диска.

щего к дифференцировке в процессе метаморфоза, то клетки начинают дифференцироваться в другие структуры, как если бы они принадлежали иным сегментам тела. Это явление можно продемонстрировать с помощью *метода митотической рекомбинации, индуцированной рентгеновскими лучами.* Этот подход можно рассматривать как аналог генетической хирургии отдельных клеток, используемой для получения на любой стадии развития клонов мутантных клеток с определенным генотипом. Именно эти вопросы будут обсуждаться в следующем разделе.

16.5.14. Гомеозисные селекторные гены играют важную роль в запоминании позиционной информации клетками имагинальных дисков [58]

Нормальная соматическая клетка содержит два гомологичных набора хромосом. Один из гомологов каждой пары происходит от отца, другой от матери. В норме обмен ДНК за счет кроссинговера между гомологичными хромосомами отцовского и материнского происхождения имеет место только в мейозе при формировании половых клеток. Но иногда кроссинговер происходит в процессе деления обычных соматических клеток. Хотя в норме **митотическая рекомбинация - событие** довольно редкое, его можно вызвать у насекомых облучением рентгеновскими лучами (вероятно, это побочный результат воздействия излучения на хромосомы). Как указано на рис. 16-69, если материнские и отцовские хромосомы несут различные аллели гена, то клетка является гетерозиготной. Вследствие единичного акта митотической рекомбинации можно получить две гомозиготные дочерние клетки, отличающиеся генетически как от родительских клеток, так и друг от друга: одна наследует две копии отцовского, другая - две копии материнского аллеля. Далее каждая из дочерних клеток воспроизводится обычным образом, создавая пару гомозиготных клонов, которые расположены в окружении гетеро-

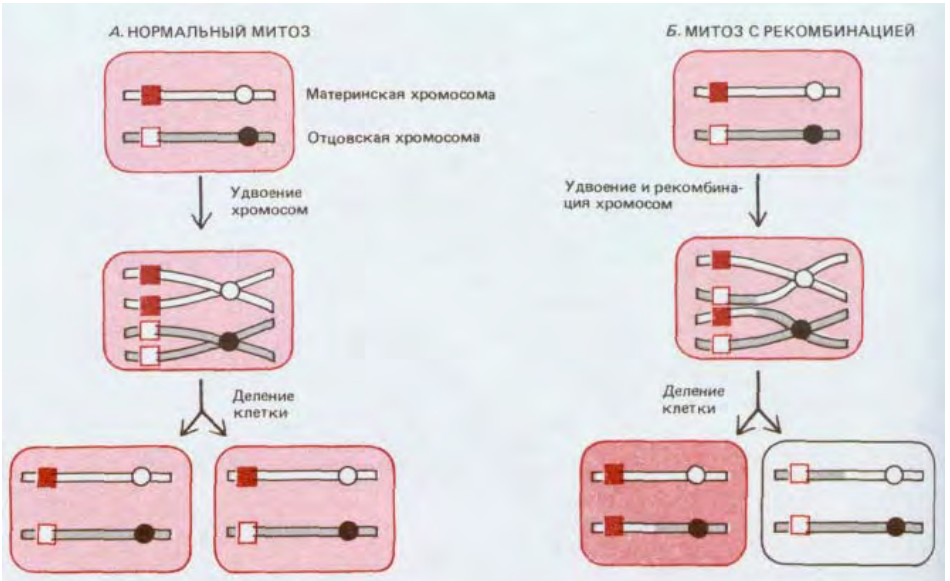


Рис. 16-69. Нормальный митоз *(А)* и митоз, сопровождающийся рекомбинацией *(Б)*. На схеме указана судьба одиночной пары гомологичных хромосом, одна из которых отцовского происхождения (выделена цветом с центромерой в виде черного кружка), а другая материнского (с центромерой в виде белого кружка). Эти хромосомы содержат ген пигментации (либо иной маркерный ген) с аллелем *А* дикого типа *(белый квадрат* на отцовской хромосоме) и рецессивным мутантным аллелем *а (красный квадрат* на материнской хромосоме). Гомозиготная *А/А* и гетерозиготная *А/а* клетки обладают нормальным фенотипом, а гомозиготные *а/а* клетки - измененным фенотипом. Рекомбинация за счет обмена ДНК между отцовской и материнской хромосомами приводит к образованию пары дочерних клеток, одна из которых является гомозиготой *А/А* (нормальный фенотип), а другая - гомозиготой *а/а* (мутантный фенотип). Митотическая рекомбинация - редкое случайное событие.

зиготных тканей (рис. 16-70). Если, например, все клетки организма исходно гетерозиготны по мутации, которая вызывает желтую пигментацию вместо нормальной коричневой, но эта мутация рецессивна (так что гетерозиготные клетки обладают коричневым фенотипом), то в результате митотической рекомбинации может возникнуть клон гомозиготных желтых клеток на коричневом фоне.

Конечно же, невозможно проконтролировать в каких именно клетках произойдет митотическая рекомбинация, равно как и невозможно преду-

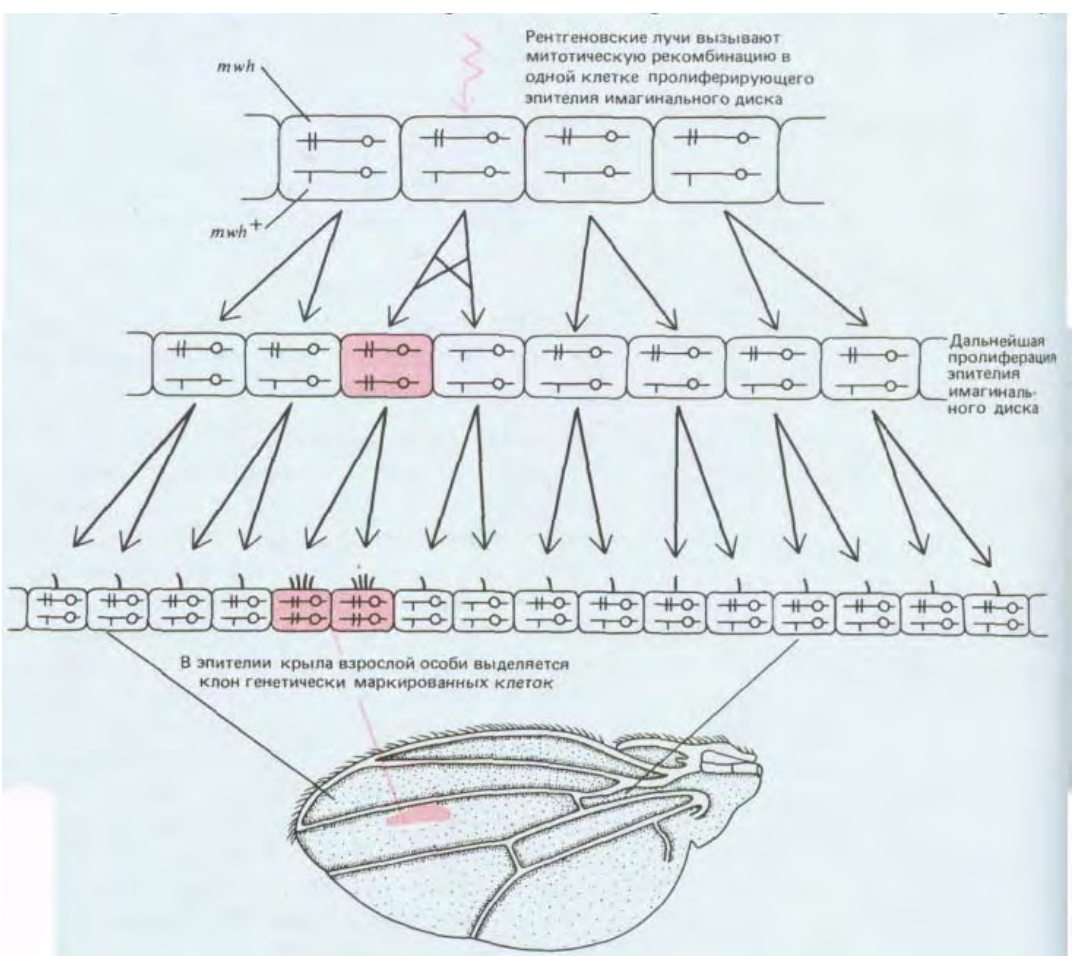


Рис. 16-70. Митотическую рекомбинацию можно использовать для создания в крыле дрозофилы клона генетически маркированных мутантных клеток. Чем раньше происходит рекомбинация, тем больше будет возможный клон.

гадать точно участок хромосомы, в котором произойдет кроссинговер. Однако здесь экспериментаторы могут довольно четко контролировать время таких событий (облучая клетки в строго определенное время) и, что еще важнее, исходный генотип. Во-первых, можно скрещивать гомозигот, у которых мутация интересующего гомеозисного селекторного гена связана с маркерной мутацией (например, мутацией, вызывающей аномальную пигментацию). В данном случае маркер позволит, выявлять гомозиготные клоны, полученные в результате митотической рекомбинации, по их аномальной окраске. Такие маркированные клоны можно с уверенностью считать гомозиготными по интересующей нас мутации.

Основные эффекты мутаций гомеозисных селекторных генов в своем большинстве рецессивны: только у гомозиготных мутантных организмов проявляется гомеозисная трансформация. Используя описанную митотическую рекомбинацию, можно создать клон клеток, меченных в имагинальном диске по гомеозисному гену, и наблюдать их поведение на гетерозиготном, фенотипически нормальном фоне. Именно так было показано, что меченые клетки (и только они) способны к гомеозисной трансформации (чем доказывается их расположение в пределах участка действия гомеозисного селекторного гена); на основе этого можно сделать вывод, что в раннем развитии имело место рекомбинационное событие. Например, можно подвергнуть действию рентгеновских лучей двухдневную личинку, гетерозиготную по мутации, которая нарушает функцию гена *Ultrabithorax (Ubx)* из комплекса bithorax. В результате в данных имагинальных дисках будут получены изолированные клоны гомозиготных клеток *Ubx /Ubx*. Если эти клоны расположены на диске жужжальца, то в жужжальце возникнут скопления ткани дикого типа. Такие наблюдения показывают, что в каждой из клеток память о позиционной информации определяется постоянной активностью нормального гомеозисного селекторного гена и что эта память в каждой из клеток проявляется автономно.

16.5.15. Гомеозисные селекторные гены и гены полярности сегментов определяют компартменты тела [59]

Запоминаемые различия, контролируемые гомеозисными селекторными генами, дискретны: экспрессия генов в клетках соседних парасегментов характеризуется четкими различиями. Это же справедливо по крайней мере в отношении одного гена полярности сегментов - *engrailed* (см. рис. 16-64, *Б),* дифференциальная экспрессия которого соответствует четкому различию между клетками задней и передней части парасегмента (что соответствует клеткам передней и задней части сегмента). Таким образом, благодаря дифференциальной экспрессии этих двух классов генов, тело делится с образованием серии отдельных участков, клетки которых характеризуются различным состоянием детерминации.

На границе двух таких участков клетки не смешиваются, как если бы селективное слипание клеток, обладающих одинаковым молекулярным адресом, позволяло им отделяться от клеток, несущих другой адрес. Так, например, если в результате генетической рекомбинации в крыле появляется клон маркированных, но все же нормальных клеток, то этот клон располагается лишь по одну сторону четко определенной границы, разделяющей два парасегмента, образующих крыло. Подразделения тела (в крыле или любом ином органе), образующиеся таким образом, называют **компартментами** (рис. 16-71). Хотя границы компартментов, как правило, не соответствуют границам нормальных органов, они совпадают с границами доменов, в пределах которых действуют гомеозисные селекторные гены, и это можно наблюдать по экспрессии гена





Рис. 16-71. *А.* Форма маркированных клонов в крыле дрозофилы указывает на существование границы компартментов. У такой границы край каждого пятна получается прямым. Даже если маркированный клон генетически изменен, что позволяет ему расти быстрее остального крыла и стать очень большим, он все равно не переходит границы компартментов *(крайний рисунок справа).* Обратите внимание, что эта граница не совпадает с центральной жилкой крыла. *Б.* Характер экспрессии гена *engrailed* в крыле, выявляемый тем же методом, что и на рис. 16-64, *Б.* Границы компартмента совпадают с границами экспрессии гена *engrailed. (А* -по F.H.C. Crick, P.A.Lawrence, Science, **189,** 340-347, 1975; *Б - с* любезного разрешения Tot Kornberg.)

engrailed (см. рис. 16-71, *Б).* У соответствующих мутантов ткань по одну из сторон границы компартмента трансформирована; с другой стороны располагается нормальная ткань (рис. 16-72).

Границы компартментов по определению являются границами двух популяций клеток, различающихся по состоянию своей детерминации, которые не могут смешиваться. Хотя в норме состояние детерминации необратимо, тем не менее каждый из компартментов должен быть самоподдерживающейся единицей. Он не способен использовать клетки соседнего компартмента или делиться с соседом своим собственным избытком клеток. Однако он способен регулировать свою внутреннюю организацию за счет усовершенствований, которые не нарушают этих ограничений. Каждый из компартментов обладает собственной детализованной внутренней структурой, возникающей в имагинальном диске в результате межклеточных взаимодействий на относительно поздних стадиях развития. Молекулярная основа этих местных механизмов формирования пространственной организации до сих пор не изучена, хотя, как упоминалось в разд. 16.5.9, не исключено, что в них принимает участие продукт гена полярности сегмента *wingless*. Можно показать, однако, что постоянные межклеточные взаимодействия определяют не только пространственную организацию, но и рост частей имагинальных дисков: данная система подчиняется правилу интеркаляции (см. разд. 16.4.9). В процессе регуляции роста и формирования пространственной организации каждый из компартментов ведет себя как более или менее независимое целостное образование. Это было показано в экспериментах, где митотическую рекомбинацию использовали для создания меченых клонов клеток с генотипом, позволяющим пролиферировать им быстрее других клонов имагинального диска. В процессе роста эти клоны занимают непропорционально большую часть компартмента, в пределах которого они расположены, но тем не менее они не способны нарушать границы компартментов; они не могут увеличить размеры компартмента или изменить его пространственную организацию (см. рис. 16-71).

16.5.16. Саморегуляция гомеозисных селекторных геноввносит вклад в механизмы клеточной памяти [60]

Совершив экскурс в будущее, т. е. рассмотрев более поздние стадии развития дрозофилы, вернемся в прошлое, чтобы с молекулярной точки зрения обсудить важные свойства гомеозисных селекторных генов. И прежде всего следует обсудить, каким образом эти механизмы обеспечивают каждую из клеток памятью о том, в каком из сегментов она находится. Один из способов достижения такого эффекта состоит в выработке механизма, действующего по принципу положительной обратной связи, где продукт гена стимулирует свою собственную транскрипцию (см. разд. 16.2.10). Существуют данные о том, что гомеозисные

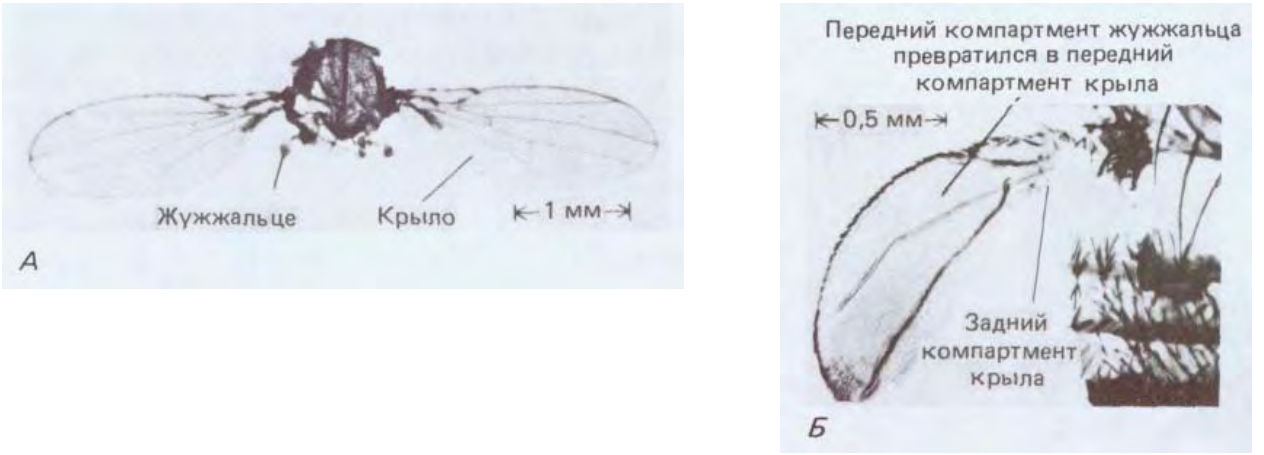


Рис. 16-72. Жужжальце мутанта bithorax (5); для сравнения приведена фотография нормального крыла и нормального жужжальца *(А)*. Передний компартмент мутантного жужжальца превратился в передний компартмент крыла. *(А - с* любезного разрешения Peter Lawrence, Б - из F. H.C. Crick, P. A. Lawrence, Science, **189,** 340 347, 1975. Copyright, 1975 by the American Association for the Advancement of Science.)

селекторные гены действительно обладают таким самоподдерживающим свойством. Например, клетки в культуре можно трансфицировать искусственно созданным вектором-плазмидой, которая содержит либо последовательность гомеозисного селекторного гена, кодирующую белок и соединенную с каким-либо иным сильным промотором, либо регуляторную последовательность того же гена, соединенную с последовательностью другого гена, кодирующего другой белок (например, фермент, выявление которого не вызывает трудностей). В первом случае можно обеспечить на необходимом уровне синтез белка, кодируемою гомеозисным селекторным геном, а во втором - проверить насколько эффективна регуляторная функция данного белка (это определяется по синтезу фермента-репортера в клетках, трансфицированных одновременно плазмидами обоих типов). В таких опытах было показано, что белок Ultrabithorax может оказывать влияние по типу обратной связи на регуляторную последовательность *Ultrabithorax,* стимулируя экспрессию соответствующего гена (рис. 16-73). Более того, он также способен воздействовать на регуляторную последовательность *Antennapedia,* контролируя синтез соответствующего белка, а белок ftz, возможно, стимулирует как *Ultrabithorax,* так и *Antennapedia*. Конечно же, условия, создаваемые в клеточной культуре как в модели, не соответствуют условиям, возникающим в зародыше, тем не менее эти наблюдения показывают, что гомеозисные селекторные гены и их родичи могут не только стимулировать или ингибировать друг друга, но и стимулировать самих себя.

Вероятно, такая положительная обратная связь важна для исходной установки состояния активации гена, но для поддержания этого состояния в течение длительного времени могут использоваться другие меха-

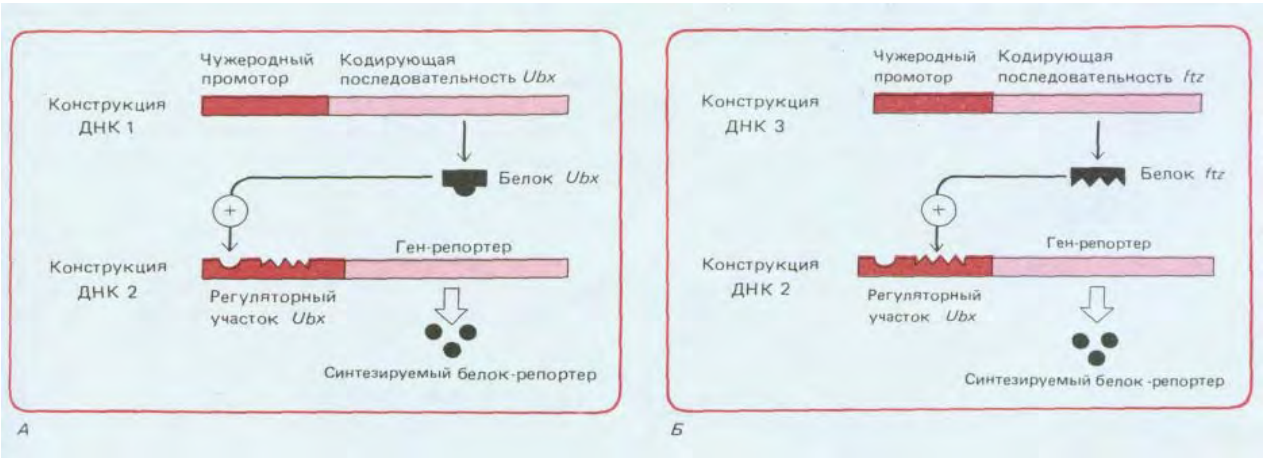


Рис. 16-73. Эксперименты, в которых были использованы клетки, трансфицированные искусственно созданными плазмидами с встроенными генами *Ultrabithorax (Ubx) u fushi tarazu (ftz),* показывают, что белки ftz *(Б)* и Ubx *(А)* могут влиять на регуляторную область гена *Ubx,* стимулируя его экспрессию. Самостимуляция *Ubx (А)* создает положительную обратную связь, которая обеспечивает самоподдерживающуюся экспрессию *Ubx* in vivo. Аналогичный эффект наблюдается для гена *Antennapedia.* На данном рисунке ситуация, однако, значительно упрощена. В реальном эмбрионе существует, по-видимому, множество регуляторных белков, которые объединяются и/или конкурируют, осуществляя контроль экспрессии этих генов.



Рис. 16-74. Мутантный эмбрион, дефектный по гену *extra sex combs (esc),* полученный от матери, у которой также отсутствует этот ген. Все сегменты трансформированы и напоминают последний брюшной сегмент (сравните с рис. 16-65). У этого мутанта характер экспрессии гомеозисных селекторных генов (сначала почти нормальный) становится нестабильным и вследствие этого вскоре наблюдается включение всех данных генов вдоль всей оси тела. (G. Struhl, Nature, **293,** 36-41, 1981.)

низмы. Тем не менее сейчас мы начинаем понимать, каким образом продукты гомеозисных селекторных генов могут использоваться одновременно в качестве молекулярных адресов, памятных записей и инструментов для регуляции активности других генов.

16.5.17. Экспрессия гомеозисных селекторных генов регулируется по принципу дифференциального сплайсинга, а также за счет контроля транскрипции [56, 61]

В широком смысле система гомеозисных селекторных генов, вероятно, обладает простой рациональной организацией и функцией. Однако в деталях существует много сложностей. Например, взаимодействия продуктов гомеозисных селекторных генов с другими генами как такового, по-видимому, недостаточно для стабилизации исходного характера экспрессии. Необходим дополнительный набор генов, и при их инактивации в результате мутации гомеозисные селекторные гены включаются независимо во всех клетках эмбриона (рис. 16-74). Постоянные отличия парасегментов друг от друга в своей основе могут быть связаны с наследуемыми изменениями регуляторных участков гомеозисных селекторных генов, которые каким-то образом подверглись импринтингу на уровне строения хроматина (см. разд. 10.3.10). Более того, несмотря на то, что комплекс bithorax определяет характер девяти парасегментов, он содержит всего 3 гена: *Ultrabithorax, abdominal-A* и *abdominal-B.* Эти гены, как и гены комплекса Antennapedia, необычайно велики. Для них характерно наличие очень сложных регуляторных последовательностей. Поэтому с каждого гена образуется набор различным образом сплайсированных транскриптов. Например, ген *Ultrabithorax* содержит примерно 75 000 пар нуклеотидов, и соответствующие ему транскрипты в зависимости от стадии развития и расположения данной клетки в эмбрионе сплайсируются по-разному. Мутации, локализованные в разных участках в пределах гена, могут воздействовать на разные парасегменты или на какие-либо части парасегментов. Так, например, мутации, локализованные в одном из участков гена *Ultrabithorax,* превращают переднюю половину жужжальца в переднюю половину крыла (см. рис. 16-72), а мутации другого участка превращают заднюю часть жужжальца в заднюю часть крыла. Эти мутации расположены в разных местах и затрагивают разные участки тела, поэтому одно время полагали, что они соответствуют разным генам; в результате они получили разные названия - *bithorax* и *postbithorax.* К настоящему времени выяснилось, что многие мутации гомеозисных селекторных генов, которые влияют на отдельные парасегменты либо части парасегментов, не являются мутациями различных генов, а могут быть отнесены к различным участкам одного и того же большого сложного гена (см. разд. 10.3.19).

16.5.18. Многие гены, контролирующие становление пространственной организации, содержат консервативные последовательности гомеобокса, кодирующего часть ДНК-связывающего белка [62]

Поразительным результатом клонирования гомеозисных селекторных генов было открытие последовательности примерно из 180 пар нуклеотидов, названной **гомеобоксом;** она с небольшими вариациями содержится практически во всех генах данного типа, а также в некоторых других генах. Например, ген группы *pair-rule (ftz)* содержит последовательность нуклеотидов, на 77% идентичную гомеобоксу *Antennapedia,* а совпадение последовательности аминокислот, которые кодируются этими генами, еще больше и достигает 83%. У дрозофилы мини-

мум 16 генов содержат гомеобокс, хотя пределы гомологии варьируют достаточно широко, и почти все гомеобокс - содержащие гены являются ключевыми среди примерно 50 генов, контролирующих пространственную организацию вдоль переднезадней оси тела. Сюда относятся гены полярности яйца *(bicoid), pair-rule-гены (ftz, even-skipped, paired),* гены полярности сегментов *(gooseberry, engrailed),* практически все гомеозисные селекторные гены из комплексов Antennapedia и bithorax. Существует как минимум один ген *(zerknüllt),* участвующий в формировании пространственной организации по дорсовентральной оси, содержащий гомеобокс. Из этих наблюдений следует, что наличие гомеобокса - один из характерных признаков генов, контролирующих становление пространственной организации.

Гены, содержащие гомеобокс, как правило, кодируют белки, локализованные в клеточных ядрах, что предполагает их прямое участие в контроле экспрессии генов. Кроме того, последовательность аминокислот, образующая гомеобокс, вероятно, позволяет белкам дрозофилы, которые ее содержат, связываться со специфическими участками ДНК, функционирующими как энхансеры и сайленсеры (разд. 10.2.7) генной экспрессии, в том числе экспрессии других содержащих гомеобокс генов.

Существование специфических регуляторных последовательностей в ДНК, узнаваемых белками, которые содержат домен, соответствующий гомеобоксу, позволяет предположить, что и они являются характерной чертой генов, содержащих гомеобокс и участвующих в формировании пространственной организации. Нетрудно представить, как такие гены с крайне незначительными различиями в регуляторных последовательностях и последовательностях, кодирующих белки, могут объединиться и образовать сложную сеть, в которой продукты одного гена контролируют экспрессию другого; подобный механизм обсуждался, когда мы рассматривали формирование пространственной организации вдоль переднезадней оси эмбриона дрозофилы. В такой системе механизмы клеточной памяти и детерминацию можно достаточно просто объяснить саморегуляцией экспрессии генов, сходной с саморегуляцией, которая была описана для генов *Ultrabithorax* (см. рис. 16-73).

16.5.19. В эволюции гомеобокс обладает высокой степенью консерватизма [62, 63]

Удивительная гомология генов, содержащих гомеобокс, дает возможность предполагать, что они возникли за счет собственной дупликации и дивергенции. Возникновение генов путем тандемной дупликации и дивергенции следует также из кластерного расположения многих этих генов в геноме дрозофилы. Комплекс Antennapedia, например, включает гены ftz, *bicoid, zerknüllt,* а также набор гомеозисных селекторных генов. Формирование кластеров генов, содержащих гомеобокс, может быть отражением их истории и не является физиологической необходимостью; у мух, у которых вследствие генетических перестроек ген *Ultrabithorax* выщеплен из комплекса bithorax, не обнаруживается никаких аномалий в строении тела.

Представляется вероятным, что по мере усложнения строения тела к геному добавляются серии измененных генов, содержащих гомеобокс. Мутанты дрозофилы, у которых отсутствуют те или иные наборы генов, содержащих гомеобокс, характеризуются фенотипическими признаками, свойственными, возможно, структурам предкового организма. Например, удалив определенные гомеозисные селекторные гены, можно получить животное с характерным расположением множества идентичных сегментов наподобие многоножки; если бы удалось пройти по пути эволюции еще на шаг назад, удалив гены полярности сегментов и гены



Рис. 16-75. *А.* Ряд сомитов (передний конец тела находится слева, задний - справа) двухдневного куриного эмбриона, окрашенных антителами, распознающими клетки нервного гребня: последние мигрируют только через переднюю половину каждого из сомитов, поскольку клетки, составляющие эту переднюю половину, существенно отличаются от клеток задней половины (в первом случае условия для миграции клеток благоприятны, во втором - нет). *Б.* Участок более взрослого куриного эмбриона, окрашенный для выявления корешков спинальных нервов в тех местах, где они проходят через сомиты. Подобно клеткам нервного гребня, нервные корешки мигрируют только через переднюю половину сомита. Результаты экспериментов по пересадке тканей показывают, что такое сегментарное строение периферической нервной системы определяется исходными различиями между передними и задними клетками сомита в отношении детерминации (это напоминает характер экспрессии гена *engrailed* у дрозофилы). *(А* - из M. Rickman, J.W. Fawsett, R.J. Keynes, J. Embryol. Exp. Morphol., 90, 437-455, 1985; *Б - с* любезного разрешения Claudio Stern.)

pair-rule, то можно было бы получить гипотетического предка, организованного наподобие нематод без сегментации, но с сохранением различив между головой и хвостом. Исходя из такой последовательности событий, ген полярности яйца *bicoid,* вероятно, можно считать предковым представителем семейства генов, содержащих гомеобокс. Конечно, это пока всего лишь плод нашего воображения, но не исключено участие такого предкового гомеобокс-содержащего гена в формировании пространственной организации тела, так как именно эту функцию выполняют практически все его потомки у дрозофилы.

Открытие гомеобокса ставит перед нами вопросы более широкого эволюционного значения. Гомеобокс-содержащие гены обнаружены не только у насекомых и других членистоногих, но и у нематоды *C. elegans, у* кольчатых червей (пиявок и дождевых червей), у морских ежей, примитивных хордовых и у позвоночных (включая лягушек, кур, мышей и человека). Гомеобоксная последовательность обладает удивительной степенью консерватизма на уровне структуры белка; один из белков, соответствующих гомеобокс-содержащему гену *Xenopus,* обладает последовательностью, 59 из 60 аминокислот которой идентичны гомеодомену в белке Antennapedia дрозофилы; и это несмотря на 500 млн. лет независимой эволюции. Такая высокая степень консерватизма позволяет предполагать, что механизмы, контролирующие основной план строения тела у насекомых и позвоночных, могут иметь фундаментальное сходство.

16.5.20. Механизмы региональной клеточной детерминации у позвоночных и насекомых могут быть сходными [63, 64]

Описывая строение раннего зародыша дрозофилы (разд. 16.5.2), мы отмечали сходство с позвоночными. Животные и того, и другого класса в своем развитии проходят через стадию гаструляции, обеспечивающую появление различных зародышевых листков; тело представителей обоих классов подразделяется на сегменты, располагающиеся более или менее перпендикулярно по отношению к закладкам зародышевых листков. Сомиты эмбриона позвоночных и сегменты эмбрионов дрозофилы внешне сходны, но анализ их поведения показывает, что они обладают различными позиционными значениями, которые и определяют их (сомитов) дальнейшую дифференцировку. Как и в случае имагинальных дисков дрозофилы, такую позиционную детерминацию можно продемонстрировать в экспериментах по трансплантации. Так, например, у ранних куриных эмбрионов вновь формирующиеся сомиты можно пересадить на другое место. На этой стадии грудные и шейные сомиты внешне практически неразличимы, хотя грудные сомиты после пересадки в область шеи дадут начало грудным позвонкам с ребрами, а сомиты шеи после пересадки в область груди дают начало характерным шейным позвонкам. На этом сходство не заканчивается. Известно, что каждый сегмент тела насекомых делится на передний и задний компартменты, отличающиеся друг от друга по экспрессии генов *engrailed.* Так же резко различаются по своей химической природе передние и задние половины сомитов куриного зародыша (рис. 16-75), что проявляется в свойствах клеточной поверхности, регистрируемых с помощью некоторых лектинов, а также в их влиянии на направление роста нервных волокон.

После открытия гомеобокса появилась возможность проверить, не являются ли такие аналогии отражением распределения определенных молекул. К настоящему времени было показано, что последовательность нуклеотидов некоторых из гомеобокс-содержащих генов позвоночных гомологичны соответствующим генам дрозофилы и эта гомология простирается за пределы гомеобокса; с помощью метода гибридиза-

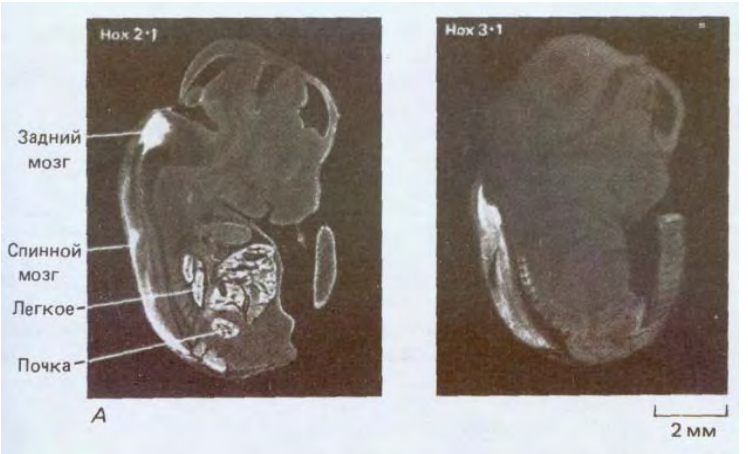




Рис. 16-76. *А.* Характер экспрессии двух гомеобокс-содержащих генов мыши, *Hox 2.1* и *Hox* 3.1, выявляемый по методу гибридизации in situ в соседних продольных срезах через весь 13,5-дневный эмбрион мыши. Высокая концентрация транскриптов соответствует высокой концентрации зерен серебра на радиоавтографах. Два этих гена экспрессируются в различных, частично перекрывающихся участках вдоль переднезадней оси в головном и спинном мозге, а также в некоторых других тканях. *Б.* Характер экспрессии гомеобокс-содержащего гена курицы (куриного *а),* обладающего особенно близкой гомологией с геном *engrailed* дрозофилы. В данном случае были использованы антитела, демонстрирующие распределение в двухдневном курином эмбрионе белка, кодируемого этим геном. В отличие от своего аналога у дрозофилы, который образует серию сегментных полос, белок en у курицы локализуется в виде отдельного скопления в среднем и заднем мозге. *(А - из* P. W.H. Holland, B.L. M. Hogan, Development, **102,** 159-174, 1988; *Б - с* любезного разрешения Tom Kornberg.)

ции in situ было показано, что эти гены позвоночных экспрессируются в строго определенных участках эмбриона позвоночных (рис. 16-76). Эти данные позволяют считать, что молекулярные механизмы формирования пространственной организации у позвоночных и насекомых в своей основе очень схожи, однако оценить масштабы сходства до сих пор не представляется возможным. Например, у позвоночных пространственная организация обеспечивается в основном межклеточными взаимодействиями на стадиях дробления. Здесь нет аналога процессам, которые происходят в синцитиальном зародыше насекомых. Более того, многие специалисты по филогенезу полагают, что сегментированность тела у этих групп животных возникла в процессе эволюции независимо. К сожалению, приходится отметить, что у позвоночных не зарегистрировано ничего даже отдаленно напоминающего гомеозисные мутации, сходные с таковыми у дрозофилы. И если это так, то возникают сомнения, что исследования дрозофилы помогут внести существенный вклад в выявление общей взаимосвязи между генами и пространственной организацией тела у всех организмов.

Заключение

Тело дрозофилы, как и тело других насекомых, состоит из набора повторяющихся модифицированных базовых модулей (сегментов) со специализированными несегментированными структурами на переднем и заднем концах тела. Любое крупное подразделение каждого из сегментов определяется экспрессией особого набора контролирующих генов, уточняющих молекулярные адреса этих подразделений. Пространственная организация начинает формироваться с возникновения асимметрии яйцеклетки. Здесь можно различить две группы генов с материнским

эффектом, которые также называют генами полярности яйца. Одна группа этих генов отвечает за дорсовентральное распределение зародышевых листков и основных видов тканей, а другая - за переднезаднее (от головы к хвосту) расположение сегментов. Примером гена этого последнего класса служит ген bicoid, мРНК которого концентрируется на переднем конце яйца. Поскольку зародыш на начальных этапах развития представляет собой синцитий, продукт гена bicoid способен легко диффундировать через цитозоль по всему эмбриону, создавая градиент морфогена, определяющий общую организацию передней половины эмбриона. Этот градиент запускает упорядоченную экспрессию иерархически организованной структуры генов, образованной генами групп gap и pairrule, генами полярности сегментов и гомеозисными селекторными генами. Эти последние гены под влиянием гена bicoid и взаимодействия между собой начинают экспрессироваться в отдельных участках эмбриона, что постепенно приводит к разделению тела на повторяющиеся сегменты и их части.

Экспрессия генов группы gap и pair-rule носит временный характер, но она накладывает отпечаток на экспрессию генов полярности сегментов и гомеозисных селекторных генов; экспрессия этих последних генов *сохраняется, подвергаясь некоторым уточнениям в процессе дальнейшего развития и обеспечивает клетки позиционной информацией. Механизм клеточной памяти частично обеспечивается положительной обратной связью (предполагающей, что белковые продукты гомеозисных селекторных генов стимулируют транскрипцию собственных генов) и частично наследуемыми изменениями структуры хроматина. Необходимость некоторых форм запоминания позиционных значений можно продемонстрировать в экспериментах на клетках имагинальных дисков, из* которых *возникают наружные структуры тела взрослого организма; эти* клетки *сохраняют память о своих исходных назначениях в течение неопределенного числа клеточных делений. Такое поведение определяется постоянным присутствием гомеозисных селекторных генов в каждой отдельной клетке любого имагинального диска. Границы компартментов, которые, по всей вероятности, поддерживаются благодаря избирательному* слипанию *отдельных клеток, делят клетки, характеризуемые различным состоянием дифференцировки, согласно экспрессии этих генов.*

В геноме гомеозисные селекторные гены сгруппированы в два класса: комплекс Antennapedia *и комплекс* bithorax. *Все они содержат гомеобоксную последовательность, которая кодирует высококонсервативную последовательность примерно из 60 аминокислот. Эта нуклеотидная последовательность присутствует и в некоторых генах полярности яйца, генах группы pair-rule, генах полярности сегментов, что свидетельству об общности эволюционного происхождения этих генов из гена-предшесвенника, который принимал участие в регуляции формирования пространственной организации. Гены, содержащие гомеобокс, обнаружены у различных животных, в том числе у круглых червей и млекопитающих. позволяет предположить, что становление пространственной организации у этих животных основано на молекулярных механизмах, сход с молекулярными механизмами, действующими у дрозофилы.*

16.6. Органогенез: координированная сборка сложных тканей

Формирование пространственной организации до сих пор рассматривалось нами с точки зрения изменения свойств клеток и при этом гор меньше внимания уделялось их положению; мы следили за нарастанием этих изменений в отдельной ткани, в частности, у дрозофилы мы рассматривали эпидермис, а в конечностях позвоночных - соединитель-

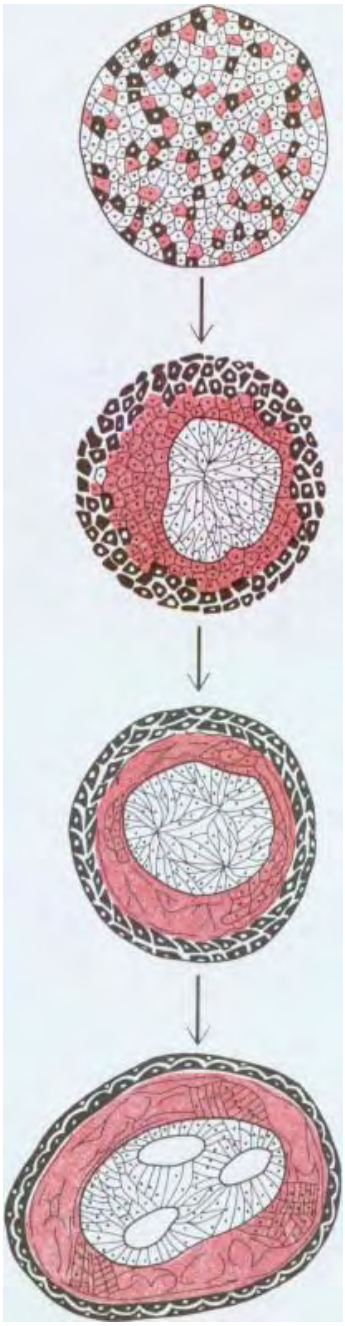


Рис. 16-77. Клетки различных участков раннего эмбриона амфибий сортируются в соответствии со своим происхождением. В классическом эксперименте, который схематически представлен на этом рисунке, клетки мезодермы, нервной пластинки и эпидермиса были дезагрегированы. После пересортировки клетки формируют структуру, похожую на нормальный эмбрион с «нервной трубкой» внутри, эпидермисом снаружи и мезодермой между ними. (P. L. Townes, J. Holtfreter, J. Exp. Zool., **128,** 53-120, 1955; с небольшими изменениями.)

ную ткань скелета. Однако на самом деле вследствие сложных движений в эмбриогенезе все органы представляют собой сложное сочетание различных тканей, образованных клетками, которые происходят из разных источников и руководствуются различными правилами. Клеточные движения позволяют собрать все эти компоненты воедино. В этом последнем разделе мы рассмотрим, каким образом позиционная информация управляет клеточными движениями и координирует построение сложных органов, каковыми являются конечности.

16.6.1. Избирательное слипание стабилизирует клеточные структуры, образованные по-разному детерминированными клетками [65, 66]

В процессе развития животного клетки движутся, пролиферируют и приходят в контакт друг с другом, вследствие чего потомки этих клеток перемешиваются. У химерных зародышей мыши, например, перемешаны клетки двух исходных морул, вследствие чего во взрослом организме хаотически перемешаны клетки двух генотипов (см. разд. 16.2.5). Но если нарушение расположения клеток происходит после их детерминации, то могут наблюдаться нарушения в пространственном распределении клеток, характеризующихся различными состояниями. Приобретение клетками свойств, определяемых их положением, предупреждает возможность случайного перемешивания клеток. Феномен компартментов у дрозофилы (см. рис. 16.5.15) демонстрирует один из способов достижения этого. Вероятно, детерминированные клетки остаются в соответствующих компартментах за счет селективного слипания с клетками, обладающими таким же состоянием детерминации. Клетки, экспрессирующие одинаковые молекулярные адреса, по всей вероятности, слипаются между собой сильнее, чем клетки с иными молекулярными адресами. Очевидно, позиционная информация, записанная в результате активации таких генов, как *engrailed* и *Ultrabithorax,* проявляется посредством определенного выбора молекул адгезии клеточной поверхности.

У ранних эмбрионов амфибий стабилизирующие эффекты межклеточной адгезии в отношении организации структуры, обеспечивающей взаимное расположение различных клеточных типов, вероятно, настолько сильны, что способны восстанавливать нормальное расположение даже после искусственной диссоциации клеток, приводящей к образованию бесформенной неупорядоченной массы клеток. Клетки мезодермы, нейральной пластинки и клетки эпидермиса способны, сортируясь из такой смеси, формировать структуры с эпидермисом снаружи, мезодермой под эпидермисом и структурой, напоминающей нервную трубку, внутри (рис. 16-77). Исследования, проведенные на курином и мышином эмбрионах, дают основания полагать, что такое поведение определяется, по крайней мере частично, семейством Ca^{2+} - зависимых гликопротеинов *(кадгеринов),* обеспечивающих клеточную адгезию (см. разд. 14.3.7). Эти и другие Ca^{2+}-зависимые молекулы клеточной адгезии, такие, как N-CAM (см. разд. 14.3.6), дифференциально экспрессируются в различных тканях раннего эмбриона и антитела против этих молекул нарушают нормальную селективную адгезию клеток одного типа.

16.6.2. Пространственные структуры, образуемые молекулами клеточной адгезии, регулируют характер морфогенетических движений [66, 67]

Изменение характера экспрессии различных кадгеринов тесно коррелирует с изменением ассоциации клеток в процессе гаструляции, нейруля-



Рис. 16-78. Изменение характера экспрессии трех кадгеринов на нескольких последовательных стадиях раннего развития куриного или мышиного эмбрионов, показанное на поперечных срезах через развивающуюся нервную трубку и сомиты. Кадгерины, расположенные определенным образом, могут содействовать регуляции морфогенетических движений, участвующих в образовании нервной трубки, хорды, сомитов, нервного гребня и склеротомов. (M. Ta-keichi, Trends in Genetics, 8, 213-217, 1987.)

ции и формирования сомитов (рис. 16-78); такие изменения в раннем эмбриогенезе могут регулироваться и по крайней мере частично зависеть от распределения кадгеринов. В частности, кадгерины, вероятно, играют важную роль в контроле образования и рассасывания эпителиальных слоев и клеточных кластеров. Следовательно, движения, участвующие в построении раннего зародыша, определяются характером химических различий между клетками, расположенными в разных местах.

Это же общее положение иллюстрируется многочисленными иными примерами. Эпителий имагинального диска дрозофилы в процессе образования крыла взрослого организма должен выпрямиться, вытянуться и уложиться определенным образом. Хотя этот процесс во многом остается загадочным, он, вероятно, определяется локализованной экспрессией специфических молекул адгезии клеточных поверхностей, которые к настоящему времени начинают идентифицировать с помощью моноклональных антител. Распределение таких *позиционно специфических* молекул клеточной поверхности тесно коррелирует с характером укладки диска в процессе метаморфоза (рис. 16-79); некоторые из этих молекул, как было показано, относятся к семейству поверхностных рецепторов клетки, именуемых *интегринами* (разд. 14.2.17). В отличие от кадгеринов интегрины опосредуют присоединение клеток к компонентам внеклеточного матрикса. Ранее было показано, что такие взаимодействия клеток с матриксом выполняют важную роль в процессе гаструляции (см. разд. 16.1.5). Молекулы межклеточной адгезии и молекулы адгезии клеточной поверхности и матрикса можно рассматривать как два вида ключевых приспособлений для трансляции определенной структуры позиционной информации в пространственную организацию морфогенетических движений.

16.6.3. У позвоночных первичным носителем позиционной информации является мезодерма [68]

Совершенно очевидно, что позиционная информация, которой обладают клетки, может проявляться по-разному. Это особенно хорошо иллюстрируется на примере развития сложных органов. Конечность позвоночных образуется клетками шести различных типов, формирующими соединительную ткань (кости, сухожилия и т. д.), эпидермис, мышцы, выстилку кровеносных сосудов, аксоны нервных клеток и их глиальные оболочки, пигментные клетки и кроветворную ткань костного мозга. И хотя все эти компоненты обладают собственной, хорошо определенной структурой, они вносят разный вклад в формирование конечности как таковой. У мух, размеры которых невелики, поверхность тела по отношению к объему очень велика, и эпидермис, образуемый эктодермой, играет

Рис. 16-79. Имагинальный диск дрозофилы, обработанный моноклональными антителами, которые распознают позиционно-специфический антиген PS2. Четкая граница окрашенного участка соответствует краю будущего крыла, где дорсальный и вентральный эпителий крыла встречаются, образуя складку. Прерывистой линией отмечена граница компартментов вдоль переднезадней оси. (V.C. Wilcox, D.L. Bower, R.J. Smith, Cell, 25, 159-164, 1981.)

доминирующую роль как в образовании экзоскелета, обеспечивающего механическую опору, так и в координации процессов формирования пространственной организации. У позвоночных, которые значительно крупнее насекомых, роли зародышевых листков изменены. Опорный каркас тела образуется соединительными тканями (главным образом за счет мезодермы); далее мы увидим, что эти ткани играют также координирующую роль в формировании пространственной организации во время органогенеза. И действительно, эксперименты на амфибиях в начале этого столетия показали, что мезодерма играет важнейшую роль в закладке пространственной организации уже на самых ранних стадиях становления общего плана строения тела.

Как уже упоминалось (см. разд. 16.1.7-16.1.9), нервная система позвоночных формируется из эктодермы под индуцирующим воздействием подстилающей ее мезодермы. Если кусочек мезодермы, расположенный непосредственно под областью будущей нервной трубки одного гаструлирующего зародыша амфибии, пересадить под эктодерму на брюшной стороне другого зародыша, то эктодерма в этом участке начнет утолщаться и сворачиваться, образуя в этом необычном месте отрезок нервной трубки. При этом особенности данного отрезка будут зависеть от происхождения мезодермы. Если мезодерма была взята из переднего участка, то из эктодермы образуется часть головного мозга; мезодерма из заднего участка вызовет образование участка спинного мозга. Это позволяет предположить, что клетки эктодермы приобретают определенные позиционные значения в зависимости от позиционных значений лежащих непосредственно под ними клеток мезодермы.

Регуляция формирования пространственной организации со стороны подстилающей соединительной ткани наблюдается при развитии многих органов позвоночных. Так, кожа и кишка со всеми их железами, придатками и локальной спецификацией приобретают характерное для них строение вследствие определенных взаимодействий, в которых компоненты соединительной ткани обеспечивают соответствующие участки эпителия соответствующей позиционной информацией. Хорошим примером тому являются эксперименты на коже, покрывающей конечности.

16.6.4. Характер и распределение производных эпидермиса контролируется дермой [66, 69]

Кожа состоит из двух слоев - эпидермиса (представляющего собой эпителий, образованный эктодермой) и дермы (являющейся соединительной тканью, образованной фибробластами, происходящими в основном из мезодермы). Из эпидермиса формируются кератинизированные придатки кожи (волосы, перья, чешуи и когти), а также многие железы. Для разных участков тела характерны различные виды кератинизированных производных: на спине, крыльях и верхних частях ног, например у курицы, располагаются ряды перьев (рис. 16-80), а на нижних частях ног - ряды чешуй. Более того, в зависимости от положения в пределах каждого ряда перья и чешуи могут различаться по форме и цвету.

Если у куриного эмбриона взять эпидермис с ноги, где он позже образует чешуи, и объединить с дермой спины, где он в норме образует перья, то из него вместо чешуи в дальнейшем будут формироваться перья, (рис. 16-81); обратная комбинация приводит к противоположному результату. Вообще дерма контролирует не только тип производных эпидермиса, но и их точное местоположение. Здесь мы вновь встречаемся с проявлением неэквивалентности (см. разд. 16.4.6): дерма разных участков тела внешне одинакова, но различается по своей способности

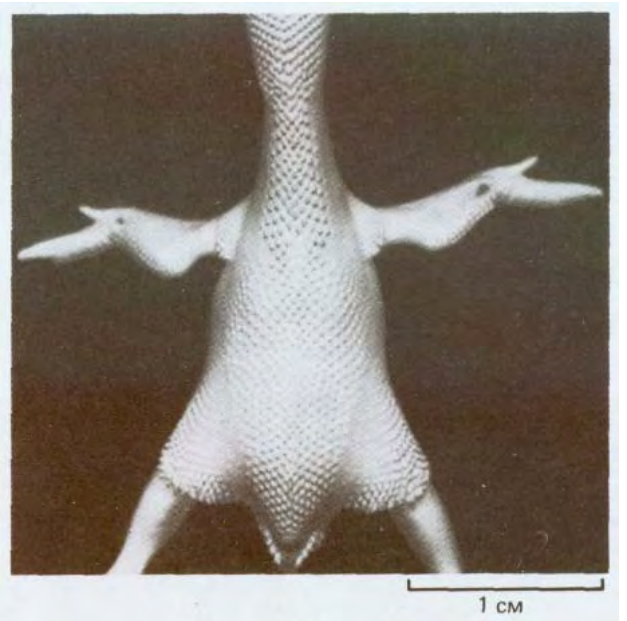


Рис. 16-80. Расположение перьевых зачатков на спине куриного эмбриона после 9 сут инкубации. Обратите внимание, что зачатки в каждом ряду разделены одинаковыми промежутками. (С любезного разрешения A. Mauger, P. Sengel.)

индуцировать определенную дифференцировку лежащего над ней эпидермиса.

Молекулярные механизмы, посредством которых соединительная ткань контролирует дифференцировку эпителия, неясны, но некоторый успех достигнут в идентификации молекул, контролирующих морфогенетические движения клеток, которые дают начало волосам, перьям или железам. И здесь также решающее значение имеют межклеточные типы адгезии, равно как и адгезия клеток с матриксом. В соединительнотканном компоненте данной структуры механические воздействия, оказываемые на коллаген, секретируемый фибробластами, приводят к агрегации последних в участках образования различных придатков. В то же время в соединительной ткани и лежащем над ней эпителии наблюдаются изменения характера экспрессии молекул клеточной адгезии, таких, как N-CAM и E-кадгерин, которые, по всей вероятности, регулируют форму клеток и их взаимную упаковку (см. разд. 14.3.6 и 14.3.7). На границе между эпителием и соединительной тканью происходит синтез и разложение различных компонентов базальной пластинки (см. разд. 14.2.15), в том числе ламинина, протеогликанов и коллагена; при этом локализация как синтеза, так и разрушения строго контролируются, что способствует осуществлению регуляции процессов разрастания эпителия и формирования складчатости.

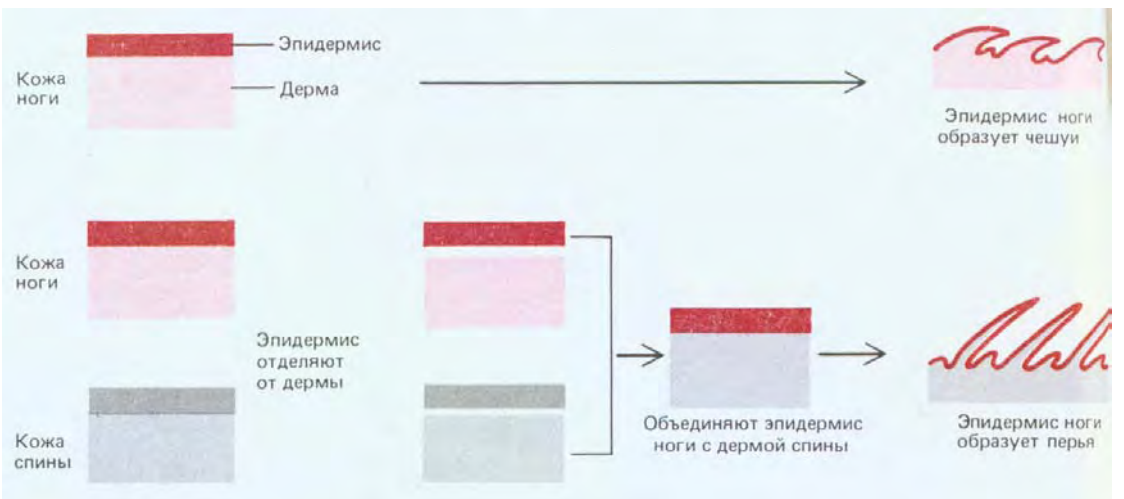


Рис. 16-81. Схема опытов, в которых было показано, что тип производных кожи определяется дермой.

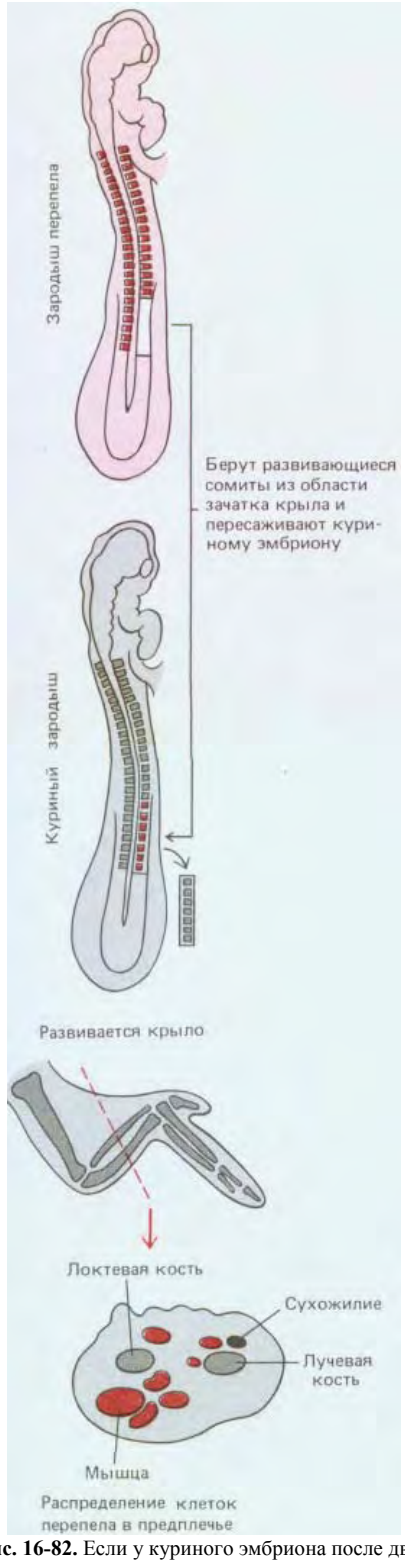


Рис. 16-82. Если у куриного эмбриона после двух суток инкубации заменить клетки сомитов такими же клетками перепела и спустя неделю приготовить гистологические препараты из области крыла, то окажется, что мышечные клетки крыла образовались из трансплантированных сомитов перепела.

16.6.5. Соединительную ткань конечности позвоночных заселяют многие типы мигрирующих клеток [11, 70]

Соединительная ткань пронизывает все тело позвоночных. В конечности соединительная ткань формирует кости и хрящи, сухожилия и связки, кожу, оболочку мышц, внешние слои стенок кровеносных сосудов и оболочки нервов и промежуточную ткань, связывающую воедино все эти компоненты. Эти формы соединительной ткани образованы фибробластами и близкородственными клетками, которые погружены в обогащенный коллагеном внеклеточный матрикс, секретируемый ими. И все эти разнообразные клетки развиваются из *мезенхимы* недифференцированной зародышевой ткани, заполняющей зачаток эмбриональной конечности; ее происхождение можно проследить вплоть до *мезодермы боковой пластинки,* соседствующей с сомитами ранних эмбрионов (см. рис. 16-15). Кроме покрывающего конечность эпидермиса, все остальные компоненты конечности являются производными популяции мигрирующих клеток, не являющихся производными боковой пластинки. Прежде чем достигнуть места назначения и принять участие в формировании структуры взрослого животного, эти клетки должны совершить длительное путешествие по эмбриональной соединительной ткани.

Такая миграция была продемонстрирована в опытах с пересадкой куриным зародышам эмбриональных клеток перепела. Хотя перепел во многом напоминает курицу, его клетки легко отличить на гистологических препаратах, так как они содержат крупную, сильно окрашивающуюся глыбку гетерохроматина, связанного с ядрышком. Такой ядрышковый маркер позволяет легко опознать пересаженные клетки, куда бы они ни попали внутри эмбриона. Если у куриного зародыша еще до закладки крыльев заместить ткань определенной группы сомитов такой же тканью от перепела, то все мышечные клетки крыльев (и только они) будут происходить от перепела (рис. 16-82). Очевидно, будущие мышечные клетки мигрируют в область закладки крыла и остаются здесь внешне неотличимыми от других клеток, но уже детерминированными, пока не наступит время их дифференцировки.

Еще одним важным примером мигрирующих клеток являются клетки, происходящие из **нервного** гребня - участка, расположенного вблизи нервной трубки (рис. 16-83) (см. разд. 16.11.9). Способность этих клеток мигрировать была доказана сходным образом после замены нервного гребня у цыпленка нервным гребнем перепела; идентификация клеток нервного гребня перепела проводилась по ядрышковому маркеру. Как и глиальные клетки, которые образуют оболочку аксонов нервных клеток, пигментные клетки конечности происходят из клеток нервного гребня. Чувствительные и вегетативные аксоны конечностей являются выростами нейронов, возникших из клеток нервного гребня. (Аксоны, обеспечивающие произвольные движения, напротив, являются выростами двигательных нейронов спинного мозга).

16.6.6. Пространственная организация соединительной ткани конечности не зависит от заселяющих эту ткань клеток

[71]

Если у раннего зародыша до начала образования почки конечности разрушить ткань сомитов или нервного гребня и/или нервной трубки, то можно легко получить конечности, лишенные определенных классов мигрирующих клеток или нервных волокон. В общем такие конечности во многих отношениях вполне нормальны. Можно, например, получить конечности, не содержащие мышечных клеток, но в них имеются нормальный скелет, кожа и чувствительные нервы; даже сухожилия разви-

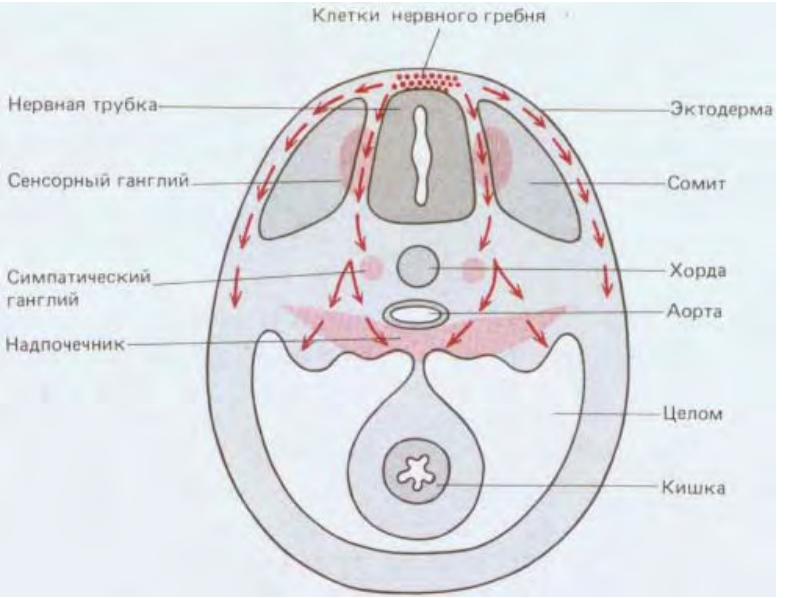


Рис. 16-83. Главные пути миграции клеток нервного гребня у куриного эмбриона (схематический поперечный разрез средней части тела). Из клеток, мигрирующих непосредственно под эктодермой (поверхностный путь), образуются пигментные клетки кожи; клетки, движущиеся по глубинному пути через сомиты, дают начало сенсорным и симпатическим ганглиям, и частично надпочечникам (см. также рис. 14-55).

ваются нормально, хотя затем, в отсутствие тянущих их мышц, постепенно дегенерируют. Точно так же в конечности, лишенной нервов и всех производных клеток нервного гребня, развивается нормальный скелет, кожа и мышцы, однако затем мышцы, лишенные нервной стимуляции, постепенно дегенерируют. Внутренние структуры конечности в отсутствие всего эпидермального покрова не будут развиваться нормально, однако частичное удаление довольно значительных участков эпидермиса не нарушает нормального развития.

Таким образом, пространственная организация соединительной ткани практически не зависит от других компонентов конечности. Более того, эти другие компоненты конечности обладают собственной, пространственной организацией, становление которой в значительной степени определяется соединительной тканью. Мы уже обсуждали, как это происходит, на примере эпидермиса (см. рис. 16-81); с помощью аналогичных экспериментов по трансплантации ткани можно показать, что это же справедливо в отношении популяций мигрирующих клеток, таких, как мышечные клетки, аксоны нервных клеток и пигментные клетки. Клетки всех этих типов в основном формируют структуру, сообразуясь с конечностью хозяина, независимо от того, из какого участка эмбриона они происходят. Если соединительная ткань как таковая является чем-то вроде центрального источника и хранилища позиционной информации конечности позвоночных, то каким образом она оказывает свое организующее влияние на мигрирующие клетки?

16.6.7. Соединительная ткань определяет пути перемещения и конечный адрес мигрирующих клеток [11, 72]

В принципе существует пять основных способов, посредством которых соединительная ткань контролирует популяции клеток, заселяющих ее. Она может определять:

1) пути, по которым клетки перемещаются;
2) участки, куда прибывают мигрирующие клетки;
3) масштабы пролиферации;
4) способ дифференцировки;
5) вероятность выживания.

Значение каждого из этих способов контроля варьирует в зависимости от типа мигрирующих клеток, но ни один из них не изучен достаточно полно. В самом деле, практически ничего не известно о молекулярных основах системы позиционных значений соединитель-

ной ткани, на которой базируется ее пространственная организация. В настоящее время для выявления позиционно зависимых различий в распределении поверхностных молекул клетки только начинают применять моноклональные антитела.

Однако некоторые общие принципы клеточной миграции начинают проясняться. Поведение всех мигрирующих клеток определяется механизмами клеточной адгезии и узнавания, рассмотренными в гл. 14; эти механизмы служат основными предпосылками нормального органогенеза. В частности, клетки в процессе миграции должны входить в тесный контакт с внеклеточным матриксом или поверхностью других клеток. Фибронектин - это тот внеклеточный матрикс, который, по всей вероятности, является важнейшим (хотя и не единственным) компонентом субстрата для многих мигрирующих клеток; антитела и пептиды, блокирующие фибронектиновые рецепторы клеточной поверхности, способны влиять на миграцию клеток нервного гребня во многих участках эмбриона; так, например, они блокируют миграцию клеток в процессе гаструляции (см. разд. 16.1.5). Общность некоторых механизмов, участвующих в обеспечении перемещения мигрирующих клеток к местам назначения, становится более понятной в результате исследований мутантных мышей, несущих мутации *Steel* или *dominant-spotting*. У таких мутантов пигментные, кроветворные и первичные половые клетки не способны достигнуть места своего назначения соответственно в коже, костном мозге и гонадах. Мутация *dominant-spotting* приводит к дефекту собственно мигрирующих клеток; мутанты *Steel* обладают дефектами соединительной ткани, в которой поселяются мигрирующие клетки.

Мы только начинаем постигать механизм, посредством которых соединительная ткань конечностей регулирует миграцию клеток по специфическим путям или, иными словами, направляет их по определенным адресам, однако можно с определенностью утверждать, что такое направление определяется позиционной информацией, которая заложена в клетках соединительной ткани. Так, например, поверхность клеток с иными позиционными значениями может обладать иными свойствами или секретировать иные компоненты внеклеточного матрикса. Перемещаясь по соединительной ткани, клетка постоянно образует выросты, анализируя ими ближайшее окружение и оценивая слабо выраженные сигналы, в отношении которых эти клетки обладают особой чувствительностью за счет специфического отбора поверхностных белков-рецепторов. Внутри клетки эти рецепторные белки соединены с цитоскелетом, обеспечивающим ее перемещение. Образованные в разных участках выступы клеточной поверхности как бы находятся в постоянном состоянии «перетягивания каната», что приводит к перемещению клетки в направлении наиболее прочного соединения с поверхностью субстрата (см. разд. 11.6.4), пока клетка не достигнет участка, где силы адгезии уравновешены или столь велики, что клетка не в состоянии отделиться от поверхности. В этом перемещении важную роль играет хемотаксис, а также взаимодействие мигрирующих клеток (см. разд. 14.3); эти процессы могут приводить либо к остановке и скапливанию клеток в одном участке, либо к их широкому распространению за счет взаимного отталкивания.

16.6.8. При исследовании развития нервной системы возникает ряд особых проблем [73]

Обсуждение миграции клеток привело нас к теме, которая в целом до сих пор не рассматривалась. Это - развитие нервной системы. Процесс этот представляется одним из наиболее загадочных. Фундаментальные вопросы биологии развития, рассмотренные в этой главе, можно суммиро-

вать следующим образом: как в организме возникают различные типы клеток и как эти клетки попадают в соответствующие для них места. Нервная система ставит перед ними еще одну проблему: каким образом между клетками образуются правильные соединения? Большую часть клеток других типов можно рассматривать как точечные объекты, каждый из которых занимает определенное положение и обладает определенными внутренними свойствами. Однако нейрон по своей сути не является точечным объектом: он необычайно увеличен за счет длинного аксона и дендритов, связывающих его с другими клетками. Если эти связи ошибочны, то работа нервной системы будет нарушена. Процессы возникновения различных типов нейронов и упаковки их клеточных тел в регулярную структуру можно объяснить, основываясь на тех же принципах, что и в случае остальных клеток. Но упорядоченный рост аксонов и дендритов и образование правильной системы синапсов представляют собой явления иного порядка. Передний конец растущего аксона или дендрита ползет примерно так же, как и мигрирующая клетка: его можно назвать мигрирующим органом неподвижной клетки. Факторы, контролирующие его движение, в некотором смысле такие же, что и факторы, контролирующие движение клеток; это - специфические типы адгезии и т. д. Но в процессе изучения взаимосвязи аксонов с другими клетками, их взаимодействия с иными нервными окончаниями и способности образовывать синапсы перед нами возникают новые проблемы, требующие иного подхода. Поэтому мы откладываем обзор строения нервной системы *(движущей силы* развития) до гл. 19.

Заключение

Позиционные значения, приобретаемые клетками в процессе пространственной организации зародыша, выражаются адгезионными свойствами их поверхности, а также их внутренним химизмом. Клетки одного тит стремятся взаимодействовать между собой и отделяются от иных, отличающихся от них клеток; таким образом происходит стабилизация пространственной организации и обеспечивается способность клеток к спонтанной сортировке при их искусственном смешивании. Изменение характера адгезионных свойств лежит в основе морфогенетических процессов, таких, как гаструляция, нейруляция и формирование сомитов. Поскольку характер позиционных значений данного класса клеток проявляется через изменение свойств клеточной поверхности, он может управлять миграцией других популяций эмбриональных клеток в процессе сборки сложных тканей или органов. Вероятно, у позвоночных клетки соединительной ткани являются первичными носителями позиционной информации. Клетки соединительной ткани дермального слоя кожи способны контролировать региональную специализацию эпидермиса, формирующего перья и чешуи. Сходным образом клетки соединительной ткани конечности контролируют и координируют образование структур, формируемых популяциями мигрирующих клеток, к числу которых относятся мышечные клетки (производные сомитов), аксоны нервных клеток (от центральной нервной системы и периферических ганглиев) и пигментные клетки (производные нервного гребня). Несмотря на то что **к** *настоящему времени идентифицированы многие молекулы клеточной адгезии общего назначения, а также показано, что некоторые из* них *выполняют в этих процессах центральную роль, молекулярные механизмы, направляющие миграцию клеток по определенным маршрутам* к *строго определенным местам назначения в конечностях, до сих пор неизвестны.*

Литература

Общая

Browder L. Developmental Biology, 2nd ed. Philadelphia, Saunders, 1984. *Gilbert S.F.* Developmental Biology, 2nd ed. Sunderland, MA, Sinauer, 1988. Molecular Biology of Development. Cold Spring Harbor Symp. **50,** 1985. *Slack J. M. W.* From Egg to Embryo: Determinative Events in Early Development.
Cambridge, U.K., Cambridge University Press, 1983. *Spemann H.* Embryonic Development and Induction. New Haven, Yale University
Press, 1938. (Reprinted, New York, Garland, 1988.)
Walbot V. Holder N. Developmental Biology. New York, Random House, 1987.
Weiss P. A. Principles of Development. New York, Holt, 1939.

Цитированная

1. *Browder L. W. ed.* Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis. Vol. 2: The Cellular Basis of Morphogenesis. New York, Plenum, 1986.
Gerhart J., et al. Amphibian early development. Bioscience, **36,** 541-549, 1986.
Slack J. M. W., ed. Early Amphibian Development. J. Embryol. Exp. Morphol., Suppl., **89,** 1985.
Trinkaus J. P. Cells into Organs: The Forces that Shape the Embryo, 2nd ed., Englewood Cliffs, NJ, Prentice Hall, 1984.
2. *Gerhart J. C.* Mechanisms regulating pattern formation in the amphibian egg and early embryo. In Biological Regulation and Development (R. F. Goldberger, ed.), Vol. 2, pp. 133-316, New York, Plenum, 1980.
Gerhart J., Ubbels G., Black S., Hara K., Kirschner M. A reinvestigation of the role of the grey crescent in axis formation of *Xenopus laevis. Nature,* 292, 511-516, 1981.
Vincent J. P., Oster G. F., Gerhart J. C. Kinematics of gray crescent formation in *Xenopus* eggs: the displacement of subcortical cytoplasm relative to the egg surface. Dev. Biol. **113,** 484-500, 1986.
3. *Gilbert S. F.* Developmental Biology, 2nd ed., pp. 73-111, Sunderland, MA, Sinauer, 1988.
Kirschner M., Newport J. Gerhart J. The timing of early developmental events in *Xenopus.* Trends Genet**., 1,** 41-47, 1985.
Wilson E.B. The Cell in Development and Heredity, 3rd ed., pp. 980-1034. New York, Macmillan, 1925. (Reprinted, New York, Garland, 1987.)
4. *Furshpan E. J., Potter D. D.* Low-resistance junctions between cells in embryos and tissue culture. Curr. Top. Dev. Biol., **3,** 95-128, 1968.
Kalt M. R., The relationship between cleavage and blastocoel formation in *Xenopus laevis.* II. Electron microscopic observations. J. Embryol. Exp. Morphol., **26,** 51-66, 1971.
Warner A. The role of gap junctions in amphibian development. J. Embryol. Exp. Morphol., Suppl., **81,** 365-380, 1985.
5. *Fink R. D.,* McClay D. R. Three cell recognition changes accompany the ingression of sea urchin primary mesenchyme cells. Dev. Biol., **107,** 66-74, 1985.
Gustafson T., Wolpert L. Cellular movement and contact in sea urchin morphogenesis. Biol. Rev., 42, 442-498, 1967.
Hardin J. D., Cheng L. Y. The mechanisms and mechanics of archenteron elongation during sea urchin gastrulation. Dev. Biol., **115,** 490-501, 1986.
McClay D.R., Wesel G.M. The surface of the sea urchin embryo at gastrulation: a molecular mosaic. Trends Genet., 1, 12-20, 1985.
Wilt F. H. Determination and morphogenesis in the sea urchin embryo. Development, **100,** 559-575, 1987.
6. *Ettensohn C.A.* Mechanisms of epithelial invagination. Q. Rev. Biol., **60,** 289-307, 1985.
McClay D. R., Ettensohn C. A. Cell adhesion in morphogenesis. Annu. Rev. Cell. Biol**., 3,** 319-345, 1987.
Odell G. M., Oster G., Alberch P., Bernside B. The mechanical basis of morphogenesis. I. Epithelial folding and invagination. Dev. Biol., 85, 446-462, 1981.
7. *Gerhart J., Keller R.* Region-specific cell activities in amphibian gastrulation. Annu. Rev. Cell. Biol., **2,** 201-229, 1986.
8. *Spemann H., Mangold H.* Induction of embryonic primordia by implantation of organizers from different species. Roux's Archiv., **100,** 599-638, 1924. (English translation in Foundations of Experimental Embryology, 2nd ed. [B. H. Willier, J. M. Oppenheimer, eds.] New York, Hafner, 1974.)
9. *Balinsky B.I.* Introduction to Embryology, 5th ed., Philadelphia, Saunders, 1981.
Longman J. Medical Embryology, 5th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1985.
Romer A. S., Parsons T. S. The Vertebrate Body, 6th ed. Philadelphia, Saunders, 1986.
10. *Kitchin I. C.* The effects of notochordectomy in *Amblystotna mexicanum.* J. Exp. Zool, **112,** 393-411, 1949.

Smith J. C., Watt F. W. Biochemical specificity of *Xenopus* notochord. Differentiation, **29,** 109-115, 1985.
11. *Le Douarin N.* The Neural Crest. Cambridge U.K., Cambridge University Press, 1982.
Newgreen D. F., Erickson C. A. The migration of neural crest cells. Int. Rev. Cytol, **103,** 89-145, 1986.
12. *Bumside B.* Microtubules and microfilaments in amphibian neurulation. Am. Zool,
13, 989-1006, 1973. *Gordon R.* A review of the theories of vertebrate neurulation and their relationship to the mechanics of neural tube birth defects. J. Embryol. Exp. Morphol., Suppl., **89,** 229-255, 1985.
Karfunkel P. The mechanisms of neural tube formation. Int. Rev. Cytol., **38**, 245-271, 1974.
13. *Blackhaw S.E., Warner A. E.* Low resistance junctions between mesoderm cells during development of trunk muscles. J. Physiol., **255,** 209-230, 1976.
Keynes R. J., Stern C. D. Mechanisms of vertebrate segmentation. Development, **103,** 413-429, 1988.
14. *Slack J.M. W.* From Egg to Embryo: Determinative Events in Early Development. Cambridge, U.K., Cambridge University Press, 1983.
15. *DiBerardino M.A. Orr N.H., McKinnel R.G.* Feeding tadpoles cloned from *Ram* erythrocyte nuclei. Proc. Nat. Acad. Sci. USA., **83,** 8231-8234, 1986.
Gurdon J. B. The Control of Gene Expression in Animal Development. Cambridge, Harvard University Press, 1974.
Gurdon J. B. Transplanted nuclei and cell differentiation. Sci. Am., **219(6),** 24-35, 1968.
McKinnel R. G. Cloning-Nuclear Transplantation in Amphibia. Minneapolis, University of Minnesota Press, 1978.
16. *Davidson E.H.* Gene Activity in Early Development, 3rd ed., pp. 411-524, Orlando, FL, Academic Press, 1986.
Jeffery W.R. Spatial distribution of mRNA in the cytoskeletal framework of Ascidian eggs. Dev. Biol., **103,** 482-492, 1984.
Satoh N. Towards a molecular understanding of differentiation mechanisms in Ascidian embryos. Bioessays, **7,** 51-56, 1987.
Wilson E.B. The Cell in Development and Heredity, 3rd ed., pp. 1035-1121, New York, Macmillan, 1928. (Reprinted, New York: Garland. 1987.)
17. *Gurdon J. B.* Embryonic induction-molecular prospects. Development, **99**, 285-306, 1987.
Kimelman D., Kirschner M. Synergistic induction of mesoderm by FGF and TGF-beta and the identification of an mRNA coding for FGF in the early *Xenopus* embryo. Cell, 51, 869-877, 1987.
Rosa F., et al. Mesoderm induction in amphibians: the role of TGF-beta2-like factors. Science, **239,** 783-785, 1988.
Slack J. M. W, Darlington B. G., Heath J. K., Godsave S. F. Mesoderm induction in early *Xenopus* embryos by heparin-binding growth factors. Nature, **326,** 197-200, 1987.
Weeks D. L., Melton 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.
18. *Austin C.R., Short R. V., eds.* Embryonic and Fetal Development, 2nd ed. Reproduction in Mammals, Ser., Book 2, Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1982.
Hogan B., Constantini F., Lacy E. Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.
Rugh R. The Mouse: Its Reproduction and Development. Minneapolis, Burgess, 1968.
19. *Gardner R.L.* Clonal analysis of early mammalian development. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **312**, 163-178, 1985.
McLaren A. Mammalian Chimeras. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1976.
20. *Johnson M. H., Chisholm J. C.,* Fleming T. P., Houliston E. A role for cytoplasmic determinants in the development of the mouse early embryo? J. Embryol. Exp. Morphol., Suppl**. 97,** 97-121, 1986.
Kelly S. J. Studies of the developmental potential of 4-/and 8-cell stage mouse blastomeres. J. Exp. Zool., **200,** 365-376, 1977.
Tarkowski A. K. Experiments on the development of isolated blastomeres of mouse eggs. Nature**, 184,** 1286-1287, 1959.
21. *Illmensee K., Stevens L.C.* Teratomas and chimeras. Sci. Am., **240(4),** 120-132, 1979.
Papaioannou V. E., Gardner R. L., McBurney M. W., Babinet C., Evans M. J. Participation of cultured teratocarcinoma cells in mouse embryogenesis. J. Embryol. Exp. Morphol., **44,** 93-1.04, 1978.

Robertson E. J. Pluripotential stem cell lines as a route into the mouse germ line. Trends Genet., **2,** 9-13, 1986.
22. *Weiss P. A.* Principles of Development, pp. 289-437, New York, Holt, 1939.
23. *Spemann H. Ü*ber die Determination der ersten Organanlagen des Amphibienembryo I-VI Arch. Entw. Mech. Org., 43, 448-555, 1918.
24. *Hardeman E. C., Chiu C.-P., Minty A., Blau H. M.* The pattern of actin expression in human fibroblast x mouse muscle heterokaryons suggests that human muscle regulatory factors are produced. Cell, **47,** 123-130, 1986.
25. *Barton S. C., Surani M. A. H., Norris M. L.* Role of paternal and maternal genomes in mouse development. Nature, **311,** 374-376, 1984.
Monk M. Memories of mother and father. Nature, **328,** 203-204, 1987.
Reik W. Collick A., Norris M. L., Barton S. C., Surani M. A. Genomic imprinting determines methylation of parental alleles in transgenic mice. Nature, **328,** 248-251, 1987.
Sapienza C., Peterson A. C., Rossant J., Balling R. Degree of methylation of transgenes in dependent on gamete of origin. Nature, **328**, 251-254, 1987.
Swain J. L., Stewart T. A., Leder P. Parental legacy determines methylation and expression of an autosomal transgene: a molecular mechanism for parental imprinting. Cell, **50,** 719-727, 1987.
26. *Kimmel C. B.,* Varga R. M. Cell lineage and developmental potential of cells in the zebra fish embryo. TIG, **4,** 68-74, 1988.
Gardner R. L., Lawrence P. eds., Single Cell Marking and Cell Lineage. Philos.
Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), 312, 1985. *Price J.* Retroviruses and the study of cell lineage. Development, **101,** 409-419, 1987.
Wolfram S. Cellular automata as models of complexity. Nature, **311,** 419-424, 1984.
27. *Edgar L. G., McGhee J. D.* DNA synthesis and the control of embryonic gene expression in *C. elegans.* Cell, **53,** 589-599, 1988.
Wilkins-A.S. Genetic Analysis of Animal Development. New York, Wiley, 1986. *Wood W. B., et al.* The Nematode *Caenorhabditis elegans.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.
28. *Kenyon C.* Cell lineage and the control of *Caenorhabditis elegans* development. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **312,** 21-38, 1985.
Sulston J. E., Horvitz H. R. Post-embryonic cell lineage of the nematode, *Caenorhabditis elegans.* Dev. Biol, **56,** 110-156, 1977.
Sulston J. E., Schierenberg E., White J. C., Thompson J. N. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans.* Dev. Biol**., 100,** 64-119, 1983.
29. *Ambros V., Horvitz H. R.* The lin-14 locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific post-embryonic developmental events. Genes Dev**., 1,** 398-414, 1987.
Chalfle M., Horvitz H. R., Sulston J. E. Mutations that lead to reiteration of the cell lineages of *C. elegans.* Cell, **24,** 59-69, 1981. *Ellis H. M., Horvitz H. R.* Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans.* Cell, **44**, 817-829, 1986.
Sternberg P. W., Horvitz H. R. The genetic control of cell lineage during nematode development. Annu. Rev. Genet, **18,** 489-524, 1984.
30. *Cooke J.* Properties of the primary organization field in the embryo of *Xenopus laevis.* IV. Pattern formation and the regulation following early inhibition of mitosis. J. Embryol. Exp. Morphol., 30, 49-62, 1973.
Satoh N. Towards a molecular understanding of differentiation mechanisms in Ascidian embryos. Bioessays, **7,** 51-56, 1987.
Stephens L., Hardin J., Keller R., Wilt F. The effects of aphidicolin on morphogenesis and differentiation in, the sea urchin embryo. Dev. Biol., **118**, 64-69, 1986.
31. *Kimble J.E.* Strategies for control of pattern formation in *Caenorhabditis elegans.* Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **295,** 539-551, 1981.
Priess J.R., Schnable H., Schnabel R. The *glr-1* locus and cellular interactions in early *C. elegans* embryos. Cell, **51,** 601-611, 1987.
Sternberg P. W., Horvitz H. R. Pattern formation during vulval development in *C. elegans.* Cell, **44,** 761-772, 1986.
Sulston J. E., White J. G. Regulation and cell autonomy during postembryonic development *Caenorhabditis elegans.* Dev. Biol., **78,** 577-597, 1980.
32. *Artavanis-Tsakonas S.* The molecular biology of the Notch locus and the fine-tuning of differentiation in *Drosophila.* Trends Genet**, 4,** 95-100, 1988.
Ferguson E. L., Sternberg P. W., Horvitz H. R. A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans. Nature,* **326,** 259-267, 1987.
Greenwald I. The lin-12 locus of *Caenorhabditis elegans.* Bioessays, **6,** 70-73, 1987.
33. *Hughes S. M., Lillien L. E., RaffM. C., Rohrer H., Sendtner M.* Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. Nature, **335,** 70-73, 1988.
Raff M. C., Abney E.R., Fok-Seang J. Reconstitution of a developmental clock in

vitro: a critical role for astrocytes in the timing of oligodendrocyte differentiation. Cell, **42,** 61-69, 1985.
Raff M. C., Miller R., Noble M. A glial progenitor cell that develops *in vitro* into an astrocyte or an aligodendrocyte depending on the culture medium. Nature, **303,** 390-396, 1983.
Richardson W.D., Pringle N. Mosley M., Westermark B., Dubois-Dalcq M. A role for platelet-derived growth factor in normal gliogenesis in the central nervous system. Cell**, 53,** 309-319, 1988.
Temple S., Raff M. C. Clonal analysis of oligodendrocyte development in culture:evidence for a developmental clock that counts cell divisions. Cell, **44,** 773-779, 1986.
34. *Malacinski G. M., Bryant S. V., eds.* Pattern formation: A Primer in Developmental Biology. New York, Macmillan, 1984.
Meinhardt H. Models of Biological Pattern Formation. New York, Academic Press, 1982.
Theories of Biological Pattern Formation. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **295,** 425-617, 1981.
35. *Bode P. M., Bode H. R.* Patterning in Hydra. In Pattern Formation: A Primer in Developmental Biology (G. Malacinski, S.V. Bryant, eds.), pp. 213-241, New York, Macmillan, 1984.
Jqffe L. F. The role of ionic currents in establishing developmental pattern. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **295,** 553-566, 1981.
Lenhoff H.M., Lenhoff S.G. Trembleys polyps. Sci. Am., **258 (4),** 86-91, 1988. *Lohs-Schardin M.* Dicophalic - a *Drosophila* mutant affecting polarity in follicle organization and embryonic patterning. Wilhelm Roux's Arch. **191,** 28-36, 1982.
Robinson K. R., Cone R. Polarization of fucoid eggs by a calcium ionophore gradient. Science, 207, 77-78, 1980.
36. *Wolpert L.* Positional information and pattern formation. Curr. Top. Dev. Biol**., 6,** 183-224, 1971.
37. *Lewis J., Slack J. M. W., Wolpert L.* Threshold in development. J. Theor. Biol., **65**, 579-590, 1977.
38. *Crick F.H.C.* Diffusion in embryogenesis. Nature, **225,** 420-422, 1970.
39. *Sounders J. W. Jr., Gasseling M. T., Cairns J. M.* The differentiation of prospective thigh mesoderm grafted beneath the apical ectodermal ridge of the wing bud in the chick embryo. Dev. Biol., **1,** 281-301, 1959.
40. *Bryant S. V., Gardiner D. M., Muneoka K.* Limb development and regeneration. Am. Zool., **27,** 675-696, 1987.
Butler E. G. Regeneration of the urodele forelimb after reversal of its proximodistal axis: J. Morphol., **96,** 265-282, 1955.
Goss R.J. Principles of Regeneration. New York, Academic Press, 1969. *Wallace H.* Vertebrate Limb Regeneration. New York, Wiley, 1981.
41. *Fallon J. F., et al, eds.* Limb Development and Regeneration, Parts A and B. Prog. Clin. Biol. Res., 110, 1983.
Wolpert L. Pattern formation in biological development. Sci. Am. **239(4),** 154-164, 1978.
42. *Maden M.* Retinoids and the control of pattern limb development and regeneratioa Trends Genet., **1,** 103-107, 1985.
Thaller C., Eichele G. Identification and spatial distribution of retinoids in the developing chick limb bud. Nature**, 327,** 625-628, 1987.
Tickle C. The number of polarizing region cells required to specify, additional digits in developing chick wing. Nature, **289,** 295-298, 1981.
Tickle C., Summerbell D., Wolpert L. Positional signalling and specification of digits in chick limb morphogenesis. Nature, **254**, 199-202, 1975.
43. *Bohn H.* Tissue interactions in the regenerating cockroach leg. In Insect Development (P. A. Lawrence, ed.), Royai Entomological Society of London Symposium No. 8, pp. 170-185, Oxford, U. K., .Blackwell, 1976.
Bryant P. J., Bryant S. V., French V. Biological regeneration and pattern formation. Sci. Am., **237(1),**66-81, 1977.
Bryant P. J., Simpson P. Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs. Q. Rev. Biol., **59,** 387-415, 1984.
Lewis J. Simpler rules for epimorphic regeneration: the polar-coordinate model without polar coordinates. J. Theor. Biol., **88,** 371-392, 1981.
44. *Akam M.* The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo, Development, **101**, 1-22, 1987.
Garcia-Bellido A., Lawrence P. A., Morata G. Compartments in animal development. Sci. Am., **241(1),** 102-111, 1979. *Ingham P. W.* The molecular genetics of embryonic pattern formation in *Drosophila.* Nature, 335, 25-34, 1988.
Scott M. P., O'Farrell P. H. Spatial programming of gene expression in early *Drosophila* embryogenesis. Annu. Rev. Cell Biol., 2, 49-80, 1986.

45. *Martinez-Arias A., Lawrence P. A.* Parasegments and compartments in the *Drosophila* embryo. Nature, **313,** 639-642, 1985.
46. *Foe V.E., Alberts B.M.* Studies of nuclear and cytoplasmic behavior during the five mitotic cycles that precede gastrulation in *Drosophila* embryogenesis. J. Cell Sci., **61**, 31-70, 1983.
Sander K. Morphogenetic movements in insect embryogenesis. In Insect Development (P. A. Lawrence, ed.), Royal Entomological Society of London Symposium 8, pp. 35-52. Oxford, U.K., Blackwell, 1976.
Technau G. M. A single cell approach to problems of cell lineage and commitment during embryogenesis of *Drosophila melanogaster.* Development, **100,** 1-12, 1987.
47. *Anderson K. V.* Dorsal-ventral embryonic pattern genes of *Drosophila.* Trends Genet., **3,** 91-97, 1987.
48. *Driever W., Nusslein-Volhard C.* The *bicoid* protein determines position in the *Drosophila* embryo in a concentration-dependent manner. Cell**,** **54,** 95-104, 1988.
Driever W. Nüsslein-Volhard C. A gradient of *bicoid* protein in *Drosophila* embryos. Cell, **54,** 83-93, 1988.
Lawrence P. A. Background to *bicoid.* Cell, **54,** 1-2, 1988.
Nüsslein-Volhard C., Frohnhöfer H.G., Lehmann R. Determination of anteroposterior polarity in *Drosophila.* Science, **238**, 1675-1681, 1987.
Sander K. Embryonic pattern formation in insects: basic concepts and their experimental foundations. In Pattern Formation: A Primer in Developmental Biology (G. Malacinski, S. V. Bryant, eds), pp. 245-268, New York, Macmillan, 1984.
49. *Nüsslein-Volhard C., Wieshaus E.* Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila.,* Nature, **287,** 795-801, 1980.
50. *Gaul U., Jäckle H.* How to fill a gap in the *Drosophila* embryo. Trends Genet**. 3,** 127-131, 1987.
Gaul U., Jäckle H. Pole region-dependent repression of the *Drosophila gap* gene Kruppel by maternal gene products. Cell, 51, 549-555, 1987.
Hafen E., Küroiwa A., Gehring W.J. Spatial distribution of the transcripts from the segmentation *gene fushi tarazu* during *Drosophila* embryonic development. Cell, **37,** 833-841, 1984.
51. *Jäckle H., Tautz D., Schuh R., Seifert E., Lehmann R.* Cross-regulatory interactions among the *gap* genes of *Drosophila.* Nature, **324,** 668-670, 1986.
52. *Ish-Horowicz D., Howard K. R., Pinchin S. M., Ingham P. W.* Molecular and genetic analysis of the hairy locus in *Drosophila.* Cold Spring Harbor Symp., **50,** 135-144, 1985.
Weir M. P., Kornberg T. Patterns of engrailed and *fushi tarazu* transcripts reveal novel intermediate stages in *Drosophila* segmentation. Nature, **318,** 433-439, 1985.
53. *DiNardo S., Sher E., Heemskerk-Jongens J., Kastis J. A., O'Farrell P. H.* Two-tiered regulation of spatially patterned *engrailed* gene expression during *Drosophila* embryogenesis. Nature, **332,** 604-609, 1988.
Ingham P. W., Baker N. E., Martinez-Arias A. The products of *ftz* and *eve* genes act as a positive and negative regulators of engrailed and wingless expression in the
Drosophila blastoderm. Nature, **331,** 73-75, 1988.
Martinez-Arias A., Baker N. E., Ingham P. W. Role of segment polarity genes in the definition and maintenance of cell states in the *Drosophila* embryo. Development, **103,** 157-170, 1988.
Rijsewijk F., et al. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene wingless. Cell, **50,** 649-657, 1987.
54. *Lewis E. B.* A gene complex controlling segmentation in *Drosophila.* Nature, 276, 565-570, 1978. *Morata G., Lawrence P. A.* Homeotic genes, compartments and cell determination in *Drosophila.* Nature, 265, 211-216, 1977.
Struhl G. A homeotic mutation transforming leg to antenna in *Drosophila.* Nature, **292**, 635-637, 1981.
Wakimoto B. T., Kaufinan T. C. Analysis of larval segmentation in lethal genotypes associated with Antennapedia gene complex in *Drosophila melanogaster.* Dev. Biol., **81,** 51-64, 1981.
55. *Akam M. E.* Segments, lineage boundaries and the domains of expression of homeotic genes. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **312**, 179-187, 1985.
Harding K., Wedeen C., McGinnis W., Levine M. Spatially regulated expression of homeotic genes in *Drosophila.* Science, **229,** 1236-1242, 1985.
56. *Akam M.* The molecular basis for metameric pattern in the *Drosophila* embryo. Development, **101,** 1-22, 1987.
Lawrence P. A., Morata G. The elements of the bithorax complex. Cell, **35,** 595-601, 1983.
Struhl G., White R. A. Regulation of the Ultrabithorax gene of *Drosophila* by other bithorax complex genes. Cell, **43,** 507-519, 1985

57. *Ashburner M., Wright T. F., eds.* The Genetics and Biology of *Drosophila.* vol 2C, London, U.K., Academic Press, 1978.
Gehring W., Nothiger R., The imaginal discs of *Drosophila.* In Developmental Systems: Insects (S. Counce, C.H. Waddington, eds.), vol. 2, pp. 211-290, New York, Academic Pess, 1973.
Hadorn E. Transdetermination in cells. Sci. Am., **219(5),** 110-120, 1968.
58. *Nöthiger R.* Clonal analysis in imaginal discs. In Insect Development (P. A. Law rence, ed.) Royal Entomological Society of London Symposium No. pp. 109-117, Oxford, U.K., Blackwell, 1976.
Stern C. Genetic Mosaics and Other Essays. Cambridge, Harvard University Press, 1968.
Struhl C. Genes controlling segment specification in the *Drosophila* thorax. Proc Natl. Acad. Sci. USA, **79,** 7380-7384, 1982.
59. *Crick F. H. C., Lawrence P. A.* Compartments and polyclones in insect development Science, **189,** 340-347, 1975.
Garcia-Bellido A., Lawrence P. A., Morata G. Compartments in animal development. Sci. Am., **241(1),** 102-111, 1979.
Kornberg T., Siden I., O'Farrell P., Simon M. The *engrailed* locus of *Drosophila: in situ* localization of transcripts reveals compartment-specific expression. Cell, 40
45-53, 1985. *Simpson P., Morata G.* Differential mitotic rates and patterns of growth in compartments in the *Drosophila* wing. Dev. Biol., **85,** 299-308, 1981.
60. *Desplan G., Theis J. O'Farrell P.H.* The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. Cell, **54,** 1081-1090, 1988.
Hiromi Y., Gehring W.J. Regulation and function of the *Drosophila* segmentation gene *fushi tarazu.* Cell, **50,** 963-974, 1987.
Robertson M. A genetic switch in *Drosophila* morphogenesis. Nature, **327,** 556-557, 1987.
61. *Bender W., et al.* Molecular genetics of the bithorax complex in *Drosophila melanogaster.* Science, **221,** 23-29, 1983.
Peifer M., Karch F., Bender W. The bithorax complex: control of segmental identity, Genes Dev., **1,** 891-898, 1987.
Struhl G., Akam M. Altered distributions of *Ultrabithorax* transcripts in *extra sex combs* mutant embryos of *Drosophila.* EMBO J., 4, 3259-3264, 1985.
62. *Desplan C., Theis J. O'Farrell P. H.* The sequence specificity of homeodomain-DNA interaction. Cell, **54,** 1081-1090, 1988.
Gehring W.J. Homeo boxes in the study of development. *Science,* **236,** 1245-1252, 1987.
Scott M. P., Carroll S. B. The segmentation and homeotic gene network in early *Drosophila* development. Cell, **51,** 689-698, 1987.
63. *Beeman R. W.* A homeotic gene cluster in the red flour beetle. Nature, **327,** 247-249, 1987.
McGinnis W., Garber R. L., Wirz J., Kuroiwa A., Gehring W.J. A homologous protein-coding sequence in *Drosophila* homeotic genes and its conservation in other metazoans. Cell, **37,** 403-408, 1984.
Müller M. M., Carrasco A. E., De Robertis E. M. A homeo-boxcontaining gene expressed during oogenesis in *Xenopus.* Cell, **39,** 157-162, 1984.
64. *Dressier G. R., Gruss P.* Do multigene families regulate vertebrate development? Trends Genet**., 4,** 214-219, 1988.
Hogan B., Holland P., Schofield P. How is the mouse segmented? Trends Genet**, 1,1** 67-74, 1985. *Holland P. W. H., Hogan B. L. M.* Expression of homeotic genes during mouse development; a review. Genes Dev**., 2,** 773-782, 1988.
Kieny M., Mauger A., Sengel P. Early regionalization of the somitic mesoderm as studied by the development of the axial skeleton of the chick embryo. Dev. BioL **28,** 142-161, 1972.
Keynes R.J., Stern C.D. Mechanisms of vertebrate segmentation. Development, **103,** 413-429, 1988.
65. *Gardner R.L.* Cell mingling during mammalian embryogenesis. J. Cell Sci., Suppl **4,** 337-356, 1986.
Steinberg M.S. Does differential adhesion govern self-assembly processes in histogenesis? Equilibrium configurations and the emergence of a hierarchy among populations of embryonic cells. J. Exp. Zool., **173,** 395-434, 1970.
Townes P.L., Holtfreter J. Directed movements and selective adhesion of embryonic amphibian cells. J. Exp. Zool., **128,** 53-120, 1955.
66. *Edelman G. M.* Cell adhesion molecules in the regulation of animal form and tissue pattern. Annu. Rev. Cell Biol**, 2,** 81-116, 1986.
McClay D. R., Ettensohn C. A. Cell adhesion in morphogenesis. Annu. Rev. Cell Biol**., 3,** 319-345, 1987. *Takeichi M.* The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. Development, **102,** 639-655, 1988.

67. *Bagaert T., Brown N.. Wilcox M.* The *Drosophila* PS2 antigen is an invertebrate integrin that, like the fibronectin receptor, becomes localized to muscle attachments. Cell, **51,** 929-940, 1987.

Duband J. L., et al. Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. J. Cell Biol., **104,** 1361-1374, 1987.

Leptin M., Wilcox M. The *Drosophila* position-specific antigens: clues to their morphogenetic role. Bioessays, **5,** 204-207, 1986.

Nose A., Nagafuchi A., Takeichi M. Expressed recombinant cadherins mediate cell sorting in model systems. Cell, **54,** 993-1001, 1988.

68. *Spemann H.* Embryonic Development and Induction, pp. 260-296, New Haven, Yale University Press, 1938 (Reprinted, New York, Garland, 1988.)

Wessells N. K., Tissue Interactions and Development. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1977.

69. *Bernfield M., Banerjee S. D., Koda J. E., Rapraeger A. C.* Remodelling of the basement membrane as a mechanism of morphogenetic tissue interaction. In The Role of the Extracellular Matrix in Development (R. L. Trelstad, ed.), pp. 545-572, Symp. Soc. Dev. Biol., 42, New York, Liss, 1984.

Ekblom P. W., Vestweder D., Kemler R. Cell-matrix interactions and cell adhesion during development. Annu. Rev. Cell Biol**., 2,** 27-47, 1986.

Harris A. K., Stopak D., Warner P. Generation of spatially periodic patterns by a mechanical instability: a mechanical alternative to the Turing model. J. Embryol. Exp. Morphol., **80,** 1-20, 1984.

Sengel P. Morphogenesis of Skin. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1976.

70. *Chevallier A., Kieny M., Mauger A.* Limb-somite relationship: origin of the limb musculature. J. Embryol. Exp. Morphol., **41,** 245-258, 1977.

Christ B., Jacob H. J., Jacob M. Experimental analysis of the origin of the wing musculature in avian embryos. Anat. Embryol**., 150,** 171-186, 1977.

Stopak D., Harris A. K. Connective tissue morphogenesis by fibroblast traction. I. Tissue culture observations. Dev. Biol., **90**, 383-398, 1982.

71. *Bryant S.V.,* Gardiner D. M., Muneoka K. Limb development and regeneration. Am. Zool., **27,** 675-696, 1987.

Chevallier A. Role of the somitic mesoderm in the development of the thorax in bird embryos. II. Origin of thoracic and appendicular musculature. J. Embryol. Exp. Morphol., **49,** 73-88, 1979.

Kieny M., Chevallier A. Autonomy of tendon development in the embryonic chick wing. J. Embryol. Exp. Morphol., **49,** 153-165, 1979.

Martin P., Lewis J. Normal development of the skeleton in chick limb buds devoid of dorsal ectoderm. Dev. Biol., **118,** 233-246, 1986.

72. *Bronner-Fraser M.* An antibody to a receptor for fibronectin and laminin perturbs cranial neural crest development *in vivo.* Dev. Biol., **117,** 528-536, 1986.

Chabot B., Stephenson D. A., Chapman V.M. Besmer P., Bernstein A. The protooncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus. Nature, **335,** 88-89, 1988.

Dufour S., Duband J. L., Konblihtt A. R., Thiery J. P. The role of fibronectins in embryonic cell migration. Trends Genet., **4,** 198-203, 1988.

Mackie E. J., et al. The distribution of tenascin coinsides with pathways of neural cell migration. Development, **102,** 237-250, 1988.

Weston J. Phenotypic diversification in neural crest-derived cells: the time and stability of commitment during early development. Curr. Top. Dev. Biol**., 20,** 195-210, 1986.

Wylie C. C., Stott D., Donovan P. J. Primordial germ cell migration. Developmental Biology: A Comprehensive Synthesis. Vol. 2: The Cellular Basis of Morphogenesis (L.W. Browder, ed.), pp. 433-448, New York, Plenum, 1986.

73. *Purves D., Lichtman J. W.,* Principles of Neural Development. Sunderland, MA, Sinauer, 1985.

17. Поддержание нормальной организации тканей

За несколько дней или недель из одной оплодотворенной яйцеклетки развивается сложный многоклеточный организм, состоящий из дифференцированных клеток, взаимное расположение которых строго детерминировано. Как правило, эта организация создается сначала в малом масштабе, а потом происходит рост. Во время эмбрионального развития детерминируются различные типы клеток, каждый в соответствующем месте. Затем, в период роста, клетки размножаются, но, за некоторыми исключениями, их специализация остается более или менее постоянной. Организм может расти в течение всей жизни, как у большинства ракообразных и рыб, а может прекращать рост, достигнув определенных размеров, как у птиц и млекопитающих. У некоторых животных с фиксированными размерами тела, например у мух и нематод, пролиферация 1 соматических клеток прекращается, как только будет достигнуто взрослое состояние. Во многих других случаях, в том числе и у высших! позвоночных, клетки продолжают делиться и во взрослом организме для замещения отмирающих клеток.

Когда у позвоночных клетки таких тканей, как кожа, кровь или легкие, изнашиваются и гибнут, их место занимают новые клети соответствующего типа. Таким образом, взрослый организм можно уподобить стабильной экосистеме, в которой одно поколение особей сменяется другим, но в целом организация системы остается неизменной. Эта глава посвящена проблемам сохранения и обновления тканей у высших позвоночных - мы в какой-то мере познакомимся здесь с поразительным разнообразием структур, функций и жизненных циклов с порациализированных клеток у этих животных.

17.1. Поддержание диф*ф*еренцированного состояния [1]

Хотя ткани организма во многих отношениях различаются между собой всем им нужны определенные элементарные условия, создав обычно сочетанием клеток разного типа. На рис. 17-1 это проиллюстрировано на примере кожи. Прежде всего тканям нужна механическая прочность, которую очень часто обеспечивает *внеклеточный матрикс* (разд. 14.2), секретируемый *фибробластами.* Кроме того, почти все ткани нуждаются в кровоснабжении, для того чтобы получать питатель вещества и освобождаться от шлаков; поэтому они пронизаны кровеносными сосудами, которые выстланы *эндотелиальными клетками.* Точно так же большинство тканей иннервировано, т.е. содержит аксоны *нервных клеток* (нейронов), одетые оболочкой из *шванновских клеток* В тканях обычно присутствуют *макрофаги,* которые могут быть нужны для ликвидации остатков отмерших клеток и удаления излишнего матрикса, а также *лимфоциты* и другие лейкоциты, призванные бороться с инфекцией. Иногда в ткани могут находиться *меланоциты,* обеспечивающие защитную или декоративную пигментацию. Большая часть этих различных клеток, играющих подсобную роль по отношению к функции

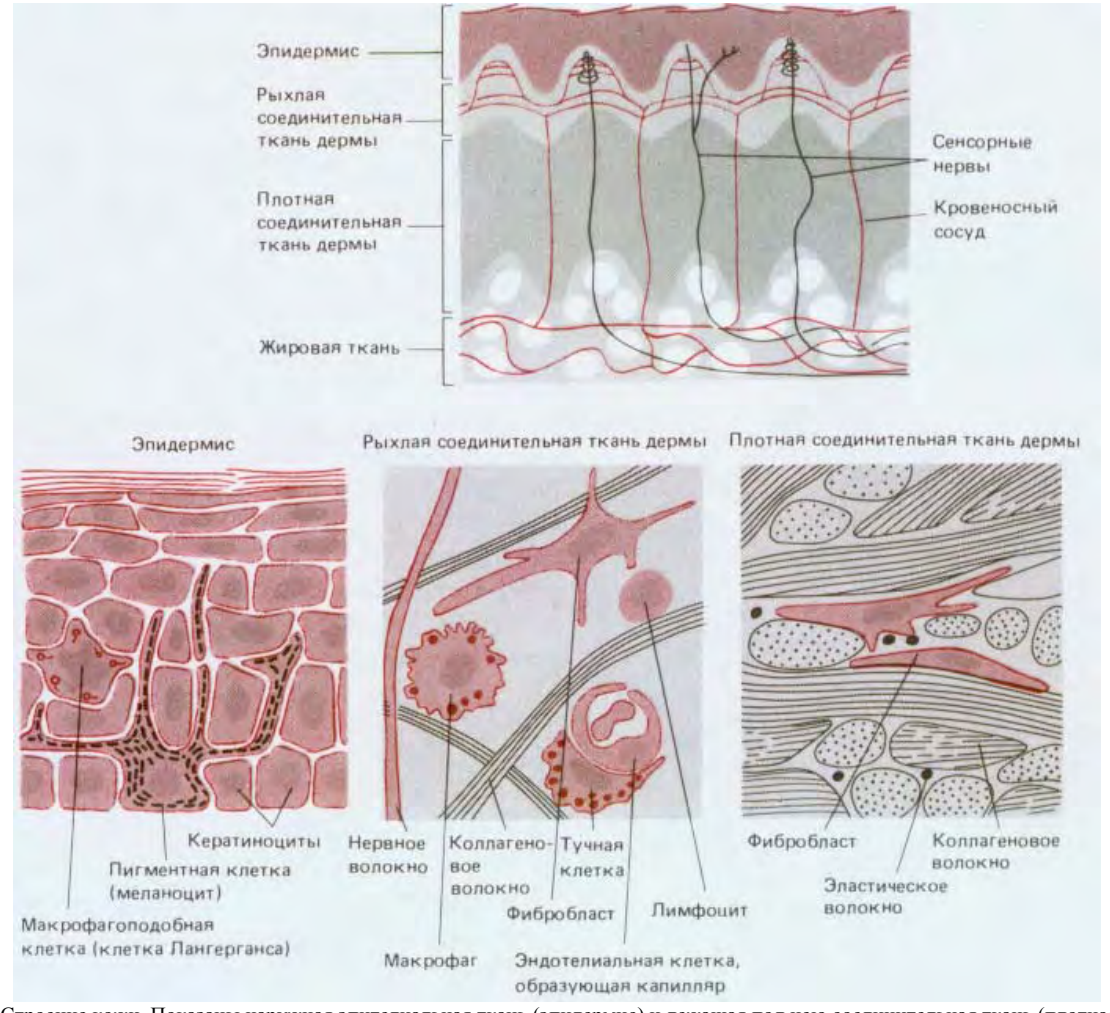


Рис. 17-1. Строение кожи. Показаны наружная эпителиальная ткань (эпидермис) и лежащая под нею соединительная ткань (плотная дерма, из которой выделывают «кожу», а глубже - рыхлая жировая ткань). Каждая ткань состоит из клеток разных типов. Дерма и подкожный слой обильно снабжены кровеносными сосудами и нервами. Часть нервных волокон заходит также в эпидермис.

данной ткани, образуется вне этой ткани и проникает в нее на раннем этапе ее развития (эндотелиальные клетки, нейроны, шванновские клетки и меланоциты - см. разд. 16.6.5) или на протяжении всей жизни (макрофаги и другие лейкоциты). Этот сложный обслуживающий аппарат необходим для поддержания главных специализированных клеток данной ткани, например сократимых клеток в мышце, секреторных в железе, кроветворных в костном мозге.

Таким образом, почти каждая ткань - это сложная смесь клеток многих типов, которые, находясь в одних и тех же условиях, тем не менее сохраняют свои различия. Более того, организация этой смеси клеток должна сохраняться несмотря на то, что в большинстве тканей взрослого организма клетки непрерывно отмирают и заменяются новыми. Это сохранение формы и функций ткани возможно в основном благодаря двум фундаментальным свойствам клеток. *Клеточная память* (разд. 10.3) позволяет дифференцированным клеткам автономно поддерживать присущий им характер специализации и передавать его дочерним клеткам. В то же время дифференцированные клетки любого типа постоянно «чувствуют» свое окружение и приводят скорость своего размножения в соответствие с обстоятельствами. Внутриклеточные механизмы, предположительно отвечающие за клеточную память, обсуждались в гл. 10; способы ответа клеток на внешние сигналы были рассмотрены в гл. 12. А здесь, в этом предварительном разделе, касающемся поведения клеток в тканях, мы сделаем краткий обзор некоторых данных о стабильности и наследуемости дифференцированного состояния и посмотрим, в какой степени это состояние может быть изменено под влиянием окружающей среды.

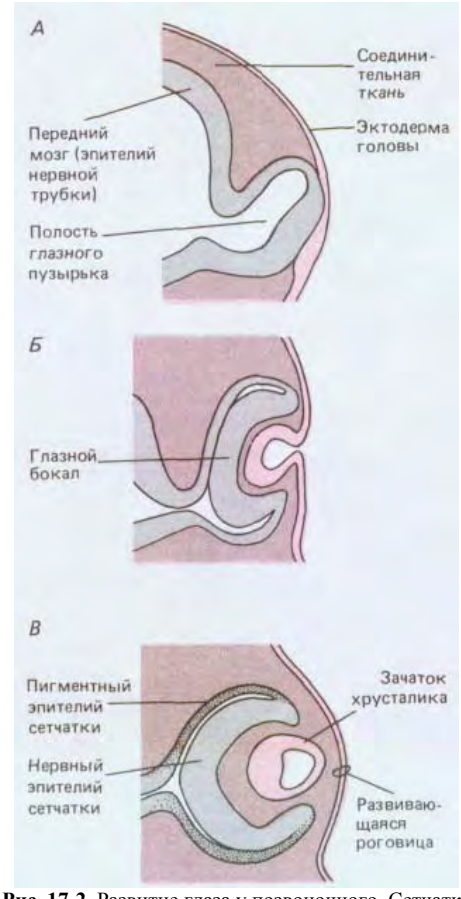


Рис. 17-2. Развитие глаза у позвоночного. Сетчатка глаза развивается из глазного пузырька - выпячивания эпителия нервной трубки в области переднего мозга. *А.* Нервный эпителий контактирует с эктодермой, покрывающей голову снаружи. *Б.* Этот контакт индуцирует инвагинацию эктодермы с последующим образованием хрусталика. Одновременно стенка глазного пузырька, обращенная к эпидермису, вдавливается внутрь, и пузырек приобретает форму бокала. *В.* Ближайший к хрусталику слой глазного бокала дифференцируется в нервный слой сетчатки, включающий фоторецепторы, а также те нейроны, которые передают сенсорные импульсы в мозг (см. рис. 17-6). Другой слой дифференцируется в пигментный эпителий сетчатки. Его клетки, плотно заполненные гранулами меланина, образуют для фоторецепторной системы затемненное укрытие, которое, подобно черной окраске внутренности фотоаппарата, уменьшает количество рассеянного света.

17.1.1. Большинство дифференцированных клеток обычно сохраняет свои специфические признаки даже в новом окружении [2]

Эксперименты, проведенные на тканевых культурах, показывают, что даже тогда, когда клетки лишаются своего обычного окружения, и они сами, и их потомки, как правило, продолжают следовать заложенным в них изначальным «инструкциям». Рассмотрим, например, эпителиальные клетки, образующие пигментный слой сетчатки (рис. 17-2). Поскольку специализация этих клеток проявляется в выработке ими темно-коричневых гранул меланина, следить за состоянием их дифференцировки нетрудно. Клетки пигментного эпителия можно выделить из сетчатки куриного эмбриона и выращивать в культуре, где они размножаются и образуют клоны. Одиночные клетки, взятые из этих клонов, неизменно дают субклоны, состоящие из подобных же клеток пигментного эпителия. Таким способом дифференцированное состояние можно поддерживать более чем в 50 клеточных поколениях.

Однако поведение клеток в какой-то мере зависит и от окружающих условий. В некоторых средах или при чрезмерной плотности культур клетки выживают, но не синтезируют или почти не синтезируют пигмента. Но даже лишенные возможности проявить свою специализацию, эти клетки остаются *детерминированными* как пигментные: оказавшись снова в более подходящих условиях, они вновь начинают вырабатывать пигмент. Есть одно известное исключение из этого правила: при определенных условиях эти клетки будут передифференцироваться в клетки хрусталика; однако никакими изменениями культуральной среды и условий роста не удается превратить их, например, в клетки крови, печени или сердца.

Не только в культуре, но и в целом организме почти все дифференцированные клетки ведут себя так, как будто их главные особенности были необратимо детерминированы в процессе их развития. Например, эпидермальные клетки остаются эпидермальными даже в самом неподходящем окружении: если из кожи хвоста крысы приготовить суспензию диссоциированных эпидермальных клеток и ввести ее под капсулу почки, то клетки будут расти там, образуя эпидермальные мешочки, содержащие волосяные фолликулы и сальные железы, как в коже на поверхности тела.

17.1.2. Дифференцированное состояние может видоизменяться под влиянием клеточного окружения [1, 3]

Хотя радикальные клеточные превращения обычно невозможны, характер очень многих дифференцированных клеток может приспосабливаться в какой-то мере к условиям окружающей среды. Допустимые изменения клеток - это в основном *модуляции* дифференцированного статуса, т. е. обратимые взаимопревращения очень сходных клеточных фенотипов. Например, печеночные клетки снижают или повышают синтез определенных ферментов (путем изменения количеств соответствующих мРНК) в зависимости от концентрации стероидного гормона гидрокортизона. Мышечные клетки тоже видоизменяют характер экспрессии своих генов в соответствии с объемом получаемой ими стимуляции (разд. 17.6.2 и 19.8.4). Особый случай представляют фибробласты и родственные им клетки - семейство *соединительнотканных клеток.* Эти клетки обладают исключительной приспособляемостью и могут испытывать разнообразные взаимопревращения: фибробласты, например, могут обратимо превращаться в хрящевые клетки. Такие трансформации важны при заживлении ран и переломов, а также при

других патологических процессах. Подробнее об этом см. в разд. 17.7; там будет показано, как эти превращения регулируются формой клеток, межклеточным матриксом и диффундирующими сигнальными молекулами. Однако даже такие изменения дифференцированных клеток возможны лишь в узких пределах: изменившаяся клетка остается членом семейства соединительнотканных клеток.

17.1.3 Некоторые структуры поддерживаются благодаря постоянному взаимодействию их частей. Пример: вкусовые почки и их нервы [4]

Вкусовые почки служат еще одним необычным примером состояния дифференцировки, зависящего от постоянных взаимодействий между клетками. Эти крохотные структуры, с помощью которых мы ощущаем сладкое, кислое, соленое и горькое, образуются главным образом в эпителии верхней стороны языка. Каждая почка состоит примерно из полусотни клеток, которые легко отличить от окружающих эпителиальных клеток по их форме (рис. 17-3). Удлиненные клетки вкусовой почки, расположенные наподобие дощечек в бочонке, проходят через всю толщу эпителия, образуя маленькое отверстие (вкусовую пору), выходящее наружу. Как полагают, именно через эту пору должны проникать внутрь молекулы вещества, вызывающего вкусовое ощущение. Во вкусовой почке можно различить клетки по крайней мере двух типов - бледные и темные; и среди них есть клетки, действующие как вкусовые рецепторы. Сенсорные сигналы передаются в мозг по нервным волокнам, пронизывающим вкусовую почку и оканчивающимся на ее клетках. Если эти волокна перерезать, вкусовые почки полностью исчезают. Регенерация нервных волокон приводит к тому, что дифференцированное состояние эпителиальных клеток изменяется и из них формируются новые вкусовые почки. Можно вызвать образование вкусовых почек даже на таком участке эпителия, где их в норме не бывает, например на нижней поверхности языка. Для этого участок эпителия нужно выращивать in vitro вместе с соответствующим сенсорным ганглием, который будет его иннервировать.

Однако, несмотря на подобные примеры, большинство тканей взрослого организма состоит из набора четко определенных, необратимо

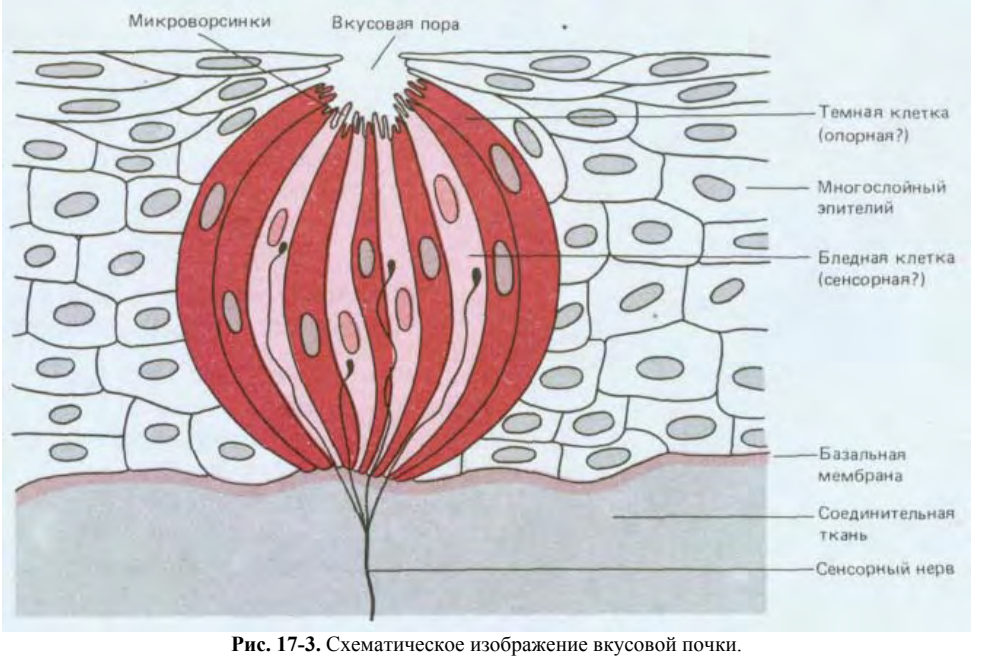


Рис. 17-3. Схематическое изображение вкусовой почки.

детерминированных типов клеток. Их число и пространственные отношения между ними должны поддерживаться в течение жизни с помощью таких механизмов, которые не требуют превращения одного типа клеток в другой.

Заключение

Большинство дифференцированных клеток в тканях взрослого организма будут сохранять свой специфический характер даже в условиях нового окружения. Хотя дифференцированные состояния, как правило, устойчивы и необратимы, даже высокоспециализированные клетки могут изменять в определенных пределах свои свойства при изменении окружающей среды. Особенно значительные превращения происходят в семействе соединительнотканных клеток, включающем фибробласты и хрящевые клетки. Вкусовые почки - еще один необычный пример того, как состояние дифференцировки может зависеть от непрерывного взаимодействия между клетками: специализированные клетки вкусовых почек полностью исчезают после перерезки нерва и вновь появляются при восстановлении иннервации.

17.2. Ткани с перманентными клетками [5]

Не все популяции дифференцированных клеток организма подвержены обновлению. Клетки некоторых типов, образовавшиеся в нужном количестве у эмбриона, сохраняются в течение всей взрослой жизни; они никогда не делятся и в случае их утраты не могут быть заменены. В этом смысле перманентны почти все разновидности нервных клеток. Сюда можно отнести и некоторые другие клетки, в том числе у млекопитающих- клетки сердечной мышцы и хрусталика.

Все эти клетки живут чрезвычайно долго и, естественно, находятся в таких местах, где они в норме защищены от повреждающих воздействий, однако в остальном они очень сильно различаются между собой. Трудно указать какую-то одну причину того, что эти клетки - должны быть перманентными, тогда как множество других клеточных популяций обновляется. В случае сердечной мышцы вообще трудно представить себе смысл перманентности клеток. Что касается нейронов (которые будут подробно обсуждаться в гл. 19), то кажется понятным, почему интенсивное обновление этих клеток во взрослом организме нецелесообразно: было бы очень трудно в точности восстанавливать сложную систему нервных связей, созданную в период развития при совершенно иных условиях. Кроме того, следы памяти, записанные в виде небольших изменений структуры или связей определенных нейронов, вероятно, стиралась бы при замене прежних клеток новыми. С другой стороны, перманентность клеток хрусталика - это, по-видимому, простое и неизбежное следствие характера роста его ткани.

17.2.1. Клетки, расположенные у взрослого в центре хрусталика, образовались еще в эмбриональном периоде [6]

Очень немногое во взрослом организме состоит из тех самых молекул, которые были синтезированы у эмбриона. К тем редким структурам, в которых не происходит обновления клеток и даже их внутреннего содержимого, относится *хрусталик глаза.*

Хрусталик развивается из эктодермы в месте ее контакта с развивающимся глазным пузырем. Здесь эктодерма утолщается и образует впячивание, которое в конце концов отшнуровывается, становясь зачатком хрусталика (см. рис. 17-2). Таким образом, хрусталик заклады-

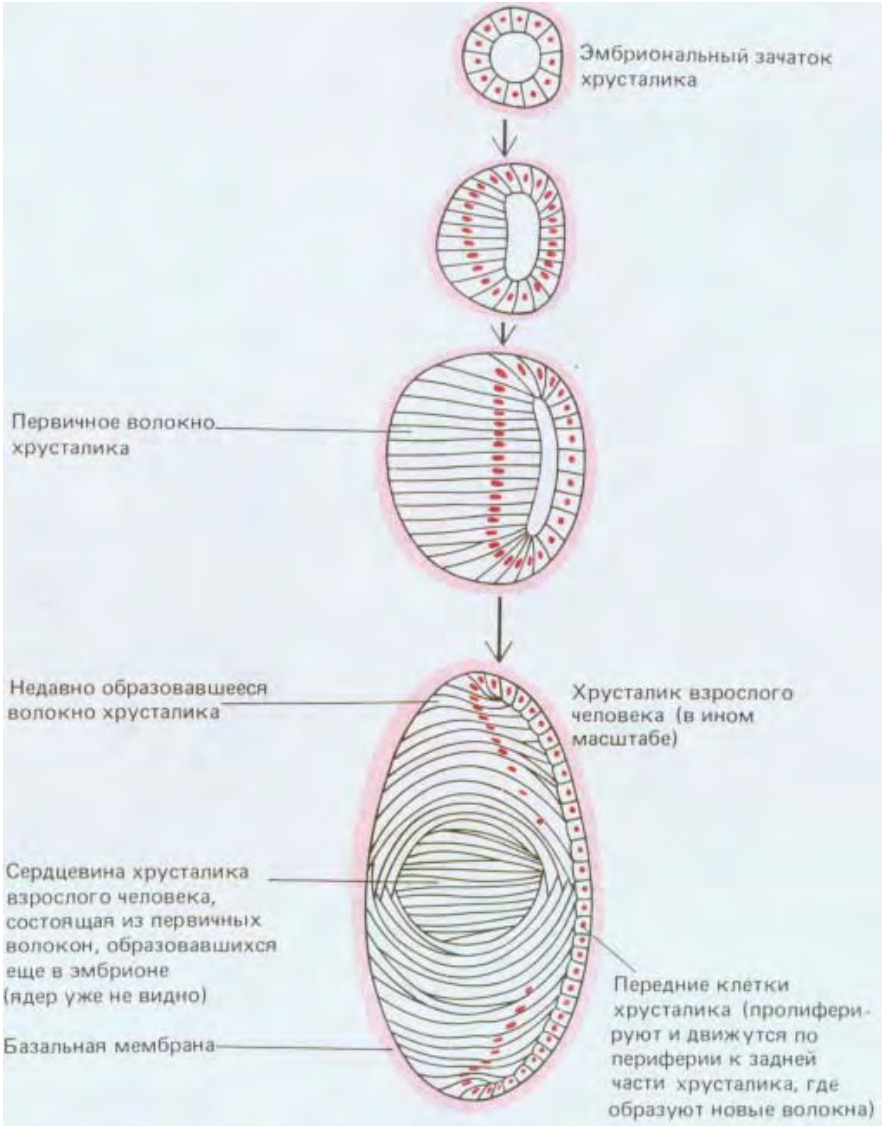


Рис. 17-4. Развитие хрусталика у человека (схематизировано).

вается в виде сферического пузырька из одного слоя эпителиальных клеток, окружающих центральную полость. Вскоре часть этого эпителия, расположенная сзади, т. е. обращенная к сетчатке, претерпевает резкое изменение. Ее клетки начинают синтезировать специфические белки хрусталика - *кристаллины* - и заполняются ими. При этом клетки необычайно удлиняются, дифференцируясь в волокна (см. рис. 17-4). В конце концов их ядра распадаются и синтез белков прекращается. Таким путем часть эпителия хрусталикового пузырька, обращенная к сетчатке, развивается в плотное преломляющее тело, которое состоит из множества высоких призматических клеток, лишенных признаков жизни и уложенных стопками (рис. 17-5). Центральная полость пузырька исчезает, в то время как передняя часть эпителия, обращенная к внешнему миру, сохраняется в виде тонкого слоя низких кубических клеток. Рост хрусталика зависит от пролиферации этих клеток в передней части, откуда они частично выталкиваются на края хрусталика и на его заднюю поверхность (см. рис. 17-4 и 17-5, *А*). Во время этого передвижения они перестают делиться, начинают синтезировать кристаллины и дифференцируются в волокна хрусталика. Таким путем на протяжении всей жизни в хрусталике появляются дополнительные волокна, хотя скорость их образования постепенно снижается.

Кристаллины в волокнах хрусталика, образовавшихся в ранний период, отличаются от кристаллинов более поздних волокон, подобно тому как гемоглобины в эритроцитах плода отличаются от гемоглобинов взрослого организма. Однако эритроциты заменяются новыми, а волокна хрусталика - нет. Поэтому в сердцевине хрусталика у взрослых находятся волокна, заложенные еще у эмбриона и содержащие кристал-

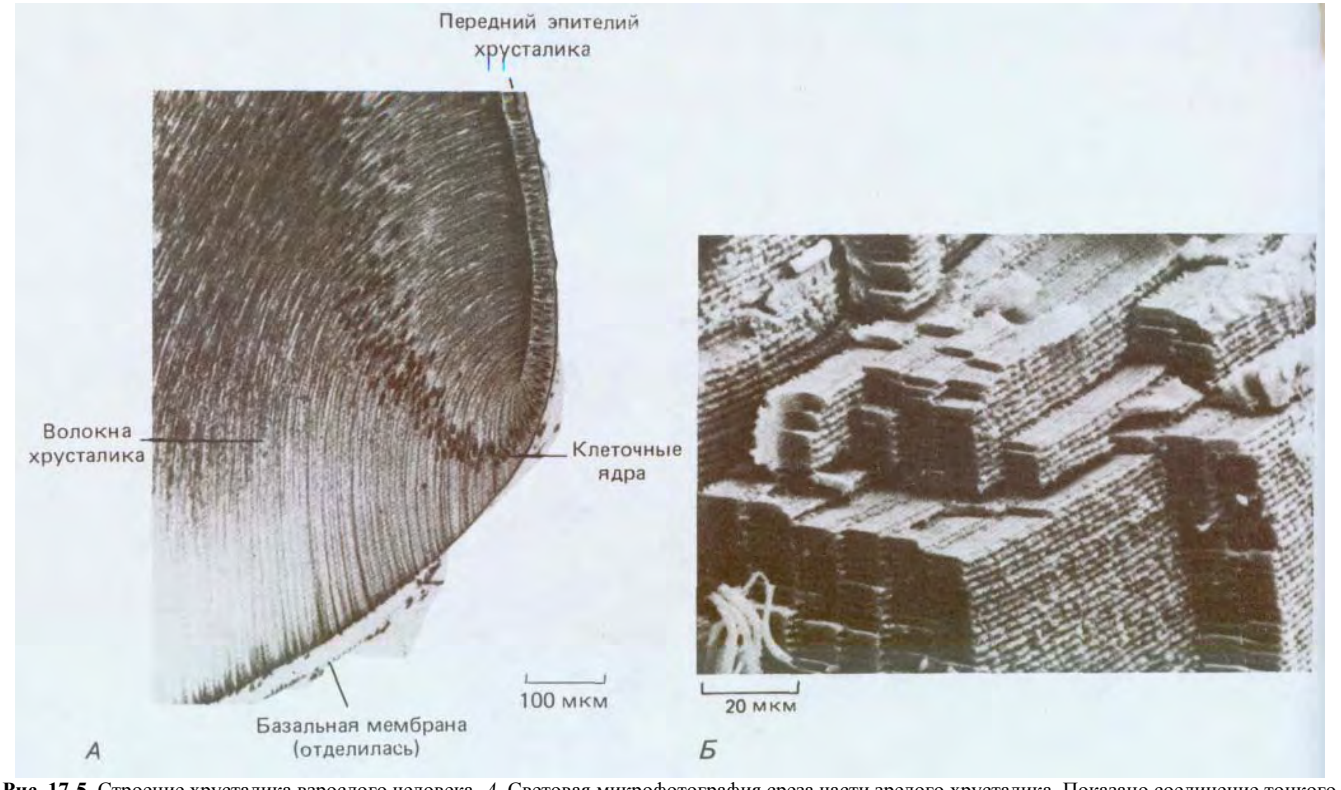


Рис. 17-5. Строение хрусталика взрослого человека. *А.* Световая микрофотография среза части зрелого хрусталика. Показано соединение тонкого эпителия, покрывающего переднюю сторону хрусталика, с дифференцированными волокнами. *Б.* Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Волокна плотно упакованы и напоминают штабеля досок на лесоскладе. Каждое волокно - это одна омертвевшая удлиненная клетка. Длина отдельных волокон достигает 12 мм. *(А - с* любезного разрешения Peter Gould; *Б - из* R.G. Kessel, R. H. Kardon, Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy, San Francisco: Freeman, 1979.)

лины определенных типов, синтезированные в том раннем периоде. Различия в показателе преломления между ранними эмбриональными типами кристаллинов и более поздними типами помогают избавить хрусталик от оптических аберраций, свойственных простым линзам, сделанным из однородного материала, например из стекла.

17.2.2. Большинство перманентных клеток обновляет свои составные части. Пример: фоторецепторные клетки сетчатки [7]

Таких неизменяемых клеток, как волокна хрусталика, мало. Как правило, даже клетки, не делящиеся в течение всей жизни организма, обновляют свои компоненты. Клетки сердечной мышцы и нейроны, хотя они и не делятся, метаболически активны и обладают способностью не только синтезировать новые РНК и белки, но и изменять свои размеры и структуру в течение жизни. Например, клетки сердечной мышцы обновляют основную массу своих белковых молекул в течение 1-2 недель, и они могут установить такой баланс между синтезом и распадом белка, что сами клетки увеличатся в размерах, если возрастет нагрузка на сердце - скажем, при длительно повышенном кровяном давлении. Нервные клетки тоже непрерывно заменяют свои белковые молекулы; более того, многие нейроны способны регенерировать перерезанные аксоны и дендриты (см. гл. 19).

Процесс обновления клеточных компонентов особенно ярко можно проиллюстрировать на примере высокоспециализированных нервных клеток, образующих **фоторецепторы** сетчатки. Нервная часть сетчатки (см. рис. 17-2) состоит из нескольких клеточных слоев, расположенных, казалось бы, весьма странным образом: нейроны, передающие зрительные сигналы в мозг (ганглиозные клетки сетчатки), лежат ближе всего

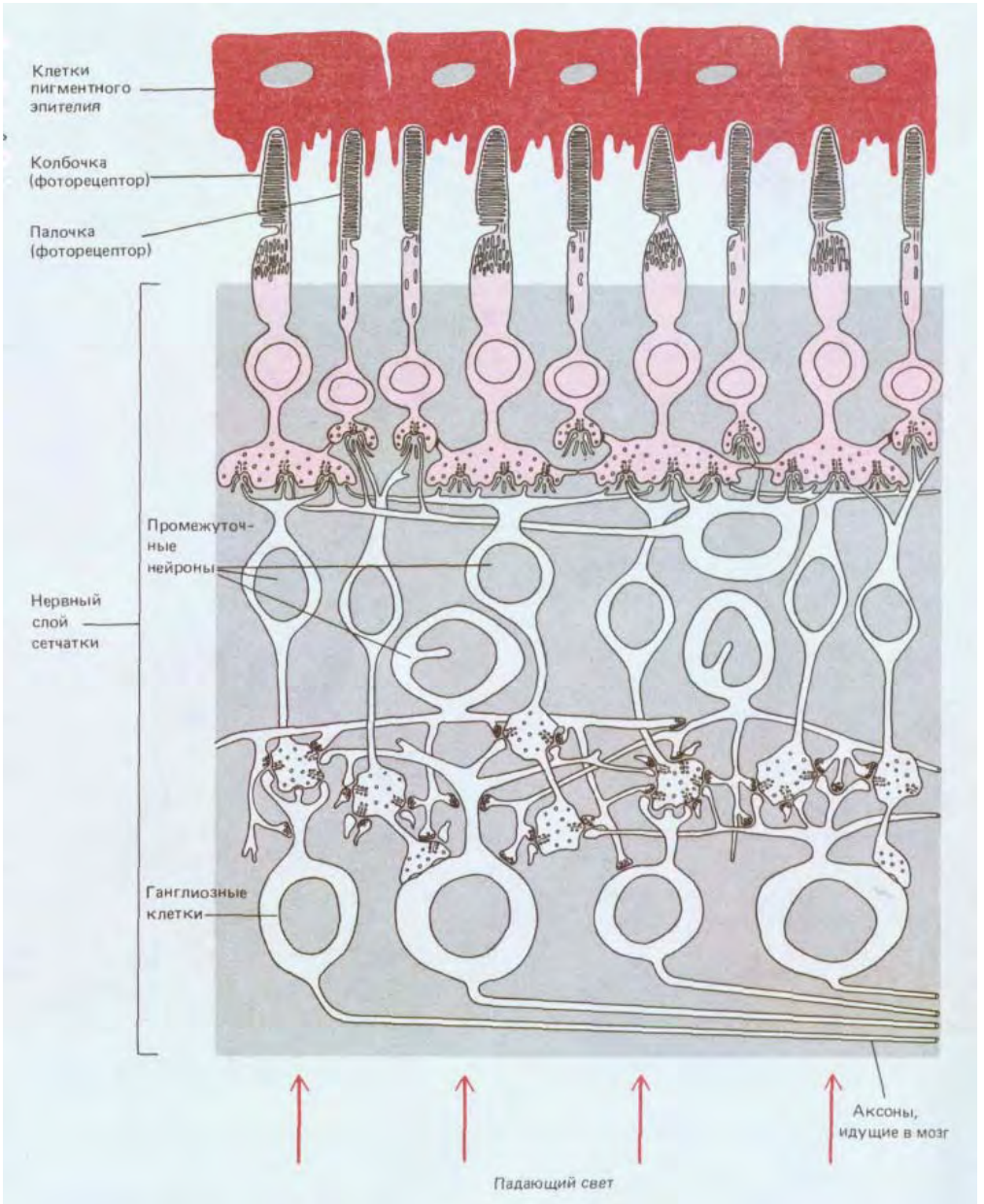
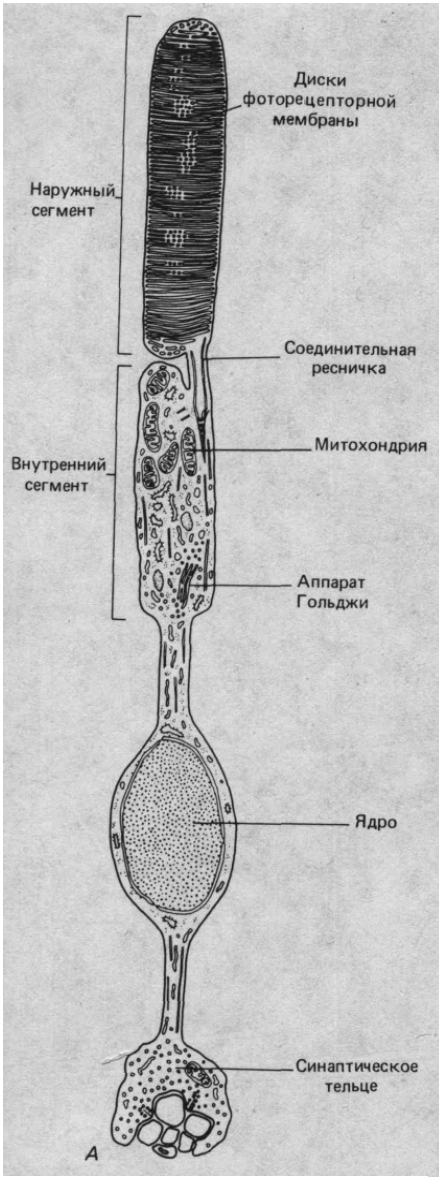


Рис. 17-6. Схема строения сетчатки. При стимуляции фоторецепторов нервные сигналы передаются через промежуточные нейроны ганглиозным клеткам, а те в свою очередь передают их в мозг. Пространство между нейронами и фоторецепторами в нервном слое сетчатки (на рисунке светло-серое) заполнено специализированными опорными клетками, которые на схеме не показаны. (По J. E. Dowling, B. B. Boycott, Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 166, 80-111, 1966.)

к внешнему миру, так что свет, фокусируемый хрусталиком, должен пройти через них по пути к фоторецепторным клеткам. Последние расположены так, что концы их, воспринимающие *свет, - наружные сегменты* - частично погружены в пигментный эпителий (рис. 17-6). В соответствии со своей формой фоторецепторы делятся на **палочки и колбочки.** Они содержат различные светочувствительные комплексы белка со зрительным пигментом. Палочки особенно чувствительны при малой освещенности, тогда как колбочки, представленные тремя разновидностями (каждая для своего участка спектра), служат для восприятия цвета и тонких деталей. Наружный сегмент фоторецептора каждого типа - это, по-видимому, видоизмененная ресничка: в нем мы находим характерное для ресничек расположение микротрубочек в участке, связывающем наружный сегмент с остальной клеткой (рис. 17-7). Главная же часть наружного сегмента почти целиком заполнена плотно уложенными мембранами, в которые погружены светочувствительные белки, связанные со зрительным пигментом. Противоположные концы фото-



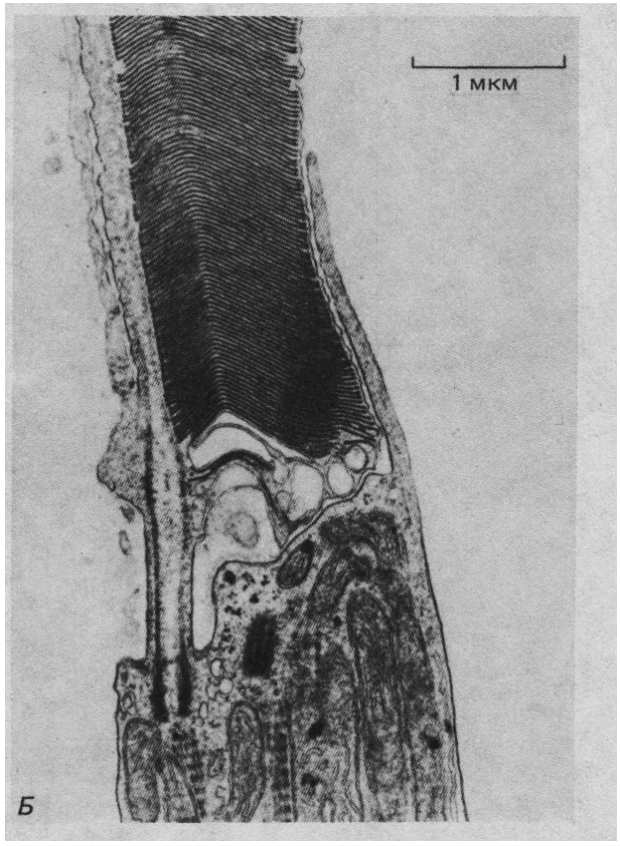


Рис. 17-7. Строение палочки. *А.* В действительности число фоторецепторных дисков в наружном сегменте достигает примерно тысячи. *Б.* Электронная микрофотография участка палочки. Можно видеть основание наружного сегмента и видоизмененную ресничку, которая связывает наружный сегмент с внутренним. *(А-T.L.* Lentz, Cell Fine Structure. Philadelphia: Saunders, 1971; *Б-M.J.* Hogan, J. A. Alvarado, J. E. Weddell, Histology of the Human Eye: An Atlas and Textbook. Philadelphia: Saunders, 1971.)

рецепторных клеток образуют синаптические контакты со вставочными нейронами сетчатки.

Фоторецепторы - это перманентные клетки, не способные делиться. Но молекулы светочувствительного белка не перманентны. Они все время обновляются, и это можно обнаружить по непрерывному включению в них радиоактивных аминокислот. В палочках (любопытно, что этого нет в колбочках) такое обновление идет как на конвейере. В опытах с кратковременным внесением аминокислот можно проследить, как через всю клетку продвигается эшелон меченых белковых молекул (рис. 17-8). После обычных этапов включения аминокислот в белок и упаковки продукта в аппарате Гольджи, происходящих во внутреннем сегменте клетки, радиоактивный материал появляется сначала у основания стопки мембран в наружном сегменте. Отсюда он постепенно перемещается к кончику сегмента, в то время как в основание стопки поступает новый материал. Наконец, после того как меченые белки вместе со слоями мембраны, в которую они погружены, дойдут до вершины стопки (у крысы приблизительно через 10 дней), они фагоцитируются и перевариваются клетками пигментного эпителия.

Дальнейшие сведения о фоторецепторах и их функции в нервной системе читатель найдет в гл. 19.

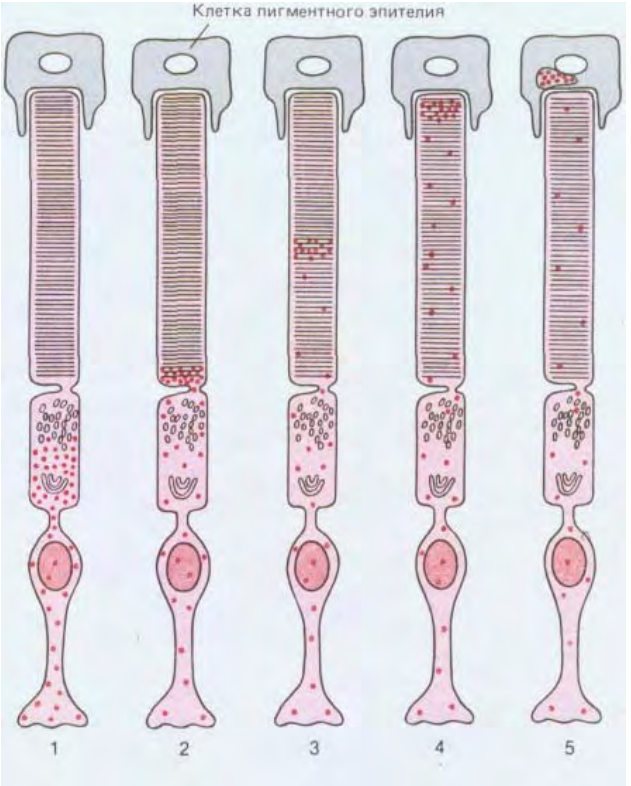


Рис. 17-8. Обновление мембранного белка в палочке сетчатки. После кратковременного введения ^{3}H-лейцина можно с помощью радиоавтографии следить за перемещением его в клетке. Красные точки - места, где есть радиоактивность. Метод выявляет только лейцин, включившийся в белки; невключившаяся метка отмывается во время приготовления препарата. Включенный лейцин сначала концентрируется по соседству с аппаратом Гольджи (1); отсюда он переходит в основание наружного сегмента и попадает в только что синтезированный диск фоторецепторной мембраны (2). Здесь образуется около 3-4 новых дисков в час (у млекопитающих), и они оттесняют более старые диски в сторону пигментного эпителия (3-5).

Заключение

Нейроны, клетки сердечной мышцы и волокна хрусталика в течение всей жизни организма не делятся и не заменяются новыми. В зрелых волокнах хрусталика клеточные ядра уже дегенерировали и белковый синтез прекратился, так что во внутренней центральной области хрусталика находятся белки, синтезированные еще в раннем эмбриогенезе. Но в большинстве других перманентных клеток метаболическая активность продолжается и идет непрерывное обновление клеточных компонентов. Это четко показано на палочках сетчатки, где новые слои фоточувствительной мембраны синтезируются около ядра, непрерывно перемещаются к верхушке клетки и затем постепенно поглощаются и перевариваются клетками пигментного эпителия.

17.3. Обновление путем простого удвоения [8]

У позвоночных дифференцированные клетки в большинстве своем не перманентны - они все время погибают и замещаются новыми. В течение жизни взрослого организма новые дифференцированные клетки создаются одним из двух способов: 1) при *простом удвоении* существующих дифференцированных клеток образуются две дочерние клетки того же типа; 2) новые клетки могут образовываться из недифференцированных *стволовых клеток,* и этот способ, как мы увидим дальше, связан с изменением клеточного фенотипа.

Скорость обновления варьирует от ткани к ткани. Время оборота клеток может измеряться сутками, как в эпителиальной выстилке тонкого кишечника (она обновляется за счет деления стволовых клеток), а может длиться год и более, как в поджелудочной железе (где происходит простое удвоение клеток). Во многих тканях, обычно обновляющихся очень медленно, при надобности возможна стимуляция более

быстрого образования новых клеток. В этом разделе мы рассмотрим обновление путем простого удвоения дифференцированных клеток на примере печени и эндотелиальных клеток.

17.3.1. Печень-промежуточное звено между пищеварительным трактом и кровью [9]

Переваривание пищи - процесс сложный. Определенные клетки, выстилающие пищеварительный тракт, выделяют различные вещества, такие как соляная кислота и ферменты, расщепляющие компоненты пищи на более простые соединения. Другие клетки всасывают продукты переваривания из просвета кишечника и переносят их в кровь для использования другими клетками организма. Все эти процессы регулируются в соответствии с составом поступившей пищи и с концентрацией

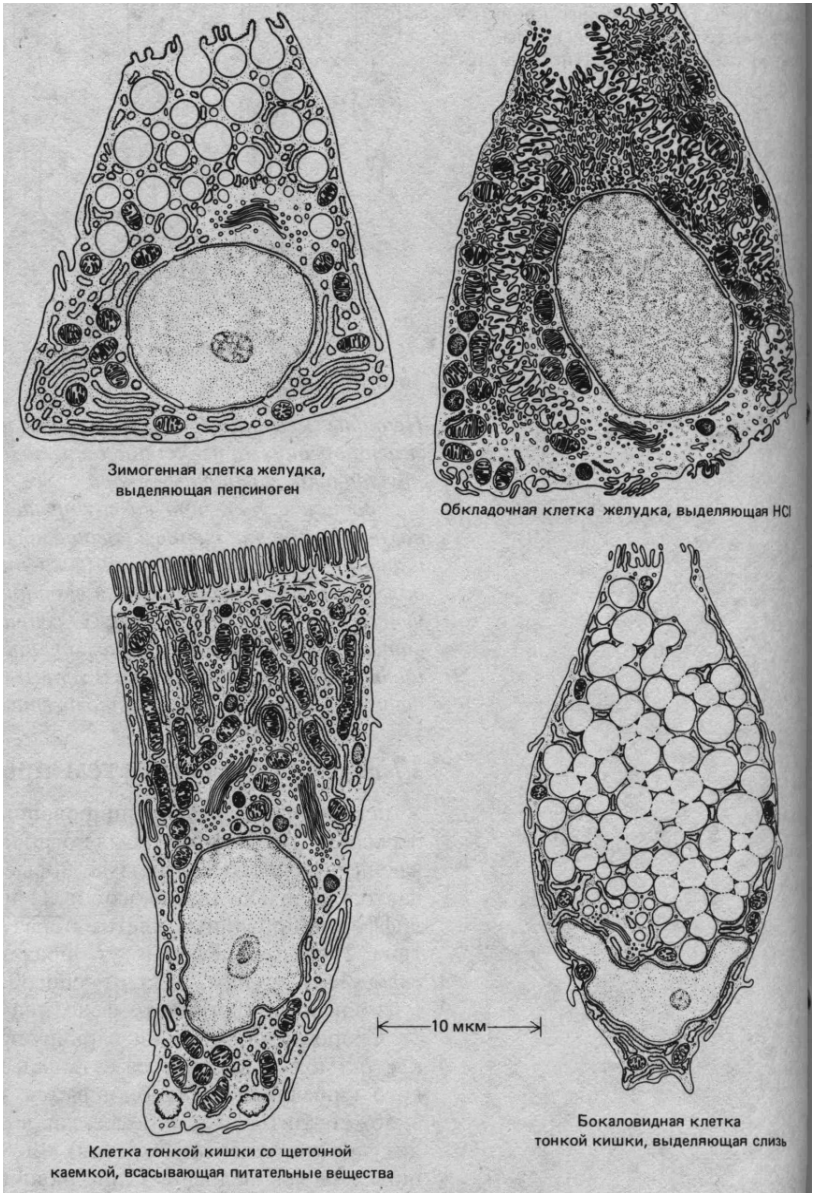


Рис. 17-9. Некоторые виды специализированных клеток, встречающихся в эпителиальной выстилке желудочно-кишечного тракта. На срезах эпителия часто видны рядом клетки разного типа (см. рис. 17-17, *Б).* (По T. L. Lentz, Cell Fine Structure. Philadelphia: Saunders, 1971.)

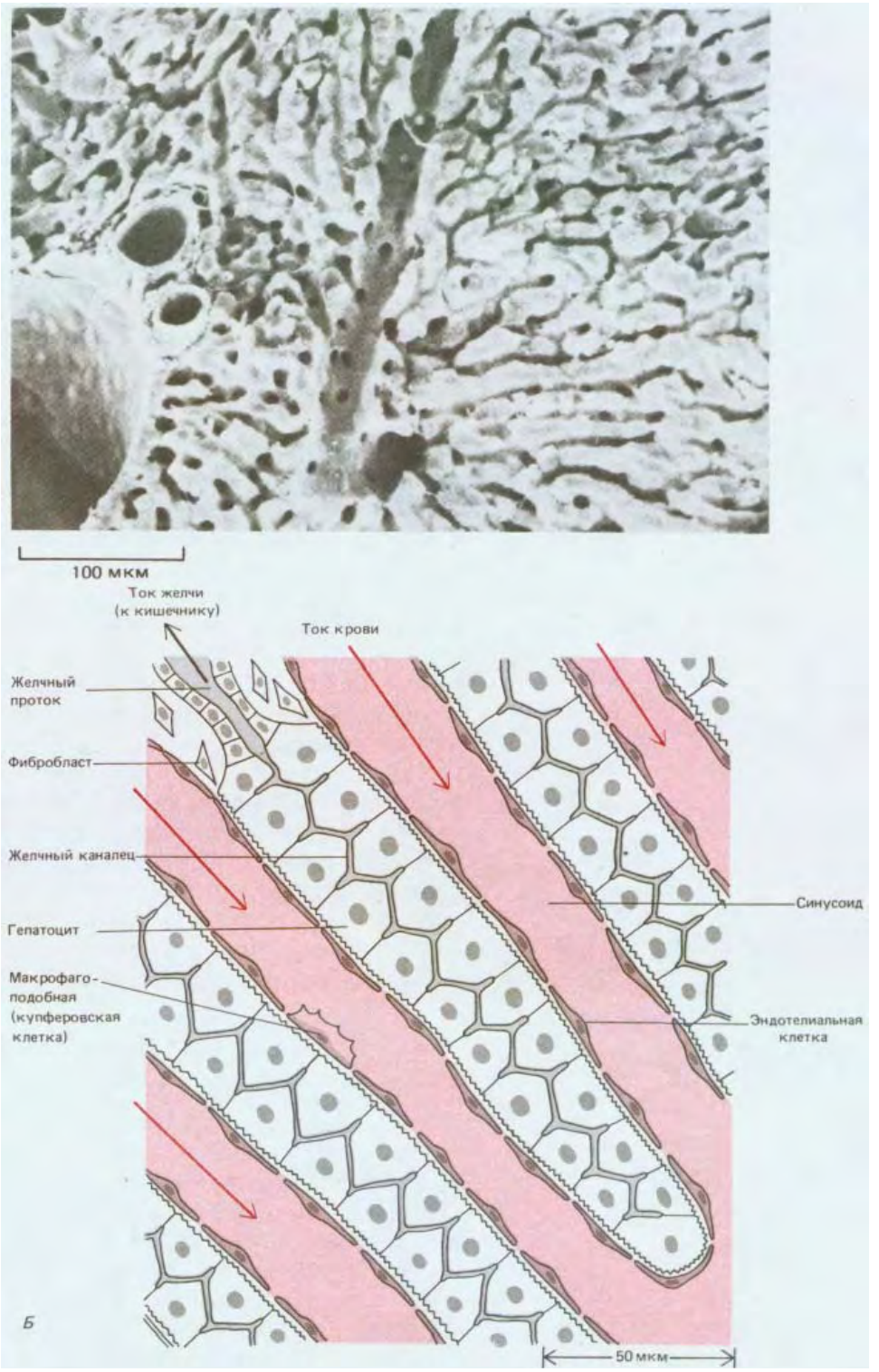


Рис. 17-10. Структура печени. *А.* Микрофотография участка печени, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Видны складчатые слои гепатоцитов (трабекулы) и множество узких каналов (синусоидов), по которым протекает кровь. Более широкие каналы - это сосуды, которые распределяют к собирают кровь, протекающую через синусоиды. *Б.* Схематическое изображение тонкой структуры печени. Гепатоциты отделены от кровяного русла лишь одним тонким слоем эндотелиальных клеток с разбросанными между ними макрофагоподобными купферовскими клетками. Небольшие отверстия в этом слое позволяют гепатоцитам обмениваться с кровью молекулами и мелкими частицами, но гепатоциты защищены при этом от прямого контакта с движущимися клетками крови. Помимо обмена веществами с кровью гепатоциты образуют систему очень узких желчных канальцев, в которые они выделяют желчь, выходящую далее через желчные протоки в кишечник. В действительности структура печени не так регулярна, как на этой схеме. *(А* R.G. Kessel, R. H. Kardon, Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. San Francisco: Freeman, 1979.)

метаболитов в циркулирующей крови. Этот комплекс задач выполняется с помощью своего рода разделения труда: одни группы клеток секретируют НС1 или ферменты, другие всасывают питательные вещества, третьи вырабатывают пептидные гормоны (например, гастрин), регулирующие пищеварительную и метаболическую активность, и т. д. (рис. 17-9). Некоторые из этих клеток расположены в стенке кишечника вперемешку, другие собраны в крупные железы, которые соединены с кишечником и развиваются у эмбриона как выросты кишечного эпителия.

Самая крупная из таких желез - печень. У эмбриона она развивается

в том месте, где одна из главных вен проходит рядом со стенкой первичной кишки. Этот орган и во взрослом состоянии сохраняет необычайно тесную связь с кровью. Печеночные клетки **(гепатоциты),** происходящие из эпителия первичной кишки, образуют складчатые слои (трабекулы), примыкающие к заполненным кровью пространствам - *синусоидам* (рис. 17-10, *А).* Кровь отделена от поверхности гепатоцитов слоем уплощенных эндотелиальных клеток, покрывающих каждую трабекулу (рис. 17-10, *Б).* Такая структура облегчает выполнение важнейших функций печени, в основе которых лежит обмен метаболитами между печеночными клетками и кровью.

Печень - важнейший орган, в котором питательные вещества, всосавшиеся из кишечника, преобразуются для использования другими тканями организма. Большую часть крови печень получает прямо из кишечного тракта (через портальную вену). Гепатоциты ответственны за синтез, расщепление и хранение множества различных веществ. Они играют центральную роль в углеводном и жировом обмене всего организма; и они же вырабатывают большую часть белков, содержащихся в плазме крови. В то же время гепатоциты сохраняют связь с просветом кишечника через систему мельчайших канальцев и более крупных протоков (рис. 17-10, *Б).* Через эти протоки гепатоциты выделяют в кишечник и отходы метаболизма, и эмульгирующее вещество - *желчь,* которая облегчает всасывание жиров. Внутри популяции гепатоцитов (в отличие от остальных частей пищеварительного тракта), по-видимому, нет заметного «разделения труда»: все гепатоциты способны выполнять один и тот же широкий круг метаболических и секреторных функций.

По своему «образу жизни» гепатоциты тоже значительно отличаются от клеток, выстилающих просвет самого кишечника. Последние находятся в очень тяжелых условиях; они не могут жить долго, соприкасаясь с механически и химически агрессивным содержимым кишечника, и должны быстро и непрерывно заменяться новыми клетками (см, рис. 17-17). Гепатоциты же избавлены от прямого контакта с содержимым кишки, они живут значительно дольше и обновляются с небольшой, но строго контролируемой скоростью.

17.3.2. Утрата печеночных клеток стимулирует их пролиферацию [10]

Даже в медленно обновляющейся ткани небольшой, но постоянный дисбаланс между образованием и утратой клеток привел бы к катастрофическим последствиям. Если у человека каждую неделю будут делиться 2% печеночных клеток, а теряться будет только 1% клеток, то печень начнет расти и через 8 лет ее вес превысит вес всего остального тела. Должен существовать какой-то гомеостатический механизм, приводящий скорость размножения клеток в соответствие с массой ткани. Необходимость в подобном контроле особенно велика у такого органа, как печень, клетки которой время от времени разрушаются под действием ядов (например, алкоголя).

Существование гомеостатического контроля клеточной пролиферации в печени было четко показано в опытах, в которых значительную часть гепатоцитов удаляли хирургическим путем или же вызывали их гибель, вводя животному четыреххлористый углерод. Примерно через сутки после такого повреждения в популяции оставшихся гепатоцитов возникает волна клеточных делений, и утраченная ткань быстро замещается. Например, если удалить у крысы две трети печени, то оставшаяся часть регенерирует до нормальных размеров приблизительно за две недели. В подобных случаях сигнал для регенерации печени можно

обнаружить в крови: если у двух крыс хирургическим путем создать перекрестное кровообращение и у одной из них удалить две трети печени, то митотическая активность появится и в неповрежденной печени второй крысы. Что это за фактор в крови и как он действует, пока не выяснено, несмотря на многочисленные исследования. Возможно, что таким сигналом служит сложное сочетание каких-то химических условий, а не один-единственный фактор роста. Сходные явления регенерации наблюдаются в почках, имеющих, по-видимому, аналогичную систему управления ростом.

17.3.3. Для регенерации необходим координированный рост компонентов ткани [11]

Подобно большинству органов, печень это смесь клеток различных типов. Кроме гепатоцитов и эндотелиальных клеток, выстилающих синусоиды, здесь имеются специализированные макрофаги *(купферовы клетки),* которые поглощают твердые частицы из кровотока и разрушают «изношенные» эритроциты; есть также небольшое число фибробластов, образующих рыхлый соединительнотканный остов (см. рис. 17-10, *Б).* Клетки всех этих типов способны к делению. Для того чтобы произошла полноценная регенерация, их размножение должно быть надлежащим образом скоординировано.

Важность сбалансированной регенерации клеток всех типов можно показать на примере дисбаланса и его последствий. Например, если многократно повреждать печень четыреххлористым углеродом или алкоголем с такими короткими интервалами, что гепатоциты не будут успевать полностью восстанавливаться, преимущество могут получить фибробласты; в этом случае печень будет необратимо «забита» излишней соединительной тканью, и для роста гепатоцитов после устранения токсического агента останется очень мало места. Такое состояние, называемое *циррозом,* часто встречается у хронических алкоголиков. Регенерация сильно поврежденных скелетных мышц тоже зачастую бывает серьезно затруднена из-за слишком быстрого роста соединительнотканного компонента, в результате чего на месте мышечных волокон появляется рубцовая ткань. Такой дисбаланс, однако, возникает при значительном повреждении ткани; в обычных же условиях обновления ткани регуляторные механизмы, пока еще мало изученные, обеспечивают поддержание соответствующей смеси клеток разного типа.

17.3.4. Все кровеносные сосуды выстланы эндотелиальными клетками [12]

В отличие от приведенных выше примеров некоординированного роста фибробластов эндотелиальные клетки, выстилающие кровеносные сосуды, обладают удивительной способностью изменять свою численность и расположение в соответствии с локальными требованиями. Почти все ткани нуждаются в кровоснабжении, а оно в свою очередь зависит от эндотелиальных клеток. Эти клетки создают способную к гибкой адаптации систему жизнеобеспечения с разветвлениями во всех областях тела. Если бы не эта способность эндотелиальных клеток расширять и восстанавливать сеть кровеносных сосудов, рост тканей и процессы заживления были бы невозможны.

Самые крупные кровеносные сосуды - это артерии и вены, имеющие толстую прочную стенку из соединительной ткани и гладкой мускулатуры (рис. 17-11, А). Эта стенка выстлана изнутри чрезвычайно тонким одиночным слоем эндотелиальных клеток, который отделен от окружающих слоев базальной мембраной. Толщина соединительнотканного

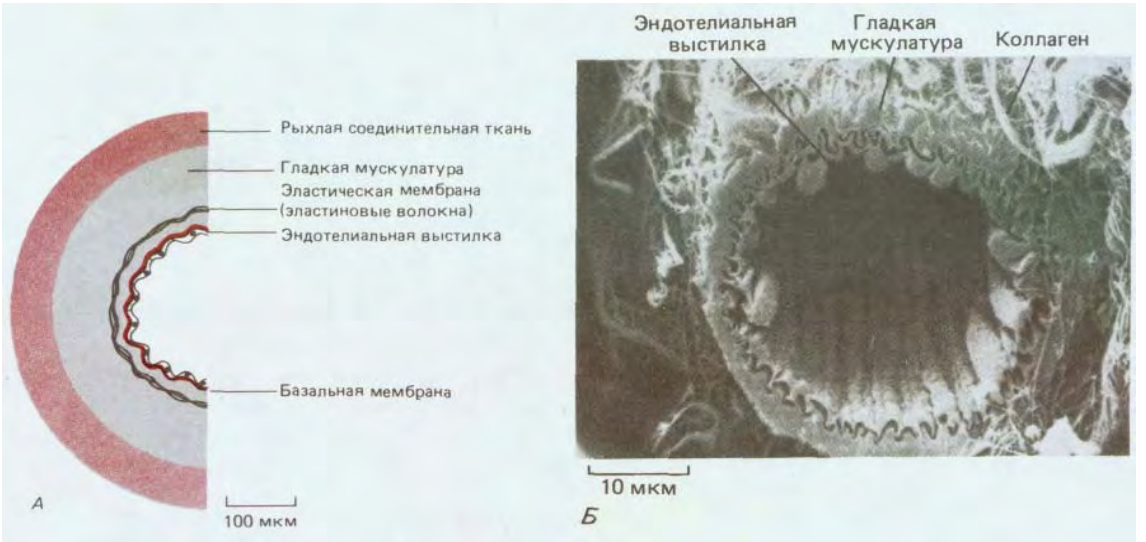


Рис. 17-11. *А.* Участок стенки малой артерии (схематический поперечный разрез). Эндотелиальные клетки, несмотря на их неприметность, являются важнейшим компонентом стенки. Сравните со строением капилляра на рис. 17-12. *Б.* Перерезанная артериола (микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа). Можно видеть внутреннюю выстилку из эндотелиальных клеток, а вокруг них - слой гладкой мускулатуры и волокнистой соединительной ткани. Эндотелий сосуда собран в складки вследствие небольшого сокращения мышечного слоя. При фиксации препарата эндотелий, сжавшись, несколько отошел от остальных слоев, и здесь образовалась узкая щель. *(Б-* R. G. Kessel, R. H. Kardon, Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. San Francisco: Freeman, 1979.)

и мышечного слоев стенки варьирует в зависимости от диаметра и функции сосуда, но эндотелиальная выстилка имеется всегда (рис. 17-11, Б). Стенки тончайших разветвлений сосудистого дерева - капилляров и синусоидов - состоят только из эндотелиальных клеток и базальной мембраны (рис. 17-12). Таким образом, эндотелиальные клетки выстилают всю сосудистую систему - от сердца до мельчайших капилляров - и управляют переходом веществ (а также лейкоцитов) из тканей в кровь и обратно. Более того, изучение эмбрионов показало, что сами артерии и вены развиваются из простых малых сосудов, построенных исключительно из эндотелиальных клеток и базальной

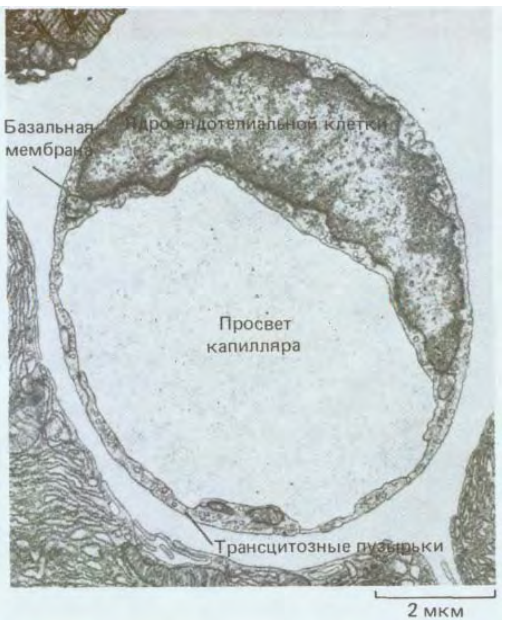


Рис. 17-12. Поперечный срез узкого капиляра та поджелудочной железы (электронная микрофотография). Стенка образована одной эндотелиальной клеткой, окруженной базальной мембраной. Обратите внимание на мелкие (80 нм) «трансцитозные» пузырьки. Предполагается, что они обеспечивают перенос макромолекул через стенку такого капилляра: молекулы захватываются в пузырьки на поверхности клетки, обращенной в просвет сосуда, и выводятся путем экзоцитоза на наружной поверхности (или наоборот). (R. P. Bolender, J. Cell Biol., **61,** 269-287, 1974. С разрешения Rockefeller Univ. Press.)

мембраны: соединительная ткань и гладкая мускулатура там, где это нужно, добавляются позднее под действием сигналов от эндотелиальных клеток.

17.3.5. Новые эндотелиальные клетки образуются путем простого деления существующих эндотелиальных клеток [13]

Во всей сосудистой системе взрослого организма эндотелиальные клетки сохраняют способность к делению и передвижению. Если, например, участок стенки аорты будет поврежден и лишится своей эндотелиальной выстилки, в окружающем эндотелии образуются новые клетки, которые перемещаются так, чтобы покрыть поврежденное место. Новые клетки способны даже покрывать внутреннюю поверхность пластиковых трубок, используемых хирургами для замены поврежденных частей кровеносных сосудов.

Пролиферацию эндотелиальных клеток можно продемонстрировать путем мечения их в фазе S ^{3}H-тимидином. В нормальных сосудах доля эндотелиальных клеток, включающих метку, особенно высока в местах разветвления артерий, где турбулентность потока крови ускоряет износ эндотелиальных клеток и тем самым, по-видимому, стимулирует их обновление. В целом, однако, эти клетки обновляются очень медленно: время жизни клетки измеряется месяцами или даже годами.

Эндотелиальные клетки не только восстанавливают выстилку существующих кровеносных сосудов, но и создают новые сосуды. Это обязательно должно происходить у зародыша, чтобы сосудистая сеть не отставала от роста тела, и в тканях взрослого организма, которые подвергаются циклическим перестройкам, а также при заживлении ран.

17.3.6. Новые капилляры образуются как ответвления существующих сосудов [14, 15]

Новые сосуды сначала возникают как капилляры, которые ответвляются от уже имеющихся мелких сосудов. Этот процесс **ангиогенеза** представляет собой реакцию на специфические сигналы. Его можно легко продемонстрировать у кроликов. В ухе кролика прокалывают небольшое отверстие и с обеих сторон укрепляют покровные стекла, чтобы получилась узкая камера с прозрачными стенками, в которой могут расти клетки, окружающие рану. Удобно также наблюдать ангиогенез в таких прозрачных структурах, как роговица глаза. Раздражение роговицы вызывает рост новых кровеносных сосудов от ее ободка, обильно снабжаемого кровью, по направлению к центру, где в норме сосудов почти нет. Таким образом происходит васкуляризация роговицы в результате прорастания эндотелиальных клеток в ее плотную, богатую коллагеном ткань.

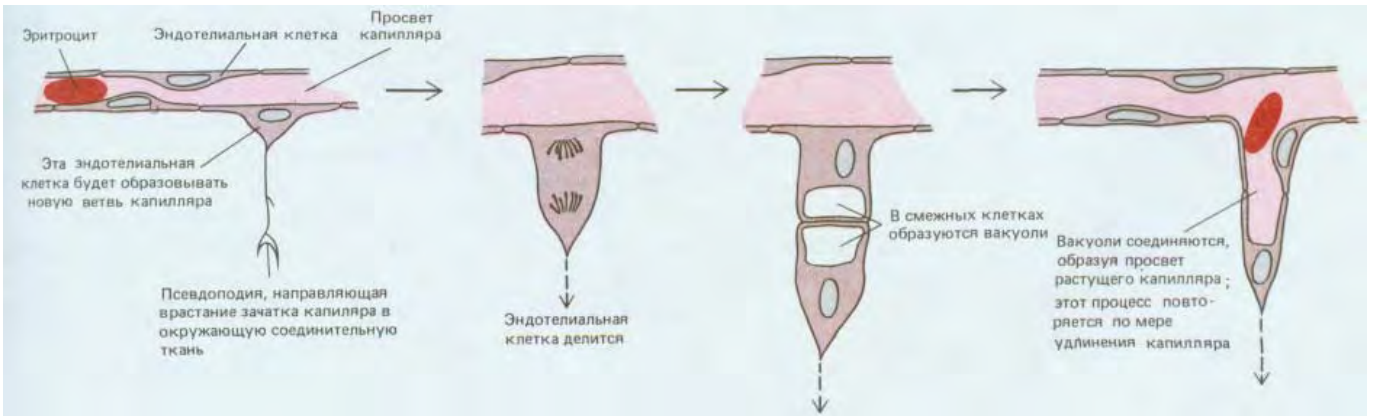


Рис. 17-13. Новый кровеносный капилляр образуется путем «отпочковывания» эндотелиальной клетки от стенки существующего малого сосуда. Эта схема основана на наблюдениях над клетками в прозрачном хвосте живого головастика. (По C. C. Speidel, Am. J. Anat., 52, 1-79, 1933.)

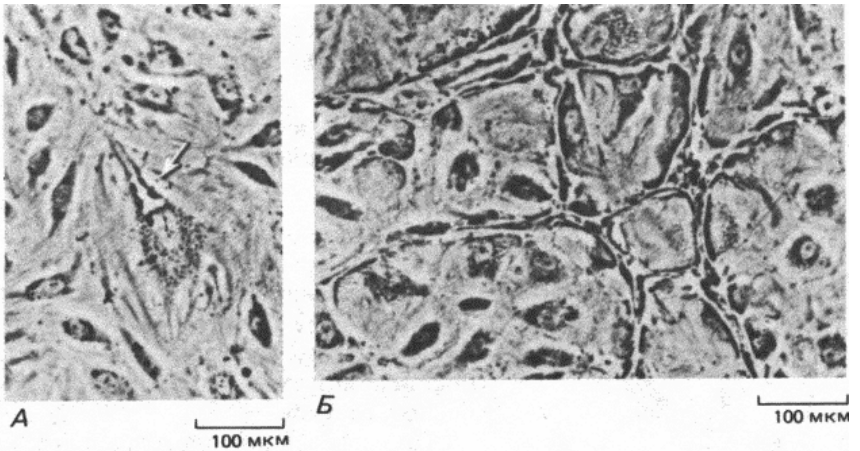


Рис. 17-14. В эндотелиальных клетках, растущих в культуре, спонтанно возникают вакуоли, которые соединяются, образуя сеть капиллярных трубочек. На фото *А а Б* представлены последовательные стадии этого процесса. Стрелкой *(А)* указана вакуоль, появившаяся сначала в одной эндотелиальной клетке. Культуры произошли от групп из двух-четырех эндотелиальных клеток, взятых из коротких отрезков капилляра. Эти клетки садятся на поверхность культуральной чашки, покрытую коллагеном, и формируют небольшую распластанную колонию, которая постепенно увеличивается по мере пролиферации клеток. Колония распространяется по чашке, и в конце концов (примерно через 20 дней) в центральных участках начинают формироваться капиллярные трубки; вскоре появляются и ответвления, а еще через 5-10 дней уже можно видеть обширную сеть трубок *(В). (}.* Folkman, C. Haudenschild, Nature, 288, 551-556, 1980. Copyright Macmillan Jornals Ltd.)

Такого рода наблюдения показывают, что эндотелиальные клетки, которые в будущем сформируют новый капилляр, отрастают от стенки существующего капилляра или небольшой венулы, выпуская сначала тонкие длинные псевдоподии (рис. 17-13); затем образуется массивный отросток, который позже становится полым и превращается в трубку. Этот отросток продолжает удлиняться до тех пор, пока не встретит другой капилляр, с которым он соединяется, создавая путь для циркуляции крови. Как показали опыты на тканевых культурах, в среде, содержащей подходящие ростовые факторы, эндотелиальные клетки спонтанно образуют капиллярные трубочки даже в условиях изоляции от клеток каких-либо других типов. Первый признак образования такой трубочки в культуре - это появление в клетке удлиненной вакуоли, которая вначале полностью окружена цитоплазмой (рис. 17-14, А). Такие же вакуоли возникают в соседних клетках и в конце концов выстраиваются концом к концу так, что сливаются в один капиллярный канал (рис. 17-14, Б). Капилляры, образующиеся в чистой культуре эндотелиальных клеток, не содержат крови, и по ним не протекает никакая жидкость. Очевидно, ток и давление крови не нужны для формирования капиллярной сети.

17.3.7. Рост капиллярной сети регулируют факторы, выделяемые окружающими тканями [15]

В живом организме эндотелиальные клетки образуют новые капилляры везде, где в них есть надобность. По-видимому, когда клеткам в тканях недостает кислорода, они выделяют ангиогенные факторы, идуцирующие новый рост капилляров. Вероятно, именно по этой причине почти все клетки у позвоночных находятся не дальше 50 мкм от капилляра. Точно так же и при заживлении ран в участке, примыкающем к поврежденной ткани, происходит кратковременная «вспышка» роста капилляров (рис. 17-15). Местное раздражение и местная инфекция тоже вызывают пролиферацию новых капилляров, а когда воспаление проходит, многие из вновь образованных капилляров претерпевают обратное развитие и постепенно исчезают.

Ангиогенез важен также при росте опухоли. Опухоль, растущая в виде плотной массы, остается очень небольшой, пока не будет обеспечена капиллярами. Без снабжения внутренней части кровью она существовала бы только за счет диффузии питательных веществ с периферии и поэтому не могла бы увеличиваться больше чем до нескольких миллиметров в диаметре. Для дальнейшего роста опухоль должна индуцировать образование капиллярной сети, которая проросла бы

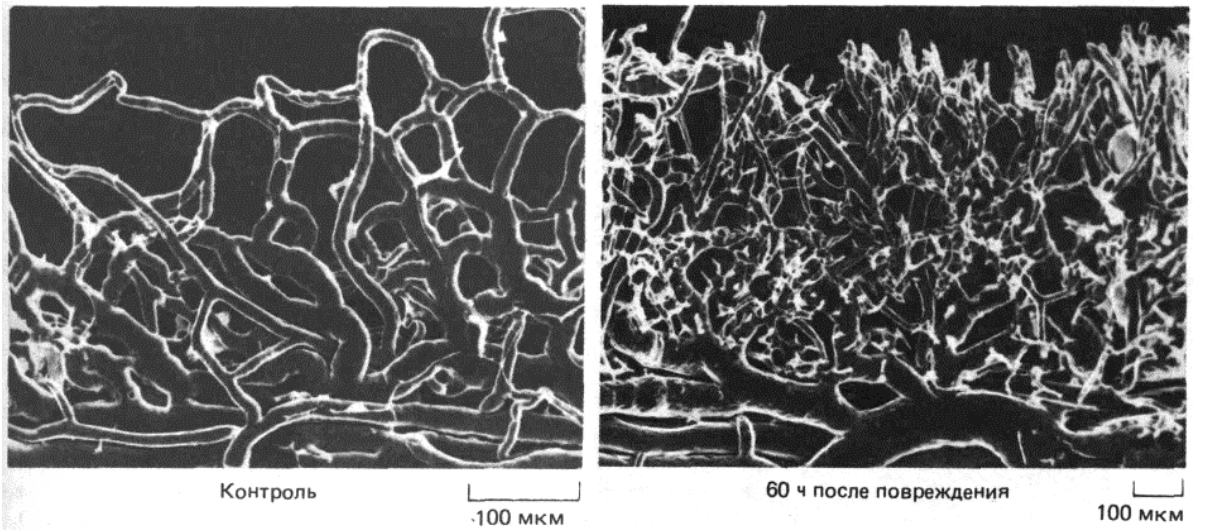


Рис. 17-15. Слепки кровеносных сосудов края роговицы, показывающие реакцию на повреждение (микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа). Слепки сделаны путем инъекции в сосуды специальной смолы, которая позже затвердевает. При этом выявляется форма просвета, но не внешние очертания клеток. Через 60 ч после ранения множество новых капилляров начинает отрастать по направлению к поврежденному участку (чуть выше верхнего края фото). Их ориентированный рост отражает хемотаксическую реакцию эндотелиальных клеток на ангиогенный фактор, выделяемый в области раны. (С любезного разрешения Peter C. Burger.)

в опухолевую массу. Маленький кусочек такой опухоли, пересаженный в роговицу, вызывает быстрый рост капиллярных сосудов в направлении от васкулярного края к имплантату (рис. 17-16), и скорость роста опухоли резко возрастает, как только сосуды достигнут ее.

Во всех этих случаях внедряющиеся эндотелиальные клетки должны отвечать на сигнал, который подает ткань, требующая притока крови. Ответ эндотелиальных клеток имеет по крайней мере три составляющих. Во-первых, клетки должны продырявить базальную мембрану вокруг существующего кровеносного сосуда. Показано, что эндотелиальные клетки во время ангиогенеза секретируют *протеазы,* например *активатор плазминогена,* которые позволяют им «проедать» себе путь в базальной мембране родительского капилляра или венулы. Во-вторых, эндотелиальные клетки должны двигаться в сторону источника сигнала. В-третьих, они должны делиться. При определенных обстоятельствах один или два из этих трех компонентов ответа могут быть вызваны в отсутствие других. Например, иногда новые капилляры образуются даже при блокаде пролиферации эндотелиальных клеток облучением. Показано также, что какой-то фактор, находящийся в раневой жидкости, привлекает эндотелиальные клетки и побуждает их к секреции протеаз, не стимулируя, однако, пролиферацию.

Другие факторы способны вызвать все три компонента реакции эндотелиальных клеток. Таковы, например, *кислый фактор роста фибробластов* (кислый ФРФ) и *основной фактор роста фибробластов* (основной ФРФ). Эти два белка, которые были независимо выделены и очищены из нескольких различных источников и поэтому известны и под разными другими названиями, сходны по аминокислотным последовательностям (55% гомологии). Помимо сильно выраженного действия их на эндотелиальные клетки они стимулируют пролиферацию фибробластов и клеток ряда других типов, а также служат важными регуляторами раннего эмбрионального развития (разд. 16.2.3). Какие клетки их выделяют, не вполне ясно. Клетки многих типов, включая макрофаги, тучные клетки и жировые клетки, могут выделять и другие вещества, действующие как ангиогенные факторы в период заживления, роста ткани или воспаления. Ангиогенез, так же как и иные процессы клеточной пролиферации, регулируется не каким-то одиночным сигналом, а сложным (и, возможно, избыточным) комплексом сигналов.

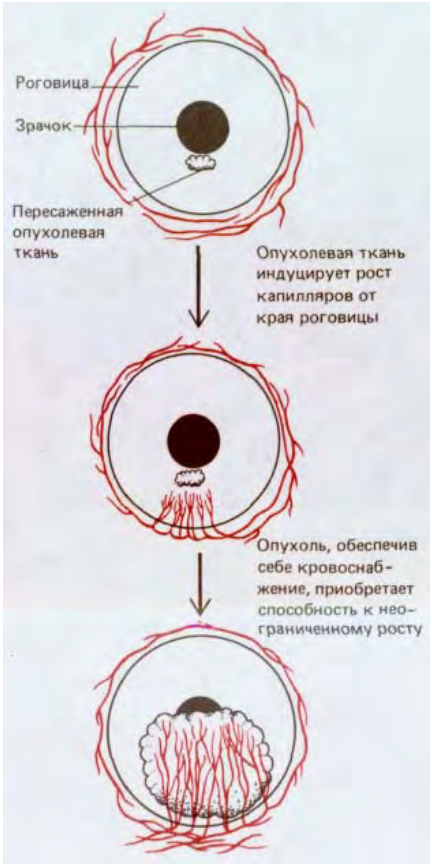


Рис. 17-16. Опухолевая ткань, пересаженная в роговицу, выделяет фактор, вызывающий рост капилляров. Капилляры обеспечивают опухоль питательными веществами из общего кровотока, и это позволяет ей расти.

Заключение

У *позвоночных большинство популяций дифференцированных клеток подвержено обновлению. В некоторых случаях полностью дифференцированные клетки просто делятся, образуя дочерние клетки того же типа. Примером могут служить гепатоциты (печеночные клетки), скорость размножения которых регулируется таким образом, чтобы поддерживать нужное общее их количество. Если значительная часть печет разрушена, скорость деления оставшихся гепатоцитов возрастает для восполнения потери. Но восстановление иногда бывает несбалансированным; например, когда в многократно повреждаемой печени фибробласты начинают расти слишком быстро по сравнению с гепатоцитами, печеночная ткань замещается фиброзной.*

Эндотелиальные клетки образуют одиночный слой, выстилающий все кровеносные сосуды и регулирующий обмен веществами между кровью и окружающими тканями. Новые кровеносные сосуды развиваются из существующих мелких сосудов в виде выростов эндотелиальных клеток: эти клетки способны образовывать полые капиллярные трубочки даже при росте в культуре. В живом организме испытывающие кислородное голодание и поврежденные ткани стимулируют ангиогенез, выделяя ангиогенные факторы, которые привлекают близлежащие эндотелиальные клетки и стимулируют их к пролиферации и выделению протеаз.

17.4. Обновление за счет стволовых клеток. Пример: эпидермис [8, 16]

Перейдем теперь от клеточных популяций, обновляющихся путем простого удвоения своих клеток, к таким, которые обновляются за счет **стволовых клеток.** Эти популяции сильно различаются не только по свойствам самих клеток и скорости их замещения, но и по пространственной организации этого процесса. Например, в выстилке тонкого кишечника клетки образуют однослойный эпителий. Этот эпителий покрывает поверхность *ворсинок,* выступающих в просвет кишки, и он же выстилает глубокие *крипты,* уходящие в толщу подлежащей соединительной ткани (рис. 17-17). Стволовые клетки находятся в защищенном месте в глубине крипт. Дифференцированные клетки, образующиеся из стволовых, выносятся в результате скольжения их в плоскости эпителиального слоя наверх, пока не достигнут открытой поверхности ворсинок, с кончиков которых они в конце концов слущиваются. Примером совсем иного процесса может служить кожа: *эпидермис* представляет собой многослойный эпителий, и дифференцирующиеся клетки перемещаются от места их образования в направлении, перпендикулярном плоскости клеточных слоев. В кроветворных тканях пространственная картина образования клеток сложна и выглядит хаотичной. Но прежде чем углубляться в дальнейшие подробности, посмотрим, что представляет собой стволовая клетка.

17.4.1. Стволовые клетки обладают способностью неограниченно делиться и давать дифференцированное потомство [17]

Для стволовой клетки определяющим будут следующие свойства:

1) она сама не является терминально дифференцированной (т. е. не прошла путь дифференцировки до конца);

2) она способна к неограниченному делению (по крайней мере в течение жизни организма);

3) при ее делении каждая дочерняя клетка стоит перед выбором - остаться стволовой клеткой, какой была родительская, или встать на

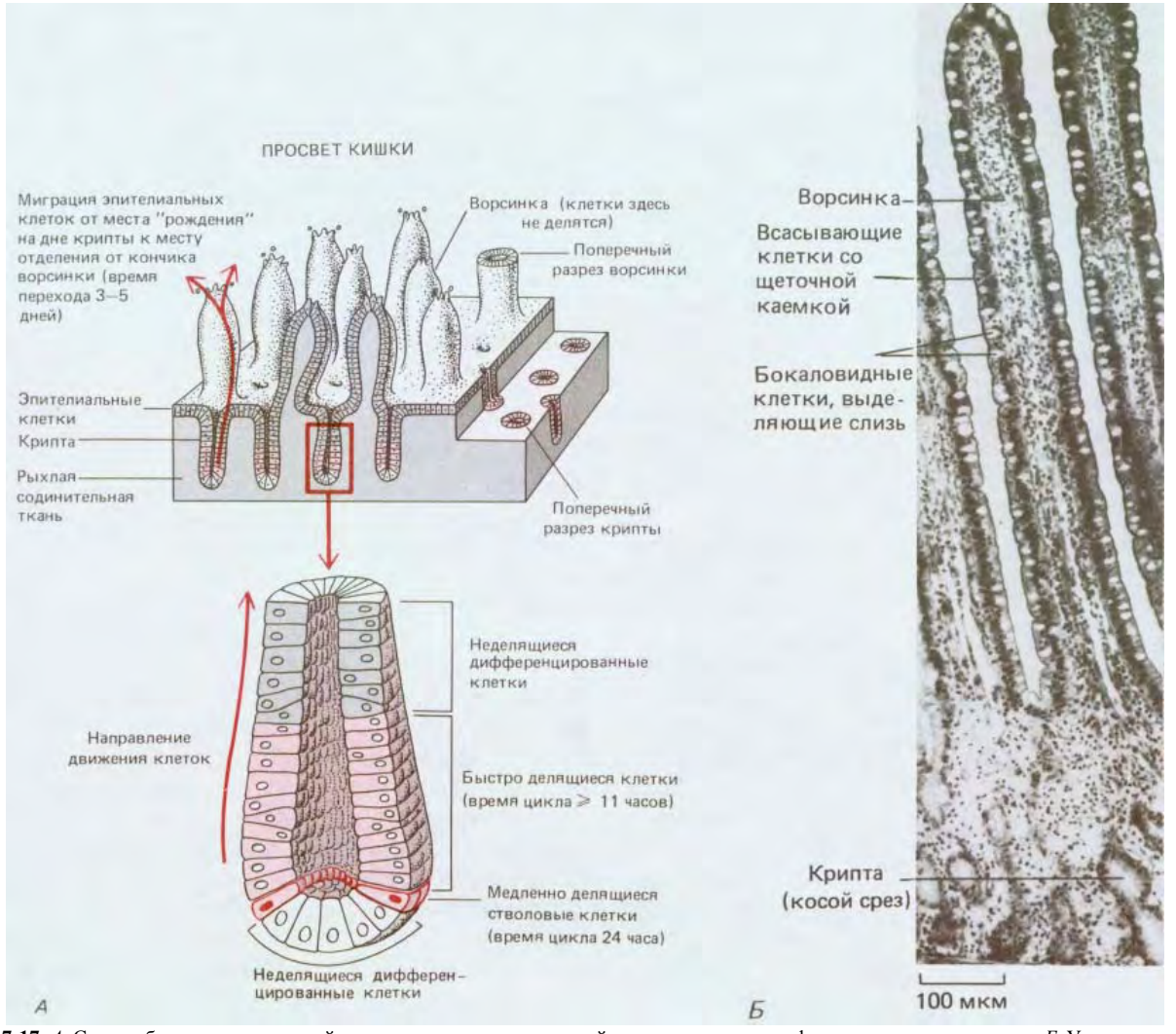


Рис. 17-17. *А.* Схема обновления клеточной популяции в выстилке тонкой кишки за счет пролиферации стволовых клеток. *Б.* Участок среза, на котором можно видеть ворсинки и крипты. Обратите внимание на светлые бокаловидные клетки (они выделяют слизь), разбросанные в эпителии ворсинок среди всасывающих клеток со щеточной каемкой. См. также рис. 17-9, где показана структура этих клеток. (С любезного разрешения Peter Gould.)

путь, необратимо ведущий к полной дифференцировке (рис. 17-18).

Стволовые клетки нужны в любом месте, где постоянно возникает потребность в новых дифференцированных клетках, которые, однако, сами делиться не могут. В ряде тканей конечное состояние дифференцировки явно несовместимо с клеточным делением. Например, ядра клеток могут разрушаться, как это происходит в наружных слоях эпидермиса, или выталкиваться из клеток, как при созревании эритроцитов у млекопитающих. Иногда осуществлению митоза и цитокинеза препятствует то, что цитоплазма плотно заполнена таким материалом, как, например, миофибриллы мышечных клеток. В других терминально дифференцированных клетках невозможность деления может быть обусловлена какими-то более тонкими биохимическими причинами. В любом таком случае обновление будет зависеть от стволовых клеток.

Стволовые клетки предназначены не для того, чтобы выполнять определенную специализированную функцию, а для того, чтобы производить клетки с такой функцией. Поэтому стволовым клеткам часто не свойствен какой-либо характерный вид, и тогда их трудно опознать. Но это не означает, что все они одинаковы. Не будучи внешне дифференцированы, они тем не менее *детерминированы* (разд. 16.2.8): клетка-сателлит в скелетной мышце - как источник мышечных волокон, базальная клетка эпидермиса - как источник ороговевающих эпителиальных клеток, сперматогония - как источник спермиев, базальная клетка обоня-

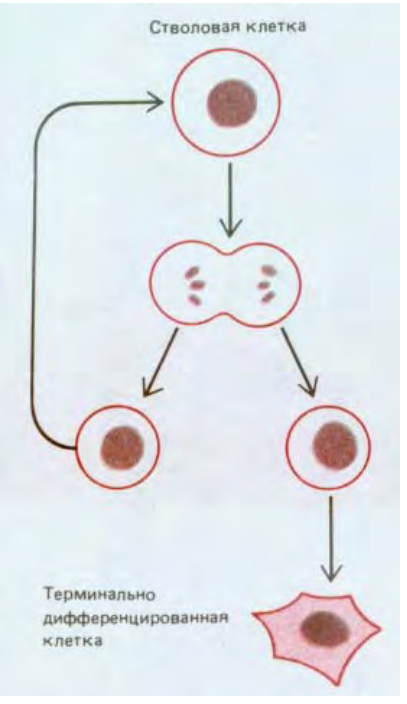


Рис. 17-18. Судьба потомков стволовой клетки. Каждая дочерняя клетка, образующаяся при делении стволовой клетки, может остаться также стволовой, а может пойти по пути, ведущему к терминальной дифференцировке.

тельного эпителия - как источник обонятельных нейронов (рис. 17-19) и т. д. Стволовые клетки, порождающие только один вид дифференцированных клеток, называют *унипотентными,* а те, которые порождают несколько их *видов - плюрипотентными.*

При изучении тканей, образующихся из стволовых клеток, возникает много серьезных вопросов. Чем определяется, будет ли данная стволовая клетка делиться или останется в состоянии покоя? От чего зависит, станет ли дочерняя клетка тоже стволовой или начнет дифференцироваться? И если она вступит на путь дифференцировки, то чем этот процесс будет регулироваться? Мы начнем рассмотрение с эпидермиса, так как его простая пространственная организация облегчает изучение биологии его стволовых клеток и судьбы их потомства.

17.4.2. Эпидермис подразделен на пролиферативные единицы [18, 19]

Эпидермальный слой кожи и эпителиальная выстилка пищеварительного тракта - это две ткани, наиболее подверженные прямым повреждающим воздействиям со стороны внешнего мира. В обеих тканях зрелые дифференцированные клетки быстро снашиваются в самых уязвимых участках и так же быстро замещаются в результате пролиферации менее дифференцированных клеток, находящихся в более защищенных местах.

Эпидермис - это многослойный эпителий, состоящий в основном из *кератиноцитов* (называемых так потому, что характерной чертой их дифференцированного состояния является синтез кератина) (рис. 17-20). От слоя к слою эти клетки изменяют свой внешний вид. Самый глубокий из внутренних слоев образован *базальными клетками.* В основном именно эти клетки делятся путем митоза. Над базальными клетками находится несколько слоев более крупных *шиповатых клеток* (рис. 17-21). Такое название они получили благодаря своему виду на препаратах для световой микроскопии: их многочисленные десмосомы с отходящими от них толстыми пучками кератиновых волокон едва различимы и выглядят как крошечные шипы на поверхности клеток. Выше шиповатых клеток лежит тонкий слой зернистых клеток (рис. 17-20); он образует границу между внутренней метаболически активной зоной и самым наружным слоем, состоящим из мертвых клеток, в которых все внутриклеточные органеллы исчезли. Эти наружные клетки редуцированы до плоских *чешуек,* заполненных плотно упакованным кератином. На поверхности, обращенной к цитоплазме, плазматические мембраны чешуек и наружных зернистых клеток укреплены тонким (12 нм), жестким слоем

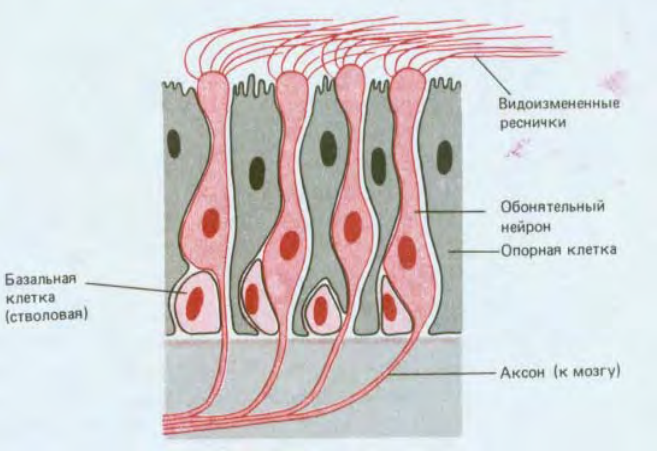


Рис. 17-19. Схема строения обонятельного эпителия, специализированного для восприятия запахов. Здесь можно различить три типа клеток: опорные клетки, базальные клетки и обонятельный нейроны. Как показывают эксперименты с применением радиоавтографии, базальные клетки являются стволовыми: из них образуются обонятельные нейроны. Это редкое исключение из правила, согласно которому нейроны представляют собой перманентные клетки. Каждый обонятельный нейрон служит около месяца (у млекопитающих), а затем заменяется новым. От круглой «головки» обонятельного нейрона отходят 6- 8 видоизмененных ресничек; как полагают, в них-то и содержатся рецепторы для пахучих веществ. Аксон, идущий от другого конца нейрона, передает информацию в мозг. Всякий раз, когда базальная клетка дифференцируется в обонятельный нейрон, от него отрастает новый аксон, который образует надлежащие связи в мозгу.

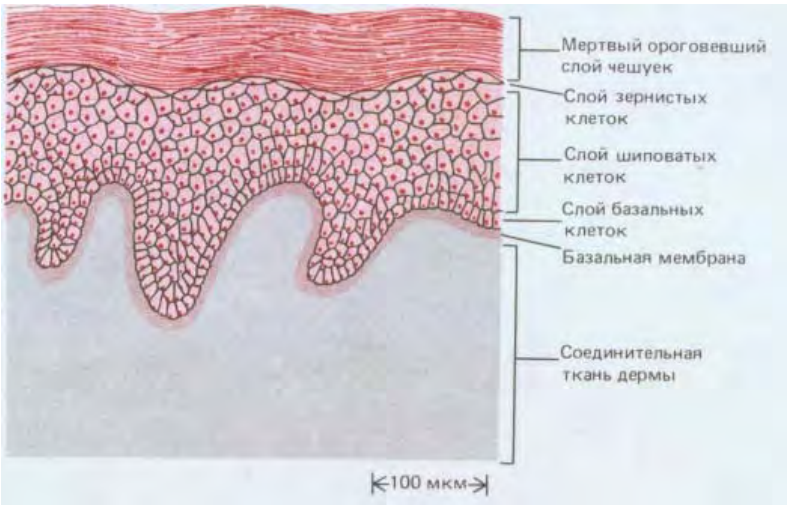


Рис. 17-20. Строение эпидермиса средней толщины у млекопитающего (схема) (см. также рис. 17-1). Зернистые (гранулярные) клетки находятся между шиповатыми клетками и уплощенными чешуйками. Они проходят предпоследнюю стадию ороговения и содержат интенсивно окрашивающиеся гранулы малоизученного материала - кератогиалина, участвующего в уплотнении и перекрестном сшивании кератина внутри клетки. Кератогиалин в основном состоит из белка *филаггрина.* Кроме клеток, которым предстоит ороговение, в глубоких слоях эпидермиса находится небольшое число клеток совсем иного типа (на схеме не показанных): это макрофагоподобные клетки Лангерганса, происходящие из костного мозга; меланоциты, происходящие из нервного гребня; клетки Меркеля, связанные с нервными окончаниями в эпидермисе.

с поперечными сшивками, содержащим внутриклеточный белок *инволюкрин.* Сами чешуйки обычно настолько уплощены, что границы их в световом микроскопе почти неразличимы; но если выдержать препарат в растворе NaOH, эти клетки несколько набухнут, и тогда после надлежащей окраски можно увидеть (если эпидермис в данном участке тонкий) удивительно правильную геометрическую картину расположения клеток: чешуйки уложены здесь гексагональными колонками, которые аккуратно сцеплены между собой краями клеток (рис. 17-22). Ширина колонок такова, что под каждой из них, в ее основании, находится около десятка базальных клеток. Эти клетки можно подразделить на центральные и периферические в соответствии с их положением в основании колонки. Периферические (но не центральные!) клетки

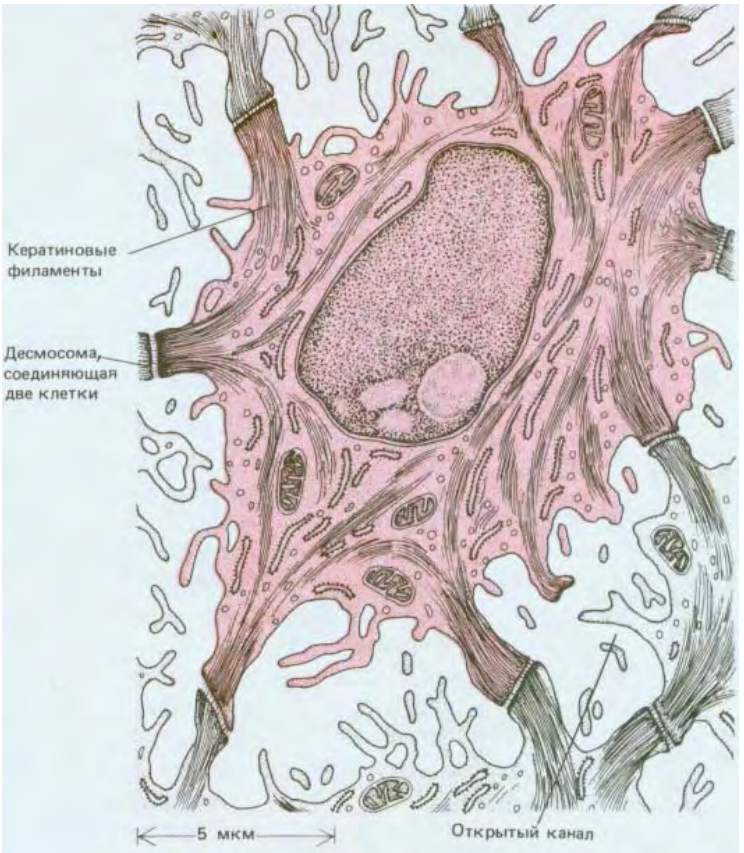


Рис. 17-21. Рисунок, сделанный по электронной микрофотографии среза шиповатой клетки эпидермиса (выделена цветом). Видны пучки кератиновых нитей, которые пронизывают цитоплазму и направляются к десмосомам, соединяющим клетку с ее соседями. Обратите внимание, что между соседними клетками есть открытые каналы, позволяющие питательным веществам свободно диффундировать через метаболически активные слои эпидермиса. Ближе к его поверхности, на уровне зернистых клеток, имеется водонепроницаемый барьер, образованный, по-видимому, изолирующим веществом, который эти клетки выделяют из особых пузырьков. (R. V. Krstic, Ultrastruture of the Mammalian Cell: An Mas. Berlin: Springer, 1979.)

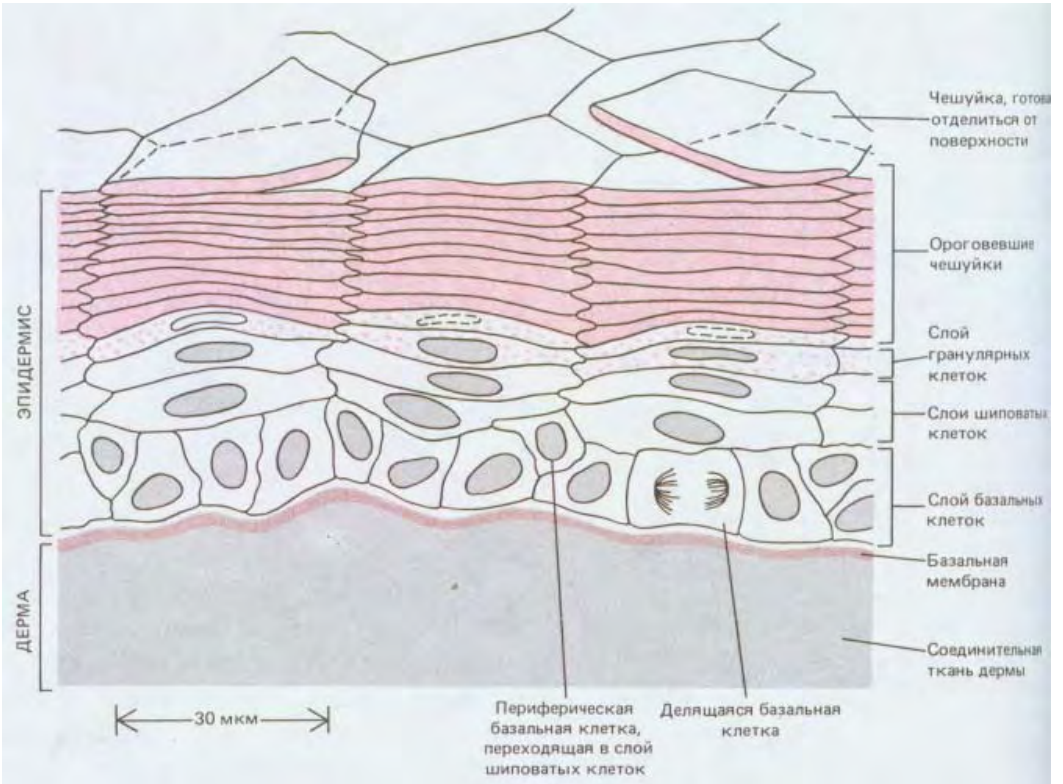


Рис. 17-22. Пролиферативные единицы, или колонки, в эпидермисе тонкой кожи. Эта структура выявляется при набухании ороговевших чешуек в растворе, содержащем NaOH. Такая организация в виде колонок свойственна лишь тонким участкам эпидермиса.

иногда можно видеть в тот момент, когда они переходят из базального слоя наверх, в слой шиповатых клеток. Каждую колонку называют пролиферативной единицей эпидермиса. Хотя упорядоченная организация в виде правильных колонок выявляется только в некоторых участках кожи, она служит хорошей иллюстрацией общих принципов обновления эпидермальных клеток.

17.4.3. В дифференцирующихся эпидермальных клетках по мере их созревания последовательно синтезируются различные кератины [19]

Перейдем от описанной статической картины к динамике. Центральная базальная клетка колонки делится, и некоторые из дочерних клеток, в свою очередь поделившись, сдвигаются к периферии основания. Периферические базальные клетки переходят из базального слоя в слой шиповатых клеток - на первую ступень движущегося вверх «эскалатора». Достигнув зернистого слоя, шиповатые клетки начинают терять свои ядра и цитоплазматические органеллы и постепенно превращаются в ороговевшие чешуйки наружного слоя. В конце концов эти чешуйки отслаиваются и разносятся токами воздуха, образуя один из главных компонентов комнатной пыли. У человека промежуток времени от момента рождения клетки в базальном слое эпидермиса до ее слущивания с поверхности кожи занимает от двух до четырех недель в зависимости от участка тела.

Сопутствующие химические изменения можно изучать, анализируя тонкие слои эпидермиса, срезанные параллельно поверхности, или последовательные слои клеток, обдираемые при повторном наложении и снятии кусков липкой ленты. При этом можно экстрагировать и охарактеризовать молекулы кератина, которых очень много во всех слоях эпидермиса. Существует множество различных видов кератина (разд. 11.5.1), кодируемых большим семейством гомологичных генов: благодаря меняющемуся прецессингу их транскриптов разнообразие кератинов еще больше возрастает. По мере того как стволовая клетка. находившаяся в основании колонки, превращается в чешуйку наверху

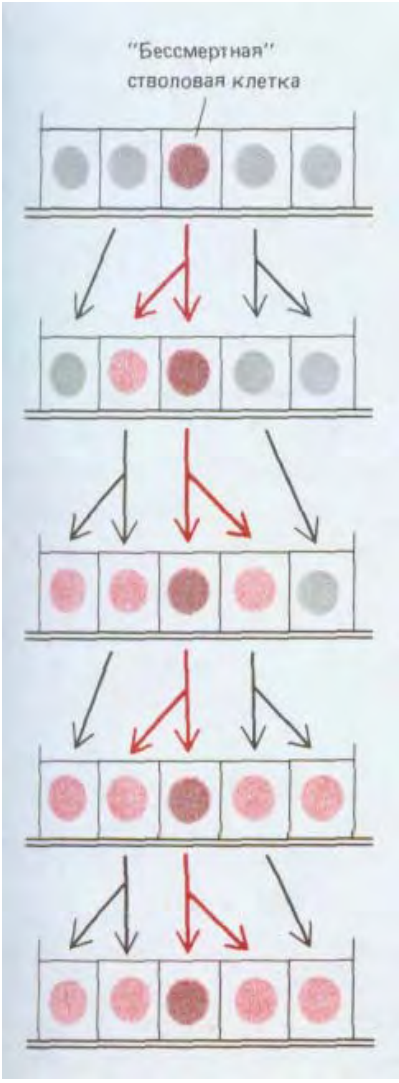


Рис. 17-23. Каждая пролиферативная единица должна всегда содержать по меньшей мере одну «бессмертную» стволовую клетку, потомки которой будут находиться в этой единице и в отдаленном будущем. Стрелками показано происхождение одних клеток от других. Стволовая клетка в каждой клеточной генерации представлена здесь в центральном положении. Другие базальные клетки могут изначально обладать иными химическими свойствами, которые предопределяют их уход из базального слоя и дифференцировку; в другом варианте базальные клетки будут эквивалентны бессмертным стволовым клеткам по своим свойствам, но их потомство может выталкиваться из базального слоя и слущиваться с кожи, и в этом смысле такие базальные клетки будут смертными.

(рис. 17-22), в ней последовательно экспрессируются различные выборки из всего комплекта гомологичных кератиновых генов. В ходе этого процесса начинают синтезироваться другие характерные белки, такие как инволюкрин, и это тоже входит в координированную программу терминальной дифференцировки клеток.

17.4.4. Возможно, что «бессмертие» стволовой клетки сохраняется благодаря контакту с базальной мембраной [20]

Если каждая пролиферативная единица эпидермиса поддерживается неопределенно долго за счет размножения ее базальных клеток, то среди них должна быть хотя бы одна клетка, потомство которой не вымирает полностью до конца жизни животного. Мы будем называть такую клетку *бессмертной стволовой клеткой* (рис. 17-23). В принципе деление бессмертной стволовой клетки могло бы давать две первоначально одинаковые дочерние клетки, чья дальнейшая судьба зависела бы уже от последующих условий их жизни. В противоположном крайнем случае деление стволовой клетки могло бы всегда быть асимметричным, так что одна и только одна из дочерних клеток наследовала бы свойства, *необходимые для* бессмертия; в другой же клетке что-то изменялось бы уже в момент ее образования, и это заставляло бы ее дифференцироваться и обрекало в конце концов на гибель. В таком случае число бессмертных стволовых клеток никогда не могло бы увеличиться, а это противоречит фактам. Если участок эпидермиса разрушен, непрерывность ткани восстанавливают окружающие здоровые эпидермальные клетки, которые мигрируют и размножаются, чтобы закрыть брешь. При этом образуются новые пролиферативные единицы, и их центральные базальные клетки неизбежно должны были возникнуть в результате таких делений, когда из одной бессмертной клетки получаются две.

Таким образом, при делении стволовой клетки судьба дочерних клеток должна хотя бы отчасти зависеть от внешних факторов. Одним из таких факторов мог бы быть контакт с базальной мембраной, разрыв которого приводил бы к запуску терминальной дифференцировки. Эксперименты на тканевых культурах в какой-то мере подтверждают это предположение: эпидермальные клетки продолжают делиться, если они растут в контакте с подходящим субстратом (например, со слоем фибробластов), но сразу начинают дифференцироваться при росте в суспензии.

Однако такого рода регуляция внешними факторами не позволяет объяснить все. Другие данные указывают скорее на обратное направление причинно-следственной связи, т. е. на то, что изменения, ведущие к терминальной дифференцировке, приводят к откреплению клеток от базальной мембраны, а не наоборот. Согласно этой гипотезе, лишь немногие из базальных клеток способны быть стволовыми. Поверхность этих стволовых клеток имеет особые свойства, которые позволяют им прикрепляться к базальной мембране. Эти клетки запрограммированы на то, чтобы давать определенную долю потомства, «обреченную» на дифференцировку, в которую входит и потеря способности к прикреплению. В особых условиях тканевой репарации отношение дифференцирующихся клеток-потомков к пролиферирующим может быть изменено под действием местных ростовых факторов так, чтобы образовались дополнительные клетки для покрытия раны. Данные в пользу этой гипотезы были получены в экспериментах, в которых кератиноциты выращивали in vitro в условиях недостатка кальция; это удерживало их в состоянии монослоя, так что все клетки были базальными. Тем не менее некоторые клетки в этих условиях вступали на путь терминальной

дифференцировки, на что указывал синтез инволюкрина; эти дифференцирующиеся клетки выходили из базального слоя, как только повышалась концентрация Ca^{2+} в среде (разд. 14.3.4).

17.4.5. Пролиферация базальных клеток регулируется в соответствии с толщиной эпидермиса [21]

Чем бы ни определялся выбор между сохранением статуса стволовой клетки и переходом на гибельный путь терминальной дифференцировки, должны действовать другие факторы, которые регулировали бы скорость образования новых эпидермальных клеток. Например, если наружные слои эпидермиса соскоблить, то базальные клетки начинают делиться быстрее. Через некоторое время это приводит к восстановлению нормальной толщины эпидермиса, и пролиферация в базальном слое снова снижается до обычного уровня. Все происходит так, как будто удаление наружных дифференцированных слоев освобождает базальные клетки от влияния какого-то ингибирующего фактора, который вновь начинает действовать, как только эпидермис полностью восстанавливается.

Хотя известно, что кератиноциты, растущие в культуре, реагируют на многие гормоны и ростовые факторы, включая фактор роста эпидермиса, очень важный для клиницистов вопрос о молекулярных механизмах, регулирующих пролиферацию этих клеток in vivo, до сих пор не выяснен. Последствия нарушенной регуляции этого процесса можно наблюдать при *псориазе.* При этом распространенном заболевании кожи пролиферация базальных клеток сильно ускорена, эпидермис утолщен и клетки слущиваются с поверхности кожи уже через неделю после их образования в базальном слое, еще не успев подвергнуться полному ороговению.

17.4.6. Секреторные клетки кожи обособлены в железах, и их популяциям свойственна иная динамика [22]

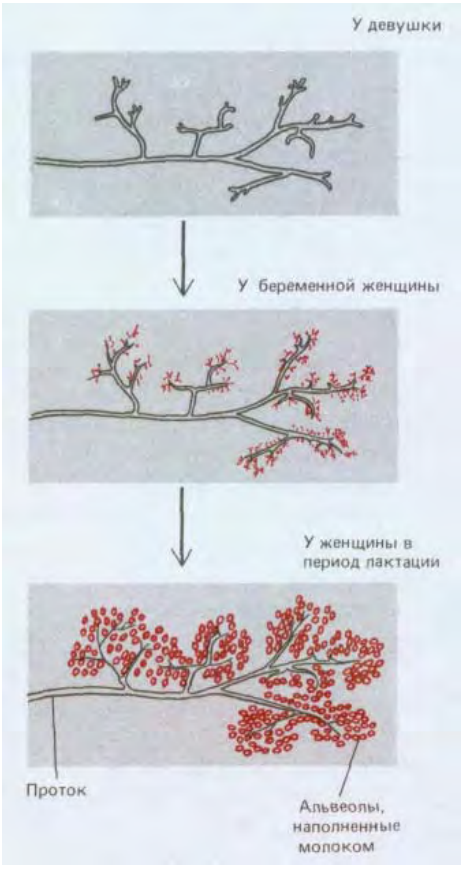
Кожа служит не только защитным барьером - она выполняет и другие функции. В определенных специализированных участках наряду с описанными выше ороговевшими клетками из эпидермиса развиваются и клетки иных типов. В частности, *секреторные* клетки обособлены в глубоко лежащих железах, и обновление их происходит совершенно иначе, чем в участках ороговения.

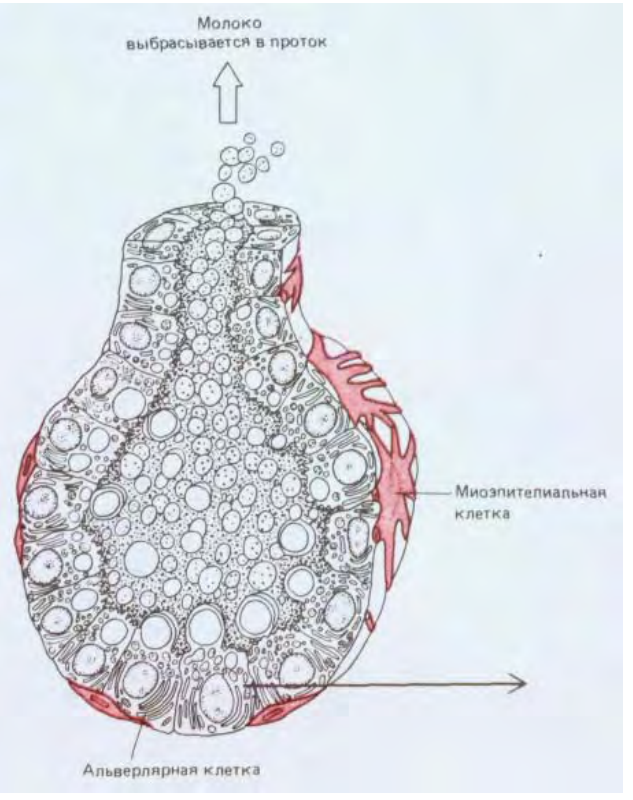
Простейшим примером подобной структуры может служить *потовая железа.* Она состоит из длинной трубки со слепым концом и образуется как впячивание эпидермиса. Пот выделяют клетки нижней части этой трубки, и он выходит на поверхность кожи через выводной проток (рис. 17-24). Секреторные клетки образуют однослойный эпителий, окруженный небольшим числом сократимых *миоэпителиальных клеток* (см. рис. 17-25, *Б* и 17-38, *Д).* Выводной проток выстлан двуслойным эпителием без миоэпителиальных элементов. Сходным образом устроены и железы, выделяющие слезы, ушную серу, слюну и молоко. По крайней мере в слюнных и молочных железах в протоках имеются стволовые клетки, предназначенные для обновления популяции секреторных клеток.

Молочная железа представляет особый интерес в связи с гормональной регуляцией деления и дифференцировки ее клеток. Образование молока должно начинаться, когда рождается ребенок, и прекращаться, когда ребенка отнимают от груди. Когда молочная железа не функционирует, ее железистая ткань состоит из разветвленных систем выводных протоков, погруженных в соединительную ткань и выстланных в секре-



Рис. 17-24. Схема строения потовой железы.





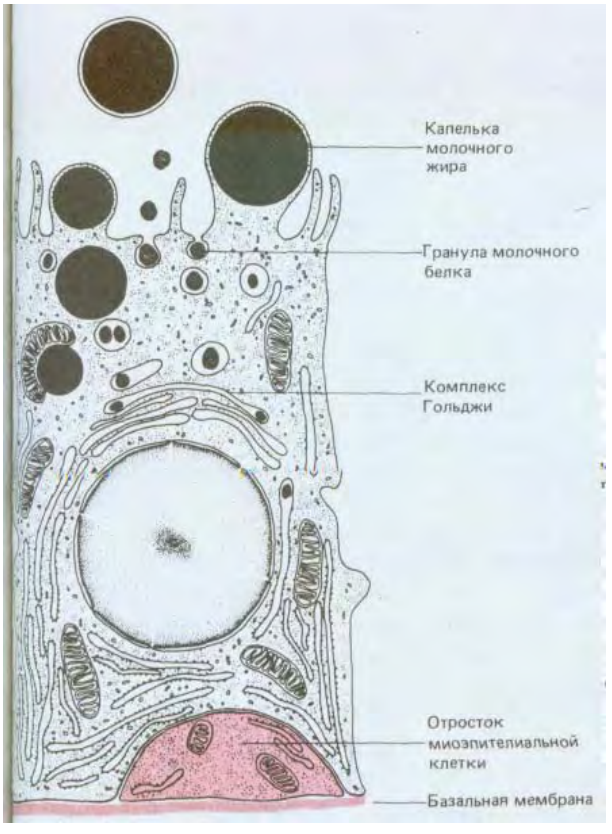


Рис. 17-25. Молочная железа. *Вверху слева.* Схема образования альвеол из протоков молочной железы во время беременности и лактации. Показан только один небольшой участок железы. В покое железа содержит небольшое количество неактивных железистых элементов, погруженных в массу жировой соединительной ткани (на рисунке - серый фон). Во время беременности происходит сильнейшая пролиферация железистой ткани за счет жировой с преимущественным развитием секреторных отделов железы и образованием альвеол. *Вверху справа.* Одна из секретирующих молоко альвеол молочной железы и охватывающая ее «корзинка» из миоэпителиальных клеток. Миоэпителиальные клетки сокращаются и выдавливают молоко из альвеол в ответ на воздействие гормона окситоцина, который рефлекторно выделяется у женщины при кормлении грудью. *Внизу.* Клетки одного и того же типа вырабатывают и молочные белки, и молочный жир. Белки выводятся из клеток путем обычного экзоцитоза, а жир выходит в виде капель, окруженных плазматической мембраной, отделившейся от клетки. *(В* по R. Krstic, Die Gewebe des Menschen und der Säugetiere. Berlin: Springer-Verlag, 1978; *В из* D. W. Fawcett, A Textbook of Histology, 11 th ed. Philadelphia: Saunders, 1986.)

торных участках одним слоем сравнительно неактивных эпителиальных клеток. На первом этапе подготовки к интенсивной выработке молока гормоны, циркулирующие в крови в период беременности, стимулируют здесь клеточную пролиферацию; концевые отделы протоков растут и ветвятся, образуя небольшие расширения - альвеолы, содержащие секреторные клетки (рис. 17-25). Секреция молока начинается только при стимуляции этих клеток изменившимся набором гормонов в крови матери после рождения ребенка. Когда кормление ребенка грудью прекращается, секреторные клетки дегенерируют, макрофаги уничтожают их остатки, большая часть альвеол исчезает и железа переходит в состояние покоя.

Заключение

Многие ткани, особенно те, которым свойственно быстрое замещение клеточной популяции (например, выстилка кишечника, эпидермальный слой кожи, кроветворные ткани), обновляются с помощью стволовых клеток. Стволовые клетки - это, по определению, не до конца дифференцированные клетки, способные неограниченно делиться и давать потомство, часть которого дифференцируется, а часть остается стволовыми клетками. Стволовые клетки эпидермиса лежат в базальном слое, контактируя с базальной мембраной. Потомки стволовых клеток дифференцируются, уходя из этого слоя, и по мере удаления от него последовательно синтезируют различные виды кератинов; затем ядра в клетках дегенерируют, и образуется наружный слой мертвых ороговевших клеток, которые в конце концов слущиваются с поверхности. На тех участках, где эпидермис тонок, он четко подразделяется на пролиферативные единицы, или колонки, по меньшей мере с одной «бессмертной» стволовой клеткой в основании каждой из них. Судьба потомков стволовой клетки отчасти зависит от внешних факторов, еще не вполне выясненных. Скорость пролиферации стволовых клеток регулируется гомеостатически в соответствии с толщиной эпидермиса. В железах, связанных с эпидермисом, например в потовых и молочных железах, тоже имеются стволовые клетки, но обновление клеточной популяции организовано по-иному.

17.5. Обновление с помощью плюрипотентных стволовых клеток. Пример: образование клеток крови [23, 24]

Кровь содержит много типов клеток, выполняющих совершенно различные функции - от транспорта кислорода до выработки антител. Некоторые из этих клеток функционируют исключительно в пределах кровеносной системы, а другие используют ее только для транспорта, а свои функции выполняют в других местах. Однако жизненный цикл всех клеток крови до некоторой степени сходен. У всех у них время существования ограниченно, и они непрерывно образуются в течение всей жизни животного. И наконец, что весьма примечательно, все они восходят к одному и тому же типу стволовых клеток костного мозга. Таким образом, эта гемопоэтическая, или кроветворная, стволовая клетка плюрипотентна, т.е. дает начало всем видам терминально дифференцированных клеток крови.

Клетки крови (рис. 17-26) можно разделить на красные и белые-эритроциты и лейкоциты. **Эритроциты** остаются в пределах кровеносных сосудов и переносят O_2 и CO_2, связанные с гемоглобином. Лейкоциты борются с инфекцией, а также поглощают и переваривают остатки

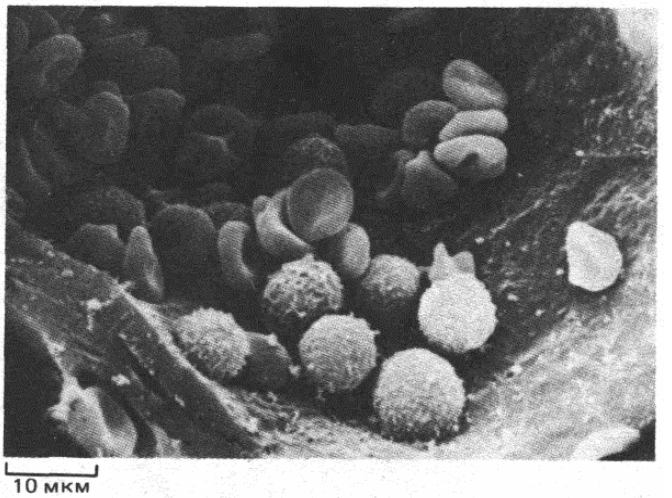


Рис. 17-26. Клетки крови млекопитающего в малом кровеносном сосуде (микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа). Более крупные, почти шарообразные клетки с шероховатой поверхностью - это лейкоциты, а клетки меньшей величины, более гладкие и уплощенные - эритроциты. (R. G. Kessel, R. H. Kardon, Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. San Francisco: Freeman, 1979.)

разрушенных клеток и т. п., выходя для этого через стенки небольших кровеносных сосудов в ткани. Кроме того, в крови в большом количестве содержатся *тромбоциты,* представляющие собой не обычные целые клетки, а мелкие клеточные фрагменты, или «мини-клетки», отделившиеся от кортикальной цитоплазмы крупных клеток, называемых *мегакариоцитами.* Тромбоциты специфически прилипают к эндотелиальной выстилке поврежденных кровеносных сосудов, где помогают восстанавливать их стенку и участвуют в процессе свертывания крови.

17.5.1. Существуют три категории лейкоцитов: гранулоциты, моноциты и лимфоциты [23, 24]

В то время как каждый эритроцит похож на всякий другой эритроцит, а тромбоцит - на другой тромбоцит, лейкоциты делятся на ряд различных классов. На основе морфологических особенностей, видимых в световой микроскоп, их традиционно подразделяют на три главные группы: *гранулоциты, моноциты* и *лимфоциты.*

Все гранулоциты содержат многочисленные лизосомы и секреторные пузырьки, или гранулы, и получили свои названия за различный характер окрашивания этих гранул (рис. 17-27). Различие в окрашивании отражает важные химические и функциональные особенности. **Нейтрофилы** (называемые также *полиморфно ядерными лейкоцитами* из-за многодольчатых ядер), самые многочисленные из гранулоцитов, захватывают, убивают и переваривают микроскопические организмы, в особенности бактерии. **Базофилы** выделяют гистамин (а у некоторых животных серотонин), который участвует в воспалительных реакциях. **Эозинофилы** помогают в разрушении паразитов и влияют на аллергические реакции.

Моноциты, выходя из кровяного русла (рис. 17-*27, Г),* становятся **макрофагами,** которые наряду с нейтрофилами являются главными «профессиональными фагоцитами» (разд. 6.5.14). Оба типа фагоцитов содержат специализированные органеллы, которые сливаются с новообразованными фагоцитозными пузырьками (фагосомами) и атакуют поглощенные микроорганизмы с помощью высокореактивных молекул супероксида (O^-_2) и гипохлорита (HOC1; это действующий компонент отбеливателей), а также концентрированной смеси лизосомных гидролаз. Макрофаги, однако, значительно больше по размерам и дольше живут, чем нейтрофилы, а к тому же обладают уникальной способностью переваривать крупные микроорганизмы, такие как простейшие.

Лимфоциты участвуют в иммунном ответе и представлены двумя главными классами: *В-лимфоциты* производят антитела, а *Т-лимфо-*

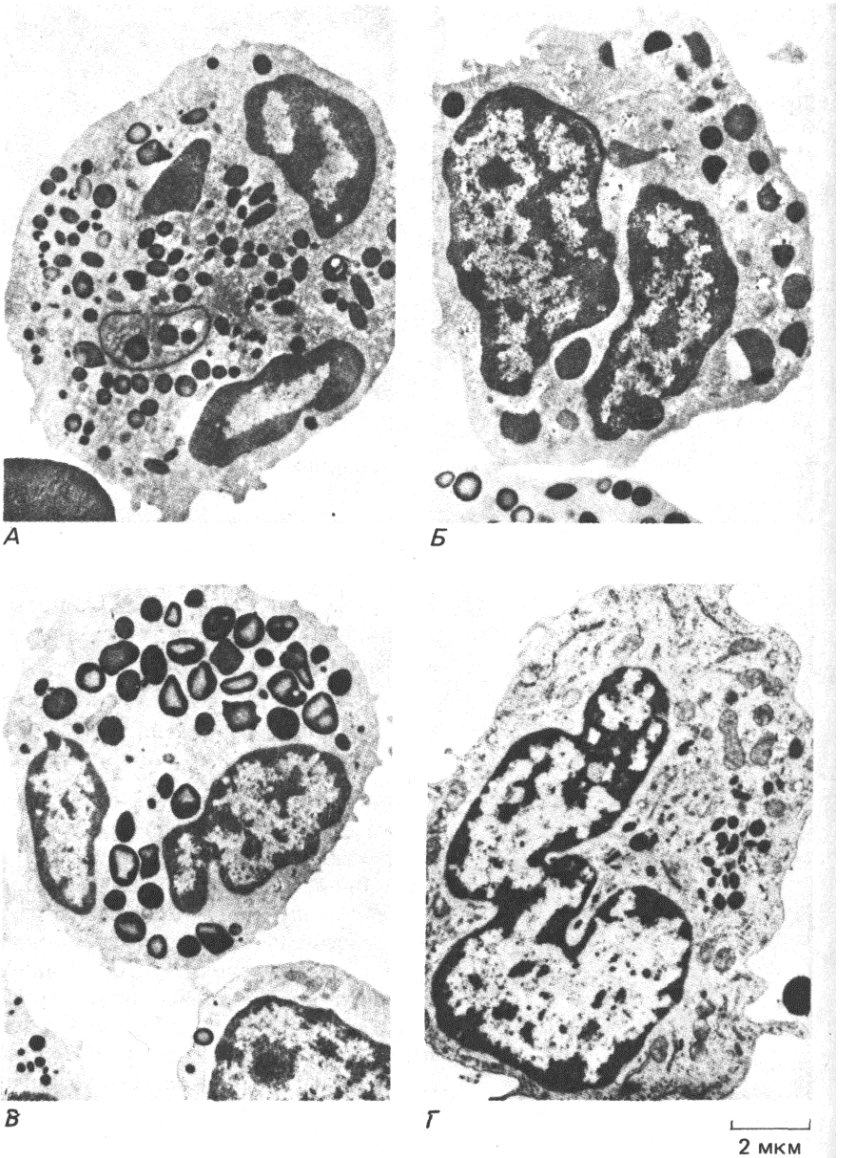


Рис. 17-27. Электронные микрофотографии лейкоцитов четырех типов: А-нейтрофил; Б-базофил; В-эозинофил; *Г*- моноцит. Электронные микрофотографии лимфоцитов представлены на рис. 18-4. Клетки каждого типа выполняют особую функцию, что отражается в различиях их секреторных гранул и лизосом. В каждой клетке только по одному ядру, но оно имеет неправильную дольчатую форму, так что на фото *А, Б* и *В* места соединения долей не попали в плоскость среза. (С любезного разрешения Dorothy Bainton.)

циты убивают клетки, инфицированные вирусом, и регулируют активность других лейкоцитов (см. гл. 18). Кроме того, существуют лимфоцитоподобные клетки, называемые *природными киллерами,* способные убивать некоторые виды опухолевых и инфицированных вирусом клеток. Образование лимфоцитов - это особая тема, которая будет подробно обсуждаться в гл. 18. Здесь мы будем рассматривать в основном развитие других клеток крови, часто объединяемых под названием **миелоидных клеток.**

Различные типы кровяных клеток и их функции приведены в табл. 17-1.

Таблица 17-1. Клетки крови

Тип клетки	Главные функции	Обычное содержание в крови человека (в 1 л)
Эритроциты Лейкоциты	Транспортируют O_2 и CO_2	$5\text{-}10^{12}$
Гранулоциты		
Нейтрофилы (полиморфноядерные лейкоциты	Фагоцитируют и разрушают внедрившиеся бактерии	$5\text{-}10^{9}$
Эозинофилы	Разрушают более крупные паразитические организмы и влияют на аллергические воспалительные реакции	$2\text{-}10^{8}$
Базофилы	Выделяют гистамин и серотонин при некоторых иммунных реакциях	$4\text{-}10^{7}$
Моноциты	Становятся макрофагами в тканях, где фагоцитируют и переваривают внедрившиеся бактерии, инородные тела и стареющие клетки	$4\text{-}10^{8}$
Лимфоциты		
В-клетки	Вырабатывают антитела	$2\text{-}10^{9}$
Т-клетки	Убивают клетки, инфицированные вирусом, и регулируют активность других лейкоцитов	$1\text{-}10^{9}$
Клетки-киллеры (NK - клетки)	Убивают клетки, инфицированные вирусом, и клетки некоторых опухолей	$1\text{-}10^{8}$
Тромбоциты (фрагменты клеток, образующиеся в костном мозге из мегакариоцитов)	Инициируют свертывание крови	$3\text{-}10^{11}$

17.5.2. Образование каждого типа клеток в костном мозге регулируется отдельно [23, 25]

Большинство лейкоцитов функционирует не в крови, а в других тканях, а кровь просто переносит их туда, где они нужны. Местная инфекция или повреждение любой ткани, например, быстро привлекает лейкоциты, и это составляет часть **воспалительной реакции,** помогающей в борьбе с инфекцией при заживлении раны. Воспалительная реакция - сложный процесс, в котором участвуют разнообразные сигнальные молекулы, выделяемые местными тучными клетками, нервными окончаниями, тромбоцитами и лейкоцитами, а также комплемент (разд. 18.5). Некоторые из этих сигнальных молекул воздействуют на ближайшие капилляры таким образом, что адгезия между эндотелиальными клетками уменьшается, но зато их поверхность становится более адгезивной для передвигающихся рядом лейкоцитов. Так лейкоциты ловятся, как мухи на липкую бумагу, а затем могут выйти из сосуда, протискиваясь между эндотелиальными клетками и «проедая» путь через базальную мембрану с помощью переваривающих ферментов. Другие молекулы действуют как хемоаттрактанты для определенных видов лейкоцитов; под их воздействием эти клетки поляризуются и начинают ползти по направлению к источнику аттрактанта. В результате большое количество лейкоцитов переходит в пораженную ткань (рис. 17-28).

Другие сигнальные молекулы, образовавшиеся в ходе воспалитель-

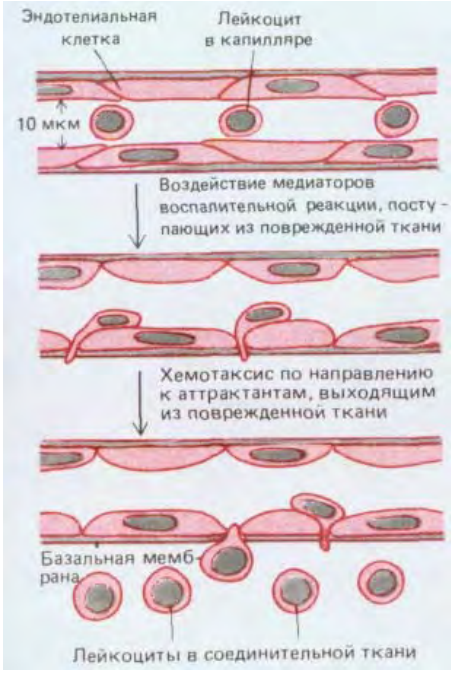


Рис. 17-28. Миграция лейкоцитов из кровотока в поврежденную или инфицированную ткань при воспалительной реакции. Эту реакцию запускают различные сигнальные молекулы, локально выделяемые клетками (главным образом в соединительной ткани) или образующиеся при активации комплемента. Некоторые из таких медиаторов воздействуют на эндотелиальные клетки капилляров, ослабляя их соединение с соседними клетками, в результате чего капилляры становятся более проницаемыми. Изменение поверхности эндотелиальных клеток ведет также к прилипанию крови. Другие медиаторы действуют как хемоаттрактанты, заставляя связавшиеся лейкоциты пробираться между эндотелиальными клетками капилляров в ткань.

ной реакции, уходят в кровь и побуждают костный мозг к усиленной выработке лейкоцитов и их выбросу в кровяное русло. Костный мозг служит главной мишенью для такой регуляции, так как у взрослых млекопитающих клетки крови, за исключением лимфоцитов и некоторых макрофагов, образуются только в костном мозге. Эта регуляция более или менее специфична в отношении клеток определенного типа: например, некоторые бактериальные инфекции приводят к избирательному увеличению числа нейтрофилов, а заражение простейшими и другими паразитами - к накоплению эозинофилов (именно поэтому врачи обычно используют подсчет лейкоцитов разного типа при диагностике инфекционных и иных воспалительных заболеваний).

В других случаях избирательно возрастает число эритроцитов, как, например, у человека в условиях больших высот, где кислорода недостаточно. Таким образом, образование кровяных клеток **(гемопоэз)** по необходимости подвергается сложному контролю, при котором количество клеток каждого типа регулируется индивидуально, в соответствии с меняющимися потребностями. Понять, как работают эти регуляторные механизмы - задача огромной важности для медицины.

У интактных животных гемопоэз изучать труднее, чем превращения клеток таких тканей, как эпидермис. В эпидермисе существует простая, регулярная пространственная организация, при которой легко следить за процессом обновления и находить стволовые клетки. В кроветворных тканях это не так просто. Но, с другой стороны, кроветворные клетки живут как кочевники, и это делает их удобным объектом для экспериментов иного рода. Диспергированные кроветворные клетки можно легко, не повреждая их, переносить из одного организма в другой; кроме того, пролиферацию и дифференцировку отдельных клеток и их потомства можно наблюдать и изучать в условиях культуры. По этой причине о молекулах, регулирующих образование клеток крови, известно больше, чем об аналогичных регуляторных молекулах в других тканях млекопитающих. Но и о клетках крови эти знания еще весьма недостаточны.

17.5.3. Костный мозг содержит кроветворные стволовые клетки [23, 26]

Различные типы кровяных клеток и их ближайших предшественников в костном мозге можно узнать по внешнему виду (рис. 17-29). Они перемешаны друг с другом, а также с жировыми клетками и фибробластами, образующими нежную опорную сеть коллагеновых волокон и другие компоненты внеклеточного матрикса. Кроме того, вся ткань пронизана тонкостенными кровеносными сосудами *(кровяными синусами), в* которые переходят новообразованные клетки крови. Имеются также мегакариоциты; в отличие от других кровяных клеток они остаются в костном мозге и после созревания, составляя одну из самых заметных гистологических особенностей этой ткани; они необычайно велики (до 60 мкм в диаметре) и имеют высокополиплоидное ядро. В нормальных условиях мегакариоциты облепляют стенки кровяных синусов и протягивают свои отростки сквозь отверстия в их эндотелиальной выстилке; от этих отростков отделяются тромбоциты, которые затем уносит кровь (рис. 17-30).
Отсутствие видимой упорядоченности в расположении различных клеток костного мозга затрудняет идентификацию каких-либо предшественников зрелых кровяных клеток, кроме самых ближайших. На очень ранних стадиях развития, когда явная дифференцировка еще не началась, все клетки-предшественницы внешне весьма сходны между собой, а у первичных стволовых клеток вообще нет видимых признаков,

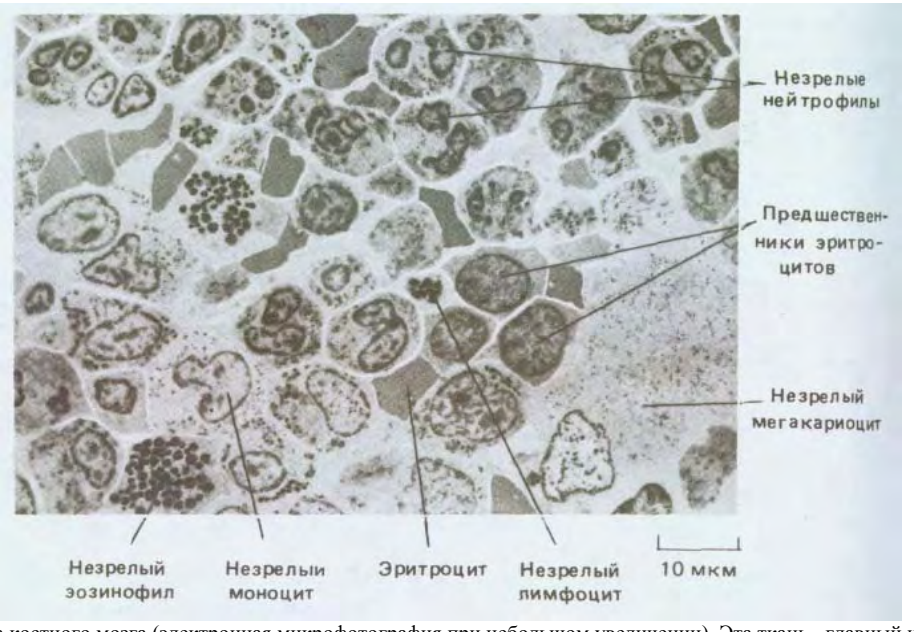


Рис. 17-29. Срез участка костного мозга (электронная микрофотография при небольшом увеличении). Эта ткань - главный источник новых клеток крови (кроме Т-лимфоцитов). Обратите внимание на то, что незрелые клетки крови определенного типа имеют тенденцию собираться «семейными группами». (J.A.G. Rhodin, Histology: A Text and Atlas. New York: Oxford Univ. Press, 1974.)

по которым их можно было бы распознать. Чтобы идентифицировать и охарактеризовать стволовые клетки, нужен функциональный тест, позволяющий прослеживать судьбу потомства отдельных клеток. Как мы увидим, с этой целью можно просто изучать колонии, образуемые отдельными клетками в культуре. В случае кроветворной системы, однако, такие клеточные клоны можно распознавать и в интактном животном.

Если животное подвергнуть рентгеновскому облучению в большой дозе, кроветворные клетки у него будут разрушены, и через несколько дней оно погибнет из-за неспособности организма восполнять утрату клеток крови. Облученное животное можно, однако, спасти путем инъекции клеток, взятых из костного мозга здорового иммунологически совместимого донора. Среди этих клеток, очевидно, есть такие, которые смогут образовать колонии в организме облученного реципиента и таким образом снабдить его кроветворной тканью. Такие колонии развиваются, в частности, в селезенке; она служит у нормальных мышей важным дополнительным очагом кроветворения. Если исследовать селезенку облученной мыши через неделю или две после введения клеток от здорового донора, в ней можно увидеть обособленные узелки, каждый из которых содержит колонию миелоидных клеток (рис. 17-31);

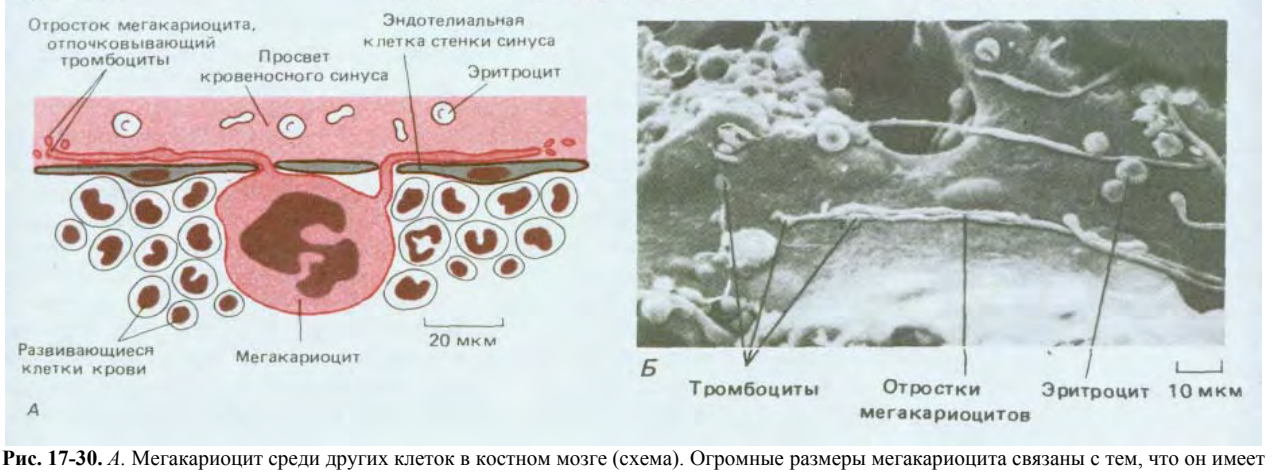


Рис. 17-30. *А.* Мегакариоцит среди других клеток в костном мозге (схема). Огромные размеры мегакариоцита связаны с тем, что он имеет высокополиплоидное ядро. Один мегакариоцит образует около 10000 тромбоцитов, отщепляющихся от длинных отростков, которые проходят через отверстия в стенках соседних кровеносных синусов. *Б.* Внутренность такого синуса в костном мозге (микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа). Видны отростки мегакариоцитов. (Б - из R. G. Kessel, R.H. Kardon, Tissues and Organs: A Text-Atlas of Scanning Electron Microscopy. San Francisco: Freeman, 1979.)



Каждый узелок содержит клон кроветворных клеток, происходящих от одной из инъецированных клеток костного мозга

Рис. 17-31. Схема опыта, в котором селезенку сильно облученного животного заселяют кроветворными клетками костного мозга, взятыми от здорового донора. Такой эксперимент впервые позволил анализировать индивидуальные миелоидные клетки-предшественники, что необычайно расширило возможности изучения гемопоэза.

через две недели в некоторых колониях может быть больше миллиона клеток. Раздельность узелков позволяет предполагать, что каждый из них, подобно колонии бактерий на культуральной чашке, образован клоном, происходящим от одной исходной клетки, и это подтверждают эксперименты с использованием генетических маркеров.

Клетку - родоначальницу такой колонии называют **колониеобразующей единицей (КОЕ).** Колониеобразующие клетки гетерогенны. Одни дают начало только одному типу миелоидных клеток, а другие - нескольким типам. Некоторые клетки проходят много циклов деления и образуют большие колонии, тогда как другие меньше делятся и образуют маленькие колонии. Большинство колоний гибнет, произведя какое-то ограниченное количество терминально дифференцированных кровяных клеток. Однако встречаются также колонии, способные к интенсивному самообновлению, и они производят наряду с терминально дифференцированными клетками крови новые колониеобразующие клетки. Как полагают, родоначальницами таких самообновляющихся колоний являются стволовые кроветворные клетки из пересаженного костного мозга.

17.5.4. Плюрипотентная стволовая клетка дает начало всем классам клеток крови [27]

Зачастую в одной селезеночной колонии, образовавшейся из одной стволовой клетки, можно найти миелоидные клетки всех типов. Таким образом, кроветворная стволовая клетка *плюрипотентна:* она может давать начало многим различающимся типам клеток. Хотя селезеночные колонии, по-видимому, не содержат лимфоцитов, другие эксперименты показывают, что и лимфоциты происходят от той же самой стволовой клетки, которая порождает все миелоидные клетки. Это эксперименты с генетическими маркерами, с помощью которых можно идентифицировать клетки одного клона даже после их выхода в кровяное русло. Было использовано несколько клональных маркеров, но лучшими оказались специально сконструированные ретровирусы. Маркерный вирус, как и все ретровирусы, может включить свой геном в хромосому инфицируемой клетки, но у него удалены гены, необходимые для образования инфекционных вирусных частиц. Поэтому маркер присутствует только в колонии клеток, которые были первоначально инфицированы. Потомство одной из таких клеток отличается от потомства другой только тем, что у них различны хромосомные сайты интеграции вируса. Для анализа потомства кроветворных клеток сначала инфицируют клетки костного мозга ретровирусом (разд. 5.5.8) in vitro, а затем вводят их летально облученным реципиентам; после этого можно использовать ДНК-зонды, чтобы прослеживать потомство отдельных инфицированных клеток в различных кроветворных и лимфоидных тканях.

Эти опыты не только подтверждают, что все классы клеток крови - и миелоидных, и лимфоидных - происходят от общей стволовой клетки (рис. 17-32), но и позволяют прослеживать «родословные» этих клеток крови в течение долгого времени. Через 1-2 месяца после пересадки костного мозга большинство клеток крови облученной мыши-реципиента - это потомки не более чем полудюжины плюрипотентных стволовых клеток; так же обстоит дело и спустя несколько недель, но тогда уже клетки крови - это потомство другой группы стволовых клеток. Эти наблюдения заставляют думать, что отдельная стволовая клетка в данный отрезок времени только с очень низкой вероятностью может начать образование клона дифференцированного потомства и что между начальным этапом и конечной дифференцировкой происходит мно-

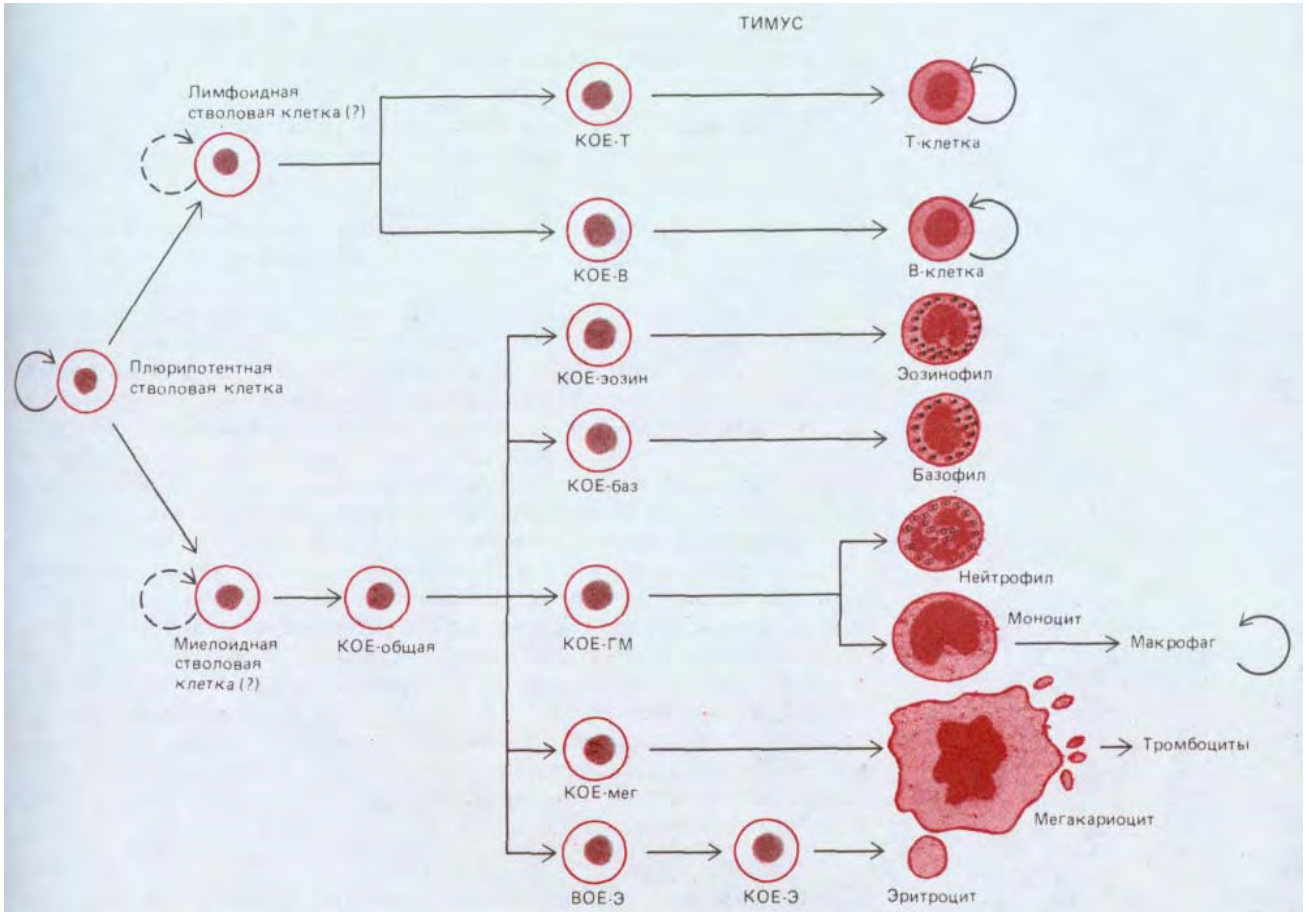


Рис. 17-32. Предполагаемая схема кроветворения. В норме плюрипотентная стволовая клетка изредка делится, образуя или такие же плюрипотентные стволовые клетки (самообновление), или коммитированные клетки-предшественники (КОЕ - колониеобразующие клетки), которые необратимо детерминированы на образование только ограниченного числа типов кровяных клеток. Пролиферацию клеток-предшественников стимулируют специфические факторы роста, но постепенно эти клетки утрачивают способность делиться и превращаются в терминально дифференцированные клетки крови, которые обычно живут лишь несколько дней или недель. У взрослых млекопитающих все показанные здесь клетки развиваются главным образом в костном мозге. Исключение составляют Т-лимфоциты, развивающиеся в тимусе, и макрофаги, образующиеся в большинстве тканей из моноцитов. Наиболее спорной в этой схеме является точка первого разветвления: не выяснено, существуют ли стволовые клетки, способные превращаться только в Т- и В-лимфоциты, и стволовые клетки, дающие начало клеткам всех других типов (миелоидным). Вполне возможно, что первичные плюрипотентные стволовые клетки могут превращаться также в различные тканевые клетки, не показанные на этой схеме, такие как клетки NC (киллеры), тучные клетки, остеокласты и разнообразные клетки, представляющие антитены (разд. 18.6.10), но пути этих превращений точно не установлены.

жество клеточных делений, так что в конце концов клон потомства будет очень большим - до нескольких миллионов клеток. Несмотря на относительную редкость и «квантовый» характер начальных событий, дифференцированные клетки образуются в целом непрерывно и с постоянной скоростью; это связано с работой регуляторных механизмов, кото-

рые действуют на промежуточных этапах дифференцировки и помогают регулировать конечную численность клеток каждого типа.

17.5.5. Число различных клеток крови увеличивается в результате деления коммитированных клеток-предшественниц [23, 28]

Если клетка уже дифференцировалась как эритроцит, гранулоцит и т. д., обратный путь для нее закрыт: состояние дифференцировки необратимо. Поэтому на какой-то стадии своего развития потомство плюрипотентной стволовой клетки должно окончательно и бесповоротно вступить на какой-то определенный путь дифференцировки. Из простого исследования костного мозга под микроскопом ясно, что это происходит задолго до последнего цикла деления, приводящего к формированию зрелых дифференцированных клеток: можно распознать специализированные клетки-предшественницы, которые еще делятся, но уже проявляют признаки начавшейся дифференцировки. Таким образом, после вступления клетки на определенный путь следует серия делений, увеличивающих число клеток данного специализированного типа.

Из сказанного видно, что кроветворную систему можно рассматривать как иерархию клеток. **Плюрипотентные стволовые клетки** дают начало **коммитированным клеткам-предшественницам,** которые уже необратимо определились как предки кровяных клеток одного или нескольких типов. Полагают, что коммитированные клетки делятся быстро, но ограниченное число раз. В конце такой серии делений они становятся **терминально дифференцированными клетками,** которые обычно больше не делятся и погибают через несколько дней или недель. Исследования in vitro дают возможность узнать, как регулируются эти клеточные процессы.

17.5.6. Факторы, регулирующие гемопоэз, можно исследовать на культурах клеток [29]

Кроветворные клетки будут выживать, размножаться и дифференцироваться в культуре только в том случае, если снабдить их специфическими факторами роста или выращивать вместе с клетками, вырабатывающими эти факторы. Длительная пролиферация плюрипотентных стволовых клеток возможна, например, при росте их в диспергированном состоянии поверх слоя клеток костномозговой стромы, предположительно имитирующего среду в неповрежденном костном мозге; в таких культурах могут образовываться миелоидные клетки всех типов. Диспергированные кроветворные клетки костного мозга можно также выращивать в полутвердой среде из агара или метилцеллюлозы с добавлением факторов, выделенных из других клеток. В такой полутвердой среде потомство каждой отдельной клетки остается на месте, образуя легко распознаваемую колонию. Отдельная коммитированная клетка, например предшественник нейтрофилов, может дать начало клону из тысяч нейтрофилов. Такая система культуры позволяет испытывать активность факторов, поддерживающих гемопоэз, и таким образом выделять их и изучать их действие. Эти вещества оказались гликопротеинами; их обычно называют **колониестимулирующими факторами,** или **КСФ.** Из все возрастающего числа КСФ, которые были идентифицированы и подвергнуты очистке, одни циркулируют в крови и действуют как гормоны, в то время как другие играют роль локальных химических медиаторов (разд. 12.1). Из КСФ гормонального типа лучше всего изучен гликопротеин эритропоэтин, который вырабатывается в почках и регулирует эритропоэз (образование эритроцитов).

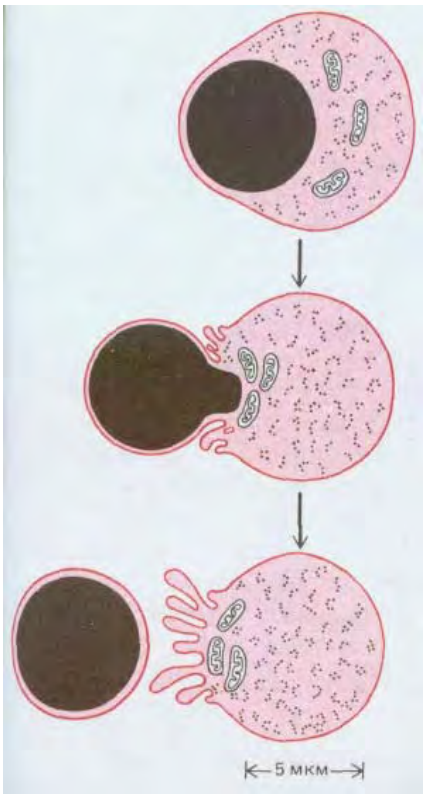


Рис. 17-33. Схема развития эритробласта (предшественника эритроцита). Эритробласт выталкивает ядро и становится незрелым эритроцитом (ретикулоцитом) незадолго до выхода клетки из костного мозга в кровоток. Спустя 1-2 дня ретикулоцит потеряет свои митохондрии и рибосомы и станет зрелым эритроцитом. Клоны эритроцитов развиваются в костном мозге на поверхности макрофага, который фагоцитирует и переваривает ядра, выбрасываемые эритробластами.

17.5.7 Эритропоэз зависит от гормона эритропоэтина [30]

Эритроциты составляют основную массу клеток, циркулирующих в крови (см. табл. 17-1). Зрелый эритроцит плотно заполнен гемоглобином и практически не содержит никаких обычных клеточных органелл. В эритроците взрослого млекопитающего отсутствуют даже ядро, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и рибосомы - они выталкиваются из клетки в процессе развития (рис. 17-33). Поэтому эритроцит не может расти или делиться; единственный возможный источник образования новых эритроцитов - стволовые клетки. При этом продолжительность жизни эритроцитов невелика - около 120 дней у человека и 55 дней у мыши. Изношенные эритроциты поглощаются и перевариваются макрофагами в печени и селезенке.

Недостаток кислорода или нехватка эритроцитов побуждает клетки почек синтезировать и выделять в кровь повышенное количество эритропоэтина, а эритропоэтин в свою очередь стимулирует образование эритроцитов. Поскольку усиленный выброс новых эритроцитов в кровоток отмечается уже через один или два дня после повышения концентрации эритропоэтина в крови, гормон должен действовать на клетки, являющиеся очень близкими предшественниками зрелых эритроцитов.

Клетки, реагирующие на эритропоэтин, можно идентифицировать, добавляя эритропоэтин в культуры клеток костного мозга на полутвердой среде. Через несколько дней появляются колонии примерно из 60 эритроцитов, каждая из которых происходит от одной коммитированной эритроидной клетки-предшественницы. Такую клетку называют колониеобразующей единицей эритроидного ряда, или КОЕ-Э, и она дает начало зрелым эритроцитам приблизительно после шести или даже меньшего числа циклов деления. КОЕ-Э еще не содержат гемоглобина;

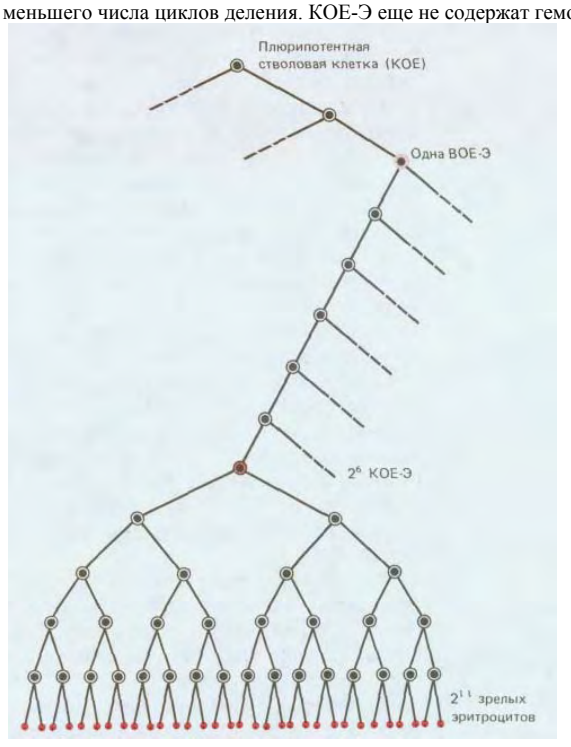


Рис. 17-34. Родословная, показывающая отношения между плюрипотентной стволовой клеткой, БОЕ-Э, КОЕ-Э и зрелыми эритроцитами. Клетки БОЕ-Э и КОЕ-Э являются коммитированными клетками-предшественниками эритроидного ряда. Клетки БОЕ-Э реагируют на интерлейкин 3, но не реагируют на эритропоэтин, а клетки КОЕ-Э хорошо отвечают на эритропоэтин. Серия клеточных делений, происходящих под влиянием эритропоэтина, - это эффективный способ регулирования эритропоэза без нарушения образования других клеток крови.

они образуются из клеток-предшественниц более раннего типа, пролиферация которых не зависит от эритропоэтина.

Второй колониестимулирующий фактор **- интерлейкин 3** (ИЛ-3)-ответствен за выживание и пролиферацию плюрипотентных стволовых клеток и большинства типов их коммитированных потомков. В его присутствии из культивируемых клеток костного мозга развиваются гораздо более крупные эритроидные колонии примерно из 5000 эритроцитов каждая. Эти колонии возникают из эритроидных клеток, называемых **взрывообразующими единицами эритроидного ряда (ВОЕ-Э).** ВОЕ-Э отличается от плюрипотентной стволовой клетки тем, что имеет ограниченную способность к пролиферации и дает начало колониям, содержащим только эритроциты, даже при таких условиях культивирования, при которых другие клетки могут порождать и иные виды дифференцированных клеток крови. Отличие от КОЕ-Э состоит в том, что ВОЕ-Э нечувствительны к эритропоэтину и от зрелых эритроцитов их отделяют целых 12 клеточных делений, для которых уже необходим эритропоэтин. (Эти клетки отличаются от КОЕ-Э еще и по размерам, и их можно отделить от последних центрифугированием.) Таким образом, ВОЕ-Э считают клетками-предшественницами, коммитированными для дифференцировки в эритроциты, и ранними предками КОЕ-Э (рис. 17-34).

17.5.8. На образование нейтрофилов и макрофагов влияет несколько колониестимулирующих факторов (КСФ) [29, 31]

Два типа «профессиональных фагоцитов» - нейтрофилы и макрофагиразвиваются из одних и тех же клеток, называемых предшественниками гранулоцитов и макрофагов (ГМ). Подобно другим гранулоцитам (эозинофилам и базофилам), нейтрофилы лишь несколько часов циркулируют в крови, а затем переходят из капилляров в соединительные ткани или другие специфические места, где они живут несколько дней, а потом гибнут. В отличие от этого макрофаги могут месяцами, а возможно, и годами находиться вне кровяного русла, где способны возобновлять пролиферацию под воздействием местных сигналов.

Было выявлено четыре различных КСФ, стимулирующих в культуре формирование колоний нейтрофилов и макрофагов. Полагают, что in vivo они действуют в различных сочетаниях, регулируя избирательное образование определенных клеток. Эти КСФ синтезируются клетками разного типа, в том числе эндотелиальными клетками, фибробластами, макрофагами и лимфоцитами; при бактериальной инфекции в какой-либо ткани их концентрация в крови быстро повышается, что ведет к ускоренному переходу фагоцитирующих клеток из костного мозга в кровоток. Из этих четырех факторов наименее специфичен ИЛ-3: он действует на плюрипотентные стволовые клетки и на большинство коммитированных клеток, включая предшественников ГМ. Три других фактора воздействуют более избирательно на коммитированных предшественников ГМ и их дифференцированное потомство (табл. 17-2), хотя в высокой концентрации некоторые из них влияют и на другие линии.

Так же как и эритропоэтин, все эти КСФ являются гликопротеинами, действующими в низких концентрациях (10^{-12} М) путем связывания со специальными рецепторами клеточной поверхности. Их воздействие на клетки-предшественники заключается не только в запуске механизма образования дифференцированных колоний, но и в активации специализированных функций (таких, как фагоцитоз и убивание клеток-мишеней) у клеток с законченной дифференцировкой. Белки, синтезированные

Таблица 17-2. Некоторые колониестимулирующие факторы (КСФ), влияющие на образование клеток крови

Фактор	Мол. масса	Клетки-мишени	Места образования
Эритропоэтин	51000	КОЕ-Э	Клетки почек
Интерлейкин	25000	Плюрипотентные стволовые клетки, большинство клеток-предшественников, многие терминально дифференцированные клетки	Т-лимфоциты, эпидермальные клетки
ГМ-КСФ [1]	23000	ГМ -предшественники [4]	Т-лимфоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты
Г-КСФ [2]	25000	ГМ-предшественники [4] и нейтрофилы	Макрофаги, фибробласты
М-КСФ [3]	70000 (димер)	ГМ-предшественники [4] и макрофаги	Фибробласты, макрофаги, эндотелиальные клетки

[1] КСФ для гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF).
[2] КСФ для гранулоцитов (G-CSF).
[3] КСФ для макрофагов (M-CSF).
[4] Предшественники гранулоцитов и макрофагов.

с помощью клонированных генов для этих факторов, служат мощными стимуляторами кроветворения у экспериментальных животных, что позволяет думать об их применении в клинике для стимуляции восстановления кроветворной ткани и при лечении инфекций.

Описаны также факторы, которые специфически стимулируют развитие других видов миелоидных клеток, таких как мегакариоциты, базофилы и эозинофилы, но они не так хорошо охарактеризованы, как обсуждавшиеся выше КСФ. Есть данные о том, что наряду с растворимыми КСФ, среди которых есть локально секретируемые продукты клеток костномозговой стромы, в регуляции кроветворения участвуют также сигнальные молекулы, связанные с клетками и с межклеточным матриксом.

17.5.9. Поведение кроветворной клетки частично зависит от случая [29, 32]

КСФ определяют как факторы, способствующие образованию колоний дифференцированных клеток крови. Трудно точно установить, какое влияние оказывает КСФ на отдельную кроветворную клетку. Этот фактор мог бы повышать вероятность выживания клетки; мог бы регулировать скорость клеточного деления или число делений, необходимых клетке-предшественнице перед дифференцировкой. Он мог бы действовать на поздних этапах дифференцировки и облегчать ее; и мог бы, напротив, действовать на ранних этапах и влиять на коммитирование (рис. 17-35). Прослеживая судьбу отдельных изолированных кроветворных клеток в культуре, можно установить, как определенный КСФ, например ГМ-КСФ, может давать все эти различные эффекты. Тем не менее до сих пор не ясно, какие эффекты существенны in vivo. Особенно непонятным остается поведение плюрипотентных стволовых клеток: эти важнейшие клетки разбросаны и малочисленны - меньше одной на тысячу клеток костного мозга, - и их очень трудно идентифицировать с полной уверенностью.

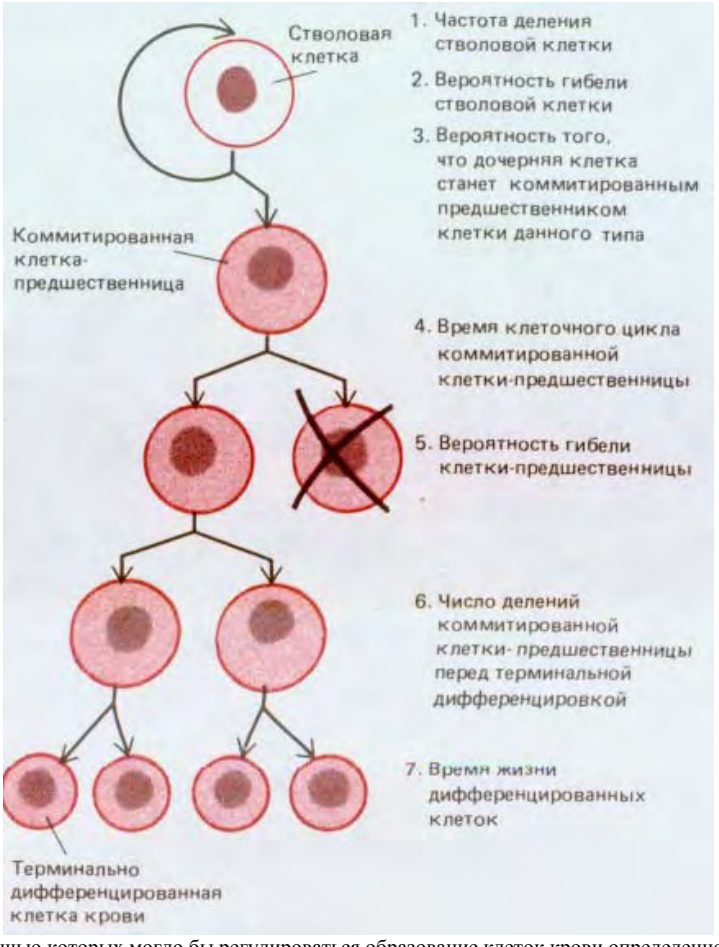


Рис. 17-35. Параметры, с помощью которых могло бы регулироваться образование клеток крови определенного типа. Исследования in vitro показывают, что колониестимулирующие факторы (КСФ) могут влиять на все эти аспекты кроветворения.

Кроме того, исследования in vitro показывают, что существует большой элемент случайности в выборе пути кроветворной клеткой. КСФ не диктуют прямо, что клетка должна делать, а изменяют вероятность того или иного поведения. В культурах кроветворных клеток, даже если эти клетки были подвергнуты отбору на максимальную гомогенность популяции, они сильно различаются по размерам, а часто и по характеру образующихся из них колоний. И если взять две сестринские клетки сразу после деления и культивировать по отдельности в идентичных условиях, они будут часто давать колонии, содержащие клетки разного типа или же клетки тех же типов, но в разных количествах. Таким образом, и программирование клеточных делений, и выведение клеток на определенный путь дифференцировки (коммитирование), видимо, включают случайные события на уровне индивидуальной клетки, даже если поведение многоклеточной системы в целом надежно регулируется. Вопрос о молекулярных механизмах, лежащих в основе этих процессов, - самая фундаментальная из нерешенных проблем кроветворения.

Заключение

Все многочисленные типы кровяных клеток ведут свое происхождение от общей плюрипотентной стволовой клетки. Во взрослом организме стволовые клетки находятся главным образом в костном мозге, где они в норме довольно редко делятся, производя новые стволовые клетки (самообновление) или различные коммитированные клетки-предшественницы, каждая из которых способна давать начало клеткам одного или нескольких типов. Коммитированные клетки усиленно делятся под воздействием сигнальных гликопротеиновых молекул (называемых колониестимулирующими факторами, КСФ) и затем дифференцируются в зрелые клетки крови, которые обычно живут лишь несколько дней или

недель. Изучению кроветворения существенно помогают опыты на культурах in vitro, *где стволовые клетки или коммитированные клетки-предшественницы при росте в полутвердой среде образуют клональные колонии. Однако плюрипотентные стволовые клетки малочисленны, их трудно распознавать и пока еще не ясно, как они выбирают свой путь среди разных вариантов развития.*

17.6. Происхождение, видоизменение и регенерация ткани скелетных мышц [33]

«Мышечными» называют все типы клеток, функция которых состоит в сокращении, хотя в остальном эти клетки могут быть мало сходны между собой. Как уже говорилось в гл. 11, сократительный аппарат, включающий актин и миозин, - это фундаментальная особенность животных клеток вообще, но в мышечных клетках он особенно сильно развит. У млекопитающих имеются четыре главных типа клеток, специально приспособленных для сокращения: волокна скелетных мышц, клетки сердечной мышцы, гладкомышечные и миоэпителиальные клетки (рис. 17-36). Они различаются по функции, структуре и пути развития.

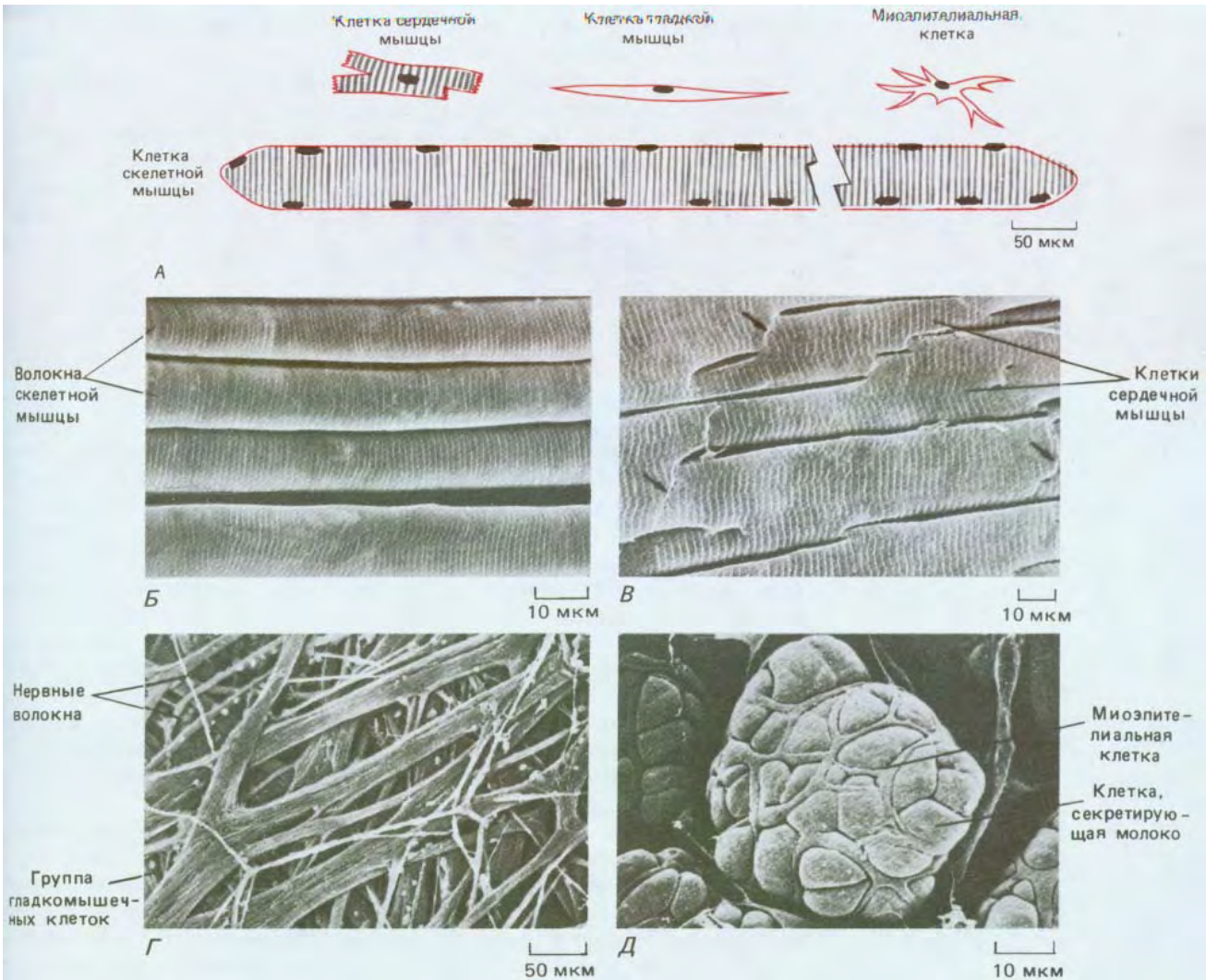


Рис. 17-36. Четыре типа мышечных клеток млекопитающих. *А.* Схематические изображения (с соблюдением масштаба). *Б- Д.* Фотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа: Б - скелетная мышца шеи хомячка; В - сердечная мышца крысы; *Г*— гладкая мышца из мочевого пузыря морской свинки; *Д*- миоэпителиальные клетки в альвеоле лактирующей молочной железы крысы. Стрелками на фото *В* указаны вставочные диски (см. разд. 11.1.14). Обратите внимание, что гладкая мышца показана при меньшем увеличении, чем другие. [Б - с любезного разрешения Junzo Desaki; С-Т. Fujiwara, Cardiac Muscle, in: Handbook of Microscopic Anatomy (E. D. Canal, ed.). Berlin: Springer Verlag, 1986; *Г* с любезного разрешения Satoshi Nakasiro; *Е-Т.* Nagato et al., Cell and Tissue Res., 209, 1-10, 1980.]

Хотя все они, по-видимому, используют для создания механической силы актин и миозин, в клетках разного типа эти белки несколько различаются по своей первичной структуре, по-разному организованы во внутреннем пространстве клетки и ассоциированы с разными наборами белков, регулирующих сокращение.

Клетки скелетных мышц, сократительный аппарат которых детально рассмотрен в гл. И, ответственны практически за все произвольные движения. Эти клетки могут иметь огромные размеры (до полуметра в длину и до 100 мкм в диаметре у взрослого человека) и за свою форму получили также название мышечных волокон. Каждая такая клетка представляет собой синцитий, содержащий много ядер в общей цитоплазме. В отличие от этого мышечные клетки трех других типов имеют более обычное строение - в них только по одному ядру. Клетки сердечной мышцы сходны с волокнами скелетной мускулатуры в том отношении, что нити актина и миозина в них образуют упорядоченные системы, придающие клетке исчерченный вид. Гладкомышечные клетки получили свое название потому, что они, напротив, не выглядят исчерченными. Функции у гладкой мускулатуры весьма разнообразны - от проталкивания пищи по пищеварительному тракту до поднятия шерсти дыбом при холоде или страхе. Миоэпителиальные клетки (тоже лишенные исчерченности) в отличие от клеток трех других типов лежат в эпителии и происходят из эктодермы. Эти клетки образуют мускулатуру радужной оболочки глаза, расширяющую зрачок, а также используются для выдавливания слюны, пота и молока из соответствующих желез (см. рис. 17-36, *Д*).

Четыре главных типа мышечных клеток можно далее подразделить на разные подтипы, каждый из которых имеет свои особенности. Но мы сосредоточим свое внимание на клетках скелетных мышц с их интересным механизмом развития, необычным способом репарации повреждений и поразительной способностью видоизменяться в дифференцированном состоянии.

17.6.1. Новые клетки скелетных мышц образуются путем слияния миобластов [2, 34]

В предыдущей главе было описано, каким образом определенные клетки, происходящие из сомитов на очень ранней стадии развития позвоночного, детерминируются как миобласты (т.е. предшественники клеток скелетных мышц) и мигрируют в соседнюю эмбриональную соединительную ткань - мезенхиму (разд. 16.6.5). Как говорилось в разд. 10.1.8, это определение судьбы клетки как миобласта (а не фибробласта, например), по-видимому, связано с активацией специфического гена, управляющего развитием. После некоторого периода пролиферации миобласты сливаются друг с другом, образуя многоядерные клетки скелетных мышц (рис. 17-37). При слиянии они претерпевают резкое изменение фенотипа в результате координированной активации целой батареи других генов (разд. 10.1.8). После объединения миобластов в синцитий ДНК в ядрах никогда уже больше не реплицируется. Слияние обусловлено специфическим взаимным узнаванием между миобластами: они не сливаются с соседними немышечными клетками. Молекулярная основа процесса узнавания не известна.

Миобласты, размножавшиеся в культуре целых два года, все еще сохраняют способность к дифференцировке, и при надлежащем изменении культуральных условий они будут сливаться, образуя мышечные клетки. По-видимому, ключевым компонентом среды, поддерживающим пролиферацию и препятствующим дифференцировке, служит фактор роста фибробластов (ФРФ): если его удалить, клетки быстро

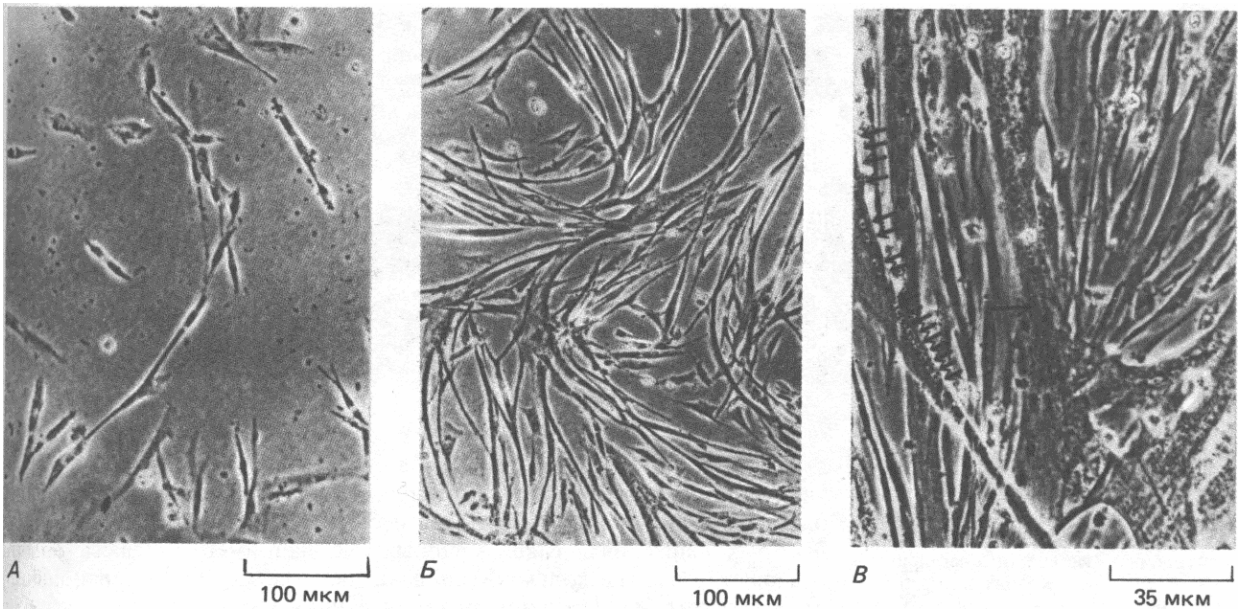


Рис. 17-37. Миобласты in vitro пролиферируют, располагаются упорядоченным образом, а затем сливаются, образуя многоядерные мышечные клетки. Микрофотографии живой культуры (в фазовоконтрастном микроскопе) на последовательных стадиях. Фото *В* сделано при большем увеличении; видна поперечная исчерченность (указана длинной стрелкой), которая появляется, как только начинает развиваться сократительный аппарат. Видны многочисленные ядра в одной клетке (короткие стрелки). (С любезного разрешения Rosalind Zalin.)

перестают делиться, сливаются и дифференцируются. Однако система регуляции сложна. Для осуществления дифференцировки миобласты должны, например, прикрепиться к межклеточному матриксу. При этом процесс слияния является кооперативным: сливающиеся миобласты, видимо, секретируют какие-то неизвестные факторы, побуждающие к слиянию другие миобласты.

17.6.2. Мышечные клетки могут видоизменять свои свойства в результате смены изоформ специфических белков [35]

Однажды образовавшаяся скелетная мышечная клетка обычно сохраняется до конца жизни животного; при этом она растет, созревает и изменяет свои свойства в соответствии с функциональными потребностями. Геном содержит различные варианты генов, кодирующих многие характерные белки скелетномышечных клеток, причем сплайсинг РНК-транскриптов некоторых генов может происходить по-разному. В результате образуется множество вариантов (так называемых изоформ) белковых компонентов сократительного аппарата. В процессе созревания мышечной клетки подбираются различные сочетания изоформ, приспособленные к меняющимся требованиям в отношении быстроты сокращения и утомляемости у плода, новорожденного и взрослого организма.

В одной и той же мышце можно найти существующие бок о бок мышечные клетки разных типов - каждый тип с особым набором белковых изоформ. У взрослых животных два типа легко распознать даже невооруженным глазом. *Красные мышечные волокна,* как, например, в темном курином мясе, богаты связывающим кислород белком миоглобином. *Белые мышечные волокна,* такие как в белом курином мясе, содержат гораздо меньше миоглобина. Различное содержание миоглобина-белка, родственного гемоглобину, - отражает различную потребность в кислороде: для красных волокон более характерно окислительное фосфорилирование, для белых - анаэробный гликолиз. Различные типы метаболизма в свою очередь связаны с разными типами сократительной активности. Красные волокна в ответ на стимуляцию сокращаются медленно, они меньше подвержены утомлению и более эффек-

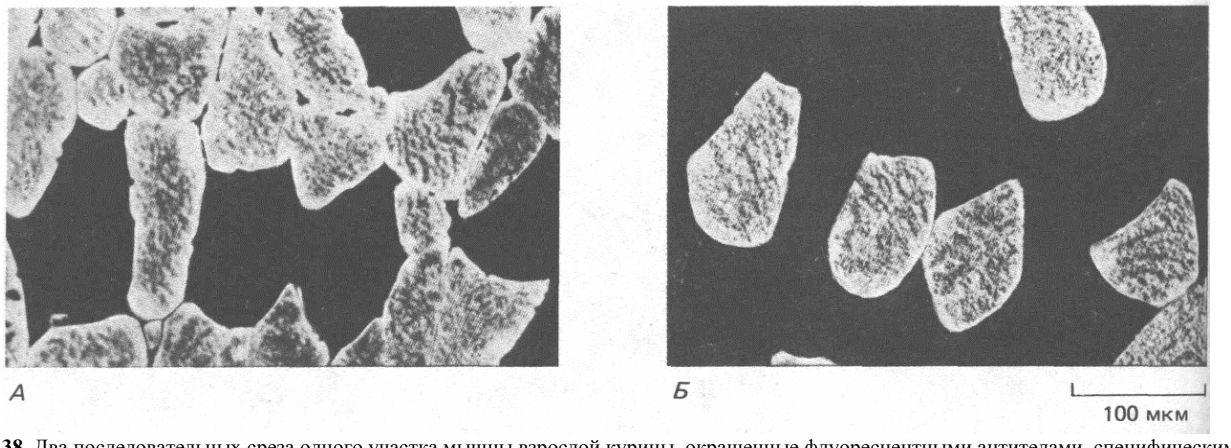


Рис. 17-38. Два последовательных среза одного участка мышцы взрослой курицы, окрашенные флуоресцентными антителами, специфическими для двух разных изоформ миозина. *А.* Белые (быстро сокращающиеся) клетки окрашены антителами к «быстрому» миозину. *Б.* Красные (медленно сокращающиеся) клетки окрашены антителами к «медленному» миозину. (G. Gauthieret al., J. Cell Biol, 92, 471-484, 1982.)

тивны при необходимости длительных усилий. Белые волокна дают быстрый ответ, легче утомляются и более эффективны при отдельных быстрых движениях. Такие мышцы, как, например, бицепсы, обычно содержат смесь нескольких типов мышечных клеток в соотношении, оптимальном для функционирования данной мышцы (рис. 17-38).

Изменяя хирургическим путем иннервацию мышц или искусственно стимулируя их вживленными электродами, можно показать, что частот электрического возбуждения сильно влияет на картину экспрессии генов в мышечной клетке. Если «медленную» мышечную клетку стимулировать с частотой, более подходящей для «быстрой» мышцы, то он частично превращается в быструю, и наоборот; это происходит отчасти за счет смены изоформ белков. Как мы уже видели (разд. 17.4.3), такие изменения возможны не только в мышечных клетках: «переключения экспрессии генов, приводящие к появлению вариантов мРНК, чаете происходят при созревании дифференцированной клетки или при ее реакции на окружающие условия.

17.6.3. Некоторые миобласты сохраняются во взрослом организме как покоящиеся стволовые клетки [36]

Мышца может расти тремя способами: возможно увеличение длины дифференцированных мышечных волокон, их толщины и их числа Поскольку клетки скелетной мышцы не способны делиться, новы волокна могут возникать только путем слияния миобластов. Число многоядерных клеток в скелетных мышцах фактически достигает уровня, свойственного взрослому организму, на весьма ранней стадии развития, у человека - еще до рождения. Последующее колоссальное нарастание мышечной массы идет за счет увеличения размеров отдельных клеток. Рост мышцы в длину зависит от включения все большего числа миобластов в существующие многоядерные клетки, главным образом на их концах, что увеличивает число ядер в каждой клетке Напротив, утолщение мышцы, как, например, у штангистов, зависит от увеличения размеров и числа сократительных миофибрилл в каждой отдельной клетке (разд. 11.1.1), а не от изменения числа мышечных клеток или их ядер.

Тем не менее и во взрослом организме сохраняются немногочисленные миобласты. Это маленькие, уплощенные и неактивные клетки, находящиеся в тесном контакте со зрелыми мышечными волокнами и окруженные своей базальной мембраной. В случае повреждения мышцы или при ее обработке фактором роста фибробластов в этих так

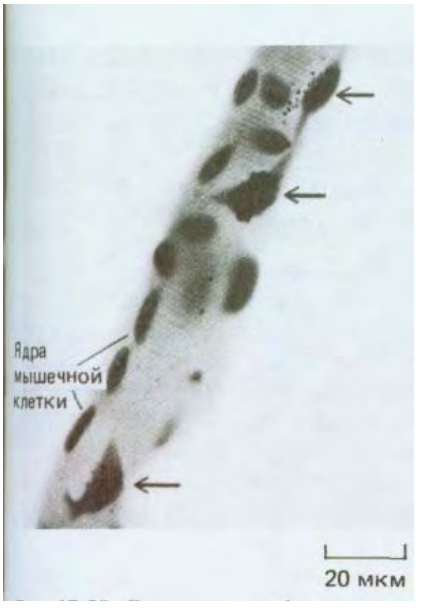


Рис. 17-39. Радиоавтограф одного многоядерного мышечного волокна с прилегающими клетками-сателлитами. Волокно было выделено у взрослой крысы и перенесено в культуральную среду, содержавшую ^{3}H-тимидин и экстракт из поврежденной мышцы, который стимулирует деление клеток-сателлитов. Делящиеся сателлиты (показаны стрелками) включили метку (зерна серебра имеют вид черных точек). Ядра мышечных клеток не способны к делению и остаются немеченными. (R. Bischoff, Dev. Biol., **115,** 140-147, 1986.)

называемых клетках-сателлитах пробуждается пролиферативная активность (рис. 17-39), и их потомки могут сливаться, образуя новые мышечные волокна. Таким образом, эти покоящиеся стволовые клетки в зрелой скелетной мышце находятся в резерве, но при надобности могут служить самообновляющимся источником терминально дифференцированных клеток.

Заключение

Клетки (волокна) скелетных мышц у позвоночных составляют один из четырех видов специализированных клеток, несущих функцию сокращения. Они ответственны за произвольные движения. Каждая клетка представляет собой синцитий и образуется в результате слияния миобластов. Миобласты могут быть стимулированы к пролиферации факторами роста, такими как ФРФ, но после слияния они уже делиться не могут. Слияние миобластов обычно сопряжено с началом дифференцировки мышечной клетки, когда в ней координированным образом включается много различных генов. Впоследствии клетки могут видоизменять свой дифференцированный характер путем изменения набора синтезируемых ими изоформ белков. В мышцах взрослого организма часть миобластов продолжает существовать в состоянии покоя в виде клеток-сателлитов. В случае повреждения мышцы они играют роль стволовых клеток - начинают пролиферировать и сливаться, чтобы возместить утрату мышечных волокон.

17.7. Фибробласты и их превращения: семейство соединительнотканных клеток [37]

Многие дифференцированные клетки взрослого организма можно объединить в семейства, принадлежность к которым определяется происхождением и свойствами клеток. Важный пример - семейство соединительнотканных клеток; члены его не только родственны, но и в необычной степени способны к взаимным превращениям. В это семейство входят фибробласты, хрящевые клетки и костные клетки. Все они специализированы для секреции межклеточного матрикса, содержащего коллаген, и совместно образуют «архитектурный каркас» тела вместе с жировыми клетками и клетками гладкой мускулатуры, имеющими, по-видимому, то же происхождение. На рис. 17-40 изображены эти типы клеток и показаны их возможные превращения. Соединительнотканные клетки играют центральную роль как опорные элементы

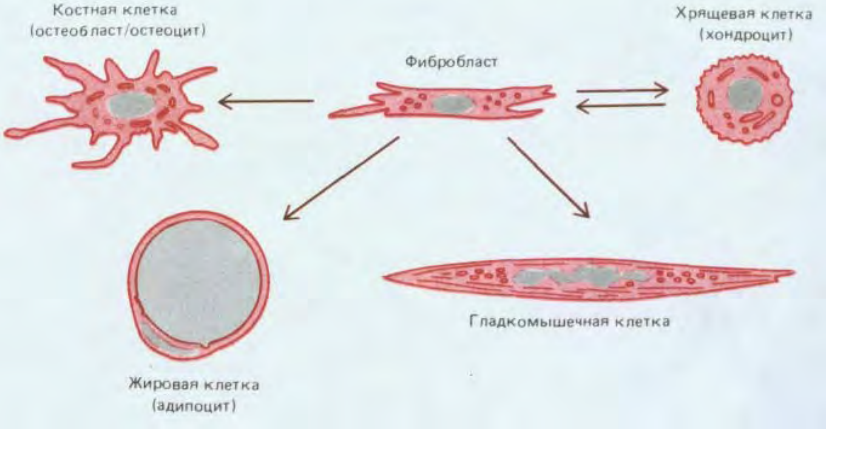


Рис. 17-40. Взаимные превращения, по-видимому, происходящие внутри семейства соединительнотканных клеток. Для упрощения фибробласты представлены клеткой одного типа, в действительности же существует много типов фибробластов; число их, однако, не установлено, так же как их потенции к дифференцировке.

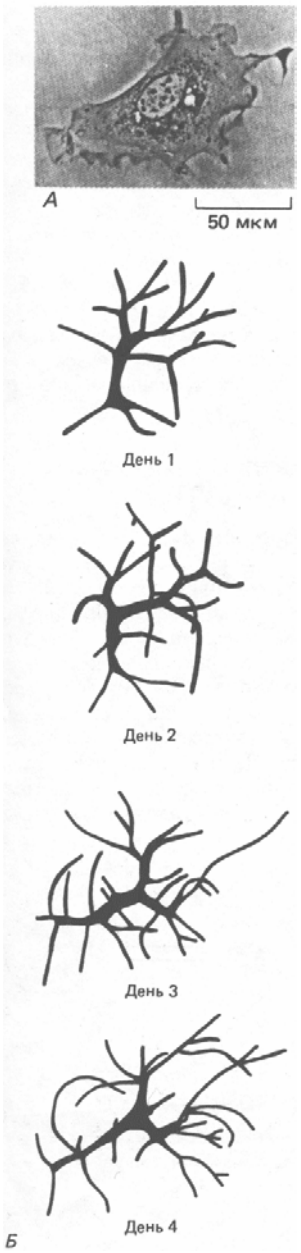


Рис. 17-41. *А.* Фазовоконтрастная микрофотография мышиного фибробласта в культуре. *Б.* Изображения живой фибробластоподобной клетки в прозрачном хвосте головастика; показаны изменения ее формы и положения в течение нескольких дней. Обратите внимание на то, что, хотя в культуре фибробласты распластываются, в тканях они могут иметь более сложную конфигурацию с многочисленными отростками. *(А - с* любезного разрешения Guenter Albrecht-Buehler; *Б - из* E. Clark, Am.J.Anat., 13, 351-379, 1912.)

и участники восстановительных процессов почти в каждой ткани и каждом органе; пластичность их дифференцировки имеет большое значение при реакциях на разного рода повреждения.

17.7.1. Фибробласты изменяют свои свойства в ответ на сигналы от межклеточного матрикса [37, 38]

Фибробласты - по-видимому, наименее специализированные клетки в семействе соединительнотканных клеток. В составе соединительной ткани они разбросаны по всему организму и секретируют мягкий внеклеточный матрикс, богатый коллагеном типа I и/или типа III, как это описано в гл. 14 (разд. 14.6.2). В случае повреждения ткани ближние фибробласты мигрируют в рану, размножаются там и образуют большие количества коллагенового матрикса, который помогает изолировать и восстановить поврежденную ткань. Способность этих клеток существовать и действовать в необычных условиях раны наряду с их «одиночным образом жизни» позволяет очень легко выращивать их в культуре, что делает их излюбленным объектом исследований клеточных биологов (рис. 17-41).

Как показано на рис. 17-40, фибробласты - это, видимо, самые пластичные из соединительнотканных клеток: они проявляют удивительную способность дифференцироваться в других представителей того же семейства. Однако, прежде чем углубляться в детали, мы должны предостеречь от слишком поспешных выводов. Есть веские данные в пользу того, что фибробласты в разных частях организма внутренне различны (см. *Приложение* в конце этой главы); не может быть уверенности даже в том, что в одном участке все фибробласты эквивалентны. Проще всего предположить, что они идентичны, поскольку не доказано, что это не так. Однако вполне возможно, что соединительная ткань содержит смесь различающихся линий фибробластов, из которых одни способны превращаться в хондроциты, другие - в жировые клетки, и т.д.; отсутствие видимых различий не обязательно означает, что существует только один тип фибробластов с множественными потенциями развития. Возможно также, что «зрелые» фибробласты, не способные к трансформации, существуют бок о бок с «незрелыми» (их часто называют мезенхимными клетками), которые могут превращаться в зрелые клетки разного типа.

Несмотря на эти неясности, однако, исследования in vivo и in vitro четко показали, что свойства соединительнотканных клеток могут радикально изменяться. Например, если препарат костного матрикса, полученный размалыванием кости в тонкий порошок и элюированием твердого минерального вещества, имплантировать в дермальный слой кожи, то там некоторые клеточные элементы - возможно, кожные фибробласты - превращаются в хрящевые клетки, а несколько позже другие клетки трансформируются в костные. При этом образуется небольшой кусочек кости, имеющий даже костномозговую полость. Эти результаты позволяют думать, что компоненты внеклеточного матрикса могут сильнейшим образом влиять на дифференцировку соединительно-

тканных клеток. Далее мы увидим, что сходные превращения клеток играют важную роль и при срастании костей после переломов. Показано даже, что костный матрикс содержит в себе высокие концентрации нескольких факторов роста, влияющих на поведение соединительнотканных клеток, например TGF-β (трансформирующий фактор роста (3-см. разд. 13.3.4, табл. 13-1), который, как установлено, индуцирует дифференцировку хряща in vitro.

17.7.2. Внеклеточный матрикс может влиять на дифференцировку соединительнотканных клеток, изменяя их форму и способность к прикреплению [39]

Внеклеточный матрикс может влиять на дифференцированное состояние соединительнотканных клеток как физическим, так и химическим путем. Это было показано в исследованиях на хрящевых клетках *(хондроцитах),* растущих в культуре. При надлежащих условиях эти клетки размножаются и поддерживают свой дифференцированный статус, синтезируя на протяжении многих клеточных поколений большие количества весьма характерного хрящевого матрикса, которым они сами себя окружают. Однако если культуру вести при относительно низкой плотности клеток в виде монослоя на культуральной чашке, то происходит трансформация: клетки теряют округлую форму, типичную для хондроцитов, распластываются на субстрате и перестают вырабатывать хрящевой матрикс. В частности, они прекращают синтез коллагена типа II, характерного для хряща, а вместо этого начинают производить коллаген типа I, характерный для фибробластов. За месяц существования такой культуры почти все хрящевые клетки переключают экспрессию генов коллагена и приобретают вид фибробластов. Биохимические изменения в клетке должны происходить внезапно, так как лишь в очень немногих клетках отмечается одновременный синтез коллагена обоих типов.

Разного рода экспериментальные данные говорят о том, что биохимические изменения по крайней мере частично индуцируются изменением формы клеток и их прикрепления. Например, хондроциты, претерпевшие трансформацию в фибробластоподобные клетки, можно осторожно отделить от поверхности культуральной чашки и перенести на чашку с агарозой. Образуя гель, агароза удерживает клетки в состоянии суспензии, без прикрепления к субстрату, и это заставляет их принимать округлую форму. В таких условиях клетки вскоре вновь приобретают свойства хондроцитов и начинают синтезировать коллаген типа П. Вопрос о том, каким образом форма клеток и их прикрепление могли бы влиять на экспрессию генов, обсуждается в разд. 13.3.6.

Для большинства клеток, особенно соединительнотканных, возможности прикрепления зависят от окружающего матрикса, который обычно вырабатывают сами клетки. Таким образом, клетка создает себе окружение, которое в свою очередь воздействует на клетку, закрепляя ее дифференцированное состояние. Более того, внеклеточный матрикс, образуемый клеткой, отчасти создает окружение и для соседних с ней клеток, способствуя их дифференцировке в том же направлении. Можно наблюдать, например, как в развивающемся организме или в культуральной чашке увеличивается группа хондроцитов, образующая узелок хряща, в результате превращения находящихся рядом фибробластов в хондроциты.

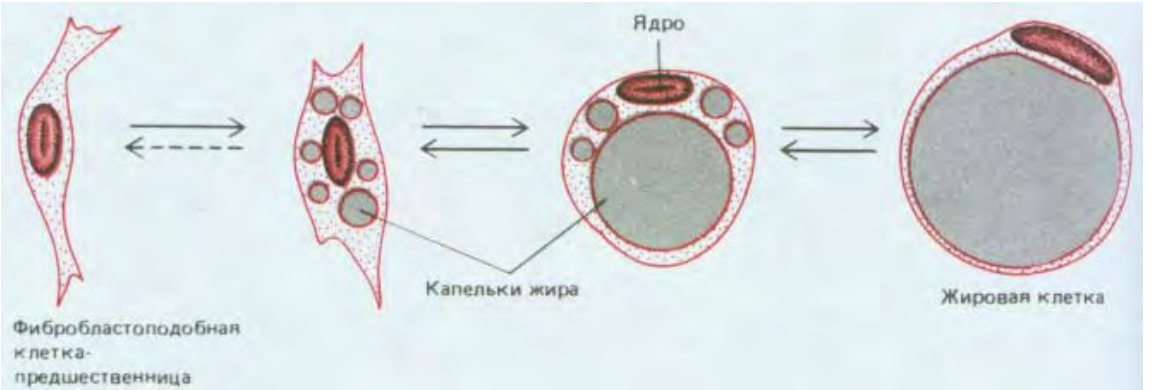


Рис. 17-42. Превращение фибробластоподобной клетки-предшественника в зрелую жировую клетку в результате накопления и слияния жировых капелек. Как показано стрелками, этот процесс по крайней мере частично обратим. Клетки, находящиеся в начальной или промежуточной стадии, могут делиться, но зрелая жировая клетка к этому не способна.

17.7.3. Различные сигнальные молекулы, действуя последовательно, регулируют образование жировых клеток [40]

Полагают, что **жировые клетки,** или **адипоциты,** у млекопитающих тоже развиваются из фибробластоподобных клеток, как в ходе нормального развития, так и при различных патологиях, например при миодистрофии, когда мышечные клетки погибают и постепенно замещаются жировой соединительной тканью. Дифференцировка жировой клетки начинается с образования специфических ферментов; затем происходит накопление жировых капелек, которые в дальнейшем сливаются и увеличиваются в объеме, настолько сильно растягивая клетку, что остается лишь тонкий ободок цитоплазмы вокруг массы жира (рис. 17-42).

Факторы, влияющие на этот процесс, можно исследовать в культуре клеток, используя клеточные линии, например некоторые штаммы мышиных клеток 3Т3. Вначале было обнаружено, что для развития жировых клеток в культуре необходимо присутствие сыворотки плода коровы - обычного компонента культуральной среды. Главный фактор сыворотки, запускающий дифференцировку жировой клетки, позднее был идентифицирован как *гормон роста - белок, в* норме выделяемый в кровяное русло гипофизом. Получены данные, что этот гормон стимулирует дифференцировку не только жировых клеток, но и хондроцитов, и оказывает такое действие как in vitro, так и in vivo. Но гормон роста - это не единственная секретируемая сигнальная молекула, регулирующая развитие жировых клеток. Предшественники жировых клеток, стимулированные гормоном роста, становятся чувствительными к IGF1 (инсулиноподобный фактор роста 1), который побуждает дифференцирующиеся жировые клетки к пролиферации.

На дифференцировку жировых клеток, так же как и хондроцитов, влияют факторы, изменяющие их форму и прикрепление. Например, дифференцировка клеток 3Т3 в жировые клетки подавляется, если у них есть возможность распластаться на поверхности культуральной чашки, покрытой фибронектином, к которому они прочно прилипают. Однако это подавление можно снять с помощью цитохалазина, так как он разрушает актиновые нити и в результате клетки округляются.

Все эти эксперименты на клетках соединительной ткани иллюстрируют общее положение: дифференцировку регулирует совместное действие растворимых сигнальных веществ и контактов с внеклеточным матриксом. Эффект каждого фактора зависит от свойств реагирующей клетки, которые в свою очередь зависят от предыстории развития данной клетки.

Заключение

В семейство соединительнотканных клеток входят наряду с фибробластами хрящевые, костные, жировые и гладко мышечные клетки. Фибробласты, по-видимому, способны превращаться во все другие клетки этого семейства, и в некоторых случаях это превращение обратимо. Пока не ясно, присуще ли это свойство одному типу фибробластов, которые плюрипотентны, или же речь идет о смеси различных фибробластов с более узкими потенциями. Превращения соединительнотканных клеток регулируются составом окружающего внеклеточного матрикса, формой клеток, гормонами и факторами роста.

17.8. Мягкие клетки и твердый матрикс: рост, обновление и репарация кости [41]

Кость - это очень плотная специализированная соединительная ткань. Подобно железобетону, костный матрикс состоит из двух компонентов - прочных волокон (фибриллы коллагена типа II), противодействующих растяжению, и твердых частиц (фосфат кальция в виде кристалликов гидоксиапатита), устойчивых к сжатию. Объем пространства, занятого коллагеном, почти равен объему, занимаемому фосфатом кальция. В костях взрослого организма фибриллы расположены упорядоченными слоями, напоминая структуру фанеры: в каждом слое они лежат параллельно друг другу, но под прямым углом к фибриллам обоих смежных слоев.

Кость при всей ее твердости подвержена изменениям. Весь ее плотный внеклеточный матрикс пронизан каналами и полостями, заполненными живыми клетками, которые составляют около 15% веса компактной кости. Эти клетки участвуют в непрекращающемся процессе перестройки костной ткани. Клетки одного типа разрушают старый костный матрикс, а клетки другого типа образуют новый. Этот механизм обеспечивает обновление матрикса внутри кости.

Кость может расти только путем аппозиции, т. е. отложения дополнительного матрикса вместе с клетками на свободной поверхности твердой ткани. У эмбриона аппозиционный рост кости должен быть скоординирован с ростом других тканей так, чтобы организм мог увеличиваться в размерах без существенного искажения пропорций. Рост большей части скелета, особенно рост длинных костей конечностей и туловища, координируется с помощью сложной стратегии. У эмбриона сначала из хряща образуются миниатюрные «модели» будущих костей. Каждая такая модель растет, и по мере образования нового хряща более старый хрящ замещается костью. Рост и разрушение хряща и отложение кости в период развития так тонко скоординированы, что у взрослого животного кость, даже достигнув полуметра в длину, имеет почти такую же форму, как первоначальная хрящевая модель, длина которой не превышала нескольких миллиметров. Не углубляясь детально в геометрию этого процесса, мы остановимся на активности клеток, лежащей в основе роста костей и хряща у зародыша и обновления соответствующих тканей у взрослого организма; здесь особенно четко выявляется роль взаимодействий между клетками разного типа.

17.8.1. Хрящ способен к интерстициальному росту [39, 42]

«Сотрудничество» кости и хряща основано на их контрастных свойствах. Обе ткани образуются из мезенхимных клеток, секретирующих большие количества внеклеточного матрикса, который содержит коллаген. Но костный матрикс тверд, а хрящевой может деформироваться, так как

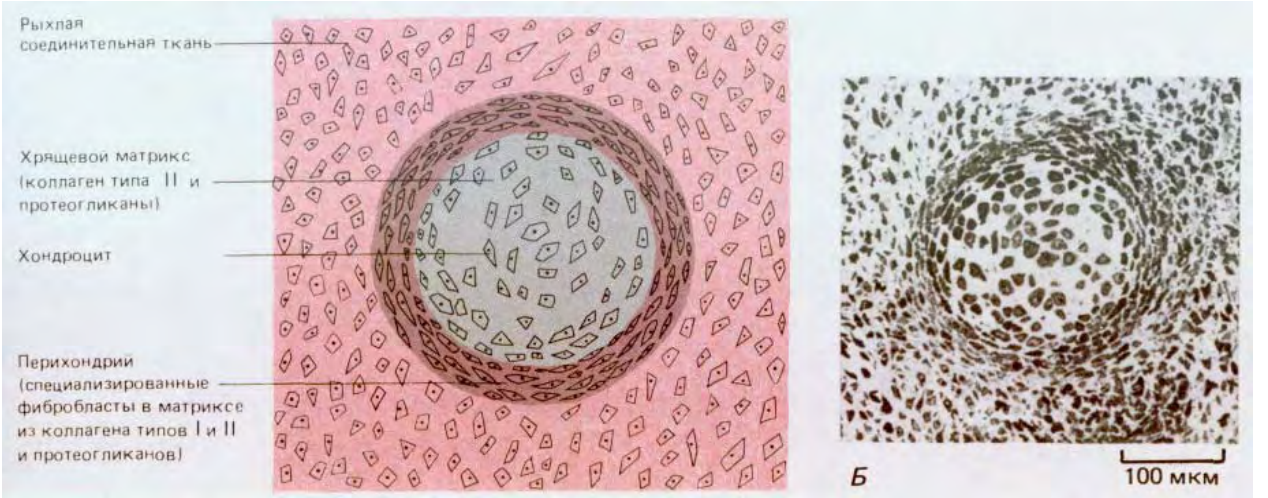


Рис. 17-43. *А.* Схематическое изображение среза, проходящего через хрящевой стержень в период его образования. Показан окружающий хрящевую ткань фиброзный перихондрий. Каждый хондроцит заполняет лакуну в хрящевом матриксе. *Б.* Поперечный срез через такой стержень у куриного эмбриона на ранней стадии развития. По мере роста ткани количество хрящевого матрикса, приходящегося на один хондроцит, будет сильно возрастать, и граница между хрящом и перихондрием обозначится более резко. (С любезного разрешения Peter Gould.)

состоит в основном из протеогликанов в высокой концентрации (разд. 14.2.4) и из коллагена типа II. Поэтому **хрящ** в отличие от кости способен к интерстициальному росту: он может увеличиваться в объеме за счет того, что клетки, уже окруженные матриксом, продолжают секретировать его.

Хрящевые клетки, или хондроциты, отделены друг от друга матриксом. Каждая клетка занимает в матриксе небольшую полость, или лакуну. Хрящ обычно не содержит кровеносных капилляров, и жизнедеятельность его клеток поддерживается благодаря диффузии питательных веществ и газов через матрикс от лежащих довольно далеко кровеносных сосудов и в обратном направлении. Большую часть хряща окружает *перихондрий* - плотный слой соединительной ткани, содержащей коллаген (рис. 17-43). Хрящ растет изнутри, по мере того как хондроциты секретируют новый матрикс, а волокнистый перихондрий выступает в роли корсета, ограничивающего изменения формы. В процессе роста хряща образуются и новые клетки: хондроцит, находящийся в своей лакуне, разделившись, даст две клетки, и каждая из них будет затем секретировать новый матрикс, который вскоре изолирует их друг от друга (рис. 17-44). Новые клетки могут также переходить в хрящ из перихондрия. Как полагают, перихондриальные клетки, напоминающие фибробласты, делятся и подвергаются превращению, в результате которого они начинают образовывать вокруг себя хрящевой матрикс и быстро становятся настоящими хондроцитами. По-видимому, этот процесс, происходящий in vivo, аналогичен описанной выше трансформации соединительнотканных клеток in vitro (разд. 17.7.2).

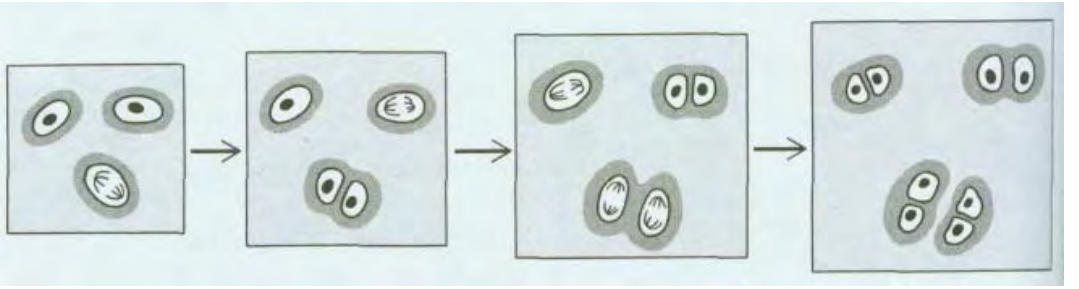


Рис. 17-44. Рост хряща. Ткань разрастается, по мере того как хондроциты делятся и производят больше матрикса. Новосинтезированный матрикс, непосредственно окружающий клетки, выделен более темным серым цветом. Хрящ может также расти благодаря поступлению фибробластов из перихондрия и их превращению в хондроциты (см. рис. 17-43).

17.8.2. Остеобласты секретируют костный матрикс, а остеокласты разрушают его [41, 43]

Кость - ткань более сложная, чем хрящ. Костный матрикс секретируют остеобласты, которые лежат на поверхности уже существующего матрикса и наслаивают на него новый костный материал. Некоторые остеобласты остаются свободными на поверхности, в то время как другие постепенно погружаются в продукт своей собственной секреции. Этот свежеизготовленный материал (состоящий главным образом из коллагена типа I) называется *остеоидом.* Он быстро превращается в плотный костный матрикс в результате отложения фосфата кальция. Оказавшись заключенной в твердый матрикс, исходная костеобразующая клетка, называемая теперь **остеоцитом,** уже не имеет возможности делиться, хотя и продолжает секретировать в небольших количествах матрикс. Подобно хондроциту, остеоцит занимает небольшую полость, или лакуну, в матриксе, но в отличие от хондроцитов он не изолирован от своих собратьев: от каждой лакуны отходят очень узкие *канальцы,* которые содержат отростки лежащего в лакуне остеоцита, позволяющие ему образовывать щелевые контакты с соседними остеоцитами (рис. 17-45). Хотя такие сети из остеоцитов сами не секретируют матрикс и не разрушают его, им, вероятно, принадлежит важная роль в регуляции активности тех клеток, которые это делают.

В то время как остеобласты откладывают костный матрикс, **остеокласты** разрушают его (рис. 17-46). Остеокласты - это крупные многоядерные клетки типа макрофагов. Подобно другим макрофагам, они развиваются из моноцитов, образующихся в кроветворной ткани костного мозга. Предшественники остеокластов - моноциты - выходят в кровяное русло и скапливаются в местах резорбции кости; там они сливаются друг с другом, образуя многоядерные остеокласты, которые внедряются в поверхностные слои костного матрикса и постепенно растворяют его.

Остеокласты способны проделывать глубокие ходы в материале компактной кости, образуя полости, в которые затем проникают другие клетки. По оси такого туннеля прорастают кровеносные капилляры, а стенки его покрываются слоем остеобластов (рис. 17-47). Остеобласты откладывают концентрическими слоями новую кость, которая постепенно заполняет полость, оставляя лишь узкий канал вокруг нового кровеносного сосуда. Многие остеобласты оказываются замурованными

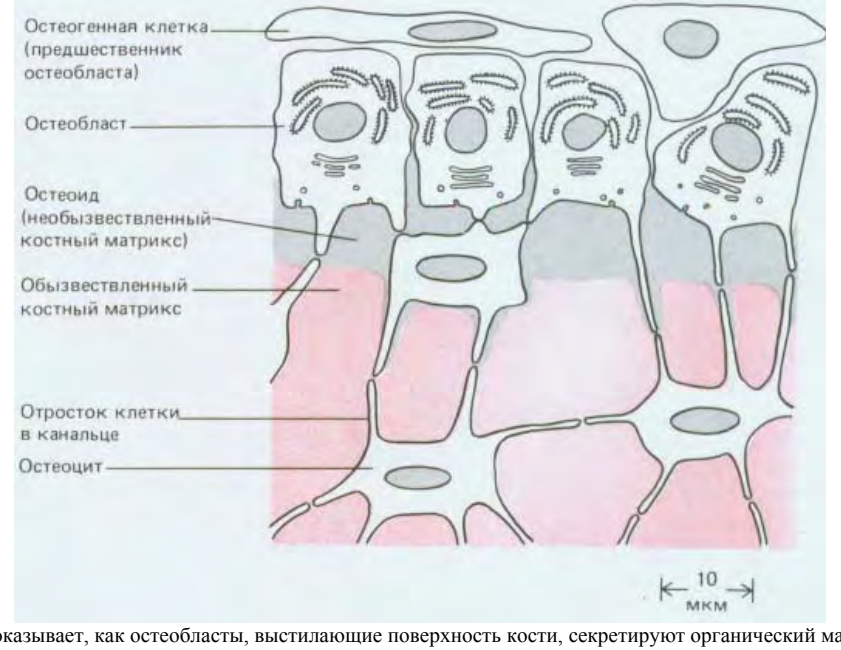
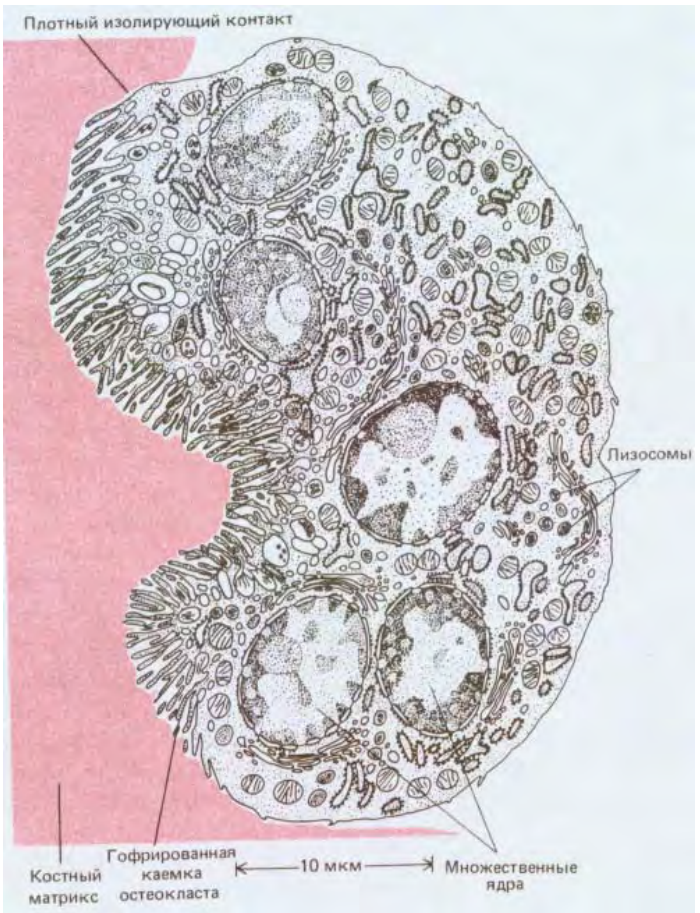


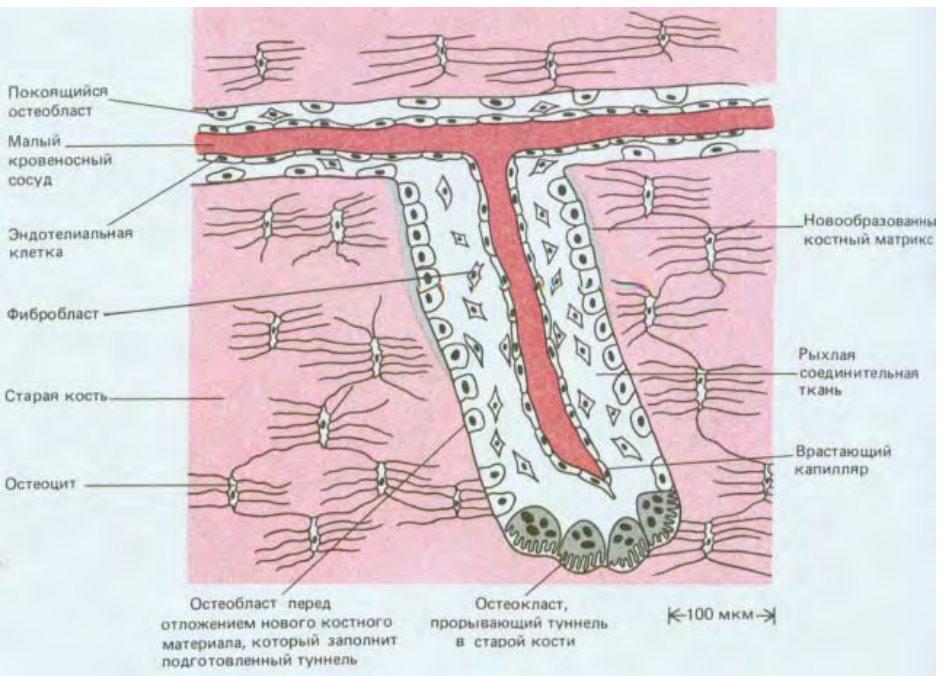
Рис. 17-45. Эта схема показывает, как остеобласты, выстилающие поверхность кости, секретируют органический матрикс кости (остеоид) и превращаются в остеоциты по мере погружения в этот матрикс. Образующийся матрикс вскоре обызвествляется. Полагают, что сами остеобласты ведут свое происхождение от остеогенных стволовых клеток - близких родственников фибробластов.

Рис. 17-46. Остеокласт - гигантская клетка, разрушающая костный матрикс. «Гофрированная каемка»-это место секреции кислот (для растворения минерального вещества кости) и гидролаз (для переваривания органических компонентов матрикса). Клетка показана в поперечном разрезе. Форма остеокластов изменчива, они подвижны и часто посылают отростки для резорбции кости сразу во многих участках. Остеокласты развиваются из моноцитов, их можно рассматривать как специализированные макрофаги. (R. V. Krstic: Ultrastucture of the Mammalian Cells An Atlas. Berlin: Springer, 1979.)



в костный матрикс и образуют там концентрические кольца остеоцитов. В то время как одни туннели заполняются костью, другие заново прокладываются остеокластами в более старых концентрических системах. Результаты этой непрерывной перестройки хорошо видны на гистологических препаратах компактной кости (рис. 17-48).

Рис. 17-47. Схема, иллюстрирующая процесс перестройки компактного вещества кости. Остеокласты, действуя небольшими группами, прокладывают тоннели в старой кости, продвигаясь ежедневно приблизительно на 50 мкм. Вслед за ними в тоннель входят остеобласты; они выстилают стенки тоннеля и начинают образовывать новую кость, откладывая матрикс со скоростью 1-2 мкм в сутки. Одновременно по оси тоннеля прорастают капилляры. В конце концов тоннель будет постепенно заполняться концентрическими слоями новой кости - останется свободным только узкий центральный канал. Каждый такой канал не только обеспечивает доступ остеобластам и остеокластам, но содержит также один или несколько кровеносных сосудов, доставляющих питательные вещества, необходимые для жизни костных клеток. Обычно за год у здорового взрослого млекопитающего таким способом заменяется 5-10% кости. (По Z. F. G. Jaworski, B. Duck, G. Sekaly, J. Anat., **133,** 397-405, 1981.)



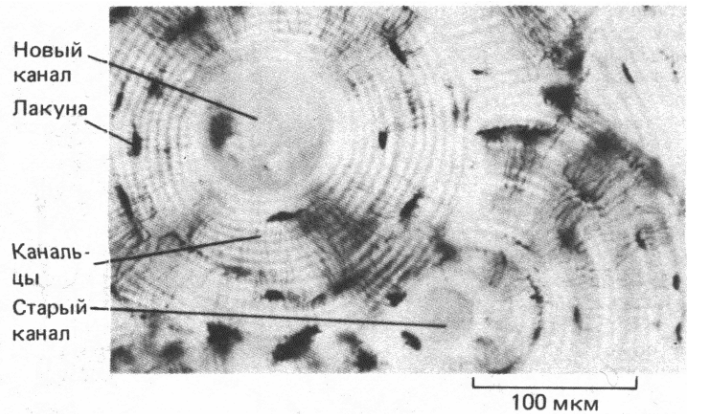


Рис. 17-48. Микрофотография поперечного среза компактного вещества длинной кости. Видны контуры тоннелей, проделанных остеокластами, а затем заполненных с помощью остеобластов. Срез приготовлен методом шлифования. Плотный матрикс сохранился, но клетки разрушены; однако отчетливо видны лакуны и канальцы, *которые* были заполнены остеоцитами и их отростками. Чередующиеся светлые и темные концентрические кольца соответствуют изменяющейся ориентации волокон коллагена в последовательных слоях костного матрикса, отложенного остеобластами, выстилавшими стенки в разные периоды жизни особи. (Такая картина получается при наблюдении образца между двумя частично скрещенными поляроидными фильтрами.) Обратите внимание на то, что часть более старой системы концентрических костных слоев (внизу справа, с узким центральным каналом) частично резорбирована и заменена более новой системой, в которой центральный канал все еще остается широким - по-видимому, потому, что он еще находится в процессе заполнения.

В этих процессах еще много непонятного. Кости, например, обладают удивительной способностью перестраивать свою структуру таким образом, чтобы приспособиться к испытываемым нагрузкам. Это означает, что накопление и разрушение матрикса каким-то образом регулируются локальными механическими напряжениями. Какие механизмы определяют, будет ли матрикс откладываться на поверхности данной кости остеобластами или разрушаться остеокластами, не известно. Вероятно, важную роль в этом играют факторы роста, выделяемые костными клетками, заключенными в толще матрикса (разд. 17.7.1). Эти факторы могли бы высвобождаться при разрушении матрикса или при воздействии соответствующих нагрузок.

17.8.3. В развивающемся организме остеокласты разрушают хрящ, чтобы проложить путь для роста кости [44]

Как полагают, замена хряща костью в процессе развития организма тоже зависит от активности остеокластов. По мере созревания хряща клетки в некоторых участках значительно увеличиваются в размерах за счет окружающего матрикса, а сам матрикс минерализуется, подобно кости, в результате отложения кристаллов фосфата кальция. В то же время хондроциты в таких участках набухают и гибнут, оставляя большие пустоты. В эти пустоты внедряются остеокласты и кровеносные сосуды, разрушающие остатки хрящевого матрикса, а следующие за ними по пятам остеобласты начинают откладывать костный матрикс. Единственное, что остается от хряща в длинных костях взрослого животного, - это тонкий слой, образующий гладкое покрытие в области суставов, где одна кость сочленяется с другой (рис. 17-49).

Однако в соединительной ткани, окружающей кость, сохраняются клетки, способные к образованию нового хряща. В случае перелома кости клетки из прилежащей области проведут починку, воспроизведя «на скорую руку» первоначальный эмбриональный процесс: сначала откладывается хрящ, чтобы заполнить брешь, а затем хрящ заменяется костью.

17.8.4. Структура тела стабилизируется его соединительнотканным каркасом, а также избирательным сцеплением клеток [45]

Отдельная кость, как и весь организм в целом - это динамическая система, поддерживающая свою структуру благодаря балансу между противоположными функциями различных специализированных клеток. Любая динамическая система ставит проблему стабильности, и это

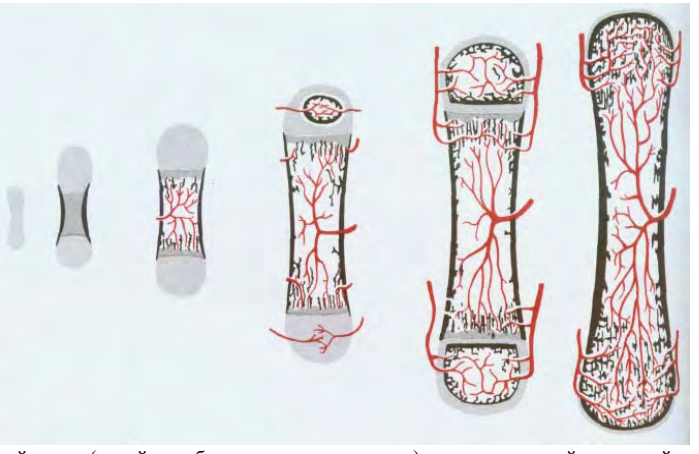


Рис. 17-49. Схема развития длинной кости (такой, как бедренная или плечевая) из миниатюрной хрящевой модели. Необызвествленный хрящ показан светло-серым цветом, обызвествленный - темно-серым, кость - черным, кровеносные сосуды - красным цветом. Хрящ не превращается в кость, а постепенно заменяется ею в результате деятельности остеокластов и остеобластов, которые внедряются в хрящ вместе с кровеносными сосудами. Остеокласты разрушают хрящевой и костный матрикс, в то время как остеобласты секретируют костный матрикс. Процесс окостенения начинается у эмбриона и заканчивается только к концу периода полового созревания. Образующаяся кость состоит из толстостенного полого цилиндра компактной кости, окружающей центральную полость, заполненную костным мозгом. Обратите внимание на то, что не все кости развиваются таким путем. Например, плоские кости черепа формируются сразу как костные пластинки, без предварительной стадии хрящевой модели. (D. W. Fawcett; A Textbook of Histology, 11 th ed. Philadelphia: Saunders, 1986, с изменениями.)

приводит к общему вопросу о поддержании структуры тела. Мы видели, каким образом клетки в тканях разного типа поддерживают свое дифференцированное состояние, как образуются новые клетки взамен утраченных, как перестраивается и обновляется внеклеточный матрикс. Но почему клетки различных типов постепенно не перемешиваются, почему не нарастает хаос? Почему структура в целом не искажается, не изменяет своих пропорций, по мере того как старые элементы заменяются новыми?

Конечно, с течением времени организм в какой-то степени все же деформируется: это одно из проявлений старения. Но поразительно то, что эти изменения так малы. Скелет, несмотря на постоянную перестройку, обеспечивает жесткую конструкцию, размеры которой почти не меняются. Это можно объяснить тем, что различные участки кости обновляются не все сразу, а мало-помалу, как при ремонте здания, в котором кирпичи заменяют по одному. Помимо консервативности способа обновления работают еще и механизмы активного гемеостаза, Например, небольшие отклонения кости от ее нормальной формы изменяют картину механических нагрузок, а эти нагрузки регулируют перестройку ткани так, чтобы вернуть кости ее нормальную форму (рис. 17-50).

Рост и обновление многих мягких частей тела гомеостатически контролируется таким образом, чтобы каждая деталь точно соответствовала предназначенному для нее месту. Эпидермис нарастает так, чтобы покрыть всю поверхность тела, и когда эта цель достигнута,

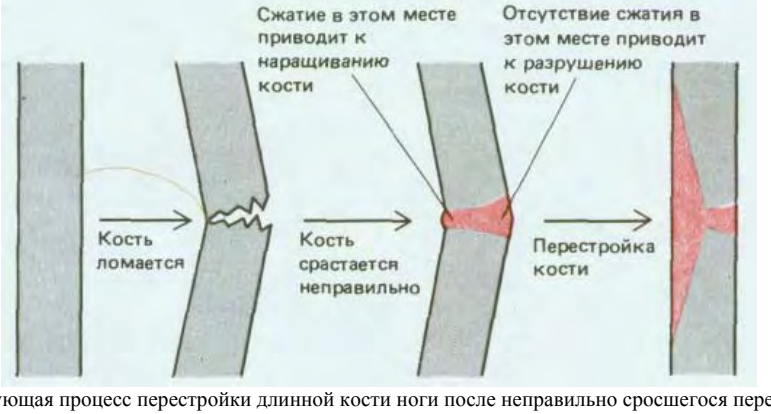


Рис. 17-50. Схема, иллюстрирующая процесс перестройки длинной кости ноги после неправильно сросшегося перелома. Деформации в недавно образовавшейся кости приводят к необычным напряжениям. В местах повышенного сжатия кости увеличивается скорость образования кости относительно скорости ее разрушения. Там же, где сжатие снижено, скорость роста кости уменьшается. Таким образом, кость постепенно перестраивается, приближаясь к своему нормальному состоянию.

миграция клеток прекращается в результате контактного торможения (разд. 11.6.8); соединительная ткань разрастается ровно настолько, чтобы заполнить образовавшийся при ранении дефект, и так далее. Но необходимо нечто большее, чем регулирование числа клеток. При обновлении дифференцированных клеток различного типа должны поддерживаться не только нужные численные соотношения между ними, но и их правильное относительное расположение. При обновлении тканей неизбежны перемещения клеток, и эти перемещения должны быть каким-то образом ограничены.

Ограничивающие факторы могут быть разными. Например, железы и другие скопления специализированных клеток часто находятся в плотных капсулах из соединительной ткани. Клетки некоторых типов погибают, если оказываются вне своего обычного окружения и лишаются специфических факторов роста, необходимых, вероятно, для их выживания. Быть может, самый важный механизм, удерживающий различные клетки на своих местах, - это избирательная адгезия: клетки одного и того же типа имеют тенденцию «слипаться» друг с другом (разд. 14.3.5), образуя либо плотные массы (как, например, в случае гладкой мускулатуры), либо эпителиальные слои (выстилка кишечника и т. п.).

Как сказано в разд. 14.3.7, этот механизм позволяет диссоциированным клеткам эпидермиса, например, спонтанно объединяться в эпителий с правильной структурой. И в более общем случае: стойкие прокладки из эпителиальных клеток разграничивают отдельные области тела, т.е. поддерживают обособленность клеток и ограничивают их распределение надлежащими территориями.

Понятно, насколько сложными и тонкими должны быть механизмы контроля и координации, сохраняющие структуру тела и организацию его тканей при постоянно протекающих перестройках и обновлении. Важнейшая роль этих механизмов четко и в жестокой форме выявляется тогда, когда они разлаживаются, как мы это увидим в последней главе книги при обсуждении проблемы рака.

Заключение

Хрящ и кость состоят из клеток, погруженных в плотный матрикс. Хрящ с его податливым матриксом способен к интерстициальному росту, тогда как твердая кость может расти только в результате отложения нового материала на ее поверхности. Тем не менее кость подвергается непрерывной перестройке благодаря совместной деятельности остеокластов, разрушающих матрикс, и остеобластов, которые его создают. Некоторые остеобласты замуровываются в матрикс, становятся остеоцитами и участвуют в регуляции обновления костного матрикса. Большинство длинных костей развивается из миниатюрных хрящевых «моделей», которые по мере роста служат матрицами для отложения костного вещества в результате совместной активности остеобластов и остеокластов. Сходным образом происходит заживление костных переломов у взрослого организма: сначала разрыв заполняется хрящом, который позже замещается костью. Хотя костная ткань, как и большинство других тканей, непрерывно обновляется, этот динамический процесс регулируется так, что глобальная структура остается прежней. Таким образом, благодаря этому и другим механизмом (таким, например, как избирательная межклеточная адгезия) организация тела стойко сохраняется, несмотря на постоянное замещение почти всех его компонентов.

Приложение. Перечень клеток взрослого человеческого организма

Сколько различных типов клеток существует в организме взрослого человека? В большом руководстве по гистологии обычно упоминается около 200 типов, заслуживающих отдельного названия. Эти традиционные названия - в отличие, например, от названий спектральных цветов - не относятся к отдельным частям некоего условно подразделенного континуума: большинство из них соответствует дискретным, четко различающимся категориям. Внутри той или иной категории часто наблюдаются некоторые вариации: волокна скелетных мышц, приводящих в движение глазное яблоко, гораздо меньше, чем волокна крупных мышц ноги; слуховые волосковые клетки в разных участках ушной улитки могут быть настроены на разную частоту звука, и т.д. Однако нет непрерывных переходов между столь разными типами клеток взрослого организма, как, например, мышечное волокно и слуховая волосковая клетка.

Традиционная гистологическая классификация основана на форме и структуре клетки, видимых под микроскопом, и на ее химической природе, очень грубо оцениваемой по связыванию различных красителей. Более тонкие методы позволяют выделить новые подклассы в рамках традиционной классификации. Так, в современной иммунологии установлено, что к прежней категории «лимфоцитов» относится более десяти разных типов клеток (см. гл. 18). Точно так же фармакологические и физиологические исследования показали, что существует много различных разновидностей гладкомышечных клеток; например, в стенке матки эти клетки обладают высокой чувствительностью к эстрогену, а на последних стадиях беременности - к окситоцину, в то время как аналогичные клетки в стенке кишечника этими свойствами не обладают. Иного рода важные различия между клетками обнаружены в эмбриологических экспериментах вроде тех, которые обсуждались в гл. 16; они показали, что во многих случаях внешне сходные клетки из разных участков организма неэквивалентны - в том смысле, что в них есть внутренние различия в возможностях дальнейшего развития и в способности воздействовать на другие клетки. Например, соединительнотканные клетки из разных участков дермы должны быть неэквивалентными, так как под их влиянием лежащие над ними эпидермальные клетки ведут себя по-разному (разд. 16.6.4). Внутри таких категорий, как «фибробласт», вероятно тоже имеется много подтипов, химические различия между которыми пока не удается выявить непосредственно.

Ввиду сказанного выше любая классификация клеток будет в какой-то степени произвольной в отношении детальности подразделения. В наш перечень включены только те виды клеток взрослого человеческого организма, которые считаются различными во всяком большом современном руководстве по гистологии. Они сгруппированы в приблизительном соответствии со своей функцией. Мы не пытались как-либо подразделять класс нейронов центральной нервной системы. Когда отдельный вид клеток, например ороговевающая эпидермальная клетка (кератиноцит), последовательно получает различные названия по мере своего созревания, мы приводим только два из них - одно для дифференцирующейся клетки и одно для стволовой клетки. С учетом сделанных оговорок 210 наименований клеток, содержащихся в перечне, составляют более или менее исчерпывающий список различных вариантов экспрессии генома в виде фенотипов нормальных клеток взрослого человека.

Ороговевающие эпителиальные клетки

Кератиноцит эпидермиса (= дифференцирующаяся эпидермальная клетка)
Базальная клетка эпидермиса (стволовая) Кератиноцит ногтей
Базальная клетка ногтевого ложа (стволовая) Клетки стержня волоса
клетка мозгового вещества
клетка коркового вещества
кутикулярная клетка Клетки корневого влагалища волоса
кутикулярная
слоя Гексли
слоя Генле
наружная Клетка волосяной матрицы (стволовая)

Клетки влажных многослойных барьерных эпителиев

Поверхностная эпителиальная клетка многослойного плоского эпителия роговицы, языка, ротовой полости, пищевода, анального отверстия, дистальной части уретры, влагалища
Базальная клетка тех же видов эпителия (стволовая)
Клетка эпителия мочевыводящих путей (выстилающего мочевой пузырь и мочевыводящие пути)

Эпителиальные клетки с экзокринной функцией

Клетки слюнной железы
слизистая клетка (секрет богат полисахаридами)
белковая клетка (секрет богат гликопротеиновыми ферментами)
Клетка железы фон Эбнера в языке (секрет служит для промывания вкусовых почек)
Клетка молочной железы, секретирующая молоко
Клетка слезной железы, секретирующая слезы
Клетка церуминозной железы уха, секретирующая ушную серу
Клетка эккринной потовой железы, секретирующая гликопротеины (темная клетка)
Клетка эккринной потовой железы, секретирующая малые молекулы (светлая клетка)
Клетка апокринной потовой железы (выделяет пахучий секрет, чувствительна к половым гормонам)
Клетка железы Молля в веке (специализированная потовая железа)
Клетка сальной железы, секретирующая богатое липидами кожное сало
Клетка боуменовой железы в носу (секретирует жидкость, промывающую обонятельный эпителий)
Клетка бруннеровой железы в двенадцатиперстной кишке, секретирующая щелочной раствор слизи и ферментов
Клетка семенного пузырька, секретирующая компоненты семенной жидкости, включая фруктозу (как источник энергии для движения спермиев)
Клетка предстательной железы, секретирующая другие компоненты семенной жидкости
Клетка бульбоуретральной железы, секретирующая слизь
Клетка бартолиниевой железы, выделяющая жидкость для увлажнения влагалища
Клетка железы Литтре, секретирующая слизь
Клетка эндометрия, секретирующая главным образом углеводы

Изолированная бокаловидная клетка дыхательного и пищеварительного трактов, секретирующая слизь Слизистая клетка выстилки желудка

Зимогенная клетка слизистой желудка (секретирует пепсиноген) Обкладочная клетка слизистой желудка (секретирует HC1) Ацинозная клетка поджелудочной железы (секретирует пищеварительные ферменты и бикарбонат)

Клетка Панета в тонком кишечнике (секретирует лизоцим) Пневмоциты типа II в легком (секретируют сурфактант) Клетка Клара в легком (функция неизвестна)

Клетки, выделяющие гормоны

Клетки передней доли гипофиза, выделяющие
гормон роста
фолликулостимулирующий гормон
лютеинизирующий гормон
пролактин
адренокортикотропный гормон
тиреотропный гормон
Клетка промежуточной доли гипофиза, выделяющая меланоцитстимулирующий гормон
Клетки задней доли гипофиза, выделяющие
окситоцин
вазопрессин
Клетки желудочно-кишечного тракта, секретирующие
серотонин
эндорфин
соматостатин
гастрин
секретин
холецистокинин
инсулин
глюкагон
бомбезин
Клетки щитовидной железы,
секретирующие
тиреоидный гормон
кальцитонин
Клетки паращитовидной железы
секретирующие паратгормон
оксифильные (функция неизвестна)
Клетки надпочечников,
секретирующие
адреналин
норадреналин
стероидные гормоны
минералокортикоиды
глюкокортикоиды
Клетки половых желез, секретирующие
тестостерон (клетки Лейдига в семенниках)
эстроген (клетки theca interim яйцевого фолликула в яичниках)
Клетки юкстагломерулярного аппарата почки
юкстагломерулярные клетки (секретируют ренин)
клетка macula densa вероятно, близки по функции;
периполярная клетка возможно, участвуют в секреции
мезангиальная клетка эритропоэтина

Эпителиальные всасывающие клетки желудочно-кишечного тракта, экзокринных желез и мочеполовых путей

Клетка со щеточной каемкой из микроворсинок (в тонком кишечнике)

Исчерченная клетка протока экзокринной железы
Эпителиальная клетка желчного пузыря
Клетка со щеточной каемкой в проксимальном почечном канальце
Клетка дистального почечного канальца

Безресничная клетка семявыносящего протока
Клетки эпидидимиса
главная клетка
базальная клетка

Клетки, ответственные за процессы метаболизма и накопление резервных материалов
Гепатоцит (печеночная клетка)
Жировые клетки
клетка белого жира
клетка бурого жира
липоцит печени

Эпителиальные клетки, выполняющие главным образом барьерную функцию, - выстилают легкие, кишечник, экзокринные железы и мочеполовой тракт
Пневмоциты типа I (выстилающие воздушную полость легкого) Клетка протока поджелудочной железы (центроацинарная клетка)
Неисчерченная клетка протока потовой железы, слюнной железы, молочной железы и др.
Париетальная клетка почечного клубочка Подоцит почечного клубочка
Клетка тонкой части петли Генле (в почках)
Клетка собирательной трубки (в почках)
Клетка протока семенного пузырька, предстательной железы и др.

Эпителиальные клетки, выстилающие замкнутые внутренние полости
Клетки эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов
фенестрированная
непрерывная
селезеночная
Синовиальные клетки (выстилают суставные полости и секретируют главным образом гиалуроновую кислоту)
Серозные клетки (выстилают полости брюшины, плевры и перикарда)
Плоские клетки, выстилающие перилимфатическое пространство уха
плоская клетка
столбчатая клетка эндолимфатического мешочка с микроворсинками без микроворсинок
«темная» клетка
клетка вестибулярной мембраны
базальная клетка сосудистой полоски
маргинальная клетка сосудистой полоски
клетка Клаудиуса
клетка Бётчера
Клетка сосудистого сплетения (секретирует цереброспинальную жидкость)
Плоская клетка мягкой и паутинной оболочек Клетки ресничного эпителия глаза
пигментированные
непигментированные
«Эндотелиальная» клетка роговицы

Ресничные клетки с проталкивающей функцией
Клетки дыхательных путей
Клетки яйцевода и эндометрия (у женщин)
Клетки rete testis и семявыносящего протока (у мужчин)
Эпендимные клетки, выстилающие полости мозга

Клетки, секретирующие внеклеточный матрикс
Эпителиальные
Амелобласт (секретирует зубную эмаль)
Клетка planum semilunatum вестибулярного аппарата (секретирует протеогликан)
Интердентальная клетка кортиевого органа (секретирует вещество текториальной мембраны, лежащей над волосковыми клетками этого органа)

Неэпителиальные (соединительнотканные)
Фибробласты (рыхлой соединительной ткани, роговицы, сухожилий, ретикулярной ткани костного мозга и др.)
Перицит кровеносного капилляра
Клетка nucleus pulposus межпозвоночного диска
Цементобласт/цементоцит (секретирует цемент корня зуба, сходный с веществом кости)
Одонтобласт/одонтоцит (секретирует дентин зуба)
Хондроциты
гиалинового хряща
волокнистого хряща
эластического хряща
Остеобласт/остеоцит
Первичная остеогенная клетка (стволовая клетка остеобластов)
Гиалоцит стекловидного тела глаза
Звездчатая клетка перилимфатического пространства уха

Сократимые клетки
Клетки скелетных мышц
красные (медленные)
белые (быстрые)
промежуточные
мышечное веретено с ядерной сумкой
мышечное веретено с ядерной цепочкой
клетка-сателлит (стволовая)
Клетки сердечной мышцы
обычные
узловые (пейсмейкерные)
волокна Пуркинье
Клетки гладкой мускулатуры (разные)
Миоэпителиальные клетки
радужной оболочки
экзокринных желез

Клетки крови и иммунной системы
Эритроцит
Мегакариоцит
Макрофаги и родственные клетки
моноцит
микрофаги соединительной ткани (разные)
клетка Лангерганса (в эпидермисе)
остеокласт (в кости)
дендритная клетка (в лимфоидных тканях)
микроглиальная клетка (в центральной нервной системе)

Нейтрофил Эозинофил Базофил Тучная клетка Т-лимфоциты
Т-хелпер
Т-супрессор
Т-киллер
В-лимфоциты,
продуцирующие
IgM
IgG
IgA
IgE
Клетка-киллер
Стволовые клетки и коммитированные предшественники для крови и иммунной системы (разные)

Сенсорные преобразователи
Фоторецепторы
палочки колбочки
чувствительные к синему
чувствительные к зеленому
чувствительные к красному
Слуховые рецепторные клетки
внутренние волосковые клетки кортиева органа
наружные волосковые клетки кортиева органа
Рецепторы ускорения и силы тяжести
волосковые клетки вестибулярного аппарата
тип I
тип II
Вкусовые рецепторные клетки
клетка вкусовой луковицы,
тип II
Обонятельные рецепторные клетки
обонятельный нейрон
базальная клетка обонятельного эпителия (стволовая для обонятельных нейронов)
Рецепторы pH крови
клетки каротидного тельца
тип I
тип II
Осязательные рецепторные клетки
клетка Меркеля в эпидермисе
первичные осязательные нейроны (разные)
Терморецепторные клетки
первичные терморецепторные нейроны
чувствительные к холоду
чувствительные к теплу
Болевые рецепторы
первичные нейроны, чувствительные к боли (разные)
Рецепторы положения и напряжений в скелетно-мышечной системе первичные проприоцептивные нейроны (разные)

Вегетативные нейроны
Холинэргические (разные)
Адренэргические (разные)
Пептидэргические (разные)

Опорные клетки органов чувств и периферических нейронов
Опорные клетки кортиева органа
внутренняя столбчатая клетка
наружная столбчатая клетка
внутренняя фаланговая клетка
наружная фаланговая клетка
пограничная клетка
клетка Генсена
Опорная клетка вестибулярного аппарата
Опорная клетка вкусовой почки (клетка вкусовой почки, тип I)
Опорная клетка обонятельного эпителия
Шванновская клетка
Клетка-сателлит (инкапсулирующая тела периферических нейронов)
Глиальная клетка кишечника

Нейроны и глиальные клетки центральной нервной системы
Нейроны (огромное разнообразие типов, пока еще плохо классифицированных)
Глиальные клетки
астроциты (разные)
олигодендроцит

Клетки хрусталика
Эпителиальная клетка передней части хрусталика
Волокно хрусталика (клетка, содержащая кристаллины)

Пигментные клетки
Меланоцит
Эпителиальная клетка пигментного слоя сетчатки

Половые клетки
Оогония/ооцит
Сперматогония (стволовая клетка для сперматоцитов)
Сперматоцит

Питающие клетки
Клетка яйцевого фолликула
Клетка Сертоли (в семеннике)
Эпителиальная клетка тимуса

Литература

Общая
Clark W.E. Le Gros. The Tissues of the Body, 6th ed. Oxford, U.K., Clarendon Press, 1971.
Cormack D. Ham's Histology, 9th ed. Philadelphia: Lippincott, 1987.
Fawcett D. W. (Bloom and Fawcett) A Textbook of Histology, 11 th ed. Philadelphia, Saunders, 1986.
Goss R.J. The Physiology of Growth. New York: Academic Press, 1978.
Weiss L., ed. Histology: Cell and Tissue Biology, 5th ed. New York, Elsevier, 1983.
Wheater P.R., Burkitt H.G., Daniels V.G., Functional Histology, 2nd, ed. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1987.

Цитированная
1. *Clark W.E. Le Gros.* The Tissues of the Body, 6th ed. Oxford, U.K., Clarendon Press, 1971.
Montagna W. The skin. Sci. Am. **212(2),** 56-66, 1965.
Wessels N. K. Tissue Interactions and Development. Menlo Park, CA, Benjamin Cummings, 1977.
2. *Cahn R. D., Cahn, M. B.* Heritability of cellular differentiation: clonal growth

expression of differentiation in retinal pigment cells in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55,** 106-114, 1966.
Coon H. G. Clonal stability and phenotypic expression of chick cartilage cells in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **55,** 66-73, 1966.
Itoh Y, Eguchi G. In vitro analysis of cellular metaplasia from pigmented epithelial cells to lens phenotypes: a unique model of studying cellular and molecular mechanisms of "transdifferentiation". Dev. Biol, **115,** 353-362, 1986.
Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **61,** 477-483, 1968.
3. *Anderson J. E.* The effect of steroid hormones on gene transcription. In: Biological Regulation and Development (R. F. Goldberger, K. Yamamoto, eds.), Vol. 3B, pp. 169-212. New York, Plenum, 1983.
Okada T. S., Kondoh H., eds. Commitment and Instability in Cell Differentiation. Curr. Top. Dev. Biol., **20,** 1986.
4. *Hosley M. A., Hughes S. E., Oakley B.* Neural induction of taste buds. J. Cотр. Neurol., **260**, 224-232, 1987.
Kinnamon S. C. Taste transduction: a diversity of mechanisms. Trends Neurosci., **11,** 491-496, 1988.
Zalewski A. A. Neuronal and tissue specifications involved in taste bud formation. Ann. N.Y. Acad. Sci., **228,** 344-349, 1974.
5. Goss R.J. The Physiology of Growth. New York, Academic Press, 1978.
6. *Clayton R. M.* Divergence and convergence in lens cell differentiation: regulation of the formation and specific content of lens fibre cells. In Stem Cells and Tissue Homeostasis (B. Lord, C. Potten, R. Cole, eds.), pp. 115-138. Cambridge University Press, 1978.
Goss R.J. The Physiology of Growth, pp. 210-225. New York, Academic Press, 1978.
Maisel H., ed. The Ocular Lens: Structure, Function, and Pathology. New York, Dekker, 1985.
Wistow G. J., Piatigorsky J. Lens crystallins: the evolution and expression of proteins for a highly specialized tissue. Annu. Rev. Biochem., **57,** 479-504, 1988.
7. *Fawcett D. W.* (Bloom and Fawcett) A Textbook of Histology, 11 th ed. Philadelphia, Saunders, 1986.
Gevers W. Protein metabolism in the heart. J. Mol. Cell. Cardiol., **16,** 3-32, 1984.
Young R. W. Visual cells. Sci. Am. **223(4),** 80-91, 1970.
8. *Aherne W.A., Camplejohn R.S., Wright N. A.* In Introduction to Cell Population Kinetics. London, Edward Arnold, 1977.
Wright N.A., Alison M.R. Biology of Epithelial Cell Populations, Vol. 1-3. Oxford, U.K., Oxford University Press, 1984.
9. *Fawcett D. W.* (Bloom and Fawcett). A Textbook of Histology, 11th ed. pp. 679-715. Philadelphia, Saunders, 1986.
Moog F. The lining of the small intestine. Sci. Am. **245(5),** 154-176, 1981.
10. *Fausto N.* New perspectives on liver regeneration. Hepatol., **6,** 326-327, 1986.
Gohda E., et al. Purification and partial characterization of hepatocyte growth factor from plasma of a patient with fulminant hepatic failure. J. Clin. Invest., **81,** 414-419, 1988.
G*oss K. J. T*he Physiology of Growth, pp. 251-266. New York, Academic Press, 1978.
Holder N. Regeneration and compensatory growth. Br. Med. Bull., **37,** 227-232, 1981.
11. *Anderson J. R.,* ed. Muir's Textbook of Pathology, 12th ed. London, Edward Arnold, 1985.
Robbins S. L., *Cotran R. S., Kumar V.* Pathologic Basis of Disease, 3rd ed. Philadelphia, Saunders, 1984.
12. *Campbell J. H., Campbell G. R.* Endothelial ceil influences on vascular smooth muscle phenotype. Annu. Rev. Physiol., **48,** 295-306, 1986.
Development of the Vascular System. Ciba Symp. 100. London, Pitman, 1983.
Fawcett D. W. (Bloom and Fawcett) A Textbook of Histology, 11th ed., pp. 367-405. Philadelphia, Saunders, 1986.
Ryan U.S., ed. Endothelial Cells, Vols. 1-3. Boca Raton, FL, CRS Press, 1988.
13. *Goss R.J.* The Physiology of Gowth. pp. 120-137. New York, Academic Press, 1978.
Hobson B., Denekamp J. Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. Br. J. Cancer, **49,** 405-413, 1984.
14. *Folkman J.* The vascularization of tumors. Sci. Am. **234(5),** 58-73, 1976.
Folkman J., Haudenschild C. Angiogenesis in vitro. Nature., **288,** 551-556, 1980.
Madri J. A., Pratt B. M. Endothelial cell-matrix interactions: in vitro models of angiogenesis. J. Histochem. Cytochem., **34**, 85-91, 1986.
15. *Folkman J., Klasbrun M.* Angiogenic factors. Science, **235,** 442-447, 1987.
Kalebic T., Garbisa S., Glaser B., Liotta L. A. Basement membrane collagen: degradation by migrating endothelial cells. Science, **221,** 281-283, 1983.

Knighton D. R., et al. Oxygen tension regulates the expression of angiogenesis factor by macrophages. Science, **221,** 1283-1285, 1983.
Leibovich S.J., et al. Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha. Nature, **329,** 630-632, 1987.
Schweigerer L., et al. Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. Nature**, 325,** 257-259, 1987.
16. *Cairnie A. B., Lala P.K., Osmond D. G.,* eds. Stem Cells of Renewing Cell Populations. New York, Academic Press, 1976.
Cheng H., Leblond C. P. Origin, differentiation, and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian theory of the origin of the four epithelial cell types. Am. J. Anat., **141,** 537-562, 1974.
17. *Graziadei P.P. C., Monti Graziadei G. A.* Continuous nerve cell renewal in the olfactory system. In Handbook of Sensory Physiology, Vol. IX, Development of Sensory Systems (M. Jacobson, ed.). pp. 55-82. New York, Springer-Verlag, 1978.
18. *Alien T.O., Potten C.S.* Fine-structural identification and organization of the epidermal proliferative unit. J. Cell. Sci, **15,** 291-319, 1974.
Bereiter-Hahn, J. Matolsy A. G. Richards K. S., eds. Biology of the Integument, Vol. 2, Vertebrates. New York, Springer, 1986. *MacKenzie I. C.* Ordered structure of the stratum corneum of mammalian skin. Nature, **222,** 881-882, 1969.
Sengel P. Morphogenesis of skin. Cambridge, U. K., Cambridge University Press, 1976.
Stenn K. S. The skin. In Histology: Cell and Tissue Biology L. Weiss, ed.), 5th ed pp. 569-606. New York, Elsevier, 1983.
19. *Fuchs E., Green H.* Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell, **19,** 1033-1042, 1980.
Green H. The keratinocyte as differentiated cell type. Harvey Lectures, **74,** 101-139, 1979.
Sawyer R. H., ed. The Molecular and Developmental Biology of Keratins. Curr. Top. Dev. Biol**., 22,** 1987.
20. *Barrandon Y, Green H.* Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. Proc. Nat). Acad. Sci. USA, **84,** 2302-2306, 1987.
Green H. Terminal differentiation of cultured human epidermal cells. Cell, **11,** 405-415, 1977.
Watt F. M. Selective migration of terminally differentiating cells from the basal layer of cultured human epidermis. J. Cell. Biol., **98,** 16-21, 1984.
21. *Barrandon Y., Green H.* Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and eidermal growth factor. Cell, **50,** 1131-1137, 1987.
Read J., Watt F. M. A model for in vitro studies of epidermal homeostasis: proliferation and involucrin synthesis by cultured human keratinocytes during recovery after stripping off the suprabasal layers. J. Invest. Dermatol., 90, 739-743, 1988.
22. *Fawcett D. W.* (Bloom and Fawcett). A Textbook of Histology, 11th ed. pp. **568-576,** 901-912. Philadelphia, Saunders, 1986. *Neville M. C.,*
Neifert M. R. Lactation: Psysiology, Nutrition, and Breast-Feeding. New York, Plenum, 1983.
Patton S. Milk. Sci Am. 221(1), 58-68, 1969.
Richards R. C., *Benson G. K.* Ultrastructural changes accompanying involution of the mammary gland in the albino rat. *J. Endocrinol.,* **51,** 127-135, 1971.
Vonderhaar B. K., Topper Y. J. A role of the cell cycle in hormone-dependent differentiation. J. Cell. Biol, **63,** 702-712, 1974.
23. *Dexter T. M., Spooncer E.* Growth and differentiation in the hemopoietic system. Annu. Rev. Cell Biol., **3,** 423-441, 1987.
Weiss L., ed. Histology: Cell and Tissue Biology, 5th ed., pp. 447-509. New York, Elsevier, 1983.
Wintrobe M.M. Blood, Pure and Eloquent. New York, McGraw-Hill, 1980.
24. *Stossel T. P.* The molecular biology of phagocytes and the molecular basis of nonneoplastic phagocytic disorders. In The Molecular Basis of Blood Diseases (G. Stamatoyannopoulos, A. W. Nienhuis, P. Leder, P. W. Majerus, eds.), pp. 499-533. Philadelphia, Saunders, 1987.
Zucker M.B. The functioning of blood platelets. Sci. Am. **242(6),** 86-103, 1980.
25. *Robbins S. L., Cotran R. S., Kumar V.* Pathological Basis of Disease, 3rd ed. Philadelphia, Saunders, 1984.
Taussig M.J. Processes in Pathology and Microbiology, 2nd ed. Oxford, U. K, Blackwell, 1984.
26. *Magli M. C., Iscove N. N., Odartchenko N.* Transient nature of haemopoietic spleen colonies. Nature, **295,** 527-529, 1982.
Till J. E., McCulloch E. A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. Radiat. **Res., 14,** 213-222, 1961.
27. *Lemischka I. R., Raulet D. H., Mulligan R. C.* Developmental potential and dynamyc

behavior of hematopoietic-stem cells. Cell**, 45,** 917-927, 1986.
Wu A. M., Till J. E., Siminoitch L., McCulloch E. A. Cytological evidence for relationship between normal hematopoietic colony-forming cells and cells of the lymphoid system. J. Exp. Med., ***127,*** 455-462, 1968.
28. *Till J.E., McCulloch E. A.* Hemopoietic stem cell differentiation. Biochem. Biophys. Acta, **605,** 431-459, 1980.
29. *Dexter T. M., Heyworth C., Whetton A. D.* The role of growth factors in haemopoiesis. Bioessays, **2,** 154-158, 1985.
Metcalf D. Clonal analysis of proliferation and differentiation of paired daughter cells: action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on granulocytemacrophage precursors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77,** 5327-5330, 1980.
Metcalf D. The Hemopoietic Colony-Stimulating Factors. Amsterdam, Elsevier, 1984.
30. *Goldwasser E.* Erythropoietin and the differentiation of red blood cells. Fed. Proc., **34**, 2285-2292, 1975.
Heath D. S., Axelrad A.A., McLeod D.L., Shreeve M.M. Separation of the erythropoietin-responsive progenitors BFU-E and CFU-E in mouse bone marrow by unit gravity sedimentation. Blood. **47,** 777-792, 1976.
Ihle J. N., et al. Biological properties of homogeneous interleukin 3. J. Immunol**., 131,** 282-287, 1983.
Suda J., et al. Purified interleukin-3 and erythropoietin support the terminal differentiation of hemopoietic progenitors in serum-free culture. Blood, **67,** 1002-1006, 1986.
31. *Metcalf D.* The Wellcome Foundation Lecture, 1986. The molecular control of normal and leukaemic granulocytes and macrophages. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), **230,** 389-423, 1987.
Roberts R., et al. Heparan sulphate-bound growth factors: a mechanism for stromal cell-mediated haemopoiesis. Nature, **332,** 376-378, 1988.
32. *Spangrude G. J., Heimfeld S., Weissman I. L.* Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science, **241**, 58-62, 1988.
Suda T., Suda J., Ogawa M. Disparate differentiation in mouse hemopoietic colonies derived from paired progenitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81,** 2520-2524, 1984.
33. *Cormack D.* Ham's Histology, 9th ed., pp. 388-420. Philadelphia, Lippincott, 1987. *Pearson M. L, Epstein H. F.,* eds. Muscle Development: Molecular and Cellular Control. Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
34. *Clegg C, H., Linkhart T. A., Olwin B. B., Hauschka S. D.* Growth factor control of sceletal muscle differentiation: commitment to terminal differentiation occurs in Gl phase and is repressed by fibroblast growth factor. J. Cell Biol., **105,** 949-956, 1987.
Davis R. L., Weintraub H., Lassar A. B. Expression of single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell,* **51,** 987-1000, 1987.
Devlin R. B., Emerson C. P., Jr. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. Cell, **13**, 599-611, 1978.
Konigsberg I. R. Diffusion-mediated control of myoblast fusion. Dev. Biol., **26,** 133-152, 1971.
Menko A. S., Boettiger D. Occupation of the extracellular matrix receptor, integrin, is a control point for myogenic differentiation, Cell, **51,** 51-57, 1987.
Pinney D.F., Pear son-White S.H., Konieczny S.F., Latham K.E., Emerson C. P. Myogenic lineage determination and differentiation: evidence for a regulatory gene pathway. Cell, **53,** 781-793, 1988.
35. *Buckingham M.,* et al. Actin and myosin multigene families: their expression during the formation and maturation of striated muscle. Am. J. Med. Genet., **25,** 623-634, 1986.
Lomo T., Westgaard R. H., Dahl H. A. Contractile properties of muscle: control by pattern of muscle activity in the rat. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), 1987, **99-103,** 1974.
Miller J. A, *Stockdale F. E.* What muscle cells know that nerves don't tell them. Trends Neurosci., **10,** 325-329, 1987.
Sanes J. R. Cell lineage and the origin of muscle fibre types. Trends Neurosci., **10,** 219-221, 1987.
36. *Bischoff R.* Proliferation of muscle satellite cells on intact myofibers in culture. Dev. Biol., **115,** 129-139, 1986.
Goldspink G. Development of muscle. In Differentiation and Growth of Cells in Vertebrate Tissues (G. Goldspink, ed.), pp. 69-99. London, Chapman and Hall,
1974. *Moss F. P., Leblond C. P.* Satellite cells as a source of nuclei in muscles of growing rats. Anat. Rec., **170,** 421-435, 1971.
37. *Gabbiani G., Rungger-Brandle E.* The fibroblast. In Tissue Repair and Regeneration (L. E. Glynn, ed.), pp. 1-50. Handbook of inflammation, Vol. 3. Amsterdam, Elsevier, 1981.

Fawcett D. W. (Bloom and Fawcett). A Textbook of Histology, 11th ed., pp. 136-187. Philadelphia, Saunders, 1986.
38. *Conrad G. W., Hart G. W., Chen Y.* Differences in vitro between fibroblast-like cells from cornea, heart, and skin of embryonic chicks. J. Cell Sci., **26,** 119-137, 1977.
Hauschka P. V., Mavrakos A. E., lafrati M. D., Doleman S. E., Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix: isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-Sepharose. J. Biol. Chem., **261,** 12665-12674, 1986.
Reddi A. H., Gay R., Gay S., Miller I. J. Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone and bone marrow formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74,** 5589-5592, 1977.
Schor S. L., Schor A. M. Clonal heterogeneity in fibroblast phenotype: implications for the control of epithelial-mesenchymal interactions. Bioessays**, 7,** 200-204,
1987. *Seyedin S. M.,* et al. Cartilage-inducing factor-A: apparent identity to transforming growth factor-beta. J. Biol. Chem., **261**, 5693-5695, 1986.
39. *Benya P. D., Schaffer J. D.* Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. Cell, **30**, 215-224, 1982.
Caplan A.I. Cartilage. Sci. Am. **251(4),** 84-94, 1984. *von der Mark K., Gauss V., von der Mark H., Muller P.* Relationship between cell shape and type of collagen synthesized as chondrocytes lose their cartilage phenotype in culture. Nature, **267**, 531-532, 1977.
Zanetti N. C., Solursh M. Induction of chondrogenesis in limb mesenchymal cultures by disruption of the actin cytoskeleton. J. Cell Biol., **99,** 115-123, 1984.
40. *Spiegelman B. M., Ginty C. A.* Fibronectin modulation of cell shape and lipogenic gene expression in 3T3 adipocytes. Cell, **35**, 657-666, 1983.
Sugihara H., Yonemitzu N., Miyabara S., Yun K. Primary cultures of unilocular fat cells: characteristics of growth in vitro and changes in differentiation properties. Differentiation, **31,** 42-49, 1986.
Zezulak K.M., Green H. The generation of insulin-like growth factor-1-sensitive cells by growth hormone action. Science, **233,** 551-553, 1986.
41. *Cormack,* Hanvs Histology, 9th ed., pp. 264-323. Philadelphia, Lippincott, 1987.
Fawcett D. W. (Bloom and Fawsett). A Textbook of Histology, 11th ed., pp. 188 238. Philadelphia, Saunders, 1986.
Jee W. S. S. The skeletal system. In Histology: Cell and Tissue Biology (L. Weiss, ed.), 5th. ed., pp. 200 255. New York, Elsevier, 1983.
42. *Hall B.K.* Cartilage, Vols. 1-3. New York, Academic Press, 1983.
43. *Marcus R.* Normal and abnormal bone remodeling in man. Ann. Rev. Med., **38,** 129-141, 1987.
Osdoby P., Krukowski M., Oursler M. J., Salino-Hugg T. The origin, development, and regulation of osteoclasts. Bioessays, **7,** 30 34, 1987.
Vaughan J. The Phisiology of Bone, 3rd ed. Oxford, U.K., Clarendon Press, 1981.
44. *Cormack D.* Ham's Histology, 9th ed. pp. 312-320. Philadelphia, Lippincott, 1987.
45. *Currey J.* The Mechanical Adaptations of Bone. Princeton, NJ, Princeton University Press, 1984.
Goss R.J. The Phisiology of Growth. New York, Academic Press, 1978.
Rogers S.L. The Aging Skeleton. Springfield, IL, Thomas, 1982.
Sinclair D. Human Growth After Birth, 4th ed. Oxford, U. K., Oxford University Press, 1985.

18. Иммунная система

Наша иммунная система спасает нас от неминуемой смерти в результате инфекционных заболеваний. Любой ребенок, родившийся с сильно нарушенной функцией иммунной системы, обречен на скорую гибель, если не будут приняты чрезвычайные меры по его изоляции от множества инфекционных агентов - бактерий, вирусов, патогенных грибов и паразитов. Не только человек, но и любое позвоночное животное с иммунологической недостаточностью (иммунодефицитом) находится под угрозой смерти.

Все позвоночные имеют иммунную систему. У беспозвоночных защитные системы более примитивны; обычно их основу составляют фагоцитирующие клетки. Такие клетки - главным образом макрофаги и нейтрофилы - играют важную роль в защите от инфекции также и у позвоночных (разд. 17.5.1), но это лишь часть гораздо более сложной и совершенной защитной системы.

Иммунология, наука об иммунной системе, выросла из простого наблюдения: люди, перенесшие некоторые инфекционные болезни, становятся к ним невосприимчивыми («иммунными»), т.е. редко заболевают ими снова. Такой иммунитет высокоспецифичен: тот, кто переболел корью, защищен от вирусов кори, но не от других распространенных вирусов, таких как возбудители эпидемического паротита (свинки) или ветряной оспы. Такого рода специфичность - фундаментальная особенность всех иммунных реакций.

Многие реакции иммунной системы приводят к разрушению и удалению внедрившихся паразитических организмов и вырабатываемых ими токсичных молекул. Поскольку такие иммунные реакции направлены на разрушение, важно, чтобы они запускались только чуждыми организму, но не его собственными молекулами. Способность отличать *чужое* от *своего* - *второе* фундаментальное свойство иммунной системы. Изредка случается, что она принимает «свое» за «чужое» и начинает разрушительные действия против собственных молекул организма. Такие *аутоиммунные заболевания* могут приводить к смертельному исходу.

Иммунная система выработалась в процессе эволюции позвоночных как средство защиты от заражения микроорганизмами и более крупными паразитами; однако большая часть сведений об иммунитете была получена при изучении реакции лабораторных животных на введение неинфекционных агентов, таких как чужеродные белки и полисахариды. Почти любая макромолекула, чуждая организму реципиента, может вызвать иммунный ответ. Вещество, способное вызвать иммунный ответ, называют **антигеном** (т.е. генератором *антител).* Самое удивительное то, что иммунная система может различать даже очень сходные антигены, например два белка, различающиеся только одной аминокислотой, или два оптических изомера.

Существуют два основных типа иммунных ответов: 1) гуморальные ответы и 2) иммунные ответы клеточного типа. **Гуморальные** ответы связаны с выработкой **антител - белков,** называемых также *иммуно-*

глобулинами. Антитела циркулируют в крови и проникают в другие жидкости *организма, где специфически связываются с* чужеродными *антигенами, вызвавшими их синтез. Связывание с антителами инакти*вирует вирусы и бактериальные токсины (такие, как столбнячный или ботулинический), блокируя их способность присоединяться к рецепторам на клетках-мишенях. Связанные антитела служат «метками» для микроорганизмов, подлежащих уничтожению, - облегчают их поглощение фагоцитами или активируют особую систему белков крови (называемую *комплементом),* которая убивает эти микроорганизмы.

Иммунный ответ **клеточного** типа - второй вид иммунных реакций - состоит в образовании специализированных клеток, реагирующих с чужеродным антигеном на поверхности других собственных клеток организма. Реагирующая клетка может убить собственную клетку, зараженную вирусом и имеющую на своей поверхности вирусные белки, тем самым уничтожая инфицированную клетку до завершения репликации вируса. В других случаях реакция клетки состоит в секреции химических сигналов, стимулирующих разрушение внедрившихся микроорганизмов макрофагами.

Главная проблема, с которой столкнулась иммунология, заключалась в том, чтобы понять, каким образом иммунная система специфически распознаёт и агрессивно реагирует на практически безграничное множество чужеродных молекул и в то же время не атакует десятки тысяч различных макромолекул, вырабатываемых клетками собственного организма. Чтобы подойти к ответу на этот вопрос, мы сначала рассмотрим клетки, ответственные за два типа иммунитета. Затем мы последовательно ознакомимся с функцией и структурой антител, системой комплемента и специфическими особенностями клеточного иммунитета.

18.1. Клеточная основа иммунитета

18.1.1. Иммунная система человека состоит из триллионов лимфоцитов [1]

За специфичность иммунитета ответственны **лимфоциты** - одна из групп лейкоцитов. Они содержатся в больших количествах в крови, в лимфе (бесцветная жидкость лимфатических сосудов, соединяющих между собой лимфатические узлы) и в специализированных **лимфоидных органах,** таких как тимус (вилочковая железа), лимфатические узлы, селезенка и аппендикс (рис. 18-1).

Общее число лимфоцитов в организме человека составляет около $2\text{-}10^{12}$; по клеточной массе иммунная система сравнима с печенью или мозгом. Хотя лимфоциты уже давно признаны одним из важных клеточных компонентов крови, их центральная роль в иммунитете была продемонстрирована лишь в конце 50-х годов. В решающих экспериментах мышей или крыс подвергали сильному облучению, приводившему к гибели большинства лейкоцитов, в том числе лимфоцитов. Облученным животным, неспособным к иммунному ответу, можно было вводить клетки различных типов, чтобы выяснить, какие из них восстанавливают иммунную реактивность. Таким свойством обладали только лимфоциты (рис. 18-2). Поскольку восстанавливались как клеточные формы иммунного ответа, так и выработка антител, полученные результаты доказывали, что лимфоциты ответственны за оба класса иммунных ответов. Когда проводились эти эксперименты, лимфоциты были одним из наименее изученных типов клеток позвоночных; сейчас они относятся к наиболее изученным.

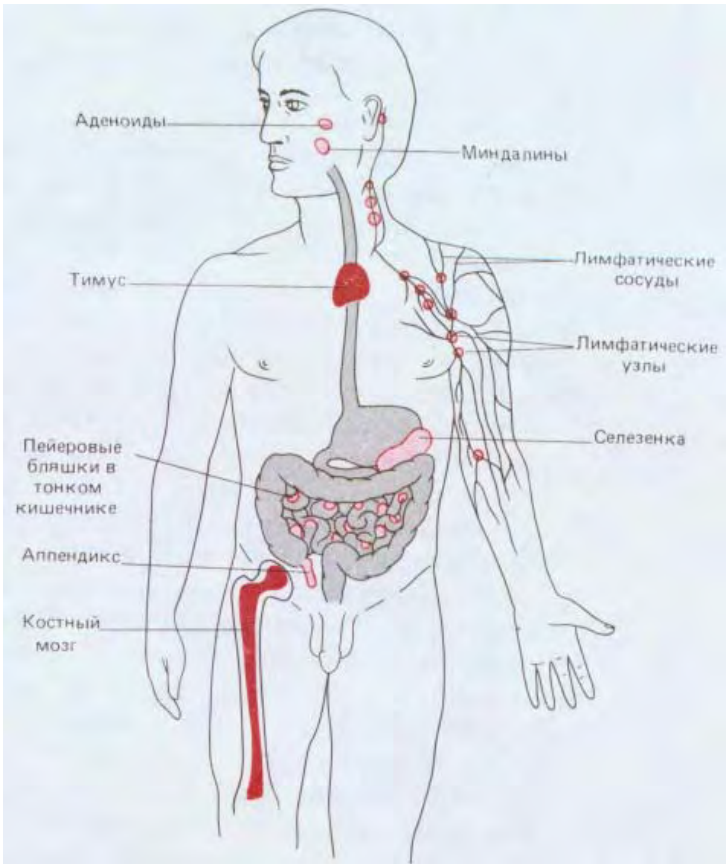


Рис. 18.1. Лимфоидные органы человека. Лимфоциты развиваются в тимусе и костном мозге (на схеме темноокрашенные участки), которые поэтому называют *первичными лимфоидными органами.* Новообразованные лимфоциты мигрируют из этих первичных органов во *вторичные лимфоидные органы* (светлоокрашенные участки), где могут реагировать с антигеном. Показаны только некоторые из вторичных лимфоидных органов.

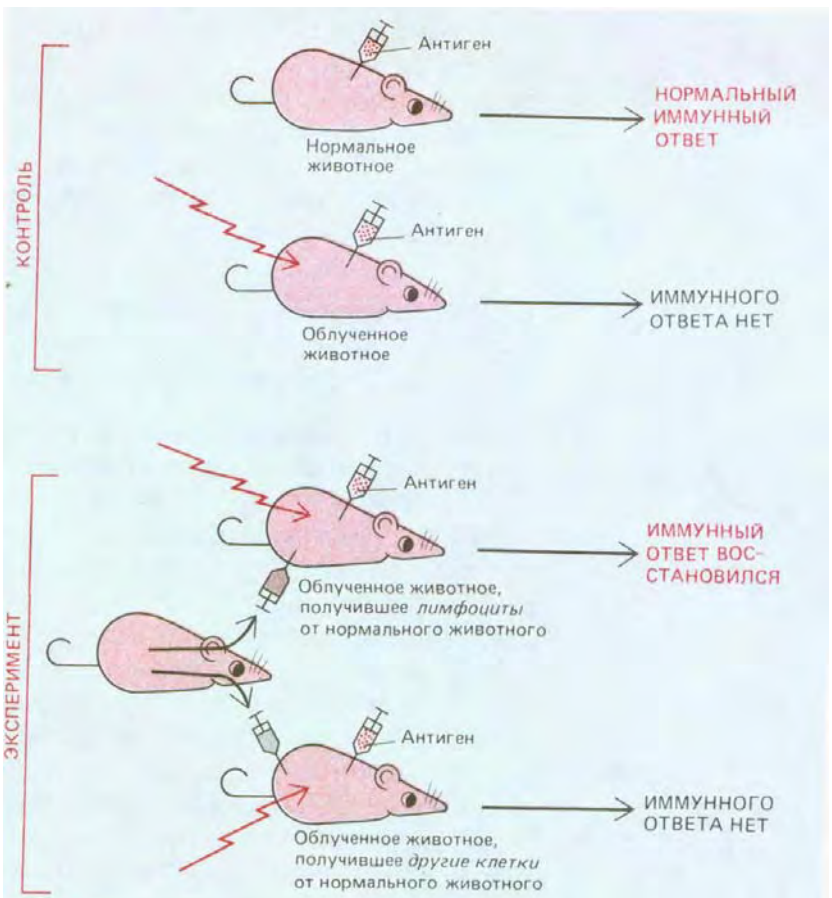


Рис. 18-2. Классический эксперимент, показывающий, что за узнавание чужеродных антигенов и реакцию на них ответственны лимфоциты. Важная особенность всех таких эсперементов с переносом клеток состоит в том, что донор и реципиент принадлежат к одной *инбредной линии* и поэтому генетически идентичны. Если лимфоциты донора ввести генетически отличающемуся от него животному, которое было подвергнуто облучению, то они будут реагировать против «чужеродных» для них антигенов реципиента и могут вызвать его гибель.

18.1.2. В-лимфоциты реализуют гуморальные иммунные ответы, а Т-лимфоциты - иммунные ответы клеточного типа [2]

В 60-х годах было установлено, что два основных класса иммунных реакций опосредуются двумя различными классами лимфоцитов: **Т-клетки,** развивающиеся в *тимусе,* ответственны за клеточный иммунитет, а **В-клетки,** которые у млекопитающих развиваются в *костном мозге* взрослой особи или в печени плода, вырабатывают антитела. Такого рода дихотомию лимфоидной системы первоначально удалось выявить у животных с экспериментально вызванными иммунодефицитами. Было показано, что удаление тимуса у новорожденного детеныша сильно ослабляет клеточные иммунные реакции, но гораздо меньше сказывается на выработке антител. У птиц можно было продемонстрировать обратный эффект, поскольку В-лимфоциты развиваются у них в *фабрициевой сумке* (свойственный только птицам лимфоидный орган, связанный с кишечником). Удаление фабрициевой сумки у цыплят нарушает выработку антител, но мало влияет на клеточный иммунитет. Изучение детей, родившихся с нарушенным иммунитетом, показало, что некоторые из них неспособны к выработке антител, но обладают нормальным клеточным иммунитетом, у других же наблюдается обратное соотношение. У детей с избирательным нарушением клеточных форм иммунитета почти всегда выявляются аномалии развития тимуса.

При исследовании животных с дефицитом Т-клеток (вследствие раннего удаления или повреждения тимуса) было обнаружено загадочное явление: у этих животных не только отсутствовали клеточные иммунные реакции, но была также несколько понижена способность к выработке антител. Как мы теперь знаем, это обусловлено тем, что некоторые из Т-клеток играют ключевую роль в регуляции иммунитета и действуют как помощники В-клеток в процессе гуморального ответа.

Действительно, большая часть Т-лимфоцитов играет в иммунитете регулирующую роль, усиливая или подавляя реакции других лейкоцитов. Эти клетки, называемые соответственно Т-хелперами и Т-супрессорами, объединяют в группу **регуляторных клеток.** Другие Т-лимфоциты, которые называют *цитотоксическими Т-клетками,* убивают клетки, инфицированные вирусами. Поскольку и цитотоксические Т-лимфоциты, и В-лимфоциты непосредственно участвуют в защите организма от инфекции, эти два типа лимфоцитов объединяют под названием **эффекторных клеток.**

18.1.3. Лимфоциты развиваются в первичных лимфоидных органах, а с чужеродными антигенами реагируют во вторичных лимфоидных органах [3]

Лимфоциты развиваются из *плюрипотентных стволовых клеток,* дающих начало всем клеткам крови, включая эритроциты, лейкоциты и тромбоциты (разд. 17.5.4). Эти стволовые клетки находятся главным образом в *кроветворных* тканях - в печени (у плода) и костном мозге (у взрослых). В-клетки у млекопитающих образуются из стволовых клеток в самих кроветворных тканях, а у птиц - в фабрициевой сумке из клеток-предшественников, которые мигрируют сюда из кроветворных тканей через кровь. Т-клетки у всех позвоночных развиваются в тимусе, куда клетки-предшественники мигрируют через кровь из кроветворных тканей. Поскольку кроветворные ткани, фабрициева сумка и тимус служат местами, где из клеток-предшественников образуются лимфоциты, их называют **первичными лимфоидными органами** (см. рис. 18-1). Хотя многие лимфоциты гибнут вскоре после своей дифференцировки в первичном лимфоидном органе (разд. 18.6.17), часть из них

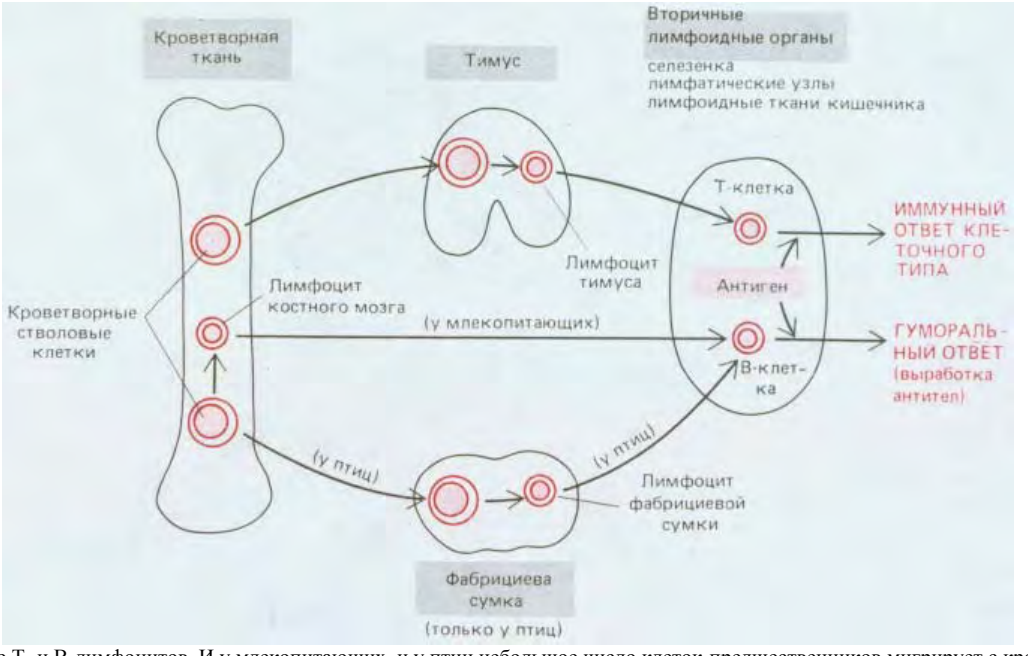


Рис. 18-3. Развитие Т- и В-лимфоцитов. И у млекопитающих, и у птиц небольшое число клеток-предшественников мигрирует с кровью в тимус, где они дифференцируются в лимфоциты тимуса. Большинство этих лимфоцитов в тимусе погибает, но некоторые мигрируют во вторичные лимфоидные органы и становятся лимфоцитами, происходящими из тимуса (Т-клетками). У птиц клетки-предшественники переходят в фабрициеву сумку, где дифференцируются в лимфоциты сумки; многие из этих лимфоцитов погибают, а некоторые мигрируют во вторичные лимфоидные органы и становятся лимфоцитами, происходящими из фабрициевой сумки (В-клетками). У млекопитающих клетки-предшественники, предназначенные для того, чтобы стать В-клетками, дифференцируются в лимфоциты в самой кроветворной ткани, а затем переходят во вторичные лимфоидные органы и становятся здесь В-клетками. Термины «Т-клетки» и «В-клетки» часто используются также для обозначения лимфоцитов тимуса и сумки (или костного мозга) соответственно. На какой стадии развития клетки-предшественники становятся детерминированными (коммитированными) к развитию в Т- или В-лимфоциты, пока не ясно. Несколько позже в этой главе мы обсудим, почему в первичных лимфоидных органах погибает так много лимфоцитов (разд. 18.4.5 и 18.6.17).

мигрирует с током крови во **вторичные лимфоидные органы** - главным образом в лимфатические узлы, селезенку и некоторые участки пищеварительного тракта (аппендикс, миндалины, аденоиды и пейеровы бляшки в тонком кишечнике (см. рис. 18-1). В основном именно во вторичных лимфоидных органах Т-клетки и В-клетки реагируют с чужеродными антигенами (рис. 18-3).

Поскольку миграция лимфоцитов из тимуса и фабрициевой сумки происходит в основном на ранних стадиях развития, удаление этих органов у *взрослого* животного сравнительно мало влияет на иммунный ответ; именно поэтому их роль в иммунитете так долго оставалась неизвестной. Напротив, костный мозг у млекопитающих в течение всей жизни продолжает генерировать большое число новых В-клеток (у мыши около $5\text{-}10^7$ в сутки).

18.1.4. Маркеры клеточной поверхности позволяют различать и разделять Т- и В-клетки [4]

Т- и В-лимфоциты становятся морфологически различимыми только после стимуляции антигеном. Нестимулированные («покоящиеся») Т- и В-клетки выглядят очень сходно даже в электронном микроскопе: это небольшие - лишь немногим крупнее эритроцита-клетки, в которых большую часть объема занимает ядро (рис. 18-4, *А*). Те и другие активируются антигеном, вызывающим их пролиферацию и дальнейшее созревание. Активированные В-лимфоциты становятся в дальнейшем продуцентами антител. Из этих клеток наиболее *зрелые-плазматические клетки с* чрезвычайно развитым гранулярным эндоплазматическим ретикулом (рис. 18-4, *Б*). В отличие от этого активированные Т-лимфоциты содержат очень мало элементов ретикулума и не секретируют антител (рис. 18-4, *В*).

Поскольку и Т-, и В-лимфоциты встречаются во всех вторичных лимфоидных органах, нужно было найти методы, которые позволяли бы различать и разделять эти два типа клеток и их различные подтипы, чтобы можно было изучать их индивидуальные свойства. К счастью, различительными маркерами могут служить многочисленные гликопротеины плазматической мембраны, характерные для разных типов лимфоцитов. Например, антитела к *гликопротеину Thy-1* (разд. 18.6.20), который у мышей имеется на Т-, но не на В-лимфоцитах, широко

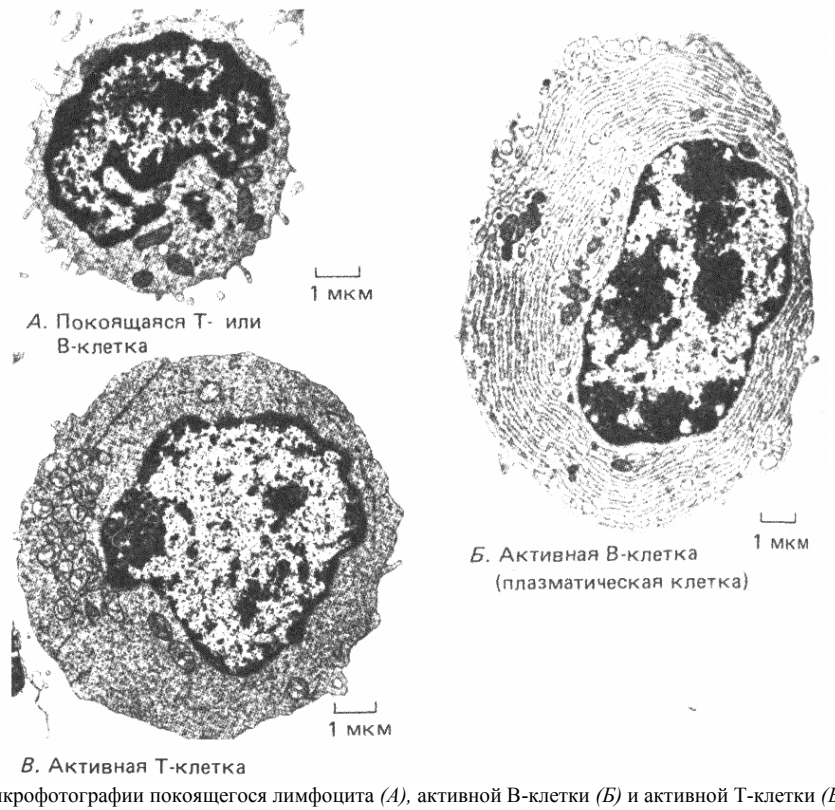


Рис. 18-4. Электронные микрофотографии покоящегося лимфоцита *(А),* активной В-клетки *(Б)* и активной Т-клетки *(В).* Покоящийся лимфоцит может быть Т- или В-клеткой, так как эти два вида лимфоцитов до их активации трудно различить по морфологическим признакам. Активная В-клетка (плазматическая клетка) заполнена гранулярным эндоплазматическим ретикулумом, полости которого набиты молекулами антител, тогда как в активной Т-клетке относительно мало гранулярного ретикулума, но зато очень много свободных рибосом. Все три клетки представлены при одинаковом увеличении. (С любезного разрешения: *А*-Dorothy Zucker-Franklin, *Б* - Carlo Grossi, В - Stefanello de Petris. *А* и *Б* - *из* D. Zucker-Franklin et al., Atlas of Blood Cells: Function and Pathology, 2nd ed. Milan, Italy: Edi. Ernies, 1988.)

используют для удаления или очистки Т-клеток из смешанной популяции лимфоцитов мыши. Антитела к *гликопротеинам CD4* и *CD8* (разд. 18.6.5) аналогичным образом широко используются для того, чтобы различать и разделять соответственно Т-клетки-хелперы и цитотоксические Т-клетки мыши и человека.

18.1.5. Работа иммунной системы основана на принципе клональной селекции [5]

Самое поразительное свойство иммунной системы - то, что она может высокоспецифичным образом реагировать на миллионы чужеродны антигенов, например вырабатывая антитела, специфически взаимодействующие с тем антигеном, который вызвал их образование. Как может иммунная система обеспечивать такое разнообразие специфических антител? Одна из гипотез, весьма популярная вплоть до 40-х годов, состояла в том, что антитела синтезируются в виде развернутых полипептидных цепей, а их конечная конформация определяется антигеном, вокруг которого они сворачиваются. В то время это казалось простейшим объяснением того факта, что животные могут вырабатывать специфические антитела к молекулам, созданным человеком и не существующим в природе. Однако от такой *инструктивной гипотезы* пришлось отказаться, когда специалисты по химии белков установили, что трехмерная структура свернутой белковой молекулы, такой к**ак** молекула антитела, определяется только ее аминокислотной последовательностью. В самом деле, денатурированная (развернутая) молекула антитела может вновь свернуться с образованием исходного антигенсвязывающего участка даже в отсутствие антигена.

В 50-х годах инструктивная гипотеза уступила место **теории** клональ-

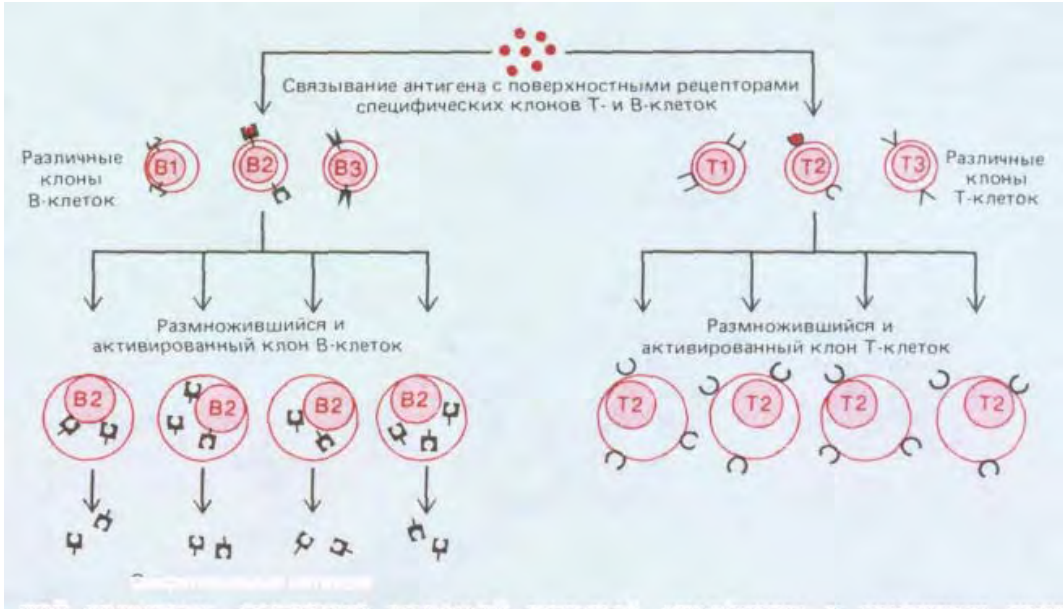


Рис. 18-5. Теория клональной селекции. Антиген активирует только те клоны Т- и В-клеток, которые уже способны на него отвечать. Предполагается, что иммунная система состоит из миллионов различных клонов лимфоцитов, из которых сотни могут быть активированы данным антигеном. В дальнейшем мы увидим, что индивидуальные клоны лимфоцитов редко отвечают на антиген автономно, как это показано на схеме и как первоначально предполагалось в теории клональной селекции. Их ответы обычно регулируются путем взаимодействий с другими клонами лимфоцитов (разд. 18.6.12). Кроме того, Т-клетки не отвечают на свободный антиген, как это показано на схеме; они отвечают только на антиген, связанный с поверхностью клетки-хозяина (разд. 18.6).

ной селекции, согласно которой каждый лимфоцит в процессе своего развития приобретает способность реагировать с определенным антигеном, еще ни разу с ним не встретившись. Это обусловлено тем, что на поверхности клетки появляются белки-рецепторы, которые специфически соответствуют какому-то антигену. Если клетка встретится с таким антигеном, то его связывание с рецепторами активирует клетку - вызовет ее размножение и созревание ее потомков. Таким образом, чужеродный антиген селективно стимулирует те клетки, у которых окажутся комплементарные ему специфические рецепторы и которые поэтому неизбежно будут реагировать именно на этот антиген - вот почему иммунные ответы антиген-специфичны (рис. 18-5).

Такую селекцию называют «клональной» потому, что иммунную систему, согласно этой теории, образуют миллионы различных клеточных «семейств», или *клонов,* каждый из которых состоит из Т- или В-лимфоцитов, происходящих от общего предка. Поскольку каждая клетка-предшественница уже детерминирована (или, как говорят, *коммитирована)* к выработке одного определенного антиген-специфического белка-рецептора, все клетки клона имеют одинаковую антигенную специфичность. Таким образом, согласно теории клональной селекции, иммунную систему по принципу ее работы можно сравнить скорее с фабрикой готовой одежды, чем с ателье, где шьют по мерке. Вопрос о том, как организм животного может вырабатывать такое множество разных антител, становится поэтому проблемой генетики, а не белковой химии.

Основные положения теории клональной селекции получили убедительные подтверждения. Например, если лимфоциты животного, которое не было иммунизировано, инкубировать в пробирке с любым из нескольких меченых антигенов, например A, B, C и D, то только очень малая доля (<0,01%) лимфоцитов будет связывать данный антиген. Это означает, что лишь немногие клетки несут специфические рецепторы для A, B, C или D. Такую интерпретацию подтверждает другой эксперимент. Антиген A делают столь высокорадиоактивным, что любая связавшая его клетка получает летальную дозу облучения; оставшаяся после этого популяция лимфоцитов уже не способна реагировать на антиген A, в то время как она продолжает нормально реагировать на B, C и D. Тот же эффект можно получить, если наполнить аффинную колонку (разд. 4.4.3) стеклянными шариками, покрытыми антигеном A, а затем пропускать через эту колонку лимфоциты. В таком опыте клетки с рецепторами для A связываются с шариками, тогда как остальные клетки проходят через колонку; клетки, прошедшие через колонку, не взаимодействуют более

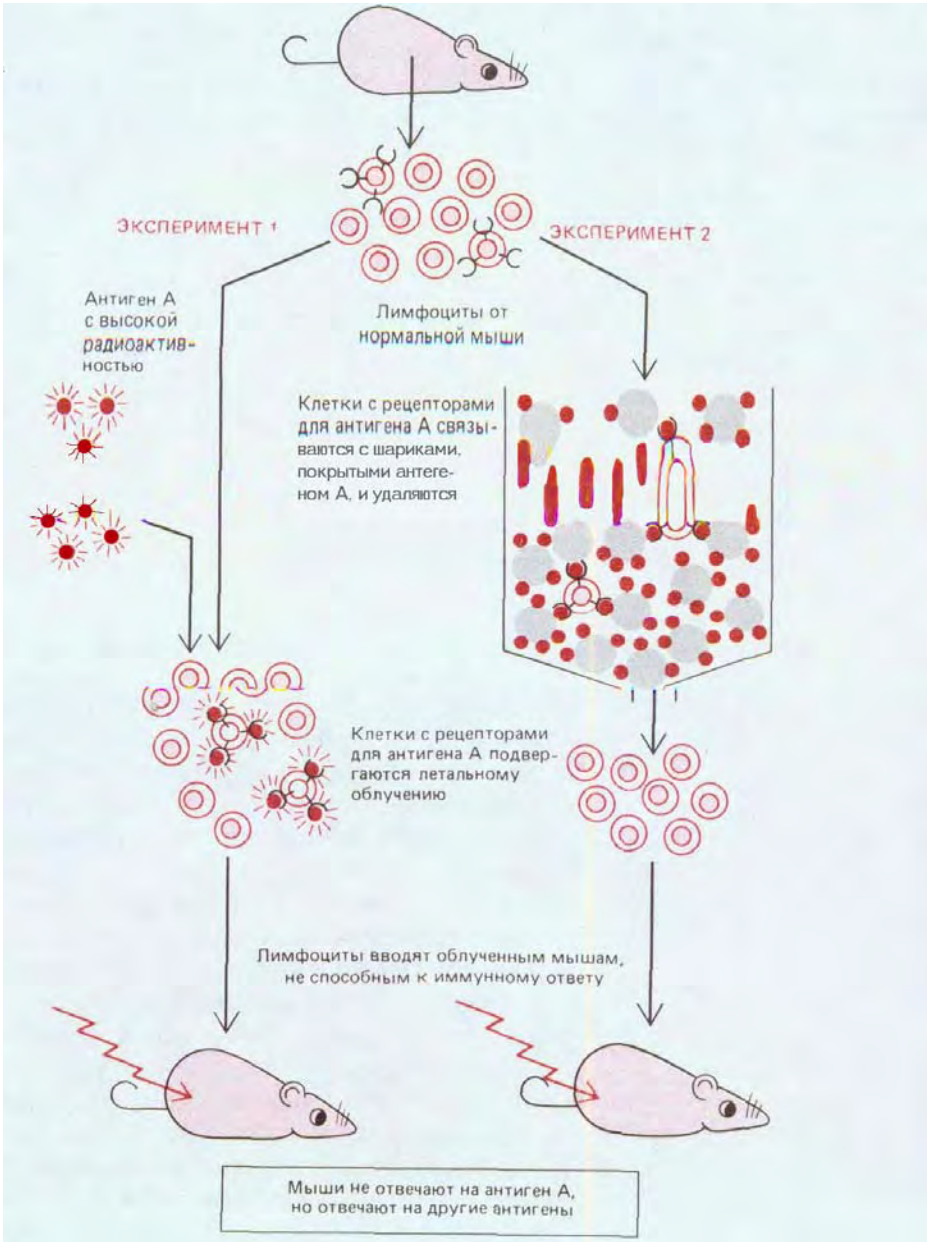


Рис. 18-6. Два типа экспериментов, подкрепляющих теорию клональной селекции. Для простоты рецепторы клеточной поверхности показаны только на лимфоцитах, способных отвечать на антиген А; на самом же деле все Т- и В-лимфоциты имеют на своей поверхности антиген-специфические рецепторы. Схематически представленные здесь эксперименты проводились главным образом с В-клетками, так как Т-клетки узнают антиген только тогда, когда он связан с поверхностью клетки-хозяина (разд. 18.6).

с А, но нормально взаимодействуют с другими антигенами (рис. 18-6). Эти два эксперимента показывают, что 1) лимфоциты коммитируются к реакции на определенный антиген еще до того, как ом подвергнутся воздействию этого антигена, и 2) коммитированные лимфоциты обладают поверхностными рецепторами, специфически связывающими данный антиген. Таким образом, подтверждаются два основных предсказания теории клональной селекции. Хотя в большинстве экспериментов такого рода изучались В-клетки и ответы, связанны с выработкой антител, другие эксперименты показали, что проявления

Т-клеточного иммунитета тоже основаны на принципе клональной селекции.

18.1.6. В большинстве случаев один антиген стимулирует много различных клонов лимфоцитов [6]

Большинство макромолекул, включая практически все белки и большую часть полисахаридов, могут служить антигенами. Те участки антигена, которые взаимодействуют с антиген-связывающим участком молекулы антитела или же рецептора на лимфоците, называются **антигенным детерминантами** (или *эпитопами).* Молекулы, которые хотя и присоеди-

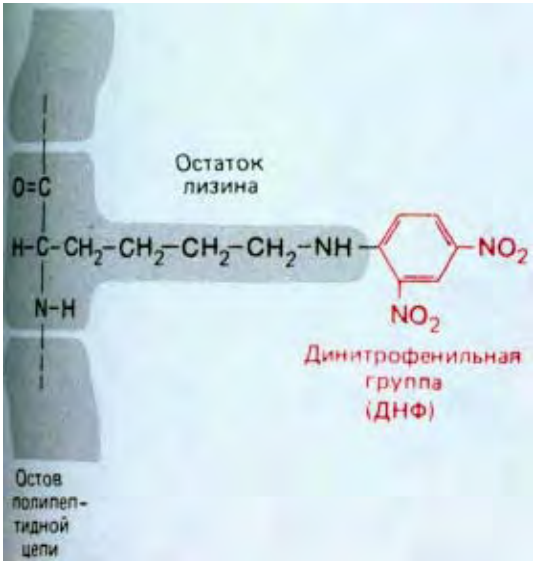


Рис. 18-7. Простой гаптен ДНФ, ковалентно связанный с боковой цепью лизина в белке. Гаптены могут индуцировать иммунный ответ, только будучи связаны с подобным макромолекулярным носителем.

няются специфически к таким антиген-связывающим участкам, но не могут индуцировать иммунный ответ, называют **гаптенами.** Гаптены - это обычно небольшие органические молекулы; они сами по себе слишком малы для того, чтобы вызвать ответ, однако становятся полноценными антигенами, будучи присоединены к подходящей мак*ромолекуле-носителю.* Гаптены служат важными инструментами для экспериментальной иммунологии. Один из наиболее часто используемых *гатенов-динитрофенильная группа* (ДНФ), которую обычно пришивают к белку, чтобы сделать ее антигенной (рис. 18-7).

Большинство антигенов имеет целый набор различных антигенных детерминант, стимулирующих выработку антител или Т-клеточные ответы. Некоторые детерминанты более *иммуногенны* (т. е. лучше индуцируют иммунитет), чем другие, и реакция на них может доминировать в общем ответе; такие детерминанты называют *иммунодоминантными.*

Как и следует ожидать от системы, работающей по принципу клональной селекции, даже одиночная антигенная детерминанта будет, как правило, активировать много клонов, каждый из которых будет иметь поверхностные рецепторы, обладающие своим особым, индивидуальным сродством к данной детерминанте. Например, даже сравнительно простая структура ДНФ-группы обеспечивает возможность многих различных взаимодействий, и когда эта группа связана с белком-носителем, она обычно стимулирует выработку сотен видов антител к ДНФ, каждый из которых вырабатывается отдельным клоном В-клеток. Такой ответ называют *поликлональным.* Когда реагирует лишь несколько клонов, ответ называют *олигоклональным,* а если весь ответ сводится к реакции лишь одного клона В- или Т-клеток, то его называют *моноклональным.* Ответы на большинство антигенов поликлональны.

Даже антиген, активирующий много клонов, воздействует лишь на ничтожную долю всей популяции лимфоцитов. Для того чтобы обеспечить встречу антигена с этими немногочисленными лимфоцитами, антигены накапливаются во вторичных лимфоидных органах, через которые непрерывно циркулируют Т- и В-лимфоциты. Антигены, проникающие в организм через пищеварительный тракт, захватываются связанными с ним лимфоидными тканями; проникающие через кожу или дыхательные пути - транспортируются с лимфой в местные лимфатические узлы; а те антигены, которые попадают в кровь, отфильтровываются в селезенке.

18.1.7. Большая часть лимфоцитов находится в непрерывной циркуляции [7]

Большинство Т- и В-лимфоцитов все время переходит из крови во вторичные лимфоидные органы и обратно. Например, в лимфатическом узле лимфоциты покидают кровяное русло, протискиваясь между специализированными эндотслиальными клетками. Пройдя через узел, они накапливаются в малых лимфатических сосудах, которые выходят из узла и соединяются с другими лимфатическими сосудами, а те проходят затем через расположенные ниже другие лимфатические узлы (рис. 18-8). Переходя во все более и более крупные сосуды, лимфоциты в конце концов попадают в главный лимфатический сосуд *(грудной проток),* по которому возвращаются в кровь. Такая постоянная циркуляция не только обеспечивает встречу соответствующих лимфоцитов с антигеном, но также позволяет нужным лимфоцитам встретиться друг с другом: как мы увидим, взаимодействия между специфическими лимфоцитами играют решающую роль в большинстве иммунных ответов. Циркуляция лимфоцитов зависит от специфических взаимодействий

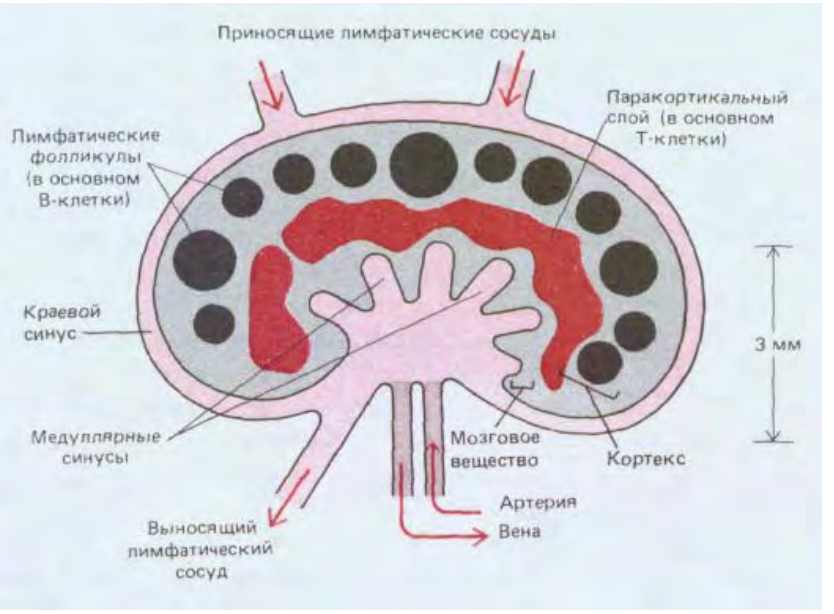


Рис. 18-8. Сильно упрощенная схема лимфатического узла человека. В-лимфоциты находятся главным образом в кортексе, где они собраны в структурах, называемых лимфатическими фолликулами. Т-лимфоциты находятся в основном в паракортикальной области. Лимфоциты обоих типов попадают в лимфатический узел из крови через небольшие специализированные вены в паракортикальной области (не показано); Т-клетки остаются в этой зоне узла, а В-клетки переходят в лимфатические фолликулы. Со временем и Т-, и В-клетки мигрируют в медуллярные синусы и покидают узел через выносящий лимфатический сосуд. Этот сосуд в конце концов вливается в кровяное русло, что позволяет лимфоцитам начать следующий цикл циркуляции через вторичный лимфоидный орган. Чужеродные антигены, попадающие в лимфатический узел, оказываются на поверхности специализированных антиген-представляющих клеток: клетки одного типа представляют антиген (в виде комплекса антиген-антитело) В-клеткам в лимфатических фолликулах, а клетки другого типа - Т-клеткам в пара-кортикальной области (разд. 18.6.10).

между поверхностью лимфоцита и поверхностью специализированных эндотелиальных клеток, выстилающих малые вены *(посткапиллярные венулы)* во вторичных лимфоидных органах: из всех клеток крови, вступающих в контакт с этими эндотелиальными клетками, только лимфоциты временно прикрепляются к ним, а затем мигрируют через посткапиллярные венулы. Моноклональные антитела (разд. 4.5.4), связываясь с поверхностью лимфоцитов и подавляя их способность присоединяться к специализированным эндотелиальным клеткам в срезах тканей, а также циркулировать in vivo, помогают определить различные *«хоминг-рецепторы»,* от которых зависят пути миграции лимфоцитов. На поверхности большинства Т- и В-клеток имеются гликопротеины двух типов: одни для циркуляции через лимфатические узлы, а другие для циркуляции через пейеровы бляшки. Некоторые лимфоциты имеют только гликопротеин второго типа и избирательно циркулируют через пейеровы бляшки; они, в сущности, составляют специфичную для кишечного тракта подсистему лимфоцитов, специализированную для ответа на антигены, проникающие в организм через кишечник. Другие хоминг-рецепторы, по-видимому, обеспечивают сегрегацию Т- и В-клеток в отдельные участки внутри лимфоидного органа (см. рис. 18-8). Когда лимфоциты активируются антигеном, они теряют хоминг-рецепторы, опосредующие циркуляцию через лимфоидные органы, и приобретают новые рецепторы, направляющие активированные клетки к местам воспаления.

18.1.8. Иммунологическая память обусловлена ростом клонов и созреванием лимфоцитов [8]

Иммунная система, так же как и нервная, обладает памятью. Именно поэтому мы можем приобретать пожизненный иммунитет ко многим вирусным заболеваниям, после того как однажды подверглись воздействию вируса. Аналогичное явление можно продемонстрировать и на экспериментальных животных. Если животному однократно впрыснуть антиген А, то после лаг-периода продолжительностью в несколько дней у него появится иммунный ответ (либо антитела, либо клеточный ответ), который будет быстро (экспоненциально) усиливаться, а затем более плавно снижаться. Таково характерное протекание **первичного** иммунного **ответа,** наблюдаемого после первого контакта животного с антигеном Если через несколько недель, месяцев или даже лет животному снова ввести антиген А, это вызовет вторичный иммунный ответ, существенно

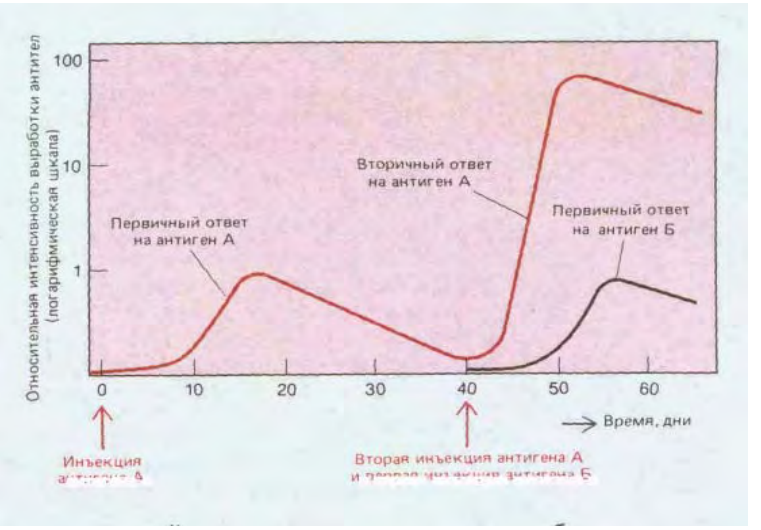


Рис. 18.9. Первичный и вторичный гуморальные ответы (образование антител), вызванные соответственно первым и вторым введением антигена А. Обратите внимание, что вторичный ответ быстрее и сильнее первичного и что он специфичен в отношении А. Это показывает, что иммунная система специфически «запомнила» ранее введенный антиген А. Такого рода иммунологическая память выявляется при изучении не только В-клеточных, но и Т-клеточных иммунных ответов

отличающийся от первичного: лаг-период будет короче, реакция сильнее и продолжительнее (рис. 18-9). Эти различия показывают, что животное «запомнило» свой первый контакт с антигеном А. Если же вместо повторной инъекции антигена А животному вводят другой антиген (например, Б), реакция в этом случае носит характер первичного, а не вторичного иммунного ответа; следовательно, вторичный ответ отражает специфическую **иммунологическую память** об антигене А.

Теория клональной селекции составляет концептуальную основу для понимания клеточного механизма иммунологической памяти. Во вторичных лимфоидных органах взрослого животного популяции Т- и В-лимфоцитов одновременно содержат клетки, находящиеся по меньшей мере на трех стадиях созревания: *виргильные клетки, клетки памяти* и *активные клетки.* Когда виргильные клетки впервые встречаются с антигеном, некоторые из них стимулируются к размножению и становятся **активными клетками,** которые мы определяем как клетки, активно участвующие в создании иммунного ответа (активные Т-клетки реализуют клеточные ответы, а В-клетки секретируют антитела). Другие виргильные клетки вместо этого стимулируются к размножению и созреванию в **клетки памяти,** которые сами не дают ответа, но легко превращаются в активные клетки при последующей встрече с тем же антигеном (рис. 18-10). Как полагают, виргильные лимфоциты живут во вторичных лимфоидных органах сравнительно недолго и, вероятно, гибнут через несколько дней, если не встречаются со своим специфическим антигеном. Клетки памяти, напротив, могут жить много месяцев или даже лет без деления, постоянно циркулируя между кровью и вторичными лимфоидными органами. Кроме того, клетки памяти проявляют большую готовность отвечать на антиген, чем виргильные клетки. Позднее мы увидим (разд. 18.4.4), что повышенная готовность

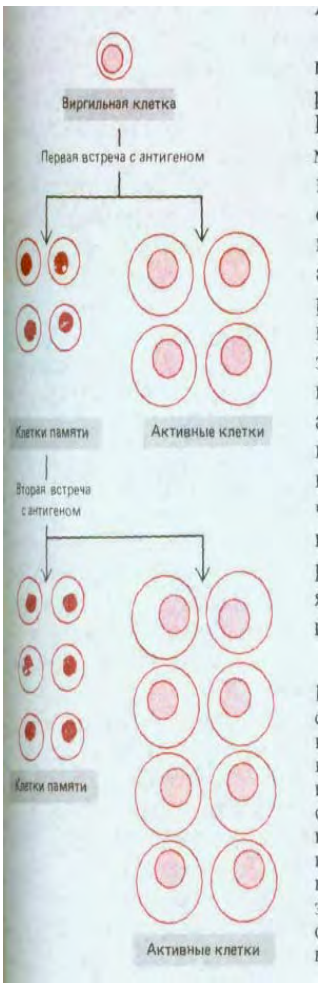


Рис. 18-10. Виргильные Т- или В-клетки, будучи стимулированы специфическим антигеном, делятся и созревают. Некоторые из них начинают затем давать иммунный ответ, другие же превращаются в клетки памяти. При последующей встрече с антигеном клетки памяти отвечают на него более «охотно», чем виргильные клетки: они пролиферируют и дают начало активным клеткам и новым клеткам памяти. Согласно этой модели, отдельная виргильная клетка может, в зависимости от условий, дать начало либо клетке памяти, либо активированной клетке. Согласно другой модели, здесь не представленной, клетки памяти и активированные клетки образуются из разных виргильных клеток. Которая из этих моделей верна, неизвестно.

В-клеток памяти отвечать на антиген объясняется, в частности, более высоким сродством рецепторов этих клеток к антигену.

В соответствии с этой схемой иммунологическая память создается при первичном ответе в результате того, что 1) пролиферация активированных антигеном виргильных клеток умножает число клеток памяти *(экспансия клона);* 2) клетки памяти имеют намного большую продолжительность жизни, чем виргильные клетки, и постоянно циркулируют между кровью и вторичными лимфоидными органами; 3) каждая клетка памяти способна более «охотно» отвечать на антиген, чем виргильная клетка. Изменения, происходящие во время первичного ответа, приводят к тому, что большая часть долгоживущих клеток в рециркулирующем пуле лимфоцитов теперь «подогнана» к антигенному окружению животного и готова к немедленному действию.

18.1.9. Отсутствие иммунного ответа на собственные антигены организма обусловлено приобретенной иммунологической толерантностью [9]

Как может иммунная система отличать «чужое» от «своего»? Одна из возможностей состоит в том, что животное наследует гены, кодирующие рецепторы для чужих, но не для собственных антигенов, и поэтому его иммунная система генетически запрограммирована таким образом, чтобы отвечать только на чужеродные антигены. Другая возможность состоит в том, что иммунная система первоначально могла быть способна отвечать и на свои, и на чужие антигены, но в раннем периоде развития могла бы «научиться» не отвечать на свои. Было показано, что верна вторая из этих гипотез. Первым свидетельством в пользу этого явилось наблюдение, сделанное в 1945 г. Как правило, при пересадке ткани от одного индивидуума другому трансплантат распознается иммунной системой как чужеродный и отторгается. Оказалось, однако, что этого не происходит при пересадках кожи между дизиготными (развившимися из двух оплодотворенных яйцеклеток, т. е. неидентичны ми) коровами-близнецами, которые во время внутриутробного развития могли обмениваться клетками крови вследствие спонтанного сращения их плацент. Эти результаты позднее были воспроизведены на курах (путем соединения кровеносных сосудов двух разных эмбрионов) и на мышах (путем введения новорожденным мышатам клеток селезенки от мышей другой линии - эти клетки выживали в течение большей части жизни мыши-реципиента). В обоих случаях, когда животные становились взрослыми, можно было пересаживать им ткань от временно присоединенной особи или от особи-донора, и трансплантат приживался (рис. 18-11), тогда как ткани, пересаженные от других, контрольных животных, отторгались. Таким образом, постоянное присутствие чужих антигенов начиная с того времени, когда иммунная система еще к созрела, приводит к долговременной ареактивности по отношению к этим антигенам. Такое состояние индуцированной антиген-специфической неспособности к иммунному ответу получило название при**обретенной иммунологической толерантности.**

Есть убедительные данные в пользу того, что неспособность иммунной системы животного реагировать на свои собственные макромолекулы *(естественная иммунологическая толерантность)* приобретаете тем же самым путем - она не врожденная. Например, нормальные мыши не дают иммунного ответа на свой собственный белок крови - компонент комплемента С5 (разд. 18.5.1). Однако мутантные мыши, у которых нет кодирующего С5 гена (в остальном генетически идентичные нормальным мышам), могут давать иммунную реакцию на этот белок Таким образом, ясно, что иммунная система потенциально способна



Рис. 18-11. Показанный здесь кожный лоскут, трансплантированный взрослой белой мыши от взрослой коричневой мыши, выжил в течение многих недель только потому, что белую мышь сделали иммунологически толерантной, введя ей сразу после рождения клетки крови от коричневой мыши. (С любезного разрешения Leslie Brent, из I. Roitt, Essential Immunology, 6th ed. Oxford, U.K.: Blackwell Scientific, 1988.)

реагировать на антигены собственного организма, но «обучается» не делать этого. По крайней мере в некоторых случаях процесс «обучения» включает элиминацию лимфоцитов, реагирующих на «свое» (разд. 18.6.17), но мы не знаем, как она происходит. Полагают, что многие из таких лимфоцитов элиминируются в первичных лимфоидных органах при встрече с антигеном. Подобный отрицательный ответ на антиген мог бы быть обусловлен специфическим окружением в этих органах или исключительной активностью новообразованных лимфоцитов. Возможно, из-за того, что новые реагирующие на «свое» лимфоциты продолжают вырабатываться из стволовых клеток в течение всей жизни, для поддержания естественной толерантности требуется постоянное присутствие «своих» антигенов. Если такой антиген, как С5, удалить, организм животного спустя недели или месяцы снова приобретает способность отвечать на него иммунной реакцией.

Толерантность к собственным антигенам иногда нарушается, что приводит к реакции Т- или В-клеток (или тех и других) на тканевые антигены собственного организма. Примером таких **аутоиммунных заболеваний** может служить миастения (myasthenia gravis). При этой болезни образуются антитела к ацетилхолиновым рецепторам на волокнах скелетных мышц (разд. 6.4.18); эти антитела препятствуют нормальному функционированию рецепторов. Такие больные страдают мышечной слабостью и могут умереть из-за недостаточной функции дыхательной мускулатуры.

18.1.10. Иммунологическую толерантность к чужеродным антигенам можно индуцировать и у взрослых животных [10]

У взрослого животного создать иммунологическую толерантность к чужеродным антигенам, как правило, гораздо труднее, чем на ранней стадии развития. Но в отношении некоторых антигенов это можно сделать экспериментально, вводя антиген 1) в очень больших дозах, 2) многократно в очень малых дозах, 3) вместе с иммунодепрессантом или 4) внутривенно после химической сшивки антигена с поверхностью В-лимфоцитов или ультрацентрифугирования антигена с целью удалить все агрегаты (это делает неэффективными нормальные механизмы презентации антигена, см. разд. 18.6.10). Таким образом, связывание антигена с комплементарными ему рецепторами на Т- или В-лимфоцитах может либо стимулировать лимфоцит к делению и созреванию, в результате чего он превращается в активную клетку или клетку памяти, либо элиминировать или инактивировать лимфоцит, что приводит

к толерантности. Молекулярные механизмы, определяющие исход дела, изучены недостаточно. Вызовет ли антиген активацию или индуцирует толерантность, зависит главным образом 1) от степени зрелости лимфоцита, 2) от природы и концентрации антигена и 3) от сложных взаимодействий между лимфоцитами разных классов и между лимфоцитами и специализированными *антиген-представляющими клетками,* которые будут описаны позже.

Заключение

Иммунная система вырабатывалась в процессе эволюции позвоночных для защиты от инфекций. Она состоит из миллионов клонов лимфоцитов. Лимфоциты каждого клона несут на своей поверхности рецептор, позволяющий им связывать ту или иную «антигенную детерминанту»-определенную группировку атомов в молекуле антигена. Существуют два класса лимфоцитов: В-клетки, вырабатывающие антитела, и Т-клетки, которые осуществляют иммунные реакции клеточного типа.

Уже на ранних стадиях своего развития многие лимфоциты, реагирующие с антигенными детерминантами макромолекул собственного организма, элиминируются или инактивируются; в результате иммунная система в норме реагирует только на чужеродные антигены. Связывание чужеродного антигена с лимфоцитом вызывает иммунный ответ, направленный против этого антигена. При этом некоторые из лимфоцитов размножаются и созревают, превращаясь в долгоживущие клетки памяти, так что при вторичной встрече организма с тем же антигеном иммунный ответ развивается быстрее и оказывается более сильным.

18.2. Функциональные свойства антител [11]

Позвоночные животные быстро погибают от инфекции, если они неспособны вырабатывать антитела. Антитела защищают нас от инфекций, инактивируя вирусы или бактериальные токсины и мобилизуя систему комплемента и различные типы лейкоцитов, которые убивают внедрившиеся микроорганизмы и более крупных паразитов. Синтезируемые исключительно В-лимфоцитами, антитела вырабатываются в миллионах разновидностей, каждая со своей аминокислотной последовательностью и своим участком для связывания антигена. В совокупности называемые **иммуноглобулинами** (сокращенно Ig), они составляют один из главных белковых компонентов крови - по весу примерно 20% суммарного белка плазмы. В этом разделе мы рассмотрим пять классов антител, имеющихся у высших позвоночных, каждый из которых осуществляет после связывания антигена характерный биологический ответ.

18.2.1. Антиген-специфические рецепторы на В-клетках - это молекулы антител [12]

Как и предсказывает теория клональной селекции, все молекулы антител, производимые какой-то одной В-клеткой, имеют одинаковый антиген-связывающий участок. Первые антитела, синтезированные вновь образовавшейся клеткой, не секретируются; вместо этого они встраиваются в плазматическую мембрану, где служат рецепторами для антигена. Каждая В-клетка имеет на своей плазматической мембране приблизительно 10^5 таких молекул.

Когда антиген присоединяется к молекулам антител на поверхности виргильной В-клетки или В-клетки памяти, это обычно инициирует сложную цепь событий, приводящую к клеточной пролиферации и со-



Рис. 18-12. Упрощенная схема молекулы антитела.

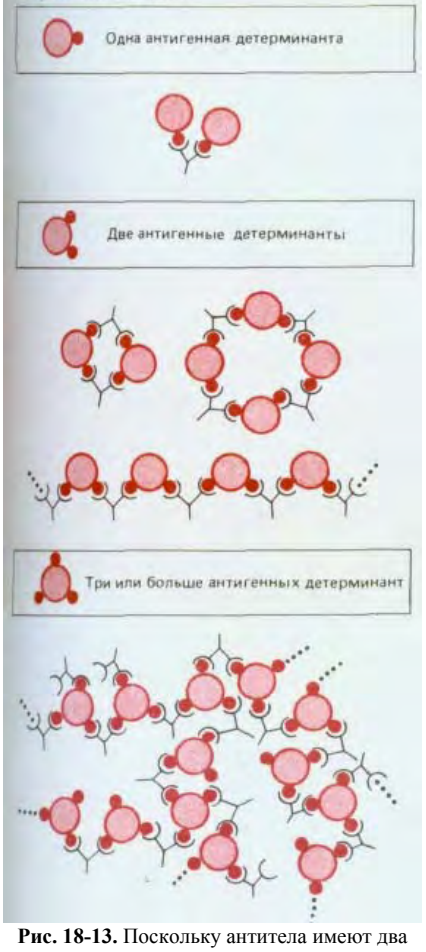


Рис. 18-13. Поскольку антитела имеют два идентичных антиген-связывающих участка, они могут сшивать антигены. Типы образующихся комплексов антиген-антитело зависят от числа антигенных детерминант у антигена. Здесь показано связывание антитела одного вида (моноклонального антитела) с антигенами, имеющими одну, две или три одинаковые антигенные детерминанты. Антигены с двумя детерминантами могут образовывать с антителами небольшие циклические комплексы или линейные цепи, а антигены с тремя или большим числом детерминант могут формировать обширные трехмерные сети, легко выпадающие в осадок.

зреванию клеток памяти или активных (секретирующих антитела) клеток. Активные клетки вырабатывают большие количества растворимых (не связанных с мембраной) антител с тем же антиген-связывающим участком, что и у антител на клеточной поверхности, и выделяют эти антитела в кровь. Активные В-клетки могут начать секретировать антитела, будучи еще малыми лимфоцитами, но конечная стадия этого пути дифференцировки - большая плазматическая клетка (см. рис. 18-4, *B),* которая выделяет антитела со скоростью около 2000 молекул в секунду. По-видимому, плазматические клетки используют для производства антител столь значительную часть мощности своего белок-синтезирующего аппарата, что не способны к дальнейшему росту и делению и через несколько дней погибают.

18.2.2. Можно стимулировать выработку антител В-клетками в культуральной чашке [13]

В 60-х годах были достигнуты успехи, открывшие новые пути изучения В-клеток. Первым из них была разработка **метода локального гемолиза,**

который позволил идентифицировать и подсчитывать индивидуальные активные В-клетки, вырабатывающие антитела к определенному антигену. В простейшем варианте этого метода берут лимфоциты (обычно из селезенки) у животного, иммунизированного бараньими эритроцитами (БЭ). Их помещают затем в агар вместе с избытком БЭ. В результате на чашке получается «газон» из иммобилизованных БЭ с вкраплением лимфоцитов. В этих условиях клетки не могут передвигаться, но любые выделяемые В-клеткой антитела будут диффундировать и покрывать поверхность всех БЭ, находящихся поблизости. Такие покрытые антителами эритроциты можно лизировать, добавив комплемент (разд. 18.5). Таким образом, присутствие каждой выделяющей антитела клетки обнаруживается по прозрачному пятну («бляшке») в темном слое БЭ. Аналогичный метод можно использовать для подсчета клеток, вырабатывающих антитела к другим антигенам, таким как белки или полисахариды, если присоединить эти антигены к поверхности бараньих эритроцитов.

Вторым важным успехом было установление того факта, что можно заставить В-клетки вырабатывать антитела, приводя их в контакт с антигеном в культуре, где можно контролировать взаимодействия клеток и условия среды. В результате удалось выяснить, что для стимуляции секреции антител В-лимфоцитами под действием большинства антигенов необходимы еще Т-лимфоциты и специализированные *антиген-представляющие клетки;* происходящие при этом межклеточные взаимодействия будут описаны позже (разд. 18.6.12).

18.2.3. Антитела имеют два идентичных антиген-связывающих участка [11]

Простейшие молекулы антител имеют форму буквы Y с двумя идентичными **антиген-связывающими** участками - по одному на конце каждой из двух «ветвей» (рис. 18-12). Поскольку таких участков два, эти антитела называют *бивалентными.* Такие антитела могут сшивать молекулы антигена в обширную сеть, если каждая молекула антигена имеет три или большее число антигенных детерминант (рис. 18-13). Достигнув определенных размеров, такая сеть выпадает из раствора. Тенденция больших иммунных комплексов к осаждению (преципитации) удобна для выявления антител и антигенов. Эффективность реакций связывания и сшивания антигена значительно возрастает благодаря гибкому *шар-*



Рис. 18-14. Шарнирный участок молекулы антитела повышает эффективность связывания молекул антигена и сшивания их друг с другом

нирному участку антитела: он позволяет изменять расстояние между двумя антиген-связывающими участками (рис. 18-14).

Защитное действие антител объясняется не просто их способностью связывать антиген. Они выполняют и целый ряд других функций, в которых участвует «хвост» Y-образной молекулы. Эта область молекулы определяет, что произойдет с антигеном, когда он будет связан. Благодаря особенностям биосинтеза иммуноглобулинов антитела с одинаковыми антиген-связывающими участками могут иметь весьма разные «хвостовые» области (разд. 18.4.7), каждая из которых придает антителам особые функциональные свойства, например способность активировать комплемент (разд. 18.5.1) или присоединяться к фагоцитирующим клеткам (разд. 18.2.5).

18.2.4. Молекула антитела состоит из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей [14]

Основную структурную единицу в молекуле антитела образуют четыре полипептидные цепи - две идентичные **легкие** (L-цепи, каждая примерно из 220 аминокислот) и две идентичные **тяжелые** (H-цепи, каждая примерно из 440 аминокислот). Все четыре цепи соединены между собой нековалентными и ковалентными (дисульфидными) связями. Молекула состоит из двух одинаковых половинок, имеющих идентичные антиген-связывающие участки; связывающая антиген поверхность обычно образуется при участии одной L- и одной H-цепи (рис. 18-15).

Протеолитические ферменты папаин и пепсин расщепляют молекулы антител на различные характерные фрагменты. *Папаин* дает два отдельных идентичных **Fab-фрагмента** (Fab - сокращение слов fragment antigen binding), каждый из которых обладает одним антиген-связывающим участком, и один Fc-фрагмент (Fc означает «кристаллизующийся фрагмент», от crystallizable). *Пепсин* дает один крупный $F(ab')_2$-фрагмент, состоящий из двух ковалентно связанных F(ab')-фрагментов (каждый из которых немного больше, чем Fab-фрагмент), и много мелких фрагментов (рис. 18-16). Поскольку $F(ab')_2$-фрагменты бивалентны, они в отличие от моновалентных Fab-фрагментов сохраняют способность сшивать антигены и образовывать преципитаты. Ни один из этих

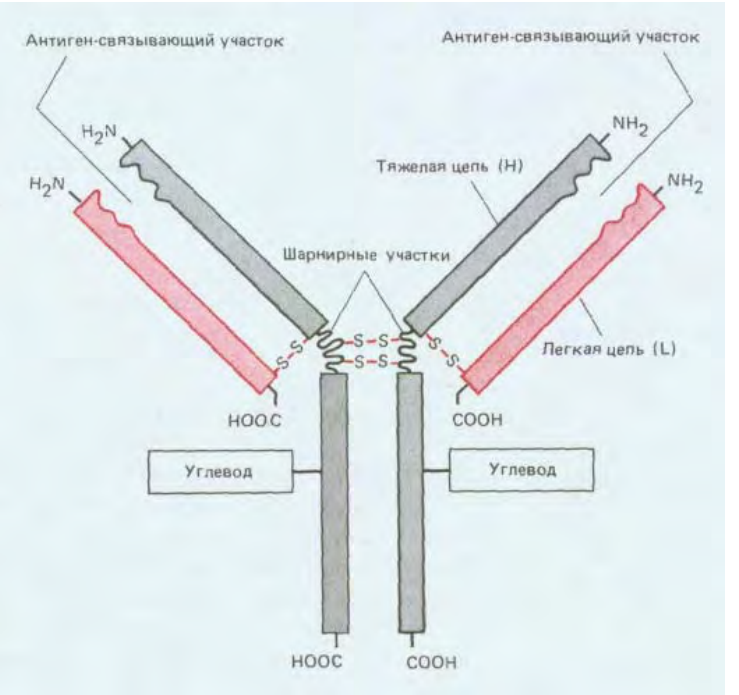


Рис. 18-15. Типичная молекула антитела состоит из двух идентичных тяжелых (H) и двух идентичных легких (L) цепей. Обратите внимание, что антиген-связывающие участки формируются за счет комплекса N-концевых областей L-и H-цепей, а «хвостовую» и шарнирную области образуют только H-цепи. Каждая H-цепь содержит одну или несколько олигосахаридных (углеводных) цепочек, функция которых не известна.

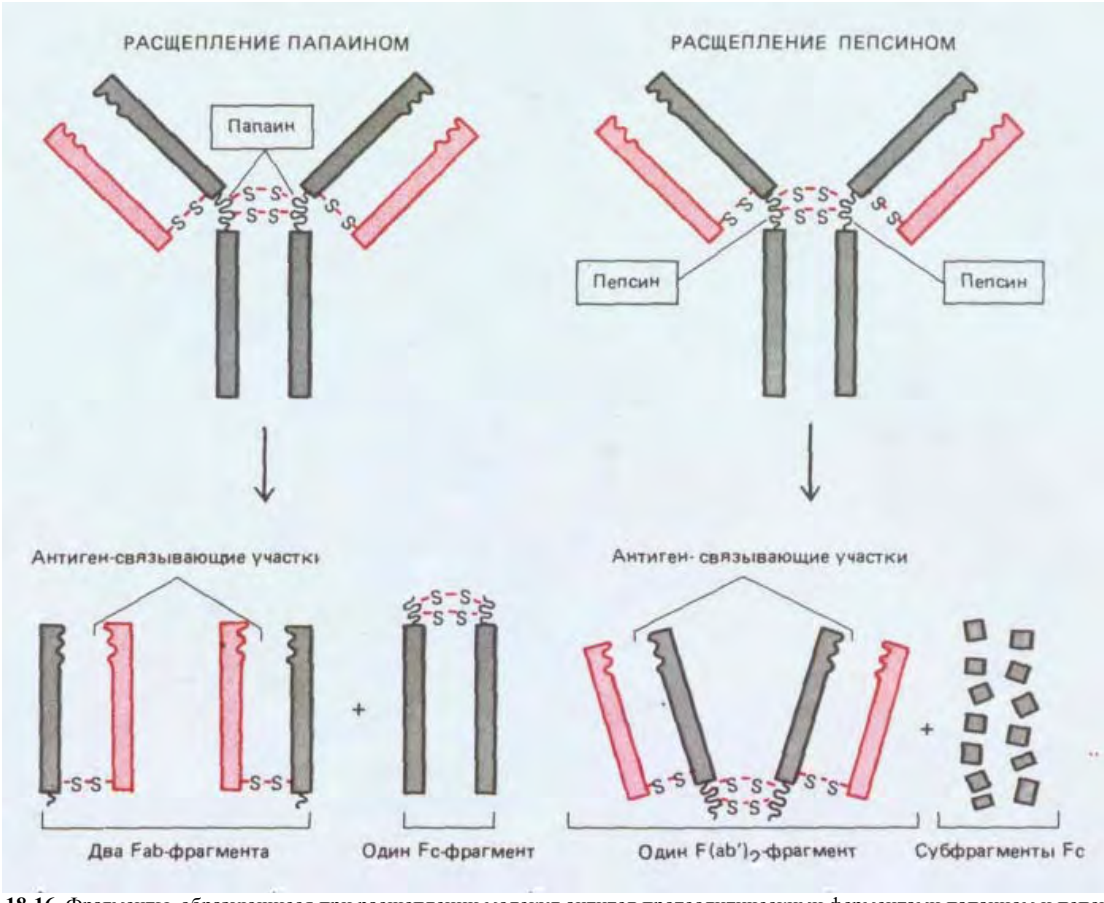


Рис. 18-16. Фрагменты, образующиеся при расщеплении молекул антител протеолитическими ферментами папаином и пепсином.

фрагментов не обладает другими биологическими свойствами нативных молекул антител, так как не содержит «хвостовой» (Fc) области, ответственной за эти свойства.

18.2.5. Существуют пять классов H-цепей, каждый со своими особыми биологическими свойствами [11, 15]

У высших позвоночных существуют пять *классов* антител - IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, каждый со своим классом H-цепей α, δ, ε, γ и μ, соответственно. Молекулы IgA содержат α -цепи, молекулы IgG- γ-цепи и т.д. (табл. 18-1). Кроме того, имеется ряд подклассов иммуноглобулинов IgG и IgA; например, у человека существует четыре подкласса IgG (IgGl, IgG2, IgG3 и IgG4), содержащих тяжелые цепи γ_1, γ_2, γ_3 и γ_4 соответственно. Разные H-цепи придают шарнирным участкам и «хвостовым» областям антител различную конформацию и определяют характерные свойства каждого класса и подкласса (см. табл. 18-1).

IgM-это всегда первые антитела, продуцируемые развивающимися В-клетками, хотя многие В-клетки со временем переключаются на выработку антител других классов (разд. 18.4.7). Непосредственный предшественник В-клетки, так называемая **пре-В-клетка,** вначале вырабатывает только μ -цепи и накапливает их. Позднее в клетке начинают синтезироваться и легкие цепи; они соединяются с μ -цепями, образуя с ними четырехцепочечные молекулы IgM (каждая с двумя μ -цепями и двумя легкими цепями), которые встраиваются в плазматическую мембрану. Таким образом, клетка приобретает поверхностные рецепторы, с помощью которых она может связать антиген, и с этого момента ее называют *виргильным В-лимфоцитом.* Многие из виргильных В-клеток вскоре начинают вырабатывать также и поверхностные молекулы IgD, имеющие тот же антиген-связывающий участок, что и молекулы IgM.

IgM - не только первый класс антител, появляющихся на поверхности развивающихся В-клеток; это также основной класс антител, выделяв-

Таблица 18-1. Свойства основных классов антител, образующихся у человека

Свойства	Класс антител				
	IgM	**IgD**	**IgG**	**IgA**	**IgE**
Типы тяжелых цепей	μ	δ	γ	α	ε
Типы легких цепей	κ или λ	κ или λ	κ или λ	κ или λ	κ *или* λ
Число четырехцепочечных единиц	5	1	1	1 или 2	1
Доля от общего количества Ig в крови, %	10	< 1	75	15	< 1
Способность активировать комплемент	++++	—	++	—	—
Прохождение через плаценту	—	—	+	—	—
Связывание с макрофагами и нейтрофилами	—	—	+	—	—
Связывание с тучными клетками и базофилами	—	—	—	—	+

мых в кровь на ранних стадиях *первичного* иммунного ответа. В секретируемой форме IgM состоит из пяти четырехцепочечных единиц, так что в общей сложности IgM имеет 10 антиген-связывающих участков Каждый пентамер содержит полипептидную цепь еще одного типа, называемую *J-цепью* (joining chain). J-цепь синтезируется клетками. выделяющими IgM, и ковалентно встраивается между двумя смежными Fc-областями, где она замыкает кольцевую структуру олигомера и препятствует дальнейшей полимеризации (рис. 18-17).

Присоединение антигена к Fab-областям секретируемой пентамерной молекулы IgM индуцирует связывание Fc-областей с первым компонентом *системы комплемента* и его активацию. Если при этом антиген расположен на поверхности внедряющегося микроорганизма, то в результате активации система комплемента осуществляет биохимическую

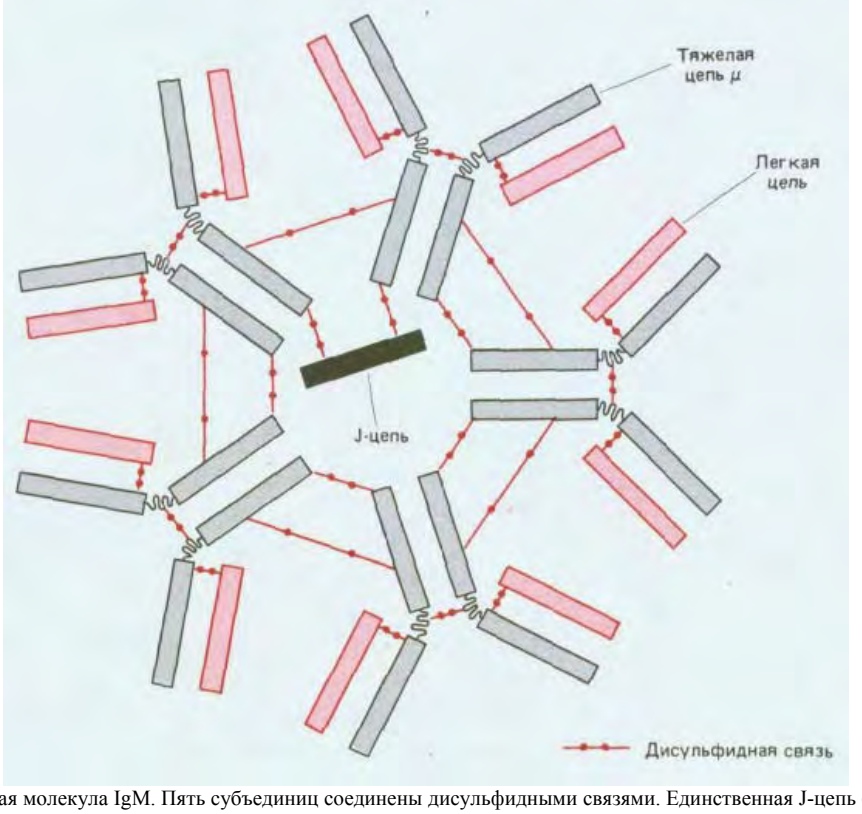


Рис. 18-17. Пентамерная молекула IgM. Пять субъединиц соединены дисульфидными связями. Единственная J-цепь (мол. масса ~ 15 000), связанная дисульфидными мостиками с двумя тяжелыми μ-цепями, замыкает кольцевую структуру и предотвращает дальнейшую полимеризацию. J-цепь гомологична одиночному домену Ig (разд. 18.3.3).

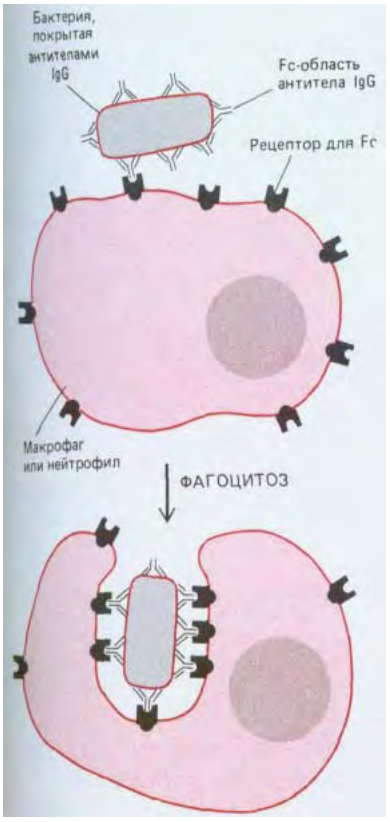


Рис. 18-18. Бактерия, покрытая антителами IgG, эффективно фрагоцитируется макрофагом или нейтрофилом с поверхностными рецепторами, способными связывать Fc-область молекулы IgG. Связывание покрытой антителами бактерии с этими Fc-рецепторами активирует процесс фагоцитоза (разд. 6.5.14).

атаку, приводящую к гибели микроорганизма (разд. 18.5). Молекулы IgD в отличие от IgM редко секретируются активными В-клетками, и у них не известно никаких функций, кроме роли рецепторов для антигена.

Основной класс иммуноглобулинов, находящихся в крови, составляют IgG, производимые в больших количествах при вторичном иммунном ответе. Помимо активации системы комплемента Fc-область молекул IgG связывается со специфическими рецепторами макрофагов и нейтрофилов. В большой мере благодаря таким Fc-рецепторам эти фагоцитирующие клетки могут связывать, поглощать и разрушать внедрившиеся микроорганизмы, покрытые IgG-антителами, которые были выработаны в ответ на инфекцию (рис. 18-18). Различные типы лейкоцитов, несущие Fc-рецепторы, могут убивать также и покрытые IgG чужеродные эукариотические клетки, не фагоцитируя их. Этот процесс, называемый *антителозависимой клеточной цитотоксичностью,* могут осуществлять макрофаги, нейтрофилы и эозинофилы (см. ниже), а также клетки-киллеры *(К-клетки)*. Киллеры - это лимфоцитоподобные клетки, специализированные, по-видимому, для убивания аномальных клеток собственного организма (разд. 18.6.4).

Молекулы IgG-единственные антитела, которые могут переходить от матери к плоду через плаценту. Клетки плаценты, соприкасающиеся с материнской кровью, имеют Fc-рецепторы, связывающие молекулы IgG, что обеспечивает их переход в кровеносную систему плода. Антитела сначала поглощаются путем эндоцитоза при участии рецепторов, а затем транспортируются в пузырьках через клетку и выводятся путем экзоцитоза в кровь плода (процесс, называемый *трансцитозом,* см. разд. 6.5.11). Антитела других классов не связываются с этими рецепторами и поэтому не могут проходить через плаценту.

IgA-основной класс антител в секретах (молоке, слюне, слезах, секретах дыхательных путей и кишечного тракта). Он представлен главным образом четырехцепочечными мономерами (подобно IgG) или же димерами, содержащими одну J-цепь и одну цепь, называемую *секреторным компонентом* (рис. 18-19). В составе секретов IgA представляет собой димер. Он транспортируется из внеклеточной жидкости в секретируемую жидкость таким же способом, как молекулы IgG-из материнской крови в кровь плода, т. е. путем трансцитоза. В данном случае в транспорте участвуют Fc-рецепторы особого типа, которые имеются на базальной поверхности эпителиальных клеток, выстилающих кишечник, бронхи или протоки молочных, слюнных или слезных желез. Здесь Fc-рецепторы связывают димеры IgA из внеклеточной жидкости (рис. 18-20).

Fc-область молекул **IgE** связывается с Fc-рецепторами еще одного типа, обладающими необычно высоким сродством к ней ($K_a \sim 10^{10}$ л/моль). Эти рецепторы имеются на поверхности *тучных клеток* в тка-

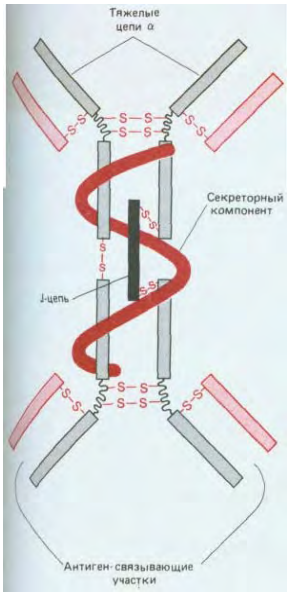


Рис. 18-19. Строение димерной молекулы антител IgA, содержащихся в секретах (сильно упрощенная схема). В дополнение к двум мономерам IgA, которые связаны одним дисульфидным мостиком между тяжелыми α -цепями, комплекс содержит также J-цепь и добавочную полипептидную цепь с мол. массой 70000 дальтон, называемую секреторным компонентом. Как полагают, эта цепь защищает молекулы IgA от переваривания протеолитическими ферментами секретов.

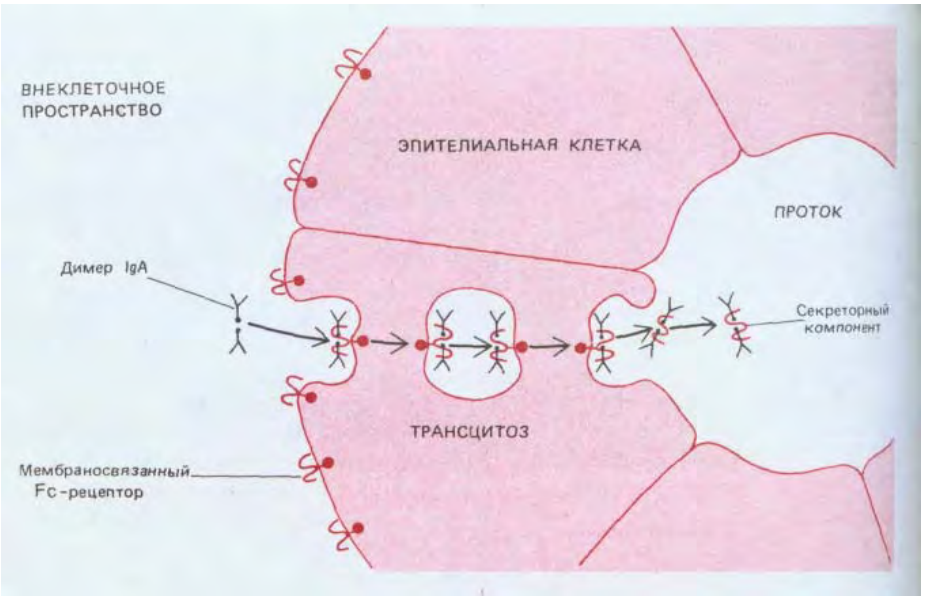


Рис. 18-20. Механизм переноса димерной молекулы IgA через эпителиальную клетку. IgA связывается на базальной поверхности эпителиальной клетки со специализированным трансмембранным белком - Fc-рецептором. Комплексы рецептор-IgA поглощаются путем эндоцитоза при участии этого рецептора, переносятся в пузырьках через цитоплазму эпителиальной клетки и секретируются в проток железы на противоположной стороне клетки путем экзоцитоза. Здесь часть Fc-рецептора, связанная с димером IgA (секреторный компонент), отщепляется от трансмембранного «хвоста», высвобождая таким образом антитело в виде комплекса в проток.
Во внеклеточную жидкость секреторных органов попадают димеры IgA из двух источников: одни вырабатываются в этих же органах плазматическими клетками, секретирующими IgA, а другие образуются в селезенке и лимфатических узлах, откуда переходят в кровяное русло и затем просачиваются из капилляров в разных тканях.

нях и *базофилов* в крови (разд. 17.5.1), а связанные ими молекулы IgE в свою очередь служат рецепторами для антигена. Присоединение антигена приводит к выделению клетками биологически активных аминов (в особенности гистамина, а у некоторых видов - серотонина) (рис. 18-21). Эти амины вызывают расширение кровеносных сосудов и увеличивают проницаемость их стенок; они в большой мере ответственны за клинические проявления таких *аллергических* реакций, как сенная лихорадка, астма и крапивница. Как полагают, при обычных обстоятельствах эти изменения кровеносных сосудов делают область воспаления более доступной для лейкоцитов, антител и компонентов комплемента. Тучные клетки секретируют также факторы, привлекающие и активирующие особый класс лейкоцитов - *эозинофилы* (разд. 17.5.1), которые могут убивать различного рода паразитов, особенно если те покрыты IgG-антителами.

18.2.6. Антитела могут иметь или κ-, или λ-цепи, но не те и другие

В дополнение к пяти классам H-цепей у высших позвоночных в антителах имеются два типа L-цепей - κ и λ, каждый из которых может сочетаться с любой H-цепью. Отдельная молекула антитела всегда состоит из двух идентичных L-цепей и двух идентичных H-цепей; поэтому ее два антиген-связывающих участка всегда совершенно одинаковы. Такая симметрия имеет решающее значение для сшивающей функции секретируемых антител. Поэтому молекула Ig может иметь

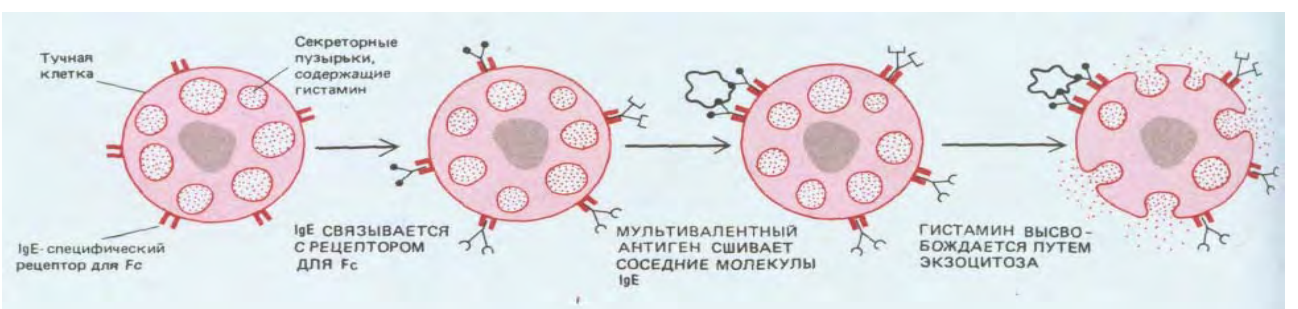


Рис. 18-21. Тучные клетки (и базофилы) пассивно приобретают поверхностные рецепторы, связывающие антиген. Антитела IgE, выделяемые активными B-лимфоцитами, попадают в ткани и связываются Fc-рецепторами на поверхности тучных клеток, специфически узнающими Fc-область этих антител. Поэтому отдельные тучные клетки (и базофилы) в отличие от B-клеток имеют на своей поверхности антитела с целым рядом различных антиген-связывающих участков. Когда молекула антигена присоединяется к этим мембраносвязанным антителам IgE и тем самым сшивает соседние молекулы IgE, она активирует тучную клетку и та высвобождает гистамин путем экзоцитоза.

L-цепи κ и λ, но не ту и другую одновременно. Каких-либо различий в биологической функции этих двух типов L-цепей пока не установлено.

18.2.7. Сила взаимодействия антигена с антителом зависит как от сродства, так и от числа связывающих участков [16]

Связывание антигена с антителом, так же как и субстрата с ферментом, обратимо. Оно определяется суммой многих относительно слабых нековалентных взаимодействий, включая гидрофобные и водородные связи, вандерваальсовы силы и ионные взаимодействия. Эти слабые взаимодействия эффективны только в том случае, если молекулы антигена и антитела настолько комплементарны друг другу, что некоторые атомы антигена входят в соответствующие углубления на поверхности антитела. Комплементарные антигену области четырехцепочечной молекулы антитела - это ее два идентичных антиген-связывающих участка; соответствующая область антигена - его *антигенная детерминанта* (рис. 18-22). Большинство антигенных макромолекул имеют много различных детерминант; если две из них или большее число (как в некоторых полимерах) одинаковы, антиген называют *мультивалентным* (рис. 18-23).

Обратимую реакцию между антигеном с одной антигенной детерминантой (Аг) и одним антиген-связывающим участком (Ат) можно представить следующим образом:

$$Аг + Ат \rightleftharpoons АгАт.$$

Точка равновесия зависит как от концентраций Ат и Аг, так и от силы их взаимодействия. Очевидно, что с увеличением концентрации Аг все большая доля Ат будет ассоциирована с Аг. Силу взаимодействия обычно выражают **константой сродства** *(K_a)* (см. рис. 3-7):

$$K_a = [АгАт]/[Аг][Ат]$$

(выражения в квадратных скобках означают концентрацию каждого из компонентов в состоянии равновесия).

Константу сродства, которую иногда называют константой ассоциации, можно определить, измерив концентрацию свободного Аг, необходимую для заполнения половины антиген-связывающих участков антитела. Когда половина участков заполнена, [АгАт] = [Ат] и $K_a = 1/[Аг]$. Таким образом, константа сродства антитела к антигену равна величине,

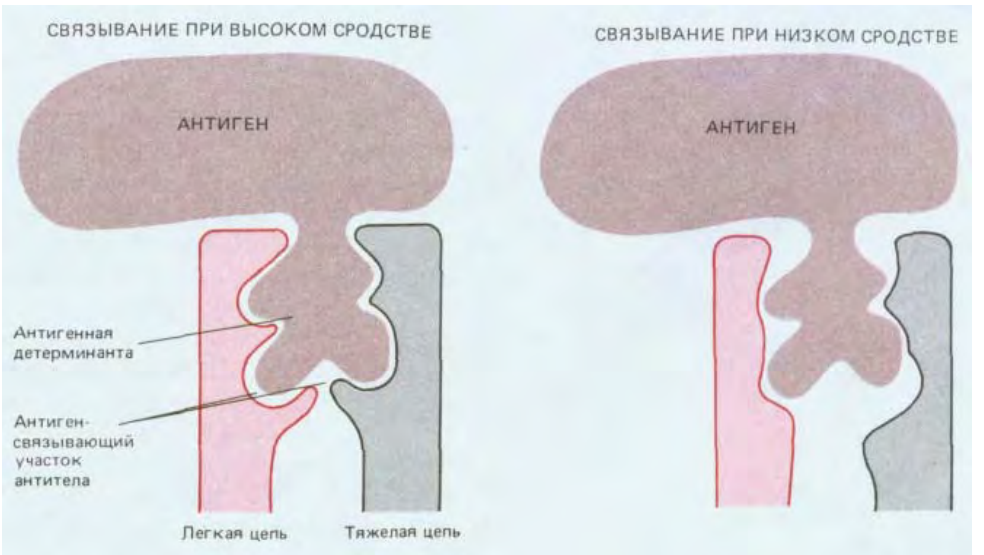


Рис. 18-22. Сильно упрощенная схема связывания антигенной детерминанты макромолекулы с антиген-связывающими участками двух различных антител - с высоким и с низким сродством к данному антигену. Антигенная детерминанта удерживается в связывающем участке различными слабыми нековалентными взаимодействиями. Обратите внимание на то, что в образование этого участка обычно вносят вклад как легкая, так и тяжелая цепи молекулы антитела.

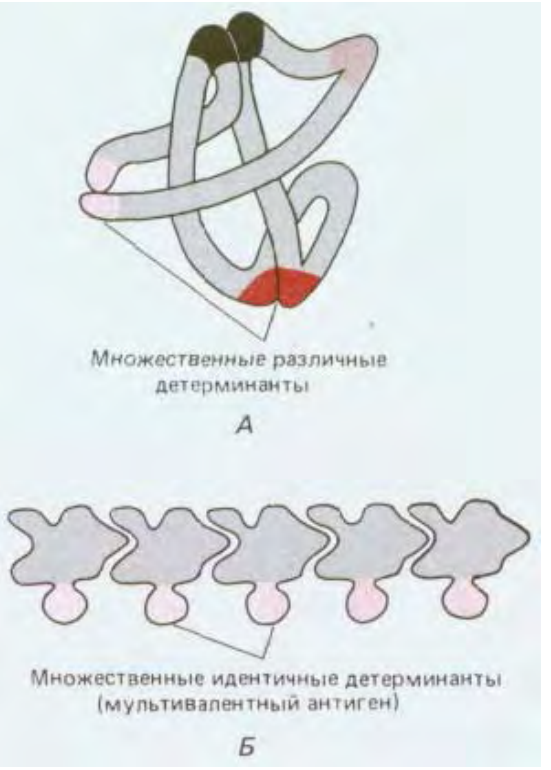


Рис. 18-23. Молекулы с множественными антигенными детерминантами. *А.* Глобулярный белок, имеющий ряд различных антигенных детерминант. Обратите внимание, что разные области полипептидной цепи могут в свернутой структуре сближаться друг с другом, образуя единую детерминанту на поверхности белка. *Б.* Полимерная структура с повторяющимися идентичными антигенными детерминантами; такую молекулу называют мультивалентным антигеном.

обратной концентрации антигена, дающей половину максимального связывания. Обычные значения варьируют в широких пределах - от $5\text{-}10^4$ до 10^{11} л/моль. Константа сродства, при которой молекулу иммуноглобулина перестают рассматривать как антитело к данному антигену, несколько произвольна, однако антитело с K_a ниже 10^4 вряд ли будет биологически эффективным; кроме того, маловероятно, что В-клетки с рецепторами, имеющими столь слабое сродство к антигену, будут им активироваться.

Сродство антитела отражает силу взаимодействия антигенной детерминанты с отдельным антиген-связывающим участком, каким бы ни было число таких участков. В отличие от этого общая авидность антитела по отношению к мультивалентному антигену (такому, как полимер с повторяющимися субъединицами) характеризует суммарную силу взаимодействия всех связывающих участков антитела, вместе взятых. Когда мультивалентный антиген взаимодействует более чем с одним антиген-связывающим участком антитела, сила связывания резко возрастает: для того чтобы антиген и антитело могли диссоциировать, все их связи друг с другом должны быть разорваны одновременно. Поэтому типичная молекула IgG при вовлечении в реакцию обоих антиген-связывающих участков будет связываться с мультивалентным антигеном по меньшей мере в 1000 раз сильнее, чем в случае, когда вовлечен лишь один участок.

По той же причине, если сродство отдельных антиген-связывающих участков IgG и IgM одинаково, молекула IgM (имеющая 10 таких участков) проявит несравненно большую авидность к мультивалентному антигену, чем молекула IgG (имеющая 2 участка). Различие в авидности, часто 10000-кратное или больше, весьма важно, так как антитела, образующиеся на ранних стадиях иммунного ответа, обычно обладаю: значительно меньшим сродством к антигену, чем те, которые вырабатываются позже. (Повышение среднего сродства продуцируемых антител с течением времени после иммунизации называется *созреванием сродства - см.* разд. 18.4.4.) Благодаря своей высокой общей авидности антитела IgM (основной класс Ig, вырабатываемых в начале иммунного ответа) могут эффективно функционировать даже при низком сродстве отдельных связывающих участков.

Заключение

Молекула антитела представляет собой белок, имеющий форму буквы Y с двумя идентичными антиген-связывающими участками на концах боковых ветвей (Fab-областей) и с участками для связывания с компонентами комплемента и/или различными рецепторами клеточной поверхности на «стебельке» (на Fc-области). Антитела защищают позвоночных от инфекций, инактивируя вирусы или бактериальные токсины и мобилизуя комплемент и различные клетки, которые убивают и поглощают *внедрившиеся микроорганизмы.*

Каждый клон В-клеток вырабатывает молекулы антител с уникальным антиген-связывающим участком. Вначале молекулы встраиваются в плазматическую мембрану клетки, где они служат рецепторами дм антигена. Когда к таким рецепторам присоединяется антиген, В-клетки активируются (обычно с помощью Т-клеток), начинают размножаться и созревают либо в клетки памяти, либо в активные клетки, выделяющие антитела с таким же антиген-связывающим участком, как и у антител встроенных в мембрану.

Каждая молекула антитела составлена из двух идентичных тяжелых (Н) цепей и двух идентичных легких (L) цепей. Как правило, част как Н~, так и L-цепей образуют антиген-связывающие участки. Сущест-

*вуют пять классов антител (IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), имеющие соответственно различные H-цепи (*α, δ, ε, γ и μ*). H-цепи образуют также Fc-областъ антитела, от которой зависит, какие другие белки будут связываться с антителом, что в свою очередь определяет биологические свойства данного класса антител. С любым классом H-цепей могут сочетаться L-цепи любого типа (*κ или λ*). Тип L-цепи, по-видимому, не влияет на свойства антител.*

18.3. Тонкая структура антител

Поскольку антитела существуют в столь огромном числе вариантов, в неиммунизированном организме любой из видов антител будет составлять менее миллионной доли всех молекул Ig, имеющихся в крови. Этот факт поставил иммунохимиков перед чрезвычайно сложной проблемой белковой химии: каким образом можно получить достаточное количество какого-либо антитела для определения его аминокислотной последовательности и трехмерной структуры?

Проблема была решена благодаря специфическому свойству опухолевых клеток, образующихся при множественной миеломе - злокачественном заболевании, при котором в костном мозге («миелогенной» ткани) развиваются множественные опухоли. Эти клетки секретируют в кровь большие количества антител одного вида. Такие антитела гомогенны, или моноклональны, поскольку рак обычно начинается с неконтролируемого роста одной-единственной клетки (см. разд. 21.1.2); в данном случае это плазматическая клетка, вырабатывающая антитела. Антитело, накапливающееся в крови, называют миеломным белком.

Еще с прошлого столетия известно, что моча больных, страдающих этим заболеванием, часто содержит необычные белки, названные *белками Бенс-Джонса* по имени английского врача, который их впервые описал. Однако только в 1950-х годах выяснилось, что эти белки представляют собой свободные L-цепи иммуноглобулина. Первоначально детальная структура антитела была определена путем изучения миеломных белков из мочи или крови больных или же белков от мышей, у которых были целенаправленно индуцированы аналогичные формы рака. Впоследствии появилась возможность делать B-клетки, секретирующие антитела, бессмертными путем их слияния с клетками миеломы, не секретирующими антитела. Образующиеся *гибридомы* стали удобным источником моноклональных антител, которые можно получить против любого желаемого антигена в неограниченном количестве (разд. 4.5.4).

18.3.1. L- и H-цепи состоят из константной и вариабелыюй областей [11, 14]

При сравнении аминокислотных последовательностей множества миеломных белков выявилась поразительная особенность, имеющая важный и неожиданный генетический подтекст. N-концевая часть последовательности как L-, так и H-цепей изменчива, а C-концевая-постоянна. Например, если сравнить последовательности большого числа различных миеломных κ-цепей (каждая длиной около 220 аминокислот), то окажется, что C-концевые половины у них одинаковы или различаются лишь незначительно, тогда как N-концевые половины все разные. Таким образом, L-цепи содержат **константную область** примерно из 110 аминокислот и **вариабельную область** такой же длины. N-концевая вариабельная область H-цепей тоже состоит приблизительно из 110 аминокислот, константная же, в зависимости от класса антител, - из 330 или 440 аминокислот (рис. 18-24).

Именно N-концевые части L- и H-цепей совместно образуют антиген-



Рис. 18-24. Как легкие, так и тяжелые цепи молекул состоят из константной и вариабельной областей. У всех легких цепей данного типа (æ или λ) вся С-концевая половина имеет одинаковую последовательность аминокислот (иногда с небольшими различиями), тогда как N-концевые половины различны. N-концевые вариабельные области тяжелых и легких цепей сходны по длине (около 110 аминокислотных остатков), тогда как константная область у тяжелых цепей в три-четыре раза (в зависимости от класса антител) длиннее, чем у легких цепей.

связывающий участок, и изменчивость их аминокислотных последовательностей служит структурной основой разнообразия таких участков, В связи с существованием вариабельной и константной областей возникают важные вопросы относительно генетических механизмов образования антител; их мы обсудим позже. Но еще до того как стало возможным прямое изучение этих вопросов, в результате исследования миеломных белков выяснились другие важные черты структуры антител.

18.3.2. Каждая L- и H-цепь содержит по три гипервариабельные области, которые совместно формируют антиген-связывающий участок [17]

Только часть вариабельной области непосредственно участвует в связывании антигена. Этот вывод вначале был сделан в результате оценки максимальных размеров антиген-связывающего участка. Первые измерения, в которых «молекулярными линейками» служили олигомеры разной величины, были проведены на антителах к декстрану - полимеру D-глюкозы. Когда для того, чтобы подавить связывание декстрана с антителами к нему, использовали дисахариды, трисахариды и олигосахариды большей длины, состоящие из остатков глюкозы, то их действие возрастало по мере удлинения цепи приблизительно до шести мономеров; с олигосахаридами большей длины эффект не увеличивался, Это позволяло предполагать, что наиболее крупные антиген-связывающие участки могут контактировать самое большее с пятью или шестью сахарными остатками антигена. Поэтому казалось крайне маловероятным, что все 220 аминокислот вариабельных областей L- и H-цепей вносят прямой вклад в построение антиген-связывающего участка.

И действительно, теперь ясно, что связывающий участок антитела формируют всего лишь около 20-30 аминокислотных остатков вариабельной области каждой из цепей. Первым свидетельством в пользу этого явились данные об аминокислотных последовательностях, показавшие, что различия между вариабельными областями как в L-, так и в H-цепях в основном ограничены тремя небольшими **гипервариабельиыми**

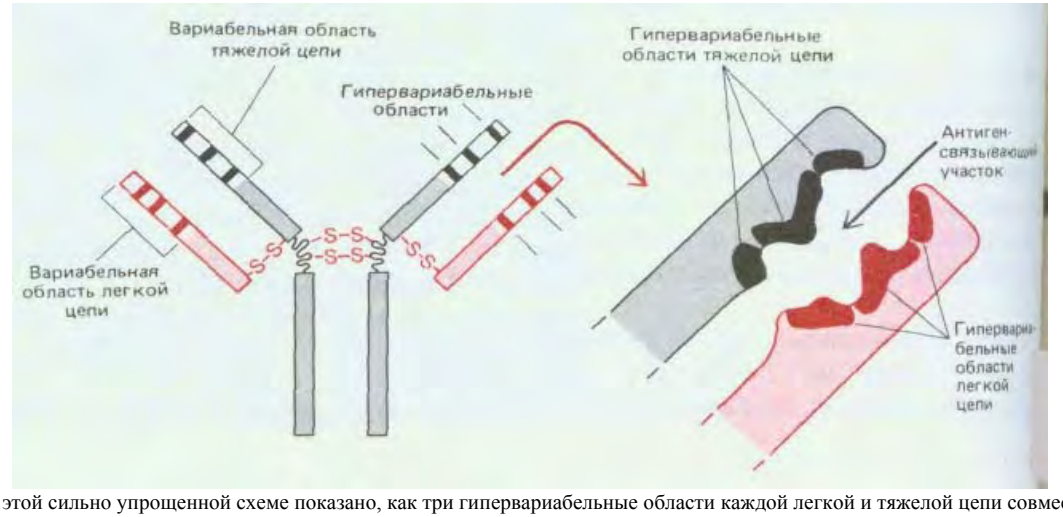


Рис. 18-25. На этой сильно упрощенной схеме показано, как три гипервариабельные области каждой легкой и тяжелой цепи совместно образуют антиген-связывающий участок молекулы антитела. Гипервариабельные области иногда называют областями, определяющими комплементарность.

областями в каждой цепи. Остальные части, известные под названием *структурных областей,* относительно постоянны. Эти данные позволили предсказать, что антиген-связывающий участок образуют всего лишь 5-10 аминокислот каждой гипервариабельной области (рис. 18-25), и это было впоследствии подтверждено рентгеноструктурным анализом антител (см. ниже).

18.3.3. L- и H-цепи свернуты в ряд повторяющихся гомологичных доменов [11, 16, 18]

Когда к концу 60-х годов была впервые определена полная последовательность аминокислот в одной из H-цепей, стала очевидной другая важная особенность структуры Ig. Оказалось, что константная область, которая в большинстве H-цепей примерно в три раза длиннее, чем в L-цепях, состоит из трех гомологичных сегментов, причем каждый из них, длиной около ПО аминокислот, содержит по одной внутрицепочечной дисульфидной связи. Эти три сегмента гомологичны не только друг другу, но также и константной области L-цепей. Единственные вариабельные домены в L- и H-цепях тоже сходны между собой, а в меньшей степени - и с константными доменами.

Эти данные позволили предсказать, что как L-, так и H-цепи построены из повторяющихся сегментов, или доменов, каждый из которых сворачивается независимо, образуя компактную функциональную единицу. И действительно (рис. 18-26), L-цепь состоит из одного вариабельного домена (V_L) и одного константного (C_L), а большинство H-цепей - из вариабельного домена (V_H) и трех константных доменов (C_N1, C_N2 и C_N3). (Каждая μ- и ε-цепь содержит один вариабельный и четыре константных домена.) Вариабельные домены ответственны за связывание антигена, а константные домены H-цепей (за исключением C_N1) образуют Fc-область, определяющую другие биологические свойства антител.

Гомология между доменами позволяет предположить, что цепи Ig возникли в ходе эволюции в результате ряда последовательных дупликаций одного исходного гена, который кодировал один-единственный домен с неизвестной функцией, состоявший из 110 аминокислот (разд. 18.6.20). Эту гипотезу подкрепляют данные о том, что каждый домен константной области H-цепи кодируется отдельной последовательностью ДНК (экзоном) (рис. 18-27).

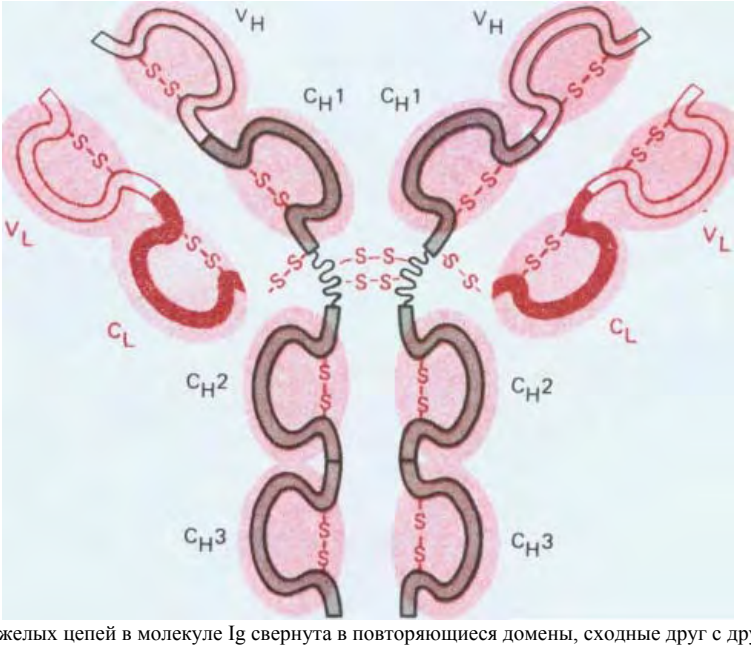


Рис. 18-26. Каждая из легких и тяжелых цепей в молекуле Ig свернута в повторяющиеся домены, сходные друг с другом. Вариабельные домены тех и других цепей (V_L и V_H) образуют антиген-связывающие участки (см. рис. 18-25), тогда как константные домены тяжелых цепей (главным образом C_H2 и C_H3) определяют другие биологические свойства молекулы. Тяжелые цепи антител IgM и IgE имеют дополнительный константный домен C_H4.

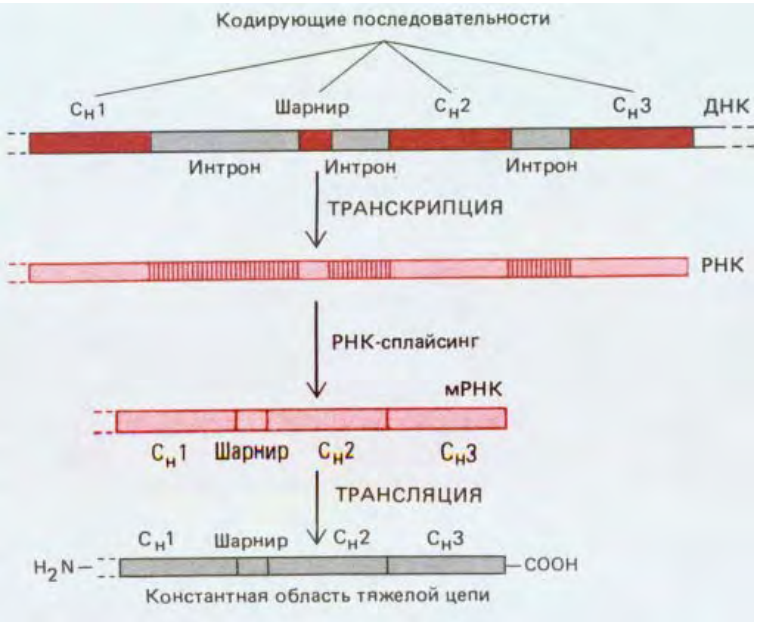


Рис. 18-27. Организация последовательностей ДНК, кодирующих константную область тяжелой цепи. Последовательности, кодирующие каждый из доменов и шарнирный участок (экзоны), разделены некодирующими последовательностями (нитронами). Интроны удаляются путем сплайсинга первичных РНК-транскриптов при образовании мРНК. ДНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи, не показана. Возможно, что наличие интронов в последовательности ДНК облегчало возникновение случайных дупликаций в ДНК, приведших к появлению генов антител в процессе эволюции (разд. 9.4.12 и 10.5.3).

18.3.4. Рентгеноструктурные исследования выявили трехмерное строение доменов и антиген-связывающих участков иммуноглобулинов [19]

Даже тогда, когда известна полная аминокислотная последовательность белка, из нее невозможно вывести его трехмерную структуру - для этого необходим рентгеноструктурный анализ кристаллов данного белка (разд. 4.1.14). В кристаллическом виде уже получены несколько фрагментов миеломных белков и один интактный IgG. Данные рентгеноструктурного анализа этих белков подтвердили предсказания иммунохимиков. Еще важнее то, что эти исследования позволили понять, как на основе одной и той же структурной схемы конструируются миллионы различных антигенсвязывающих участков.

Как показано на рис. 18-28, все домены Ig имеют очень сходную пространственную структуру, в основе которой лежит так называемая **иммуноглобулиновая укладка.** Каждый домен представляет собой, грубо говоря, цилиндр размером 4 х 2,5 х 2,5 нм, построенный как «сэндвич» из двух белковых слоев, где один слой образован тремя, а другой - четырьмя отрезками полипептидной цепи. В каждом слое прилегающие друг к другу отрезки антипараллельны и образуют β-слой (разд. 3.3.2). Два таких слоя расположены приблизительно параллельно и соединены одной внутрицепочечной дисульфидной связью.

Вариабельные домены уникальны в том отношении, что каждый из них имеет свой особенный набор из трех гипервариабельных областей, уложенных в три *гипервариабельные петли* (см. рис. 18-28). Гипервариабельные петли L- и H-вариабельных доменов собраны в группу и образуют антиген-связывающий участок, как это и было предсказано. Важный принцип, раскрытый в результате проведенных исследований, состоит в том, что вариабельная область молекулы антитела состоит из весьма консервативной жесткой структуры, к одному из концов которой прикреплены гипервариабельные петли. Поэтому огромное разнообразие антиген-связывающих участков может создаваться путем изменения одних только гипервариабельных петель - их длины и аминокислотной последовательности - без нарушения общей пространственной структуры, необходимой для функционирования антитела.

Рентгеноструктурный анализ фрагментов антител, связанных с антигеном или антигенной детерминантой (гаптеном), позволил установить, как именно (в ряде конкретных случаев) гипервариабельные петли L-

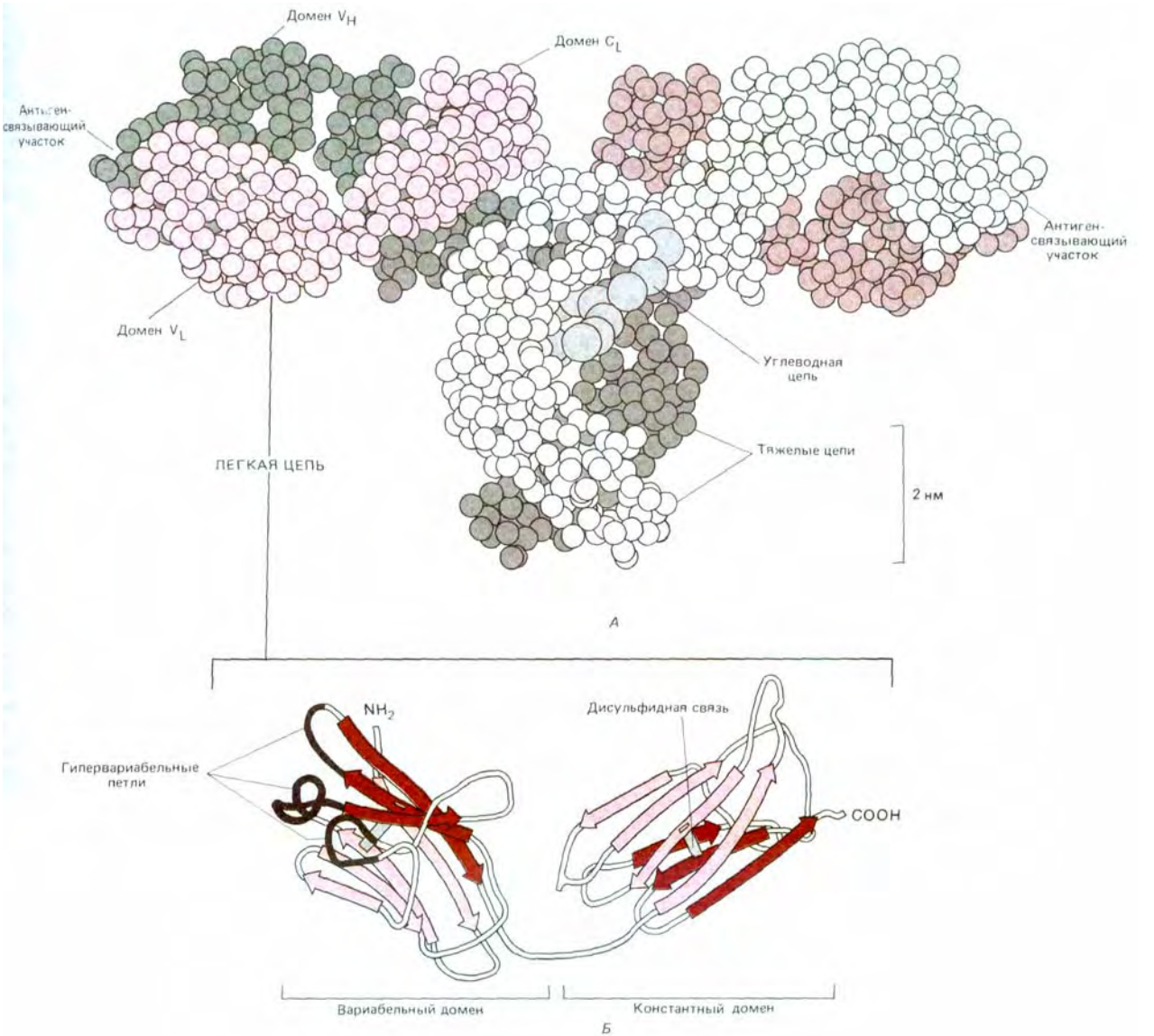


Рис. 18-28. Пространственная структура молекулы антитела IgG (по данным рентгеноструктурного анализа). *А.* Каждый аминокислотный остаток молекулы белка изображен здесь в виде маленького шарика. Одна из тяжелых цепей показана белым цветом, другая - темно-серым. Домены легких цепей показаны цветными. Молекула антитела гликозилирована: олигосахаридная цепь, прикрепленная иомену C_H2, изображена светлосерой. *Б.* Пространственная укладка всей легкой цепи. Как вариабельный, так и константный домены состоят из двух β-слоев (один из них составлен из трех отрезков цени, а другой из четырех). Полипептидные цепи в этих двух слоях показаны разными цветами; слои соединены между собой дисульфидной связью. Обратите внимание, что все гипервариабельные области образуют петли на дальнем конце вариабельного домена, где они сближаются и формируют часть антиген-связывающего участка (А - по E. W. Silverton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5140, 1977; Б - *по* M. Schiffer at al., Biochemistry, 12.4620, 1973. Copyright 1973 Amer. Chem. Soc.)

и Н-вариабельных доменов совместно образуют одну антиген-связывающую поверхность. Размеры и форма каждой такой поверхности варьируют в зависимости от конформации полипептидной цепи в гипервариабельных петлях, которая в свою очередь определяется последовательностью боковых цепей аминокислот в этих петлях. Таким образом, сейчас уже понятны общие принципы структуры антител.

Заключение

Каждая L- и Н-цепь иммуноглобулина состоит из вариабельной области длиной примерно в ПО аминокислотных остатков на N-конце и следующей за нею константной области, которая имеет такую же длину в L-цепи и в три или четыре раза длиннее в Н-цепи. Каждая цепь составлена из повторяющихся, сходным образом свернутых доменов: у L-цепи имеется один домен в вариабельной области (V_L) и один в константной области

(C_L), а у Н-цепи - один домен в вариабельной области (V_H) и три или четыре в константной области (C_H). Изменчивость аминокислотной последовательности в вариабельных областях L- и Н-цепей ограничена в основном несколькими небольшими гипервариабельными областями, которые пространственно сближены друг с другом и образуют антиген-связывающий участок. Этот участок имеет размеры, достаточные для того, чтобы контактировать с антигенной детерминантой, соответствующей по величине пяти или шести остаткам сахара.

18.4. Как создается разнообразие антител

По имеющимся оценкам, даже в отсутствие антигенной стимуляции у мыши может вырабатываться много миллионов разных молекул антител, - это ее *преиммунный репертуар.* Поскольку антиген-связывающие участки многих антител могут перекрестно реагировать со множеством близких, но различающихся антигенных детерминант, преиммунный репертуар, видимо, достаточно велик для того, чтобы почти для каждой потенциальной антигенной детерминанты нашелся подходящий антиген-связывающий участок.

Антитела представляют собой белки, а белки кодируются генами. Поэтому разнообразие антител ставит сложную генетическую проблему: каким образом число видов вырабатываемых в организме антител может превышать число генов в его геноме? (Полагают, например, что

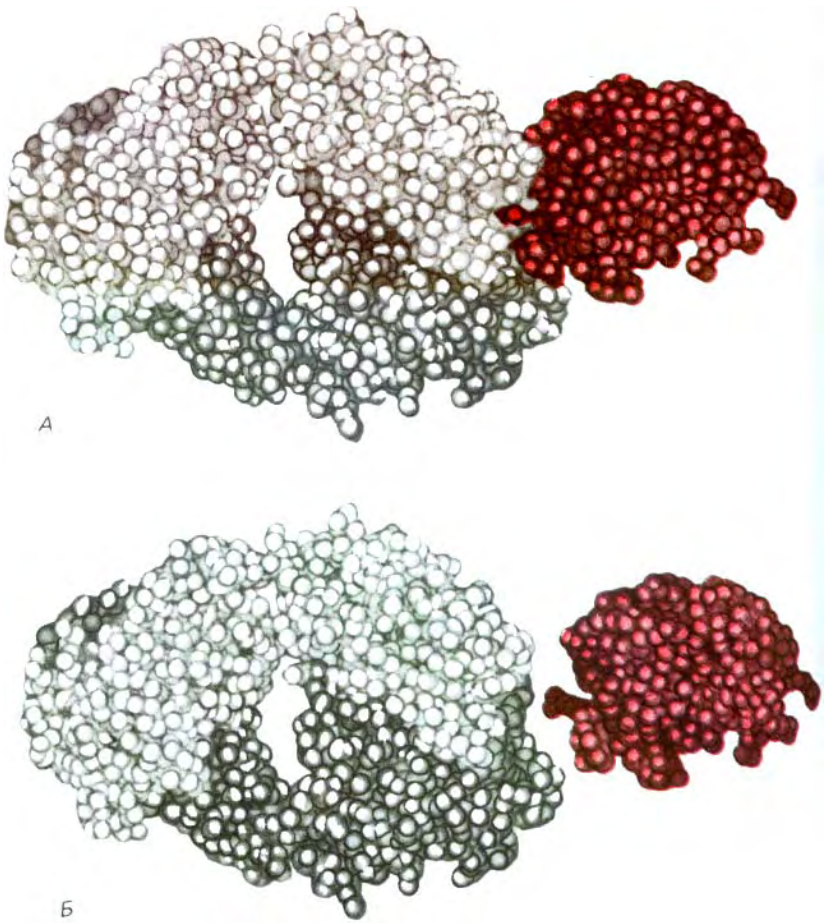


Рис. 18-29. Трехмерная структура комплекса антиген-антитело (по данным рентгеноструктурного анализа). Антиген - в данном случае это фермент лизоцим выделен цветом. Антиген-связывающий участок Fab-фрагмента антитела образуют совместно две цепи - легкая и тяжелая (на рисунке светло-серая и темно-серая соответственно). *Б.* Здесь модели антигена и антитела разделены, чтобы показать их комплементарные контактирующие поверхности. Выступ на комплементарной поверхности антигена представляет собой остаток глутамина. В ряде других антител, исследованных тем же методом, антиген-связывающий участок (для небольшого гаптена) образует гораздо более глубокую щель. (A. Amit et al., Science, 233, 747-753, 1986. Copyright 186 by the AAAS.)



Рис. 18-30. Эксперимент, который прямо показал, что в ходе развития В-клеток ДНК подвергается перестройке. Была экстрагирована ДНК из мышиной опухоли плазматических клеток (миеломы). синтезирующей специфическую легкую цепь Ig, и из 13-дневного мышиного эмбриона, у которого антитела еще не вырабатываются. Ту и другую ДНК расщепляли рестрикционной эндонуклеазой и полученные фрагменты подвергали электрофорезу в агаровом геле. Затем выявляли фрагменты, в которых имелись последовательности, кодирующие С-область L-цепи, и фрагменты с кодом для определенной V-области L-цепи (для этого использовали гибридизацию по Саузерну с двумя радиоактивными ДНК-зондами: один из них был комплементарен кодирующей последовательности для V-области, а другой - для С-области мРНК для специфической L-цепи миеломы) (разд. 18.3). В ДНК клеток миеломы последовательности, кодирующие С - и V-области, были обнаружены в составе одних и тех же фрагментов ДНК, тогда как в ДНК из эмбриона они оказались в разных фрагментах (так же как и в ДНК из другой миеломной опухоли, вырабатывавшей другую L-цепь; на схеме не показано).

у человека геном содержит менее 10^5 генов.) Однако проблема не столь грандиозна, как кажется на первый взгляд. Поскольку в антиген-связывающий участок вносят вклад как L-, так и H-цепи, у животного с 1000 генов, кодирующих L-цепи, и с 1000 генов, кодирующих H-цепи, продукты этих генов могли бы образовать 1000 x 1000 различных комбинаций, т.е. 10^6 разных антиген-связывающих участков (если предположить, что при этом любая L-цепь может сочетаться с любой H-цепью). Тем не менее иммунная система выработала уникальные генетические механизмы, позволяющие ей генерировать почти неограниченное число различных L- и H-цепей. Эти механизмы могут варьировать в зависимости от вида животных; например, они весьма различны у кур и у млекопитающих. Ниже мы сосредоточим внимание на механизмах, используемых у млекопитающих.

18.4.1. В процессе развития В-клеток происходит сборка генов антител из отдельных генных сегментов [20]

Изучение аминокислотных последовательностей миеломных белков привело к предположению о том, что вариабельная (V) и константная (С) области каждой из цепей Ig могут кодироваться двумя отдельными генными сегментами, которые каким-то образом соединяются в ДНК перед их экспрессией. Первые прямые данные о перестройке ДНК в процессе развития В-клеток были получены в 1976 г. при сравнении ДНК из ранних мышиных эмбрионов, неспособных к выработке антител, с ДНК из клеток мышиной миеломной клеточной линии, вырабатывающих антитела. Как показали эксперименты, специфические последовательности, кодирующие V- и С-области и используемые клетками миеломы, находились в этих клетках в одном и том же рестрикционном фрагменте, а у эмбрионов - в двух разных рестрикционных фрагментах. Следовательно, на каком-то этапе дифференцировки В-клеток происходит перестройка последовательностей ДНК, кодирующих молекулы антител (рис. 18-30).

Сейчас известно, что для каждого типа цепей Ig-легких цепей х, легких цепей *X* и тяжелых цепей - существует отдельный «пул» (обширная группа) генных сегментов, которые могут быть использованы при синтезе отдельной полипептидной цепи. Эти пулы находятся в разных хромосомах, и каждый из них содержит обычно большое число генных сегментов, кодирующих V-область цепи Ig, и несколько меньшее число сегментов, кодирующих С-область. В процессе развития В-клетки происходит - путем сайт-специфической рекомбинации (разд. 5.4.7)-сборка полной кодирующей последовательности для каждой из двух цепей Ig, которые будут синтезироваться; при этом последовательности, кодирующие V- и С-области, соединяются друг с другом. Помимо соединения отдельных сегментов гена, эти перестройки также активируют транскрипцию с генного промотора - возможно, путем изменений относительного положения энхансеров и сайленсеров, воздействующих на промотор (разд. 10.2.7). Поэтому цепь Ig может синтезироваться только после того, как произойдет перестройка ДНК. Процесс объединения генных сегментов увеличивает разнообразие антиген-связывающих участков; здесь играют роль несколько факторов, которые мы рассмотрим ниже.

18.4.2. Каждая V-область кодируется более чем одним генным сегментом [21]

Когда изучили последовательности ДНК, кодирующие V- и С-области, оказалось, что С-область той или иной цепи Ig кодируется лишь одним

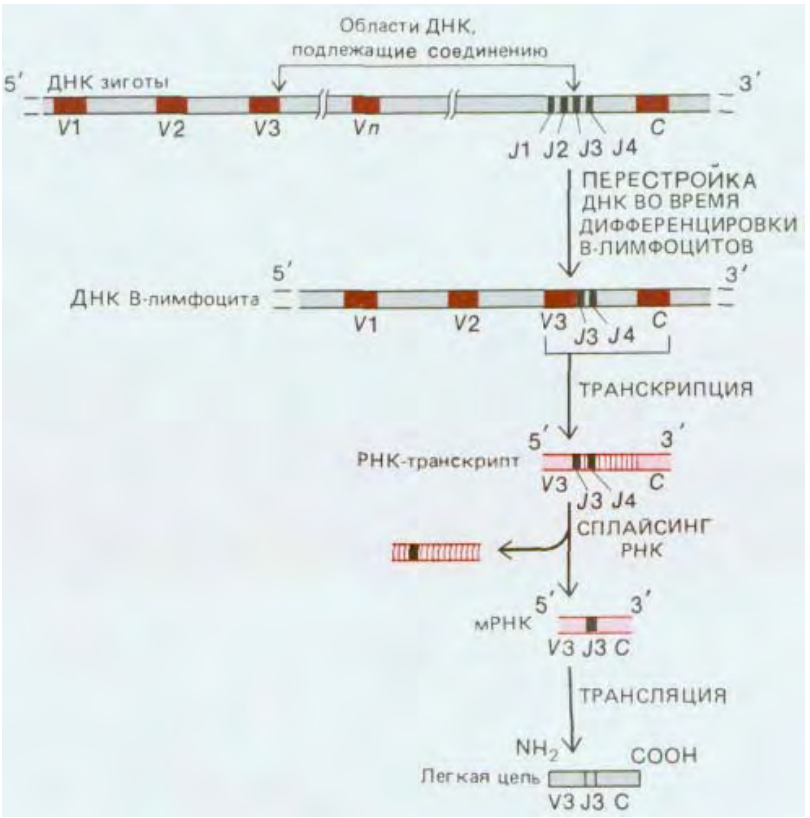


Рис. 18-31. Процесс соединения *V-J, с* которым связано образование æ-легкой цепи у мыши. В ДНК первичных половых клеток (где гены иммуноглобулинов не экспрессируются и поэтому не перестраиваются) группа из четырех J-генных сегментов отделена от С-генного сегмента коротким интроном, а от примерно 300 *V-генных* сегментов - тысячами нуклеотидных пар. *J*-сегмент кодирует около 15 С-концевых аминокислот V-области; участок соединения *V-* и *J*-сегментов совпадает с третьей гипервариабельной областью. *V*-сегменты на хромосоме часто бывают собраны в группы гомологичных семейств, которые, по-видимому, распределены по области длиной более 50000 нуклеотидных пар. В ходе развития В-клеток определенный *V-сегмент* (в представленном здесь случаеV3) перебрасывается точно в положение рядом с одним из *J*-сегментов (в данном случае J3). «Лишний» J-ген (74) и интрон транскрибируются (вместе с соединенными *V3-*, *J*3- и С-сегментами), а затем вырезаются путем РНК-сплайсинга. В результате образуются молекулы мРНК, в которых последовательности V3, J3 и С расположены рядом. Эти мРНК затем транслируются в $\varkappa$-легкие цепи.

генным сегментом (С-сегментом), тогда как каждая V-область- более чем одним сегментом. V-область каждой L-цепи кодируется последовательностью ДНК, собираемой из двух генных сегментов - длинного **V-сегмента** и короткого соединительного **J-сегмента** (не путать с белковой J-цепью, которая кодируется в другой части генома, - см. разд. 18.2.5). На рис. 18-31 показаны генетические механизмы, участвующие в образовании L-цепей.

V-область каждой H-цепи кодируется последовательностью ДНК, собираемой из трех генных сегментов: V-сегмента, J-сегмента и **D-сегмента** (diversity gene segment). Организация генных сегментов, участвующих в синтезе H-цепей, показана на рис. 18-32.

Большое число наследуемых V-, J- и D-сегментов, кодирующих цепи Ig, само по себе вносит существенный вклад в разнообразие антител. Однако этот вклад еще больше увеличивается путем комбинирования разных сегментов (так называемое *комбинационное разнообразие).* Например, у мыши каждый из примерно 300 V-сегментов пула для легкой цепи $\varkappa$ может соединиться с любым из четырех J-сегментов (см. рис. 18-31), и в результате этот пул может кодировать по меньшей мере 1200 (300 • 4) разных V-областей $\varkappa$-цепи. (Пул для легкой цепи λ у мыши содержит лишь два V-сегмента; у человека - значительно больше.) Аналогично, любой из 1000 (или около того) V-сегментов пула для H-цепи мыши может соединиться с любым из четырех J-сегментов и из по крайней мере 12 D-сегментов, так что могут быть закодированы минимум 48000 (1000-4-12) разных V-областей тяжелой цепи. Эти оценки весьма приблизительны, поскольку точное число V-генных сегментов в этих пулах неизвестно.

Наиболее важный механизм, приводящий к разнообразию антиген-связывающих участков антител, - это комбинационное разнообразие, возникающее при сборке унаследованных V-, J- и D-генных сегментов

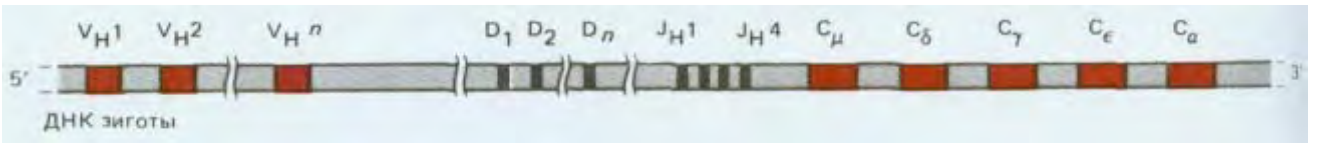


Рис. 18-32. У мыши пул генных сегментов для H-цепи содержит, по-видимому, около 1000 *V*-сегментов, по меньшей мере 12 D-сегментов, 4 *J*-сегмента и упорядоченное скопление *С*-сегментов, каждый из которых кодирует H-цепь своего класса. *D*-сегмент кодирует от I до 15 аминокислот в третьем гипервариабельном участке V-области. Единый масштаб на рисунке не выдержан, а многие детали опущены. Например:

1) имеются четыре C_γ-сегмента ($C_{\gamma1}$, $C_{\gamma2a}$, $C_{\gamma2b)}$ и $C_{\gamma3}$);

2) каждый *С*-сегмент составлен из многих экзонов (см. рис. 18-27);

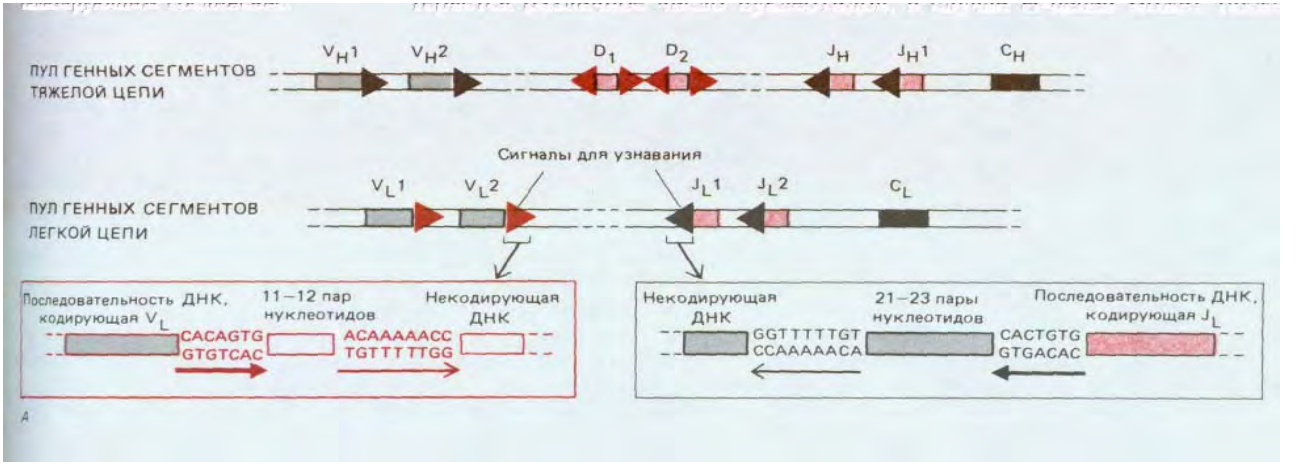
3) J_H1- и C_α-сегменты отделены друг от друга примерно 200 000 пар нуклеотидов; так же как и в случае V_α-сегментов, $V_н$-сегменты собраны на хромосоме в группы гомологичных семейств. В образовании H-цепи участвуют те же генетические механизмы, что и в образовании L-цепей (как показано на рис. 18-31), за исключением того, что вместо одной перестройки ДНК необходимы две: сначала D-сегмент соединяется с J-сегментом, а затем к ним присоединяется V-сегмент.

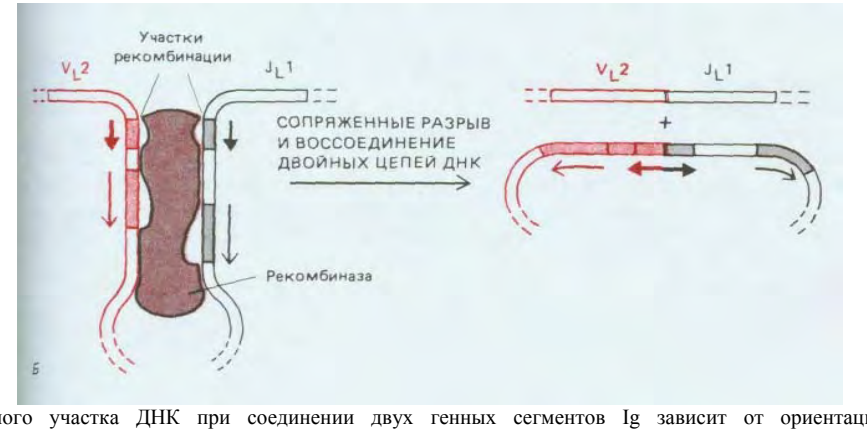
в различных сочетаниях. Как мы уже видели, у мыши один лишь этот механизм дает возможность вырабатывать по меньшей мере 1000 разных V_L-областей и порядка 50000 разных $V_н$-областей. Те и другие затем могли бы образовать $5 \cdot 10^7$ комбинаций, т.е. разных антиген-связывающих участков. В дополнение к этому сам по себе механизм соединения, как мы увидим, намного увеличивает число комбинаций - вероятно, более чем в 1000 раз. В результате это число будет значительно больше общего числа В-лимфоцитов у мыши (~ 10^8).

18.4.3. Неточное соединение генных сегментов увеличивает разнообразие V-областей *[21]*

Генные сегменты, которые могут быть удалены друг от друга на сотни тысяч пар нуклеотидов, соединяются, образуя функциональные последовательности, кодирующие V_L- или $V_н$-области. Детали этого механизма неизвестны. К каждому генному сегменту примыкают консервативные последовательности ДНК, которые, вероятно, служат участками узнавания для ферментов сайт-специфической рекомбинации (разд. 5.4.7); благодаря этому рекомбинируются только подходящие друг к другу сегменты. Например, V-сегмент всегда соединяется только с J- или D-сегментом, но не с другим V-сегментом (рис. 18-33).

В большинстве случаев сайт-специфической рекомбинации соединение ДНК бывает точным, но это не относится к соединению генных сегментов для антител. На концах рекомбинирующих сегментов часто теряется различное число нуклеотидов; в случае Н-цепей может также





Судьба промежуточного участка ДНК при соединении двух генных сегментов Ig зависит от ориентации сегментов. Если транскрипционная ориентация этих двух сегментов одинакова, то промежуточная ДНК, как показано на рисунке, освобождается в виде кольца и отбрасывается (делеционное соединение); если же сегменты ориентированы противоположно, эта ДНК сохраняется в перевернутом положении (инверсионное соединение). В биохимическом отношении процессы в обоих случаях одинаковы.

Рис. 18-33. Два типа сигналов для узнавания, используемых при соединении генных сегментов V-области в пулах генных сегментов L- и Н-цепей. *А.* Локализация сигналов. Для простоты показаны только по два генных сегмента каждого типа. Сигналы обоих типов состоят из консервативных последовательностей (приведенных внизу) длиной в 7 и 9 пар нуклеотидов (п. н.), разделенных неконсервативным спейсером; в одном случае (◄) длина спейсера 21-23 п. н. (примерно два витка двойной спирали ДНК), в другом (►) 11-12 п.н. (примерно один виток). Соединяются только подходящие друг к другу генные сегменты: это происходит лишь при сочетании «одновиткового» спейсера с «двухвитковым» (так называемое правило 12/23). *Б.* Как полагают, сигналы узнавания в свою очередь узнаются ферментом сайт-специфической рекомбинации (рекомбиназой), катализирующим соединение.

произойти вставка одного или нескольких случайно выбранных нуклеотидов. Такие случайные выпадения или вставки нуклеотидов в местах соединения сегментов в огромной степени увеличивают разнообразие кодирующих V-область последовательностей, образующихся путем рекомбинации, особенно в третьей гипервариабельной области. В данном случае увеличение разнообразия обходится дорого, так как во многих случаях оно приводит к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к возникновению нефункционального гена. В процессе развития В-клеток такое «непродуктивное» соединение происходит очень часто.

18.4.4. Направляемое антигеном соматическое гипермутирование осуществляет тонкую подстройку образования антител [22]

После иммунизации с течением времени обычно происходит постепенное увеличение сродства антител к тому антигену, которым проводилась иммунизация. Этот феномен называют **созреванием сродства,** и он обусловлен накоплением соматических мутаций в последовательностях, кодирующих V-области, после антигенной стимуляции В-лимфоцитов. Это было наиболее убедительно показано при изучении выработки олигоклональных антител (разд. 18.1.6) у инбредных мышей, у которых V-области L-цепей или H-цепей кодируются в основном какой-то одной комбинацией генных сегментов. Поскольку изначально последовательности, кодирующие V-область, одинаковы, происходящие в них со временем мутации можно легко обнаружить. В такого рода исследованиях активированные В-клетки, взятые от индивидуальных мышей в разное время после иммунизации, гибридизуют с клетками миеломы, не секретирующими антитела; в результате получают клетки-гибридомы, каждая из которых продуцирует один-единственный вид антител (разд. 4.5.4). Эти бессмертные клетки представляют собой неограниченный источник РНК и ДНК, кодирующих V-области антител. Нуклеиновые кислоты можно затем секвенировать и выявлять изменения в исходных последовательностях, кодирующих V-область. Было показано, что после повторной иммунизации в таких последовательностях со временем быстро накапливаются точечные мутации. Частоту соматических мутаций в этих последовательностях оценивают в 10^{-3} на одну пару нуклеотидов за одну клеточную генерацию, что примерно в миллион раз больше частоты спонтанного мутирования в других генах. Поэтому такой процесс получил название **соматического гипермутирования.** Полагают, что этот процесс происходит во время активации В-клеток антигеном с превращением их в клетки памяти, а не при активации с образованием клеток, секретирующих антитела. В-клетки памяти образуются главным образом в лимфоидных фолликулах вторичных лимфоидных органов (см. рис. 18-8).

Поскольку пролиферация В-клеток стимулируется связыванием антигена, любая происходящая в процессе иммунного ответа мутация, увеличивающая сродство мембраносвязанной молекулы антитела, будет вызывать предпочтительную пролиферацию В-клетки, синтезирующей такое антитело, особенно тогда, когда с течением времени после иммунизации концентрация антигена будет снижаться. Таким образом, созревание сродства - это результат повторяющихся циклов соматического гипермутирования, за которыми следует направляемая антигеном селекция в процессе гуморального ответа.



Рис. 18-34. Последовательный выбор активируемых генов Ig, который должен происходить в развивающихся В-клетках, для того чтобы они выработали антитела только с одним типом антиген-связывающего участка. Клетка должна отобрать один из четырех пулов генных сегментов для L-цепей и один из двух пулов генных сегментов для H-цепей. В ходе развития в клетке-предшественнице сначала активируется один генный пул H-цепей, и она становится пре-В-клеткой, вырабатывающей только свободные тяжелые цепи класса μ. После периода интенсивной пролиферации в пре-В-клетке активируется один пул легких цепей г или Х, и она становится В-клеткой, вырабатывающей уникальную молекулу IgM.

18.4.5. Соединение генных сегментов для антител регулируется таким образом, что обеспечивает моноспецифичность В-клеток [23]

Многочисленные экспериментальные данные показали, что, как и предсказывает теория клональной селекции, каждая отдельная В-клетка вырабатывает антитела с антиген-связывающим участком только одного типа, т.е. В-клетки *моноспецифичны*. Моноспецифичность В-клеток может быть важна по меньшей мере по двум причинам. Во-первых, если бы каждая клетка могла вырабатывать более одного вида антиген-связывающих участков, то некоторые из них могли бы продуцировать как полезные антитела, так и антитела к «своим» антигенам (аутоантитела); это затруднило бы отбор на способность реагировать с чужеродными антигенами при одновременном поддержании толерантности к собственным антигенам. Во-вторых, моноспецифичность гарантирует, что все антитела, вырабатываемые одной клеткой, составлены из двух идентичных половинок и поэтому содержат два идентичных антитен-связывающих участка; это позволяет секретируемым антителам образовывать обширные сети из сшитых антигенов, что способствует элиминации антигена (см. рис. 18-13).

Требование моноспецифичности означает, что должен существовать какой-то механизм, благодаря которому при активации генов Ig в процессе развития каждая В-клетка образует только один тип V_L-областей и один тип $V_н$-областей. Поскольку В-клетки (как все соматические клетки) диплоидны, каждая из них имеет шесть пулов генных сегментов, кодирующих антитела, два пула для H-цепей, по одному от каждого из родителей, и четыре пула для L-цепей, по одному κ- и одному λ, от каждого из родителей. Таким образом, перестройки ДНК могли бы в принципе происходить независимо в каждом пуле для H-цепей и для L-цепей; в результате сборки разных последовательностей, кодирующих V-область в разных пулах, в одной клетке могло бы вырабатываться до восьми различных видов антител, каждое со своим антиген-связывающим участком. В действительности, однако, каждая В-клетка использует лишь два из шести пулов: один из четырех генных пулов для L-цепей и один из двух для H-цепей (рис. 18-34). Таким образом, каждая В-клетка должна делать выбор не только между κ- и λ-пулами для L-цепей, но также между материнскими и отцовскими генными пулами. Экспрессия только материнского или только отцовского аллеля какого-либо гена в данной клетке называется **аллельным исключением;** этот феномен, по-видимому, свойствен только генам, кодирующим антитела (и еще генам, кодирующим близко родственные белки Т-клеточных рецепторов, см. разд. 18.6.1). Материнские и отцовские аутосомные гены для других белков экспрессируются в клетке приблизительно одинаково.

Механизмы аллельного исключения и выбора κ- или λ-L-цепей в ходе развития В-клеток неясны. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что это происходит путем регуляции перестройки ДНК по принципу обратной связи: видимо, функциональная перестройка в одном пуле генных сегментов подавляет перестройки в остальных пулах, кодирующих полипептидную цепь того же типа. Некоторые из таких данных получены в экспериментах, в которых уже собранные ранее клонированные гены инъецировали в ядро оплодотворенной яйцеклетки мыши. В результате получаются *трансгенные мыши* (разд. 5.6.10), у которых во всех лимфоцитах содержится перестроенный ген. Например, в клонах В-клеток, выделенных из трансгенных мышей с перестроенным геном L-цепи, перестройка эндогенных генов L-цепи обычно оказывается подавленной. Аналогично, введение перестроенного гена μ обычно подавляет перестройку эндогенных генов H-цепи.

Сборка последовательностей, кодирующих V-область, в развивающейся В-клетке происходит, по-видимому, в строгом порядке, начиная с пула для Н-цепи и с шагом в один сегмент. Сначала на обеих родительских хромосомах D-сегменты объединяются с $J_н$-сегментами. Затем в одной из этих хромосом происходит соединение V_H с DJ_H. Если такая перестройка дает функциональный ген, последующий синтез полной μ-цепи (которая всегда образуется первой из Н-цепей) выключает дальнейшие перестройки генных сегментов, кодирующих $V_н$-область, и подает сигнал для включения перестроек V_L. Сначала происходит соединение V_L с J_L в κ-пуле генных сегментов. Если оно неудачно, перестраивается другой κ-пул. Если и эта перестройка оказывается неудачной, происходит объединение в одном, а затем и в другом λ-пуле. Наконец, если все-таки на каком-либо этапе происходит удачное соединение и образуются L-цепи, то они объединяются с предшествующими μ-цепями молекулы антител IgM, которые выключают дальнейшую сборку последовательностей, кодирующих область V_L.

Для того чтобы выключить дальнейшую сборку последовательностей, кодирующих V_H, достаточно, видимо, образования интактной μ-цепи. Однако для того, чтобы остановить сборку последовательностей, кодирующих V_L, требуется, вероятно, построение полной молекулы антитела. Если развивающейся В-клетке не удается собрать функциональные последовательности, кодирующие как V_H-, так и V_L-области, она оказывается неспособной вырабатывать молекулы антител и, вероятно, погибает.

Хотя никаких биологических различий между легкими цепями κ и λ не было обнаружено, наличие двух отдельных пулов генных сегментов, кодирующих L-цепи, явно имеет смысл: оно увеличивает вероятность того, что пре-В-клетка, успешно собравшая последовательность, кодирующую V_H, успешно соберет также и последовательность для V_L и превратится в В-клетку.

18.4.6. Переключение синтеза с мембраносвязанной на секретируемую форму одного и того же антитела происходит путем изменения РНК-транскриптов для Н-цепи [24]

Рассмотрев генетические механизмы, от которых зависит структура антиген-связывающего участка, мы перейдем теперь к механизмам, определяющим биологические свойства антитела, т.е. тип константной области тяжелой цепи. Если сделанный однажды выбор определенных генных сегментов для кодирования антиген-связывающего участка является окончательным и для самой В-клетки, и для ее потомков, то тип синтезируемой $C_н$-области изменяется в процессе развития В-клеток. Изменения могут быть двух типов: переход от мембраносвязанной формы к секретируемой форме одной и той же $C_н$-области и изменение класса этой области.

Антитела всех классов могут синтезироваться как в мембраносвязанной, так и в растворимой, секретируемой форме. Мембраносвязанная форма служит рецептором для антигена на поверхности В-клеток. Растворимая форма вырабатывается только после того, как клетка будет стимулирована антигеном и должна будет секретировать антитела. Две формы антител различаются только С-концевым участком Н-цепи: например, у мембраносвязанных молекул IgM Н-цепь оканчивается гидрофобным участком, закрепляющим ее в липидном бислое плазматической мембраны В-клетки, тогда как у Н-цепей секретируемых молекул IgM имеется вместо этого гидрофильный С-конец, позволяющий молекулам выходить из клетки. Способность В-клетки производить

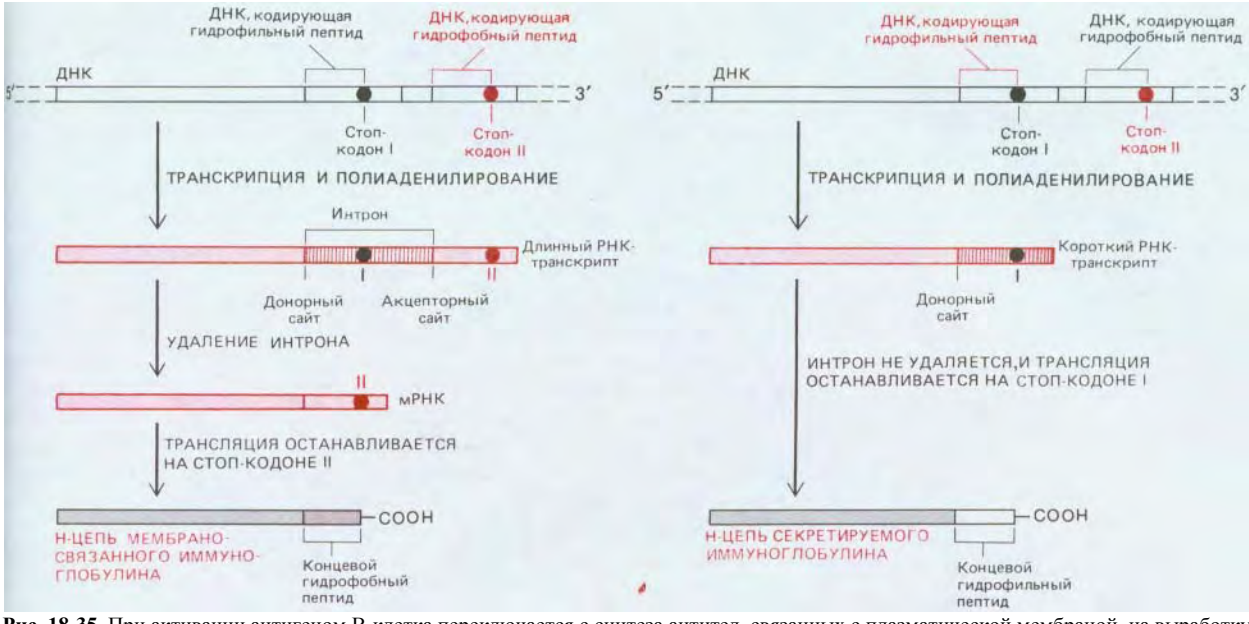


Рис. 18-35. При активации антигеном В-клетка переключается с синтеза антител, связанных с плазматической мембраной, на выработку секретируемой формы тех же антител путем изменения образующихся в клетке мРНК для Н-цепи. Предполагают, что это обусловлено изменением способа расщепления первичных РНК-транскриптов для Н-цепи и их 3'-концевого полиаденилирования. Две формы Н-цепи различаются только С-концевой областью: мембраносвязанная форма имеет гидрофобный «хвост», удерживающий ее в мембране, тогда как у секретируемой формы этот хвост гидрофильный, что позволяет ей выйти из клетки. Длинный полиаденилированный РНК-транскрипт, определяющий мембраносвязанную форму Н-цепи, имеет донорный и акцепторный сайты сплайсинга, что дает возможность удалить последовательность РНК, кодирующую гидрофильный хвост секретируемой формы. В отличие от этого короткий полиаденилированный РНК-транскрипт, определяющий секретируемую форму, имеет только донорный сайт сплайсинга; поэтому последовательность РНК, которая образуется в результате перекрестного разрыва-воссоединения, не может быть удалена.

μ-цепи с константными областями двух различных типов сначала казалась парадоксальной, так как В-клетка содержит лишь одну копию генного сегмента C_μ на гаплоидный геном и использует при выработке антител только один из имеющихся двух генных пулов для Н-цепей. Парадокс был разрешен, когда выяснилось, что активация В-клеток антигеном приводит к изменению способа процессинга РНК-транскриптов для μ-цепи в ядре, как показано на рис. 18-35 (см. также разд. 10.4.5). В переключении с мембраносвязанной на секретируемую форму антител других классов участвует сходный механизм.

18.4.7. В-клетки могут переключаться с выработки одного класса антител на выработку другого [25]

В ходе своего развития многие В-клетки переключаются с выработки антител одного класса на выработку антител других классов - процесс, называемый **переключением класса.** Все В-клетки начинают свою деятельность по синтезу антител с выработки молекул IgM, которые встраиваются в плазматическую мембрану и служат рецепторами для антигена. Затем, еще до взаимодействия с антигеном, большая часть В-клеток переходит к одновременному синтезу молекул IgM и IgD, используемых как мембраносвязанные антигенные рецепторы. При стимуляции антигеном некоторые из этих клеток активируются и начинают выделять антитела IgM, преобладающие в первичном гуморальном ответе (разд. 18.2.5). Другие стимулированные антигеном клетки переключаются на выработку антител классов IgG, IgE или IgA; клетки памяти несут эти антитела на своей поверхности (часто одновременно с IgM), а активные В-клетки их секретируют. Молекулы IgG, IgE и IgA в совокупности называют антителами *вторичных* классов, так как они, по-видимому, образуются только после антигенной стимуляции и преобладают во вторичных гуморальных ответах.

Класс антител определяется константной областью их Н-цепи (разд. 18.3.3). Поэтому способность В-клеток изменять класс вырабатываемых антител без изменения антиген-связывающего участка означает, что одна и та же собранная последовательность, кодирующая $V_н$-область, может в разное время ассоциироваться с разными генными

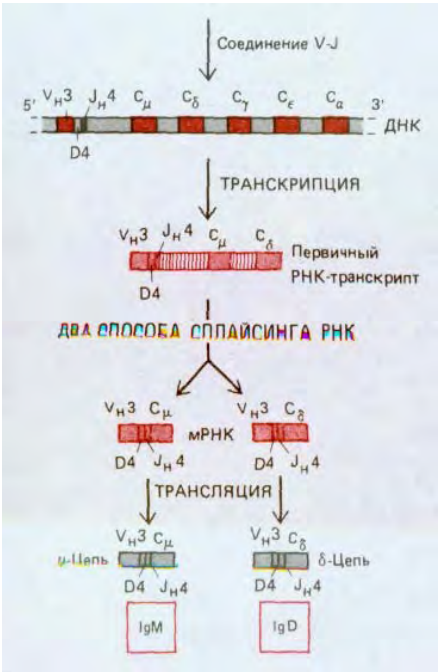


Рис. 18-36. В В-клетках, вырабатывающих одновременно мембраносвячанные антитела IgM и IgD с одними и теми же антигенсвязывающими участками, синтезируются длинные РНК-транскрипты, содержащие как C_μ, так и Cδ-последовательности. Такие транскрипты подвергаются сплайсингу двумя способами, приводящими к образованию молекул мРНК, у которых одна и та же $V_н$-последовательность соединена либо с C_μ, либо с Cδ-последовательностью. Возможно, что РНК-транскрипты, синтезируемые в таких клетках, еще длиннее и содержат все различные $C_н$-последовательности.

сегментами для $C_н$. Эта способность В-клеток имеет важный функциональный смысл: благодаря ей определенный антиген-связывающий участок, отобранный антигенами окружающей среды, может у данной особи быть распределен между всеми классами иммуноглобулинов и может, таким образом, приобрести все биологические свойства, характерные для каждого из классов.

Переключение класса происходит с помощью двух различных молекулярных механизмов. Когда виргильная В-клетка переходит от выработки одного лишь мембраносвязанного IgM к одновременному синтезу мембраносвязанных IgM и IgD, переключение происходит, вероятно, благодаря изменению процессинга РНК. Клетки продуцируют длинные первичные РНК-транскрипты, содержащие наряду с собранной последовательностью $V_н$-области как $C_μ$-, так и $C_δ$-последовательности. Затем благодаря альтернативному сплайсингу этих транскриптов образуются молекулы IgM и IgD (рис. 18-36). По-видимому, тот же механизм действует при переключении на другие классы мембраносвязанных Ig, когда виргильные В-клетки стимулируются антигеном и созревают в клетки памяти, несущие на своей поверхности IgG, IgE или IgA в качестве рецепторов для антигена.

По-иному происходит терминальное созревание активной В-клетки, секретирующей антитела одного из вторичных классов: оно сопровождается необратимым изменением на уровне ДНК - процессом, который называют *рекомбинацией переключения.* При этом происходит выпадение всех $C_н$-сегментов «сверху» (т. е. с 5'-стороны по кодирующей цепи) от определенного сегмента, предназначенного для экспрессии в клетке (рис. 18-37). Доказательство того, что этот этап переключения класса связан с делецией ДНК, было получено в опытах с клетками миеломы: оказалось, что клетки, секретирующие IgG, не содержат ДНК, кодирующей $C_μ$- и $C_δ$-области, а клетки, секретирующие IgA, не содержат ДНК для С-области Н-цепей всех остальных классов.

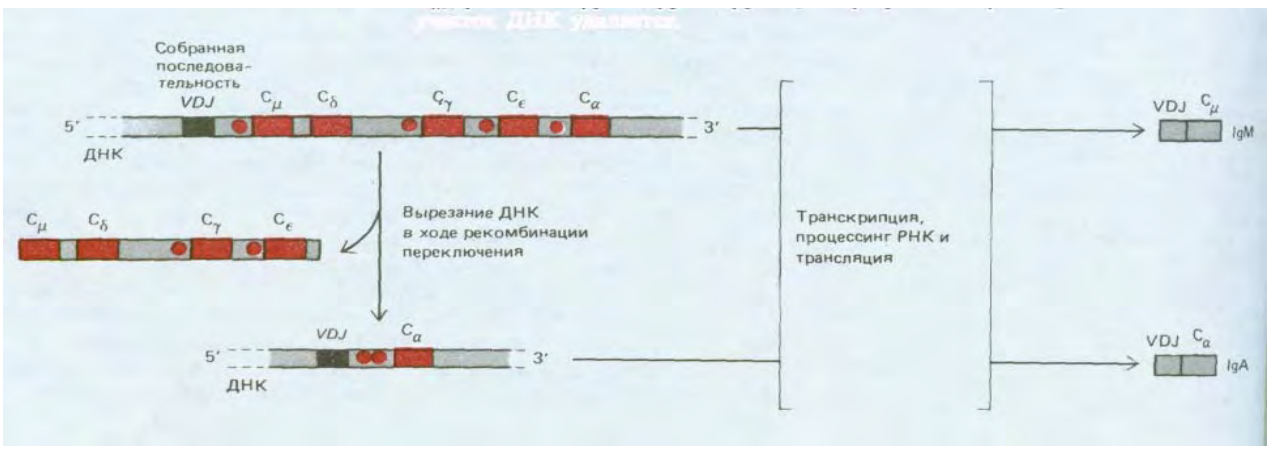


Рис. 18-37. Пример перестройки ДНК, происходящей при «переключении» $C_н$-областей. Когда В-клетка, вырабатывающая антитела IgM с участием собранной последовательности *VDJ,* стимулируется антигеном и созревает в клетку, секретирующую антитела IgA, происходит удаление участка ДНК между последовательностью *VDJ* и генным сегментом $C_α$. Специфицические участки ДНК *(переключающие последовательности,* показаны цветными кружками), расположенные «выше» каждого $C_н$-сегмента (за исключением $C_δ$), рекомбинируют друг с другом, и в результате промежуточный участок ДНК удаляется.

18.4.8. Идиотопы молекул антител служат основой иммунологической сети [26]

Антитела не только защищают организм от инфекций, но и играют важную роль в регуляции самих иммунных ответов. Окончание гуморального ответа на антиген бывает отчасти обусловлено связыванием секретируемых антител с антигеном, который в результате не может присоединяться к рецепторам В-клеток, поэтому стимуляция В-клеток прекращается. Наряду с таким простым ингибированием по типу обратной связи антитела могут участвовать и в более тонком механизме регуляции иммунитета, выступая как часть сложной **иммунологической сети.**

Иммуноглобулины сами могут действовать как антигены, и можно получить антитела, которые будут узнавать антигенные детерминанты как константных, так и вариабельных участков цепей Ig. Антигенные детерминанты (эпитопы) вариабельных областей L- и H-цепей, расположенные на антиген-связывающем участке антитела, называются **идиотопами** (рис. 18-38). Каждый специфический антиген-связывающий участок имеет свой характерный набор идиотопов, поэтому у животного, обладающего миллионами различных антиген-связывающих участков, будут также миллионы различных идиотопов. Поскольку в организме каждый отдельный идиотоп присутствует в очень малом количестве, животное не толерантно к своим собственным идиотопам, и если его надлежащим образом иммунизировать каким-либо из его собственных антител, организм животного будет давать и Т-, и В-клеточные иммунные ответы.

Можно ожидать, что животное, иммунизированное антигеном А, будет сначала вырабатывать большие количества антител к А, затем антитела к идиотопам этих антител к А, а затем в свою очередь антитела к антиидиотопическим антителам и т. д. Действительно, такой тип реакций, дающий «сеть» антител, был продемонстрирован при некоторых иммунных ответах, однако его роль в иммунорегуляции остается неясной.

Как мы увидим позже, рецепторы Т-клеток имеют много общего с мембраносвязанными антителами: они существуют в миллионах форм, каждая из которых имеет свой собственный антиген-связывающий участок и набор идиотопов. По-видимому, в организме животного содержатся как антитела, так и Т-клеточные рецепторы, узнающие большую часть собственных идиотопов организма. При этом в среднем, вероятно, антиген-связывающий участок узнаёт по меньшей мере один идиотоп собственной иммунной системы организма. Таким образом, антиген-связывающие участки иммунной системы потенциально объединены в сложную сеть взаимодействий антиидиотопов (рис. 18-39). Подобно нейронам в нервной системе, многие лимфоциты, возможно, в

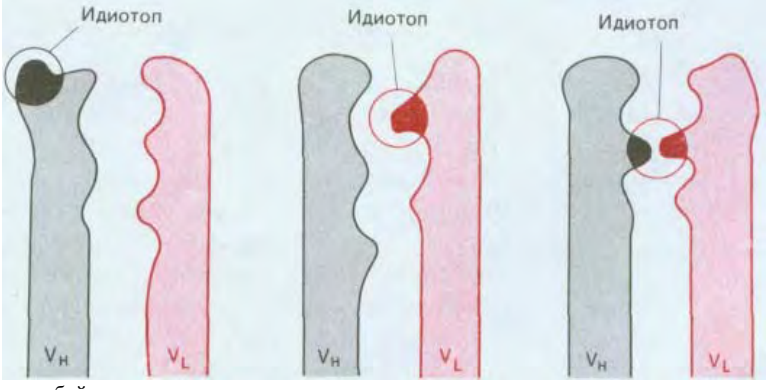


Рис. 18-38. Идиотоп представляет собой антигенную детерминанту молекулы антитела, находящуюся в антиген-связывающем участке или около него. Он может быть образован областью V_H, областью V_L или обеими областями. Каждый из различных антиген-связывающих участков имеет свой собственный уникальный набор идиотопов, который составляет его *идиотип.* Идиотопы ассоциированы также и с антиген-связывающими участками Т-клеточных рецепторов.



Рис. 18-39. Отдельный лимфоцит может быть функционально связан с другими лимфоцитами через взаимодействия идиотоп - антиидиотоп. Размеры такой идиотопической сети в принципе могут быть огромными, так как каждый лимфоцит, взаимодействующий, как показано на рисунке, с анти-А-лимфоцитом, может сходным образом реагировать и с другими лимфоцитами. Пока не ясно, насколько взаимодействия антиидиотопического типа важны для регуляции иммунных ответов.

большей степени взаимодействуют друг с другом, чем с окружающим миром, и тогда иммунный ответ можно было бы рассматривать не как ответ независимых реагирующих с антигеном лимфоцитов, а как реверберирующее возмущение иммунологической сети.

Заключение

*Антитела синтезируются при участии трех пулов генных сегментов, кодирующих соответственно ***-, λ- и Н-цепи. В каждом пуле отдельные генные сегменты, кодирующие разные части вариабельных областей L и и Н-цепей, соединяются путем сайт-специфической рекомбинации в процессе дифференцировки В-клеток. Пулы для L-цепей содержат один или несколько константных (С) генных сегментов и наборы вариабельных (V) и соединительных (J) генных сегментов. Пул для Н-цепей содержит набор С-сегментов и наборы V-, D- и J-сегментов. Для того чтобы синтезировалась молекула антитела, нужно, чтобы V_L-сегмент присоединился к J_L-сегменту с образованием последовательности ДНК, кодирующей V-область легкой цепи, а $V_н$-сегмент соединился с D- и $J_н$-сегментами с образованием отрезка ДНК, кодирующего V-областъ тяжелой цепи. Каждый из собранных генных сегментов котранскрибируется затем вместе с соответствующей последовательностью С-области, что дает молекулу мРНК, кодирующую всю полипептидную цепь. Комбинируя различным образом унаследованные генные сегменты, кодирующие V_L и $V_н$-области, позвоночные могут вырабатывать тысячи различных L-цепей и тысячи различных Н-цепей, которые могут объединяться с образованием миллионов разных антиген-связывающих участков. Это число еще больше увеличивается в результате выпадения и вставки нуклеотидов в процессе соединения генных сегментов и в результат соматических мутаций, происходящих в этих сегментах с очень высокой частотой вслед за антигенной стимуляцией.*

Все В-клетки вначале вырабатывают антитела IgM. Некоторые затем образуют антитела других классов, имеющие, однако, тот же антиген-связывающий участок, что и исходные антитела IgM. Такое переключение класса позволяет одним и тем же антиген-связывающи участкам распределяться между антителами с различными биологическими свойствами.

18.5. Система комплемента

Комплемент, получивший свое название благодаря тому, что он *комплементирует* (дополняет) и усиливает действие антител, представляет собой главное орудие, с помощью которого антитела защищают организм позвоночного от большинства бактериальных инфекций. Он представляет собой систему сывороточных белков, которые могут активироваться комплексами антиген-антитело или микроорганизмами и претерпевать каскад протеолитических реакций, конечный результат которого - сборка *комплексов, атакующих мембраны.* Такие комплексы проделывают в мембране микроорганизма отверстия, тем самым убивая его. В то же время протеолитические фрагменты, освобождаемые в процессе

активации, усиливают защитную реакцию путем расширения кровеносных сосудов и привлечения фагоцитирующих клеток к местам инфекции. Кроме того, комплемент повышает способность фагоцитирующих клеток связывать, поглощать и разрушать атакуемые ими микроорганизмы.

Лица с недостаточностью одного из главных компонентов комплемента (С3) подвержены частым бактериальным инфекциям, точно так же как и лица с недостаточностью самих антител. У комплемент-дефицитных индивидуумов возможны также болезни, связанные с осаждением иммунных комплексов (комплексов антиген-антитело) в небольших кровеносных сосудах кожи, суставов, почек и мозга, где эти комплексы вызывают воспаление и разрушение ткани. Поэтому можно думать, что комплемент в норме способствует растворению таких комплексов, когда они образуются в процессе иммунного ответа.

18.5.1. Активация комплемента представляет собой усилительный механизм в форме каскада протеолитических реакций; центральную роль играет расщепление белка С3 [27]

Комплемент состоит примерно из 20 взаимодействующих белков; часть из них - реагирующие компоненты (С1-С9, фактор В и фактор D), а остальные - регуляторные. Все это растворимые белки. Они образуются главным образом в печени и циркулируют в крови и тканевой жидкости. Большинство из них неактивно до тех пор, пока не будет приведено в действие либо непосредственно внедрившимся микроорганизмом, либо через посредство иммунного ответа. Окончательный результат активации комплемента - объединение **поздних компонентов комплемента** (С5, С6, С7, С8 и С9) в большой комплекс, атакующий мембраны, который вызывает лизис микробной клетки.

Поскольку главная функция комплемента - атака на мембраны микробных клеток, его активация в основном происходит на клеточной мембране микроорганизма, где она запускается либо антителом, связавшимся с микробной клеткой, либо полисахаридами ее оболочки. В обоих случаях активируются **ранние компоненты** комплемента. Существуют два набора ранних компонентов, принадлежащие двум разным путям активации комплемента: С1, С2 и С4 относятся к *классическому пути,* который приводится в действие связыванием антитела; фактор В и фактор D относятся к *альтернативному пути,* который запускается микробными полисахаридами. Ранние компоненты обоих путей действуют в конце концов на С3 - наиболее важный компонент комплемента (рис. 18-40). Ранние компоненты и С3 - проферменты, последовательно активируемые путем ограниченного протеолиза. Когда какой-либо из них специфическим образом расщепляется, он становится активной сериновой протеазой, способной расщеплять следующий профермент, и т. д. Многие из этих актов протеолиза приводят к отделению малого пептидного фрагмента и обнажению участка связывания с мембраной на большом фрагменте. Большой фрагмент прочно присоединяется к мембране клетки-мишени с помощью этого участка и способствует протеканию следующего этапа в цепи реакций. Таким образом, процесс активации комплемента ограничен главным образом той клеточной поверхностью, где он начался. Малый фрагмент нередко действует независимо - как способная к диффузии сигнальная молекула, стимулирующая воспалительную реакцию (разд. 18.5.4).

Активация С3 путем его расщепления - главная реакция цепи активации комплемента; именно здесь сходятся классический и альтернативный пути (см. рис. 18-40). В обоих случаях С3 расщепляется ферментным комплексом, называемым **С3-конвертазой.** Два разных пути приводят



Рис. 18-40. Основные этапы активации комплемента по классическому и альтернативному пути. Реакции активации комплемента в обоих случаях обычно происходят на поверхности внедрившегося микроорганизма, например бактерии.

к образованию разных С3-конвертаз, которые получаются в результате спонтанного объединения двух компонентов комплемента, активированных на более раннем этапе. Обе конвертазы расщепляют С3 на два фрагмента. Больший из них (С3b) ковалентно связывается с мембраной клетки-мишени и присоединяет С5. Будучи связанным, белок С5 расщепляется С3-конвертазой (которая теперь действует как С5-конвертаза) и в результате инициирует спонтанную сборку комплекса, атакующего мембраны, из поздних компонентов - от С5 до С9.

Поскольку каждый активированный фермент расщепляет много молекул следующего профермента, протеолитический каскад активации ранних компонентов действует как *усилитель:* каждая молекула, активированная в начале всей цепи, вызывает образование множества комплексов, атакующих мембраны.

18.5.2. Классический путь активируется комплексами антиген-антитело [27, 28]

Классический путь обычно активируется, когда антитела IgG или IgM связываются с антигенами на поверхности микроорганизма. Связывание антигена с антителами в свою очередь приводит к тому, что константные области антител связывают первый компонент классического пути, С1, который представляет собой большой комплекс, состоящий из трех субкомпонентов - Clq, Clr и Cls (рис. 18-41). Связывание глобулярной «головки» Clq с антителом IgM или IgM, присоединенным к антигену, активирует Clq, и в результате запускается ранний протеолитический каскад классического пути. Однако прежде чем произойдет активация, таким способом должна быть связана более чем одна «головка»; поэтому для включения классического пути нужна целая группа чужеродных антигенных детерминант (рис. 18-41, Б). Это тоже служит для концентрирования процессов активации комплемента на поверхности микроорганизмов, где антигенные детерминанты обычно расположены тесными группами. Активация субкомпонента Clq комплекса С1 активирует Clr, который приобретает протеолитическую активность и в свою очередь расщепляет и активирует Cls. Активированный Cls затем расщепляет С4 на два фрагмента, С4а и С4b (образующийся в результате такого рода протеолиза больший фрагмент принято обозначать b, а меньший фрагмент -а); С4b сразу же ковалентно пришивается к мембране и затем связывает С2. Будучи связанным, С2 также расщепляется активирован-

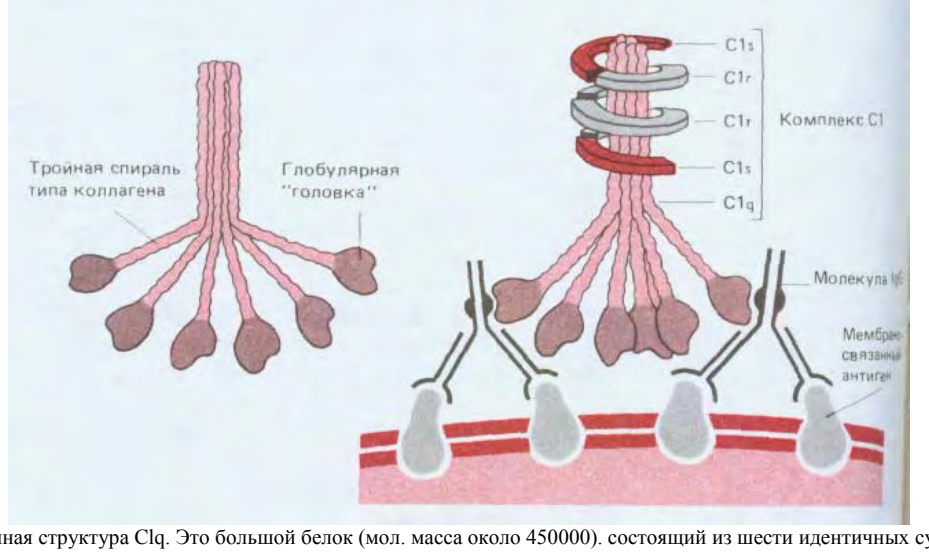


Рис. 18-41. *А.* Необычная структура Clq. Это большой белок (мол. масса около 450000). состоящий из шести идентичных субъединиц, каждая из которых в свою очередь построена из трех разных полипептидных цепей. С-концевые половины всех трех цепей каждой субъединицы образуют глобулярную структуру; N-концевые половины имеют аминокислотную последовательность, типичную для коллагена, и скручены в тройную спираль коллагенового типа (см. разд. 14.2.6). Все шесть субъединиц сшиты друг с другом дисульфидными связями между трехспиральными «хвостами» и образуют структуру, напоминающую пучок тюльпанов. К глобулярным «головкам» этой структуры могут присоединяться антитела IgG или IgM. Таким образом, каждая молекула Clq имеет шесть участков связывания антител. *Б.* Связывание С1 с двумя молекулами IgG, присоединенными к группе антигенных детерминант на поверхности клетки-мишени. Каждый комплекс С1 состоит из одной молекулы Clq, непрочно связанной с тетрамером, который составлен из двух молекул Clr и двух молекул Cls (тетрамер показан схематично).

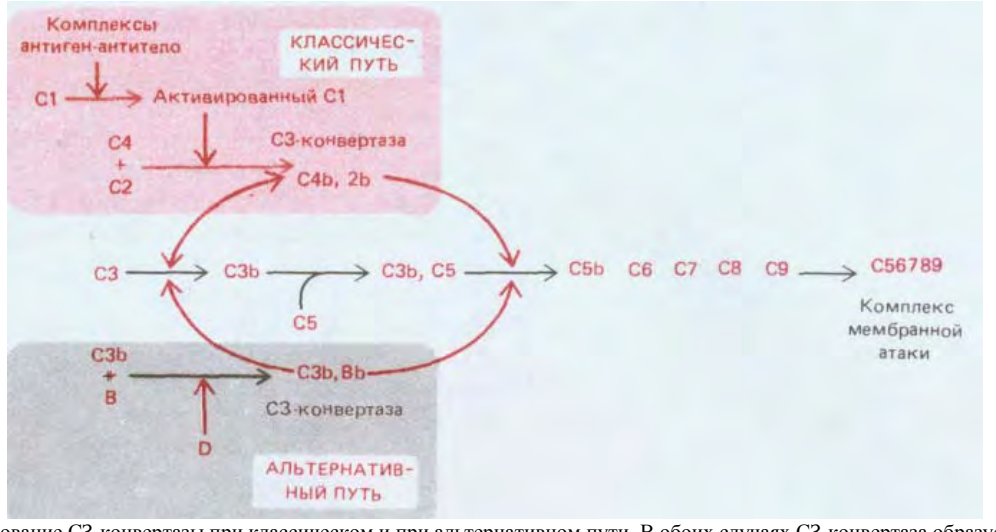


Рис. 18-42. Образование C3-конвертазы при классическом и при альтернативном пути. В обоих случаях C3-конвертаза образуется в результате соединения двух компонентов комплемента, активированных ранее в цепи протеолитического каскада. Белки C3 и C5 гомологичны. Связав C3b, C5 становится похожим на C3 и расщепляется C3-конвертазой (работающей как C5-конвертаза) с образованием C5b, который инициирует сборку комплекса, атакующего мембраны. Активированные компоненты комплемента часто обозначают с помощью верхней черты (например, активированный C1 - как C1); чтобы упростить текст, мы не пользовались этим обозначением.

ным C1s; больший фрагмент, C2b, остается связанным с C4b, образуя комплекс C4b,2b, который представляет собой C3-конвертазу классического пути. Как показано на рис. 18-42, C4b,2b расщепляет C3 на два фрагмента - C3a и C3b. Фрагмент C3b быстро связывается с мембраной-мишенью и присоединяет к себе C5. Связанный C5 расщепляется комплексом C4b,2b на C5a и C5b (вспомним, что C3-конвертаза - это также и C5-конвертаза). Фрагмент C5b соединяется с C6, в результате чего инициируется сборка поздних компонентов с образованием комплекса, атакующего мембраны.

18.5.3. Альтернативный путь может прямо активироваться микроорганизмами [27, 29]

Полисахариды клеточных стенок микроорганизмов даже в отсутствие антител могут прямо активировать **альтернативный путь.** Активация классического пути тоже активирует альтернативный путь с помощью положительной обратной связи. Таким образом, альтернативный путь обеспечивает первую линию обороны от инфекции, пока не сформировался иммунный ответ, и усиливает действие классического пути после начала иммунного ответа.

Хотя мы говорим, что полисахариды микробов прямо активируют альтернативный путь, однако это лишь упрощенная схема. На самом деле этот путь активируется фрагментом C3b, а роль полисахаридов состоит в том, чтобы предохранить C3b от быстрой инактивации под действием механизма, который защищает окружающие нормальные клетки от атаки активированного комплемента (см. ниже). C3b, приводящий в действие альтернативный путь, образуется либо классическим путем (отсюда петля положительной обратной связи), либо путем спонтанного протеолиза C3, который происходит с малой скоростью даже тогда, когда каскад комплемента не запущен.

Следующий этап активации альтернативного пути - присоединение фактора B к мембраносвязанному C3b. Затем циркулирующий в крови в активной форме фактор D расщепляет связанный фактор B с образованием активного фрагмента Bb, и в результате получается C3b, Bb - C3-конвертаза альтернативного пути, под действием которой образуются дополнительные молекулы C3b; некоторые из них связывают C5. Как и в классическом пути, C3-конвертаза может служить и C3-конвертазой. C3-конвертаза расщепляет мембраносвязанные молекулы C3

и таким образом инициирует сборку комплекса, атакующего мембраны (см. ниже, рис. 18-43).

Повреждение мембран нормальных клеток собственного организма комплементом, активированным по классическому пути, предотвращается тем, что для активации C1 нужны связанные антитела. Альтернативный путь, однако, активируется фрагментом C3b, который может связаться с любой мембраной и, как уже говорилось, с небольшой скоростью образуется спонтанно. Поэтому необходимы специальные механизмы защиты собственных нормальных клеток от такого рода атаки. В отличие от больших скоплений C3b, формирующихся по классическому пути, большая часть спонтанно образующегося C3b связывается с мембранами в виде одиночных молекул. Здесь они быстро инактивируются специфическим белком-ингибитором - фактором H, который конкурирует с фактором B за связывающий участок на C3b; C3b, связанный с микробными мембранами, защищен от этого ингибиторного белка (механизм защиты неизвестен) полисахаридами клеточной стенки микробов. Поэтому такие молекулы C3b могут связывать фактор B и таким образом активировать альтернативный путь.

18.5.4. Активация комплемента способствует фагоцитозу и воспалению [27]

Фрагмент C3b, образующийся как при классическом, так и при альтернативном пути, обладает рядом важных свойств. Как мы уже видели, он активирует альтернативный путь с образованием добавочных количеств C3b и связывает C5, обеспечивая расщепление его C3-конвертазой. Однако комплемент работает не только на образование комплексов, атакующих мембраны; C3b играет еще и третью важную роль: он присоединяется к специфическим рецепторным белкам на макрофагах и нейтрофилах и повышает способность этих клеток фагоцитировать ту микробную клетку, к которой уже присоединился C3b. Таким образом, C3b вносит решающий вклад в защиту от бактерий, независимую от лизиса клеток под действием комплемента.

В ходе каскадной протеолитической активации комплемента образуется несколько небольших биологически активных белковых фрагментов. Из них наиболее важны C3a и C5a. Оба этих фрагмента представляют собой пептиды с сильными основными свойствами, отщепляемые от N-концов исходных белков; оба вызывают сокращение гладкой мускулатуры и стимулируют секрецию гистамина тучными клетками и базофилами. Гистамин местно увеличивает проницаемость кровеносных сосудов, что позволяет лейкоцитам и дополнительным количествам антител и комплемента проникать в места инфекции. C5 служит также мощным хемоаттрактантом для нейтрофилов и усиливает механизмы, с помощью которых эти клетки уничтожают поглощенные бактерии. Именно эти два пептида в основном ответственны за местную воспалительную реакцию, которой обычно сопровождается активация комплемента.

18.5.5. В результате сборки поздних компонентов комплемента образуется гигантский комплекс, атакующий мембраны [27, 30]

Сборка поздних компонентов начинается с того, что C5 (уже слабо связанный с C3b на мембране клетки-мишени) расщепляется C3-конвертазой классического или альтернативного пути с образованием C5a и C5b. Как мы только что видели, C5a освобождается и способствует воспалительной реакции. C5b остается связанным с C3b и временно имеет способность присоединять C6 с образованием C56, а потом C7

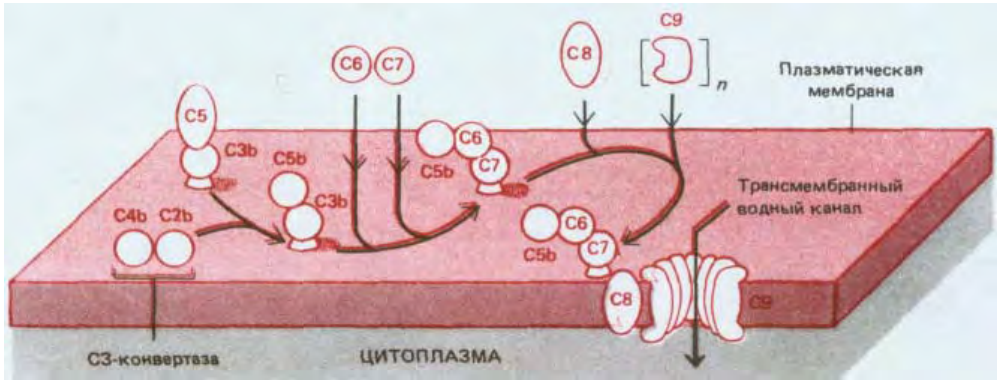


Рис. 18-43. Сборка поздних компонентов комплемента *с* образованием комплекса, атакующего мембраны. Связывание молекулы С9 с С5678 индуцирует в С9 конформационное изменение, которое приводит к обнажению гидрофобной области и встраиванию С9 в липидный бислой клетки-мишени рядом с С8. Это инициирует цепную реакцию: измененный С9 связывает вторую молекулу С9, которая претерпевает конформационное изменение и встраивается в бислой, где может связать следующую молекулу С9, и так далее. Таким образом цепь молекул С9 формирует широкий трансмембранный канал. Конечный комплекс С5678(9) может содержать до 18 молекул С9 и иметь мол. массу около 2 млн. (каждая молекула С9 содержит 537 аминокислотных остатков). Комплексы С5678 сами по себе образуют небольшие трансмембранные поры.

с образованием С567. Затем комплекс С567 через С7 прочно связывается с мембраной. К этому комплексу добавляется одна молекула С8, и образующийся С5678 связывает от 8 до 18 молекул С9, которые частично разворачиваются и полимеризуются, формируя трансмембранный канал (рис. 18-43). Изученные последовательности ДНК позволяют предполагать, что белки С6, С7, С8 и С9 эволюционно родственны между собой.

Комплексы, атакующие мембраны, после негативного контрастирования имеют на электронных микрофотографиях характерный вид: они образуют водные поры, пронизывающие мембрану (рис. 18-44). По этой причине, а также благодаря нарушению структуры близлежащего липидного бислоя мембрана становится легко проницаемой. Поскольку малые молекулы могут проходить сквозь мембрану около комплексов и через них, а макромолекулы остаются в клетке, нарушается нормальный клеточный механизм контроля водного баланса (см. схему 6-1, т. 1). Поэтому клетка путем осмоса поглощает воду и в результате набухает и лопается. Этот процесс настолько эффективен, что очень небольшое число комплексов, атакующих мембраны (возможно, даже один), может убить эритроцит. Комплексы могут разрушать даже вирус, имеющий оболочку, для которого не характерна большая разность осмотического давления по обе стороны мембраны и который поэтому не подвержен осмотическому лизису; вероятно, это происходит из-за дезорганизации мембраны вируса.

18.5.6. Каскад комплемента точно регулируется [27, 31]

Поскольку каскад комплемента действует как усилитель и может приводить к разрушению клеток, необходимо, чтобы ключевые активные компоненты инактивировались вскоре после их появления и атака не распространялась на близлежащие клетки собственного организма. Это достигается по меньшей мере двумя способами. Прежде всего, специфические белки-ингибиторы, содержащиеся в крови, останавливают каскад путем связывания или расщепления определенных компонентов, стоит им только активироваться в результате протеолиза. Например, некоторые белки-ингибиторы присоединяются к активированным компонентам комплекса С1 и прекращают их действие, в то время как другие расщепляют и тем самым инактивируют С3b. Без этих ингибиторов весь сывороточный С3 мог бы быть израсходован из-за положительной обратной связи в цепи реакций альтернативного пути.

Второй важный механизм регуляции основан на нестабильности многих активированных компонентов каскада: если они не связываются тотчас же с определенным другим компонентом или с близлежащей мембраной, они быстро инактивируются. Особенно ярким примером

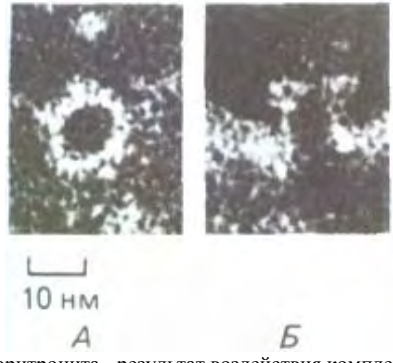


Рис. 18-44. Отверстия в плазматической мембране эритроцита - результат воздействия комплемента. Электронные микрофотографии (негативный контраст). На фото *А* отверстие видно сверху, на фото Б-сбоку. Контрастирующее вещество заполняет отдельные каналы, и поэтому они выглядят темными. (R. Dourmashkin, Immunology, 35, 205-212, 1978.)

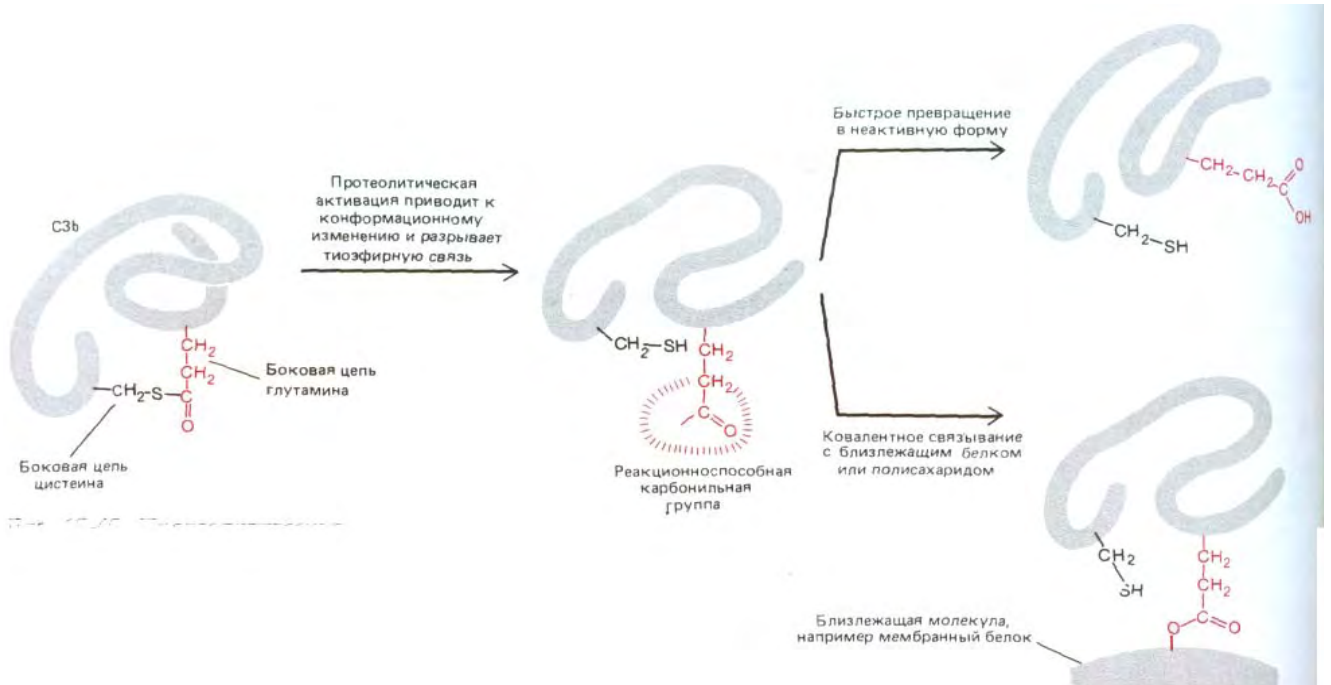


Рис. 18-45. Протеолитическая активация C3 или C4 ведет к изменению конформации белка. При этом разрывается показанная на рисунке необычная внутримолекулярная ковалентная связь. В результате разрыва этой тиоэфирной связи между боковыми цепями белка образуется весьма реакционноспособная карбонильная группа, которая ковалентно присоединяется к другой макромолекуле, образуя с ней эфирную или амидную связь. Однако способность белка реагировать таким образом падает со временем полужизни около 60 мкс; поэтому он связывается только с мембранами, расположенными очень близко к тому месту, где началась активация комплемента. Как C3, так и C4 состоят более чем из одной полипептидной цепи; показанные на рисунке реакции претерпевает в каждом из белков цепь наибольшего размера.

служат активированные C4b и C3b. Когда любой из них образуется путем расщепления предшественника, он претерпевает ряд быстрых конформационных изменений, приводящих к короткоживущей активной форме. Такая активная форма имеет гидрофобный участок, а также боковую цепь глутамина с высокой реакционной способностью, образующуюся при механическом разрыве необычной тиоэфирной связи в белке (рис. 18-45). В результате глутамин образует ковалентную связь с белком или полисахаридом на близлежащей мембране. Поскольку время полужизни активных форм C4b и C3b очень мало (менее 0,1 мс), они обычно успевают связаться только с тем участком мембраны, который находится совсем близко к месту активации компонентов комплемента. Поэтому атака комплемента ограничивается лишь поверхностной мембраной микроба и не распространяется на окружающие нормальные клетки собственного организма.

Как в процессе эволюции могла выработаться столь сложная система? Можно предполагать, что это происходило путем последовательных шагов. При этом, видимо, многие из самых сложных компонентов, таких как комплекс, атакующий мембраны, появились сравнительно поздно. Кажется вероятным, что система первоначально формировалась вокруг компонента C3 и обеспечивала образование ковалентного комплекса между C3b и мембранами чужеродных клеток. Этот комплекс сам по себе значительно усиливает способность макрофагов и нейтрофилов поглощать и разрушать микроорганизмы. Однако люди, у которых отсутствует один из поздних компонентов и поэтому не может быть собран атакующий комплекс, защищены тем не менее от большинства бактериальных инфекций. Исключение составляют лишь немногие бактерии, способные выживать внутри фагоцитирующей клетки; поэтому для защиты от них особенно важен лизис, осуществляемый комплементом. Полагают, что и альтернативный, и классический пуп ведут свою эволюцию от такой примитивной системы комплемента. Вероятно, вначале возник альтернативный путь как механизм врожденной неспецифической защиты от инфекции, и лишь значительно позже

выработался классический путь, в котором активация С3 сопряжена со связыванием антител и тем самым - со специфическими приспособительными иммунными реакциями. Представление об эволюционном родстве двух путей согласуется с тем, что многие из их компонентов гомологичны, включая сериновые протеиназы C1r, C1s, C2, фактор B и фактор D.

Заключение

Система комплемента действует сама по себе и совместно с антителами, защищая организм позвоночного от инфекции. Ранние компоненты комплемента представляют собой проферменты крови, которые последовательно активируются в усилительном каскаде реакций ограниченного протеолиза. Этот процесс может протекать либо по классическому пути, который запускается связыванием антител IgG или IgM с антигеном, либо по альтернативному пути, который может запускаться непосредственно клеточными стенками внедрившихся микроорганизмов. Наиболее важный компонент комплемента - белок ИС3, активируемый в результате протеолитического расщепления и затем ковалентно связывающийся с близлежащими мембранами. Микроорганизмы, несущие на своей поверхности активированный С3 (С3b), легко поглощаются и уничтожаются фагоцитирующими клетками. Кроме того, С3b помогает инициировать сборку поздних компонентов, которые образуют большой комплекс мембранной атаки, вызывающий лизис внедряющихся микроорганизмов. При активации комплемента освобождается также ряд небольших растворимых пептидных фрагментов, привлекающих и активирующих нейтрофилы и стимулирующих секрецию гистамина тучными клетками; это приводит к воспалительной реакции в местах активации комплемента. Протеолитический каскад комплемента остается «привязанным» к мембранам внедрившихся микроорганизмов, активировавших этот каскад, главным образом благодаря тому, что некоторые из компонентов, включая С3b, остаются активными менее 0,1 миллисекунды и поэтому не могут распространить атаку на близлежащие собственные клетки организма.

18.6. Т-лимфоциты и клеточный иммунитет

Разнообразные реакции Т-клеток в совокупности называют *иммунным ответом клеточного типа.* Как и образование антител, эти реакции играют у позвоночных важную роль в защите от инфекции, особенно от некоторых вирусов и грибов. Так же как и ответы, связанные с выработкой антител, они высокоспецифичны в отношении антигена.

Существует, однако, несколько важных особенностей, отличающих Т-клетки от В-клеток.

1) Некоторые Т-клетки прямо сражаются с инфекцией путем уничтожения клеток, инфицированных вирусом, но большинство Т-клеток регулирует активность других эффекторных клеток, таких как В-клетки и макрофаги.

2) Как эффекторные, так и регуляторные Т-клетки действуют в основном на коротких расстояниях, прямо взаимодействуя с клетками, которые они убивают или активность которых регулируют. В-клетки, напротив, выделяют антитела, распространяющиеся очень далеко от места их образования.

3) Вероятно, по этой причине Т-клетки связывают чужеродный антиген только тогда, когда он находится на поверхности другой клетки собственного организма; антиген узнается в ассоциации с особым классом гликопротеинов клеточной поверхности, называемых MHC; эти

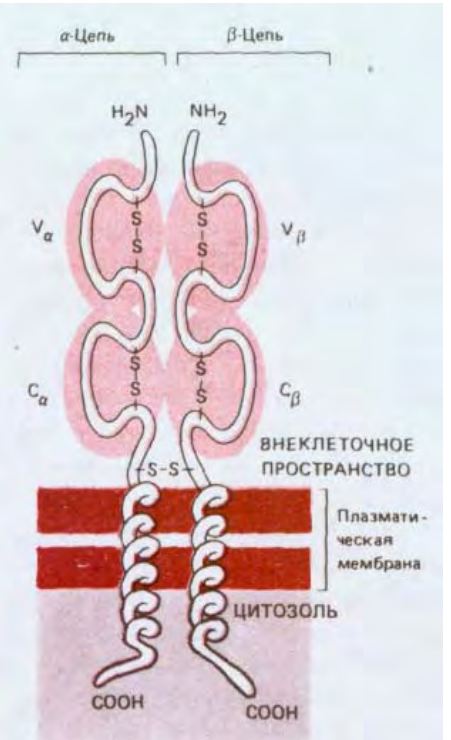


Рис. 18-46. Т-клеточный рецептор -гетеродимер, состоящий из полипептидных цепей α и β обе цепи гликозилированы (не показано). Каждая из цепей имеет длину в 280 аминокислот; большая внеклеточная часть каждой цепи свернута в два Ig-подобных домена - один вариабельный (V) и один константный (С). Исходя из анализа аминокислотных последовательностей (выведенных из последовательностей клонированных кДНК), полагают, что антиген-связывающий участок, образуемый доменами V_α и V_β, по общим размерам и геометрии сходен с антиген-связывающим участком молекулы антитела. Однако в отличие от антител, имеющих два участка для связывания антигена, Т-клеточные рецепторы имеют лишь один такой участок (вероятно, потому, что они всегда связаны с плазматической мембраной, где могут действовать кооперативно). Показанный здесь α/β-гетеродимер нековалентно ассоциирован с инвариантным набором мембранных белков - так называемым комплексом CD3 (не показан). Типичная Т-клетка имеет на своей поверхности от 20000 до 40000 α/β-белков.

молекулы названы так потому, что они кодируются комплексом генов, получивших название *главного комплекса гистосовместимости* (major histocompatibility complex, MHC) (см. разд. 18.6.5). В результате активация Т-клеток происходит только при их контакте с другой собственной клеткой; это наиболее важное различие между процессами узнавания антигена Т- и В-клетками.

18.6.1. Т-клеточные рецепторы представляют собой антителоподобные гетеродимеры [32]

Поскольку Т-клетки активируются только в результате тесного контакта с другими клетками, их рецепторы для антигенов существуют только в мембраносвязанной форме. Поэтому такие рецепторы было трудно выделить - в отличие от антител, которые секретируются (но могут быть и мембраносвязанными), и значительно больше времени потребовалось на то, чтобы идентифицировать эти молекулы и кодирующие их гены, Первые рецепторные белки были выделены в 1983 г., после того как стало возможным выращивать в культуре чистые клоны антиген-специфических Т-клеток (разд. 18.6.11), что позволило иметь большие количества Т-клеток с идентичными рецепторами. Затем могли быть получены моноклональные антитела против клонированных клеток, и те из них, которые узнают Т-клеточный рецептор, были идентифицированы по их способности блокировать вызванные антигеном ответы исходных клеток, но не ответы других Т-клеточных клонов. Эти антитела были затем использованы для очистки молекул рецепторов; оказалось, что рецептор состоит из двух полипептидных цепей α и β, соединенных дисульфидными связями. Каждая из этих цепей имеет отличительную особенность, общую у них с антителами, - наличие вариабельной N-концевой и константной С-концевой областей (рис. 18-46).

Примерно год спустя эти черты сходства с антителами стали важным элементом остроумного способа выделения генов, кодирующих Т-клеточные рецепторы. Т- и В-лимфоциты близко родственны, поэтому большинство генов транскрибируется у них одновременно, и, значит, они содержат в основном одни и те же мРНК; однако мРНК для Т-клеточного рецептора содержат только Т-клетки. Исследователи взяли суммарную мРНК Т-клеточных клонов, гибридизацией на истощение удалили мРНК, содержащуюся также и в В-клетках (разд. 5.6.4), и получили небольшую популяцию мРНК, свойственную только Т-клеткам, Затем из этой мРНК приготовили библиотеку кДНК (разд. 5.6.3) и использовали индивидуальные клоны кДНК из этой библиотеки дм получения радиоактивных ДНК-зондов. Предполагая, что вариабельность N-концов Т-клеточных рецепторных белков (как и V-областей антител) создается путем перестроек ДНК, каждый из ДНК-зондов использовали затем для анализа соответствующих геномных ДНК в попытке выявить перестройки в процессе развития Т-клеток. Таким путем в конце концов были локализованы (на разных хромосомах) генные пулы, кодирующие α- и β-цепи. Было показано, что эти пулы, та же как и генные пулы для антител, содержат отдельные V-, D-, J- и С-сегменты, которые объединяются путем сайт-специфической рекомбинации в процессе развития Т-клеток в тимусе.

За одним исключением, все механизмы, используемые В-клетками для создания разнообразия антител, используются также и Т-клетками для создания разнообразия Т-клеточных рецепторов. Полагают, однако, что у Т-клеток особенно важную роль играют механизмы, связанные с выпадением и вставкой нуклеотидов при соединении генных сегментов, Но зато здесь, по-видимому, не используется механизм соматического гипермутирования, приводимый в действие антигеном (разд. 18.4,4).

Причина этого, возможно, состоит в том, что при гипермутировании могли бы возникать Т-клетки, реагирующие со «своими» молекулами. Такого рода проблема гораздо менее существенна для В-клеток, так как большая часть В-клеток, реагирующих на «свое», не могла бы активироваться без помощи реагирующих на «свое» Т-клеток-хелперов (разд. 18.6.12).

Недавно были обнаружены Т-клеточные рецепторы второго типа-гетеродимеры, состоящие из γ- и δ-цепей. Эти рецепторы экспрессируются на субпопуляциях клеток с неизвестными функциями в тимусе, эпидермисе и кишечном эпителии.

Как α/β-, так и γ/δ-Т-клеточные рецепторы физически ассоциированы на поверхности клетки с одним и тем же набором полипептидных цепей - так называемым *комплексом ТЗ* (или *CD3).* Этот комплекс имеется на поверхности всех зрелых Т-клеток. Полагают, что он участвует в передаче сигнала от активированного антигеном Т-клеточного рецептора внутрь клетки.

18.6.2. Различные ответы Т-лимфоцитов опосредуются разными классами этих клеток [33]

Т-лимфоциты убивают клетки, инфицированные вирусами, а также способствуют или противодействуют ответам других лейкоцитов. Эти три функции осуществляются разными классами Т-лимфоцитов - *цитотоксическими Т-клетками, Т-клетками-хелперами* (или *индукторами)* и *Т-клетками-супрессорами* соответственно. Цитотоксические Т-клетки вместе с В-клетками - это главные эффекторные клетки иммунной системы; Т-хелперы и Т-супрессоры вместе называют *Т-клетками-регуляторами.*

Из трех основных классов Т-клеток мы меньше всего знаем о Т-супрессорах. Известно, например, что Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки используют для узнавания антигена одни и те же рецепторы (α/β-гетеродимеры), тогда как природа рецепторов, используемых Т-супрессорами, пока неясна (хотя по крайней мере некоторые из них, видимо, тоже используют α/β-гетеродимеры). Одна из причин ограниченности наших знаний о Т-супрессорах состоит в том, что было чрезвычайно трудно получить в культуре клоны этих клеток, в то время как получать антиген-специфичные клоны цитотоксических Т-клеток и Т-хелперов сравнительно легко (разд. 18.6.11).

Хотя цитотоксические Т-клетки и Т-хелперы используют антигенные рецепторы, кодируемые одними и теми же пулами генных сегментов, они не могут узнавать одни и те же молекулы МНС на поверхности клеток. Такое различие отражает разные функции клеток этих двух типов.

18.6.3. Цитотоксические Т-лимфоциты убивают клетки, инфицированные вирусами [34]

Вирусы воспроизводятся внутри клеток, где они укрыты от воздействия антител; поэтому наиболее эффективный способ предотвратить их распространение на другие клетки состоит в том, чтобы убить инфицированную клетку еще до начала сборки вируса. Это и есть основная функция цитотоксических Т-клеток. Ввиду высокого разрушительного потенциала этих лимфоцитов чрезвычайно важно, чтобы их атака была ограничена только инфицированными клетками. Как показала микрокиносъемка, цитотоксическая Т-клетка в каждый данный момент может сосредоточить свою атаку лишь на одной клетке-мишени, даже если

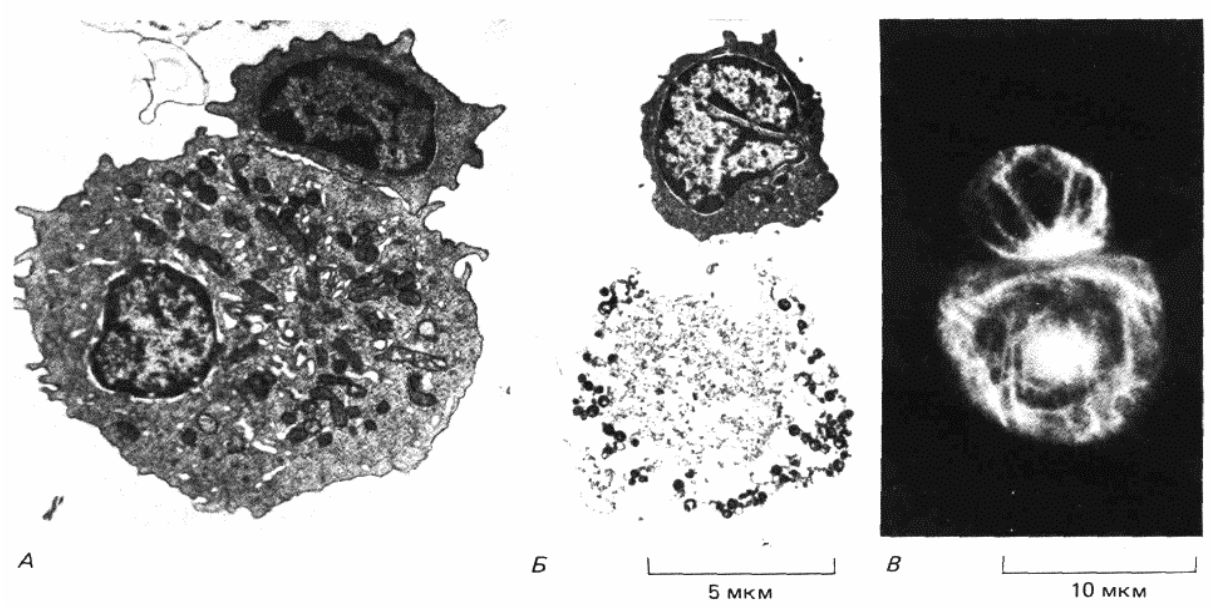


Рис. 18-47. Цитотоксическая Т-клетка (меньшая из двух) и убиваемая ею в культуре клетка-мишень. *А* и *Б* электронные микрофотографии; В-картина иммунофлуоресценции после окрашивания антителами к тубулину. Цитотоксические Т-клетки были взяты у мышей, иммунизированных клетками-мишенями -чужеродными опухолевыми клетками. Показано, как Т-клетка и клетка-мишень связываются друг с другом *(А, В);* на фото *Б*-Т-клетка после того, как она убила клетку-мишень. Обратите внимание, что у Т-клетки, но не у клетки-мишени центросома и расходящиеся от нее микротрубочки ориентированы в точку межклеточного контакта *(А* и *Б* из D. Zagury et al., Eur. J. Immunol., 5, 818-822, 1975; В из B. Geiger et al., J. Cell Biol., **95,** 137-143, 1982. Copyright permission of the Rockefeller Univ. Press.)

с нею связалось несколько клеток-мишеней. Каким же образом цитотоксическая клетка так точно направляет свою атаку?

По-видимому, направляющий механизм зависит от перестройки цитоскелета цитотоксической клетки в результате специфического контакта *с* поверхностью клетки-мишени. Если цитотоксическую Т-клетку во время ее взаимодействия с атакуемой мишенью пометить антителами к тубулину, то можно увидеть, что ее центросома ориентирована в точку контакта с клеткой-мишенью (рис. 18-47). Кроме того, если клетку пометить антителами к *талину* - белку, участвующему, видимо, в соединении рецепторов клеточной поверхности с кортикальными актиновыми филаментами (разд. 11.2.8), то окажется, что талин сконцентрирован в кортексе цитотоксической клетки в месте контакта. Имеются данные в пользу того, что агрегация Т-клеточных рецепторов в участке контакта приводит к локальному талин-зависимому скоплению актиновых филаментов; затем механизм, зависимый от микротрубочек, ориентирует центросому и связанный с нею аппарат Гольджи к участку контакта, направляя воздействие убивающего аппарата на клетку-мишень. Аналогичную поляризацию цитоскелета можно наблюдать и при функциональном взаимодействии Т-хелпера с клеткой, которой он «помогает».

18.6.4. Как цитотоксические Т-клетки убивают свои мишени? [35]

Цитотоксические клетки защищают нас не только от обычных вирусных инфекций, но и от опухолей вирусного происхождения. Однако такие опухоли составляют, вероятно, менее 20% всех злокачественных опухолей человека. Кроме того, имеющиеся данные никак не свидетельствуют в пользу того, что иммунные ответы защищают нас и от большинства других видов рака: в условиях иммуносупрессии люди и экспериментальные животные более подвержены вирусным опухолям (а также опухолям предполагаемой вирусной природы), но этого нельзя сказать о спонтанных и химически индуцированных опухолях. Большой интерес вызывает, однако, возможная роль неиммунологических механизмов в защите от рака. Опухолевые клетки могли бы уничтожаться макрофагами или естественными клетками-киллерами (NK, natural killer cells). NK-клетки

представляют собой лимфоцитоподобные клетки, вероятно, такого же рода, что и К-клетки, которые убивают эукариотические клетки, покрытые антителами (разд. 18.2.5). Но в отличие от К-клеток NK-клетки могут также спонтанно и относительно неспецифически убивать многие опухолевые и инфицированные вирусами клетки в культуре в отсутствие антител. Как они в этих случаях отличают аномальные клетки от нормальных, не известно.

Мы не знаем, каким образом цитотоксические Т-клетки и NK-клетки убивают свои мишени. Некоторые линии NK-клеток и цитотоксических Т-клеток, которые можно неопределенно долго поддерживать в культуре, используют для этого механизм, вероятно, сходный с действием системы комплемента. Связывание с мишенями ведет к высвобождению этими клетками порообразующих белков, называемых **перфоринами,** которые полимеризуются в плазматической мембране клетки-мишени, превращаясь в трансмембранные каналы. Как полагают, эти каналы делают мембрану проницаемой, что способствует гибели клетки. Перфорины, которые гомологичны компоненту комплемента С9, хранятся в секреторных пузырьках и освобождаются путем локального экзоцитоза в месте контакта с клеткой-мишенью. В секреторных пузырьках содержатся также сериновые эстеразы, однако играют ли они какую-либо роль в гибели клетки-мишени, неизвестно. На электронных микрофотографиях перфориновые каналы в мембране клеток-мишеней выглядят очень сходно с каналами, образуемыми компонентом С9, и это подкрепляет мысль о сходстве механизмов действия цитотоксических клеток и комплемента. Однако обычные цитотоксические Т-лимфоциты и NK-клетки могут убивать клетки-мишени и без участия перфоринов, с помощью какого-то механизма, молекулярная основа которого не известна. Одна из возможностей состоит в том, что эти клетки активируют в клетке-мишени некий внутренний механизм саморазрушения, который приводит ее к «самоубийству».

Какие молекулы узнают NK-клетки на убиваемых ими мишенях, неизвестно. Между тем выяснено, что цитотоксические Т-клетки узнают вирусные молекулы, связанные с гликопротеинами МНС на поверхности клеток, инфицированных вирусами. Однако лишь недавно установлена решающая роль молекул МНС в «представлении» антигена Т-клеткам.

18.6.5. Молекулы МНС определяют отторжение трансплантата [36]

О молекулах МНС было известно задолго до того, как стала понятна их нормальная функция. Они были первоначально определены как главные антигены-мишени в реакциях на трансплантат. Пересадка ткани взрослого донора особи того же вида *(аллотрансплантация)* или иного вида *(ксенотрансплантация)* приводит обычно к ее отторжению. Эксперименты по пересадке кожи между разными линиями мышей, проведенные в 50-х годах, показали, что *отторжение трансплантата* обусловлено иммунной реакцией на чужеродные антигены, находящиеся на поверхности его клеток. Позднее было показано, что в этих реакциях участвуют главным образом Т-клетки и что они направлены против генетически «чужеродных» вариантов гликопротеинов клеточной поверхности, получивших название *молекул гистосовместимости* (т.е. совместимости тканей). Из них особенно большое значение имеют *главные молекулы гистосовместимости - семейство* гликопротеинов, кодируемое генами, составляющими **главный комплекс гистосовместимости** (МНС). Молекулы МНС имеются на поверхности клеток всех высших позвоночных. Впервые они были найдены у мышей и названы **антигенами H-2** (histocompatibility-2). У человека они носят название HLA

(human-leucocyte-associated), так как были первоначально обнаружены на лейкоцитах.

Три удивительных свойства молекул МНС в течение многих лет ставили иммунологов в тупик. Во-первых, эти молекулы занимают совершенно особое место среди антигенов-мишеней по своему значению при Т-клеточных трансплантационных реакциях. Во-вторых, узнавать чужеродные молекулы МНС может необычно большая доля Т-лимфоцитов: если на типичный вирусный антиген отвечает менее 0,001% Т-клеток организма, то на одиночный чужеродный МНС-антиген реагирует уже более 0,1% Т-клеток. В-третьих, многие из локусов, кодирующих молекулы МНС, более *полиморфны,* чем какие-либо другие у высших позвоночных. Это означает, что в пределах данного вида каждый локус представлен необычно большим числом аллелей (альтернативных форм одного и того же гена)-их может быть более 100, и каждый аллель встречается в популяции с относительно высокой частотой. По этой причине, а также потому, что каждый индивидуум имеет семь или больше локусов, кодирующих молекулы МНС (см. ниже), очень редко можно встретить два организма, имеющих идентичный набор гликопротеинов МНС. Это делает весьма трудным подбор доноров и реципиентов при трансплантации органов людям (за исключением генетически идентичных близнецов).

Однако позвоночным не нужна защита от вторжения чужеродных клеток других позвоночных. Поэтому наблюдаемая «одержимость» Т-клеток чужеродными молекулами МНС и исключительный полиморфизм этих молекул были не только препятствием для пересадки органов, но и загадкой для иммунологов. Загадка была решена только после того, как выяснилось, что молекулы МНС направляют Т-лимфоциты на те клетки собственного организма, на поверхности которых имеются чужеродные антигены, например на клетки, инфицированные вирусом, Позже мы увидим, как это открытие помогло в значительной степени разрешить загадку МНС (разд. 18.6.8).

18.6.6. Существуют два основных класса молекул МНС [37]

Существуют два основных класса молекул *МНС-класс I* и *класс 11,* каждый из которых представляет собой набор гликопротеинов клеточной поверхности, кодируемых двумя сцепленными группами генов, вместе составляющих главный комплекс гистосовместимости (рис. 18-48). Гликопротеины обоих классов - гетеродимеры с гомологичной общей структурой. Их N-концевые домены предназначены, по-видимому, для связывания антигена и его представления Т-клеткам.

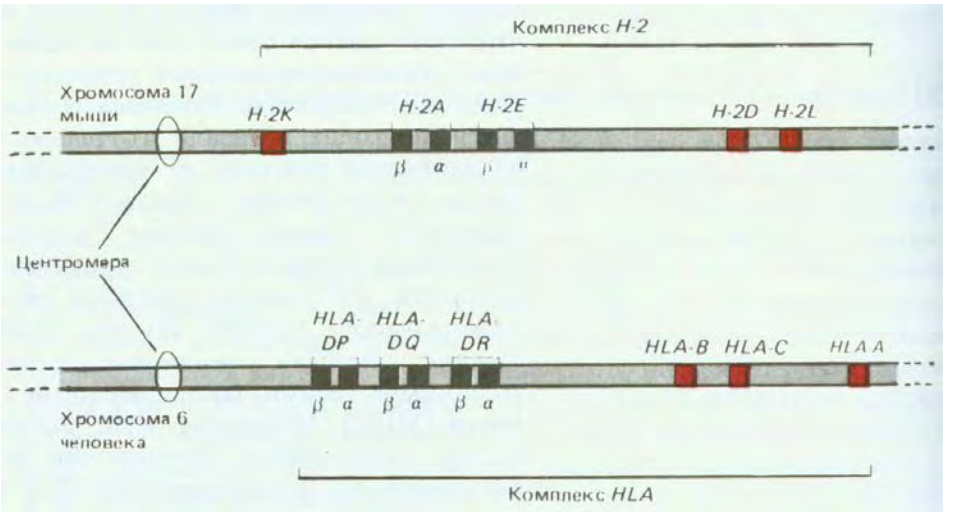


Рис. 18-48. Схема генных комплексов H-2 и HLA; показано расположение локусов, кодирующих гликопротеины МНС класса I (красные участки) и класса II (черные участки). Существуют три типа гликопротеинов класса I (H-2K, H-2D и H-2L у мыши; HLA-A, HLA-B и HLA-C у человека); каждый гликопротеин состоит из α-цепи, кодируемой одним из показанных здесь локусов, и цепи β_2-микроглобулина, кодируемой геном в другой хромосоме. У мыши имеются два типа гликопротеинов МНС класса II-H-2A и H-2E; каждый из них состоит из α-цепи и β-цепи. Показаны только три типа молекул класса II человека -HLA-DP, HLA-DQ и HLA-DR (каждая состоит из α- и β-цепи), хотя имеются еще по меньшей мере один или два других типа. Молекулы DP и DR человека гомологичны H-2E мыши, а DQ человека H-2A мыши. Все эти локусы сильно полиморфны, за , исключением $H\text{-}2F_\alpha$ и его гомологов DP_α и DR_α у человека, полиморфизм которых значительно меньше. В генном комплексе есть и много других локусов, продукты которых сходны с молекулами МНС класса I, однако их функции не известны.

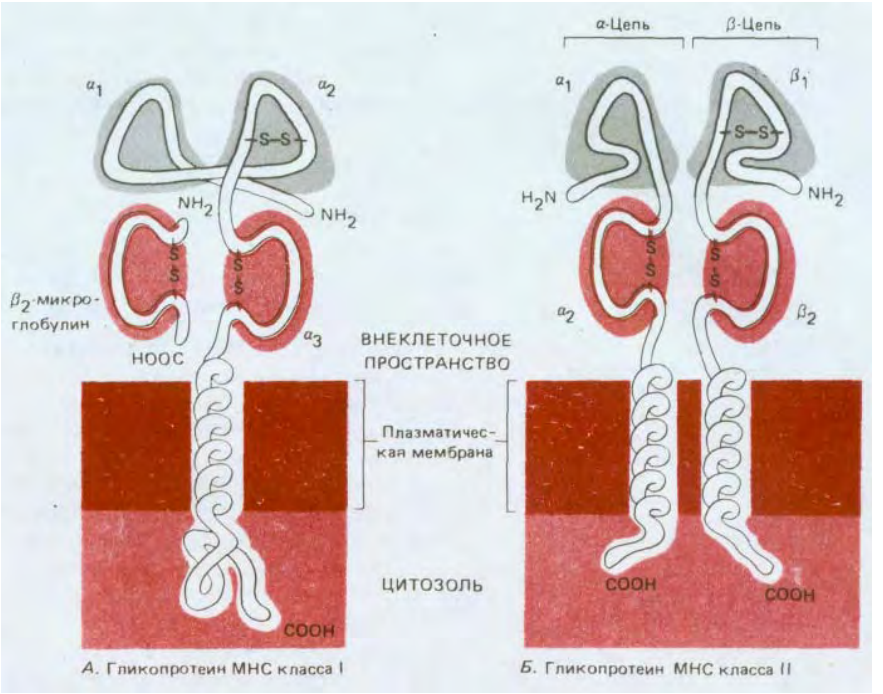


Рис. 18-49. Молекулы гликопротеинов МНС класса I *(А*) и класса II (Б). α-цепь молекулы класса I длиной около 345 аминокислотных остатков имеет три внеклеточных домена, α_1 , α_2 и α_3, кодируемых отдельными экзонами. Молекула нековалентно связана с полипептидной цепью меньших размеров - β_2 микроглобулином (96 аминокислот), который не кодируется в МНС. Домен α_3 и β_2-микроглобулин гомологичны доменам иммуноглобулинов. β_2-Микроглобулин инвариантен, однако α-цепь чрезвычайно полиморфна - главным образом это относится к доменам α_1 и α_2. Путем создания (методами генетической инженерии) гибридных генов, содержащих в одном локусе смесь экзонов α_1 , α_2 и α_3 из разных аллелей, и последующей трансфекции этими генами культивируемых фибробластов было показано, что антигенные детерминанты, узнаваемые Т-клетками, формируются путем взаимодействия доменов α_1 и α_2

В составе молекул МНС класса II полиморфны обе цепи (3 в большей степени, чем а), главным образом за счет доменов α_1 и β_1. Домены α_2 и β_2 гомологичны доменам иммуноглобулинов. Эксперименты с трансфекцией, аналогичные описанным выше для молекул МНС пасса I, показывают, что антигенные детерминанты молекул класса II, узнаваемые Т-клетками, формируются совместно доменами α_1 и β_1.

Таким образом, гликопротеины МНС классов I и II во многом поразительно сходны. У тех и других имеются четыре внеклеточных домена, из которых три содержат внутрицепочечные дисульфидные связи. Два ближайших к мембране домена подобны иммуноглобулиновым. Другие два домена взаимодействуют, образуя сложную трехмерную поверхность; в дальнейшем мы увидим, что эта поверхность, по-видимому, связывает чужеродный антиген и представляет его Т-клеткам. Все цепи, за исключением β_2-микроглобулина, гликозилированы (на схеме не показано).

Каждый ген молекулы МНС **класса I** кодирует одну трансмембранную полипептидную цепь (обозначаемую α), большая часть которой свернута в три внеклеточных глобулярных домена (α_1, α_2, α_3). Каждая α-цепь нековалентно ассоциирована с небольшим внеклеточным негликолизированным *белком - β_2-микроглобулином,* который не связан непосредственно с мембраной и кодируется отдельным геном, находящимся в другой хромосоме (рис. 18-49, *А).* Как β_2-микроглобулин, так и домен α_3, расположенные ближе к мембране, гомологичны отдельному домену иммуноглобулинов. Два N-концевых домена α-цепи, наиболее удаленные от мембраны, содержат полиморфные (вариабельные) остатки, которые узнаются Т-клетками при трансплантационных реакциях.

Молекулы МНС **класса II** тоже представляют собой гетеродимеры с двумя консервативными иммуноглобулиноподобными доменами вблизи мембраны и двумя полиморфными (вариабельными) N-концевыми доменами, расположенными дальше от мембраны. Однако в этих молекулах обе цепи кодируются в пределах МНС и обе проходят насквозь через мембрану (рис. 18-49, Б). Наличие Ig-подобных доменов в гликопротеинах классов I и II позволяет предположить, что молекулы МНС и антитела имеют общую эволюционную историю (разд. 18.6.20).

Есть веские данные в пользу того, что полиморфные области молекул МНС обоих классов взаимодействуют с чужеродным антигеном и что именно комплекс молекул МНС с чужеродным антигеном узнается Т-клеточным рецептором. Однако прежде чем обсуждать эти данные, мы рассмотрим ту различную роль, которую играют молекулы класса I и класса II, направляя цитотоксические Т-лимфоциты и Т-хелперы к соответствующим клеткам-мишеням.

Главное функциональное различие между молекулами МНС класса I и класса II находит отражение в их распределении по тканям. Молекулы МНС класса I экспрессируются практически на всех клетках, содержащих ядро, тогда как распространение молекул класса II ограничено в основном клетками, участвующими в иммунных ответах.



Рис. 18-50. Цитотоксические Т-клетки узнают чужеродные вирусные антигены в ассоциации с гликопротеинами МНС класса I на поверхности любой клетки-хозяина, тогда как Т-хелперы узнают чужеродные антигены в ассоциации с гликопротеинами МНС класса II на поверхности *антиген-представляющей клетки.* При трансплантационных реакциях клетки-хелперы тоже реагируют против чужеродных гликопротеинов класса II, а цитотоксические клетки - против чужеродных гликопротеинов класса I.

Причиной такого распределения может быть то, что молекулы класса I узнаются цитотоксическими Т-клетками, которые должны иметь возможность взаимодействовать с любой клеткой организма, оказавшейся зараженной вирусом, тогда как молекулы класса II узнаются Т-хелперами, которые взаимодействуют в основном с другими клетками, участвующими в иммунных ответах, такими как В-клетки и *антиген-представляющие клетки* (рис. 18-50, см. также разд. 18.6.10). Важнейшие свойства гликопротеинов МНС двух классов суммированы в табл. 18-2.

18.6.7. Цитотоксические Т-клетки узнают чужеродные антигены, ассоциированные с молекулами МНС класса 1 [38]

То, что молекулы МНС представляют чужеродные антигены Т-клеткам, было впервые четко показано в 1974 г. в эксперименте с цитотоксическими Т-клетками. Мышей линии X заражали вирусом А. Через семь дней в селезенке у этих мышей были активные цитотоксические Т-клетки, которые в клеточной культуре могли за несколько часов убить зараженные вирусом фибробласты линии X. Как и следовало ожидать, они убивали фибробласты, инфицированные только вирусом А, но не вирусом В; следовательно, цитотоксические Т-клетки были вирус-специфичны. Однако неожиданно оказалось, что те же самые Т-клетки не убивают фибробластов, инфицированных тем же вирусом А, если эти фибробласты взяты от мышей линии Y (рис. 18-51). Значит, цитотоксические Т-лимфоциты узнавали не один только вирус, но и какое-то различие между двумя типами фибробластов. Используя специальные линии мышей (так называемые *конгенные линии),* которые были либо генетически идентичны, за исключением локусов МНС класса I, либо генетически различны, за исключением тех же локусов, удалось показать, что инфицированные клетки-мишени могли быть убиты только в том случае, если они экспрессировали хотя бы одну такую же молекулу МНС класса I, что и первоначально инфицированная мышь. Это показывало, что гликопротеины МНС класса I необходимы для представления вирусных антигенов, связанных с клеточной поверхностью, цитотоксическим Т-клеткам. Поскольку Т-клетки данной особи узнают антиген лишь тогда, когда он ассоциирован с собственными молекулами МНС этой особи, такое совместное узнавание часто называют *рестрикцией МНС.* Только спустя 10 лет в серии экспериментов с цитотоксическими Т-клетками, реагирующими на вирус гриппа, удалось выяснить химическую природу вирусных антигенов, узнаваемых этими клетками.

18.6.8. Цитотоксические Т-клетки узнают фрагменты вирусных белков на поверхности клеток, инфицированных вирусами [39]

С 60-х годов известно, что Т-клетки, в отличие от В-клеток (и антител). обычно не узнают антигенные детерминанты в белке, образующем третичную структуру (см. рис. 18-23, *А),* но узнают детерминанты развернутой полипептидной цепи. Причины этого стали понятны, когда накопились данные о том, что антигены, различаемые Т-клетками, обычно расщепляются внутри клетки-хозяина, прежде чем их фрагменты будут представлены на ее поверхности (вначале это были данные о том, как Т-хелперы узнают антиген - см. ниже, разд. 18.6.10). Первыми прямыми данными о таком механизме представления антигена цитотоксическим Т-клеткам было сообщение о том, что некоторые цитотоксические Т-клетки, активированные вирусом гриппа, специфически узнают внутренние белки вируса, которые не могли быть доступны в интактной вирусной частице. Затем были получены данные в пользу того, что

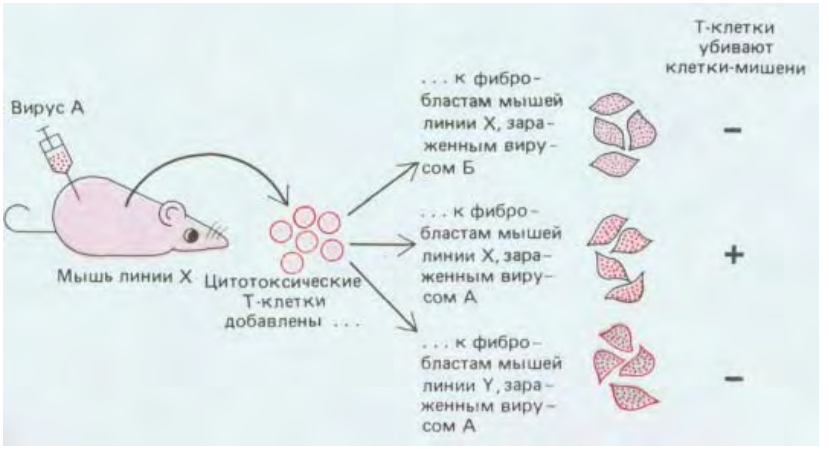


Рис. 18-51. Классический эксперимент, который показал, что цитотоксическая Т-клетка помимо вирусного антигена узнаёт и какой-то компонент поверхности клетки, инфицированной вирусом. Путем повторения этого опыта с клетками-мишенями, отличающимися от клеток инфицированной мыши только по ограниченным участкам генома, было показано, что компонент клеточной поверхности, узнаваемый цитотоксической Т-клеткой, представляет собой гликопротеин MHC класса I. Убивающую способность активных цитотоксических Т-клеток удобнее всего оценивать, используя радиоактивный изотоп ^{51}Cr, который поглощается живыми клетками и освобождается только после их гибели. Поэтому стандартный метод оценки активности цитотоксических Т-клеток включает их инкубацию в течение нескольких часов с клетками-мишенями, содержащими ^{51}Cr, а затем измерение количества ^{51}Cr, освобожденного из убитых клеток-мишеней.

Т-клетки узнают фрагменты внутренних вирусных белков. Вирусы - внутриклеточные паразиты, и их белки синтезируются путем экспрессии вирусных генов внутри инфицированной клетки (разд. 5.5). Поэтому можно предположить, что некоторые фрагменты образующихся вирусных белков «просачиваются» на поверхность зараженной клетки и связываются с молекулами MHC либо на поверхности, либо где-то внутри клетки (рис. 18-52).

Такую точку зрения подкрепляют экспериментальные данные двоякого рода. Во-первых, если нормальные фибробласты в культуре на короткое время привести в соприкосновение с фрагментами внутреннего белка вируса гриппа (нуклеопротеина, НП на рис. 18-52), то эти клетки будут узнаваться и убиваться цитотоксическими Т-клетками, которые первоначально были активированы фибробластами, зараженными вирусом гриппа, но только в том случае, если те и другие фибробласты экспрессируют одни и те же гликопротеины MHC класса I. Во-вторых, если в нормальные фибробласты ввести последовательность ДНК, кодирующую фрагмент нуклеопротеина вируса гриппа, то трансфецированные клетки будут убиваться такими же цитотоксическими Т-клетками, как и в первом эксперименте. Эти и другие эксперименты позволяют

Таблица 18-2. Свойства молекул MHC класса 1 и класса II

	Класс I	**Класс II**
Генетические локусы	H-2K, H-2D, H-2L у мыши; HLA-A, HLA-B, HLA-C у человека	Группы *I-A* и *I-E* у мыши; DP, DQ, DR и одна или две другие группы у человека
Субъединичная структура	α-Цепь (~ 45000 Да) + β_2-микроглобулин (11500 Да)	α-Цепь (29000-34000 Да) + β-цепь (25000 28000 Да)
Распределение между клетками	На поверхности почти всех клеток, содержащих ядро	На поверхности В-клеток, антиген-представляющих клеток, эпителиальных клеток тимуса и некоторых других клеток
Участие в представлении антигена	Главным образом цитотоксическим Т-клеткам	Главным образом Т-хелперам
Полиморфные домены, участвующие в узнавании Т-клеток и связывании антигена	$\alpha_1 + \alpha_2$	$\alpha_1 + \beta_1$

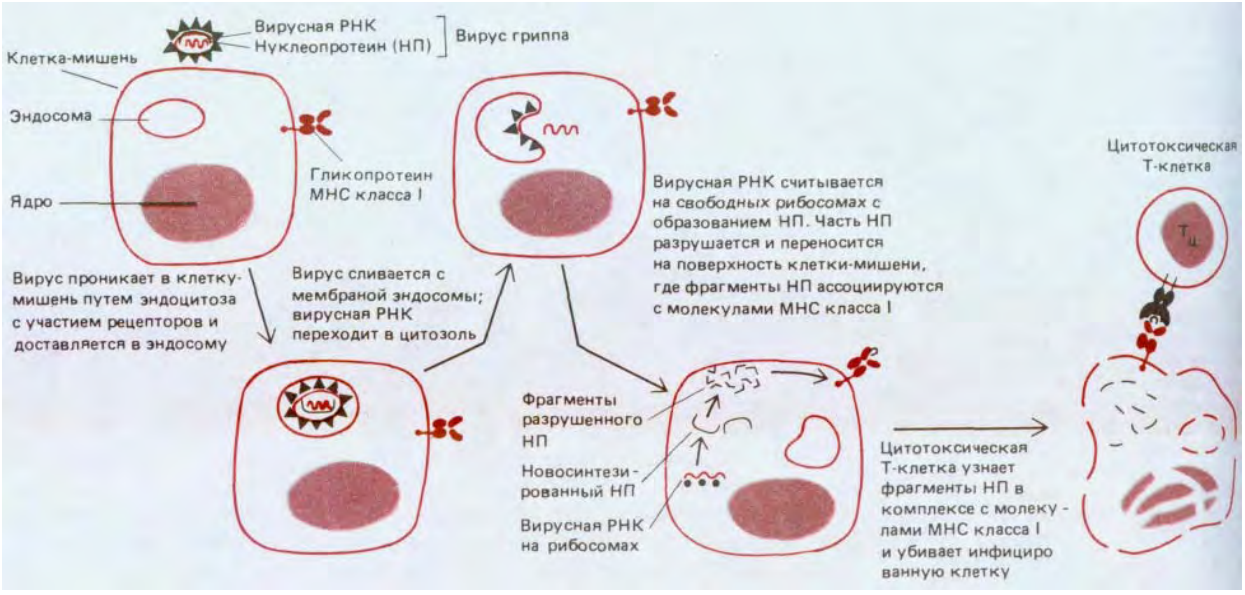


Рис. 18-52. Цитотоксическая Т-клетка убивает клетку, инфицированную вирусом, в том случае, если она узнает фрагменты вирусных белков, связанные с молекулами MHC класса I на поверхности зараженной клетки. В представленном на схеме случае пептидные фрагменты образуются из нуклеопротеина (НП) вируса гриппа; для простоты показан только этот внутренний вирусный белок. Разрушается лишь очень малая доля вирусных белков, синтезируемых в клетке-мишени. Как происходит их расщепление и как образующиеся пептидные фрагменты достигают поверхности клетки, не известно; неясно также, где эти фрагменты первоначально ассоциируются с гликопротеинами MHC.

предполагать, что фрагменты вирусных белков могут попадать на поверхность клетки и связываться там с молекулами MHC класса I.

Нетрудно себе представить, как может происходить расщепление вирусных белков в инфицированных клетках, так как известно, что почти все клеточные белки непрерывно разрушаются (разд. 8.2.4). Труднее понять, как фрагменты вирусного нуклеопротеина попадают на поверхность клетки, поскольку вирусные белки синтезируются на цитоплазматических рибосомах и в обычных условиях не имеют доступа к полости эндоплазматического ретикулума, где обычно начинают свой путь белки, предназначенные для клеточной поверхности (разд. 8.1.4). Однако для узнавания Т-клетками требуются, вероятно, очень небольшие количества антигена. Поэтому случайный выход даже небольшой доли фрагментов нуклеопротеина на клеточную поверхность может привести к образованию клетки-мишени, которую мог бы узнать цитотоксический Т-лимфоцит.

18.6.9. Рентгеноструктурный анализ позволяет выявить антиген-связывающий участок гликопротеина MHC класса I [40]

Понимание того, каким образом молекулы MHC представляют антиген Т-клеткам, сильно продвинулось в 1987 г., когда методом рентгеноструктурного анализа была изучена трехмерная структура гликопротеина MHC класса I человека. Как показано на рис. 18-53, *А,* этот белок имеет единственный предполагаемый антиген-связывающий участок, находящийся на одном из концов молекулы. Он состоит из глубокой бороздки между двумя длинными α-спиралями, принадлежащими доменам α_1 и α_2; основание бороздки образуют восемь тяжей β-структуры в составе тех же доменов. Размеры бороздки - примерно 2,5 нм в ширину и 10 нм в длину. Этого достаточно для того, чтобы разместить пептид из 10-20 аминокислотных остатков в зависимости от того, насколько плотно уложена его цепь путем сворачивания или изгибания. Интересно, что в кристаллизованном белке бороздка не была пустой: она содержала небольшую молекулу неизвестного происхождения. Предполагают, что это пептид, который очищается и кристаллизуется вместе с гликопротеином MHC (рис. 18-53, *Б).* Эти данные заставляют заподозрить

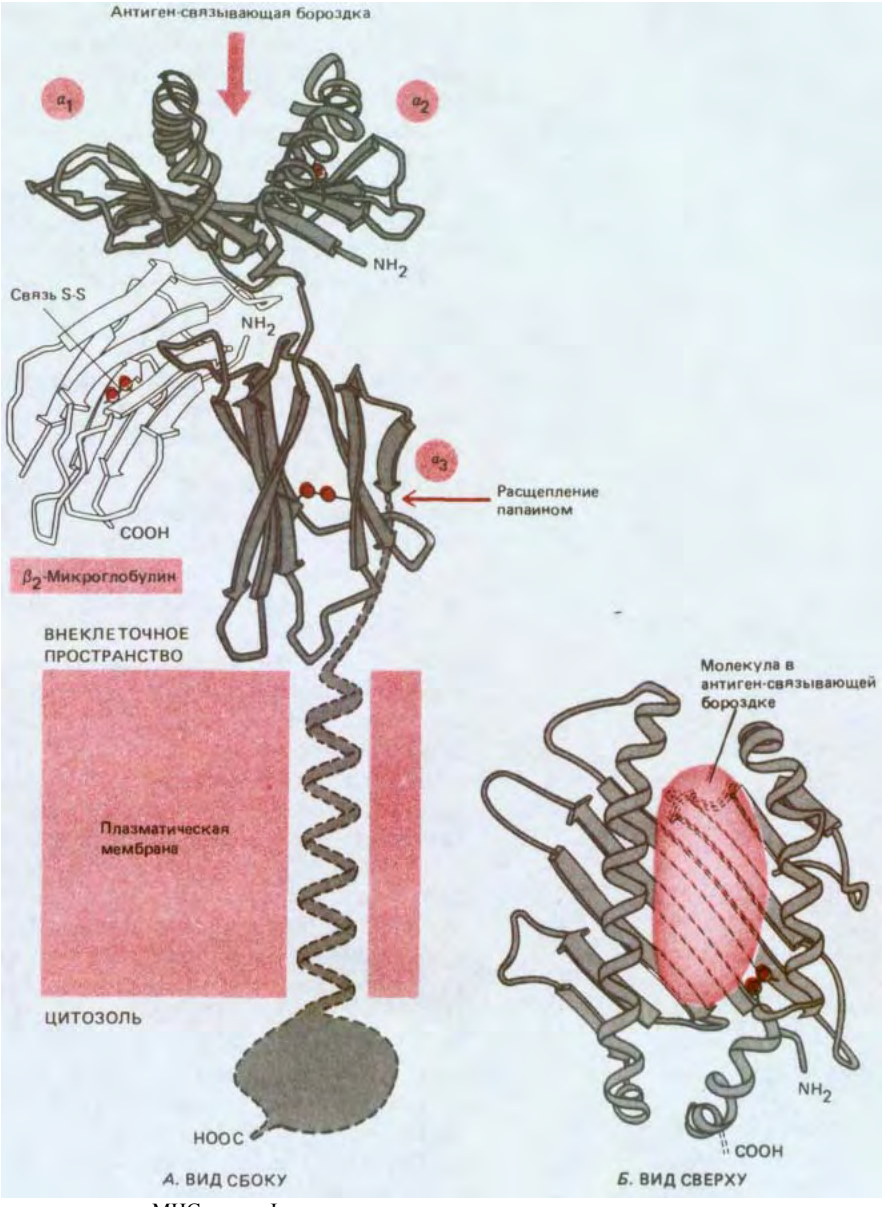


Рис. 18-53. *А.* Структура гликопротеина MHC класса I человека, основанная на данных рентгеноструктурного анализа кристаллов внеклеточной части молекулы. Путем расщепления протеолитическим ферментом папаином внеклеточная часть молекулы была отделена от трансмембранного сегмента. Оба домена, расположенные ближе всего к плазматической мембране (α_3- и β_2-микроглобулины), сходны с типичным доменом иммуноглобулинов (см. рис. 10-28, *Б*). Два домена, наиболее удаленные от мембраны (α_1 и α_2), очень сходны между собой и образуют в верхней части молекулы бороздку -- предполагаемый антиген-связывающий участок. Полагают, что молекулы MHC класса II имеют весьма сходную структуру. *Б.* Вид сверху на предполагаемую антиген-связывающую бороздку, содержащую небольшую молекулу (вероятно, пептид), которая очищалась вместе с белком MHC. Именно эта часть молекулы MHC взаимодействует с Т-клеточным рецептором. (По P. J. Biorkman et al., Nature, **329,** 506-512, 1987.)

в бороздке антиген-связывающий участок и указывают на то, что пептид, будучи однажды связан с этим участком, диссоциирует очень медленно. В пользу этого говорит и то, что фибробласты, короткое время соприкасавшиеся с фрагментами нуклеопротеина вируса гриппа, не менее трех дней остаются мишенями для цитотоксических Т-клеток, специфичных в отношении этого вируса.

Полиморфные аминокислотные остатки гликопротеина MHC (т. е. те остатки, которые варьируют в зависимости от аллельной формы молекул этого типа) локализованы большей частью либо внутри бороздки, где они могли бы связывать антиген, либо на ее краях, где были бы доступны для узнавания рецепторами Т-клеток. Полагают, что вариабельность молекул MHC класса I-результат отбора, приведшего к тому, что у них появилась способность связывать и представлять множество различных пептидов вирусного происхождения. Тем не менее продолжает удивлять то, что малое число различных антиген-связыва-

ющих участков у молекул МНС класса I данного организма (максимум шесть у человека) может связывать весьма разнообразные вирусные пептиды, специфически узнаваемые Т-клетками. Еще более загадочны в этом отношении гликопротеины МНС класса II, трехмерная структура которых, по-видимому, очень сходна со структурой молекул класса I. Хотя у индивидуума вырабатывается всего лишь примерно от 10 до 20 видов молекул класса II (каждая со своим собственным антиген-связывающим участком), эти молекулы, видимо, способны связывать практически неограниченное множество чужеродных пептидов и представлять их Т-хелперам, которые играют решающую роль почти во всех иммунных ответах.

18.6.10. Т-хелперы узнают фрагменты чужеродных антигенов в ассоциации с гликопротеинами МНС класса II на поверхности антиген-представляющих клеток [41]

Т-хелперы необходимы лимфоцитам большинства других типов для оптимального ответа на антиген. Решающую роль Т-хелперов в иммунитете драматически демонстрирует опустошительная эпидемия синдрома приобретенного иммунодефицита (СПИД). Заболевание вызывается ретровирусом (вирусом иммунодефицита человека, ВИЧ), который убивает Т-хелперы и тем самым приводит в негодность иммунную систему: больной становится восприимчивым к. заражению микроорганизмами, которые редко инфицируют здоровых людей. В результате большинство больных СПИДом умирает в течение нескольких лет после появления симптомов болезни.

Прежде чем Т-хелперы смогут помогать другим лимфоцитам отвечать на антиген, они должны быть сначала активированы сами. Эта активация происходит тогда, когда Т-хелпер узнает чужеродный антиген, связанный с гликопротеином МНС класса II на поверхности специализированной антиген-представляющей клетки. Такие клетки имеются в большинстве тканей. Они происходят из костного мозга и составляют гетерогенную популяцию, включающую дендритные клетки лимфоидных органов, клетки Лангерганса в коже и определенные типы макрофагов. Все эти специализированные антиген-представляющие клетки вместе с В-клетками, которые тоже могут представлять антиген Т-хелперам (см. ниже), и эпителиальными клетками тимуса (разд. 18.6.17) - это главные типы клеток, в норме экспрессирующих молекулы МНС класса II (см. табл. 18-2).

Разнообразные эксперименты демонстрируют центральную роль молекул МНС класса II в представлении чужеродных антигенов Т-хелперам. Например, связывание антител с этими молекулами блокирует способность клеток представлять антиген. И наоборот, фибробласты, которые не вырабатывают молекул МНС класса II и не могут представлять чужеродые антигены Т-хелперам, можно превратить в эффективные антиген-представляющие клетки путем их трансфекции геном, кодирующим молекулу МНС класса П.

Так же как и вирусные антигены, представляемые цитотоксическим Т-клеткам, антигены, представляемые Т-хелперам, - это обычно фрагменты разрушенных чужеродных белков. Полагают, что эти пептиды связаны с молекулами МНС класса II таким же способом, как пептиды вирусного происхождения с молекулами МНС класса I (см. рис. 18-53). Однако в отличие от инфицированной вирусом мишени для цитотоксической Т-клетки антиген-представляющая клетка не синтезирует чужеродный белок. Вместо этого чужеродные белки, по-видимому, поглощаются путем эндоцитоза и частично расщепляются в кислой среде эндосом или эндолизосом (разд. 6.5.9), после чего отдельные их фраг-

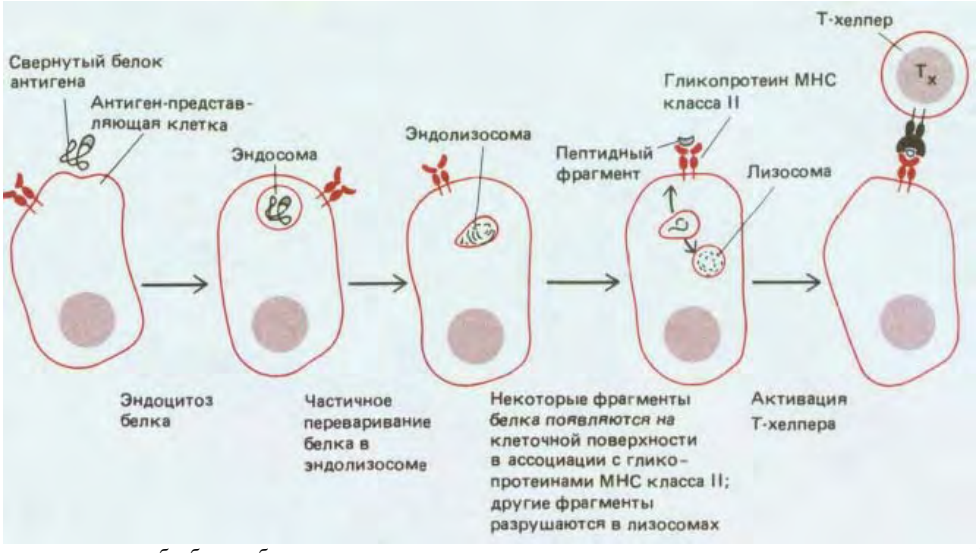


Рис. 18-54. Гипотетическая схема «обработки» белковых антигенов и их представления антиген-представляющими клетками. Было показано, что гликопротеины MHC рециркулируют (т. е. совершают кругооборот) через эндосомный компартмент; поэтому они могли бы сначала ассоциироваться с пептидными фрагментами в эндолизосомном компартменте, а затем возвращаться на клеточную поверхность со связанным пептидом (на схеме не показано).

менты возвращаются на клеточную поверхность - последовательность событий, называемая в совокупности **процессингом антигена** (рис. 18-54). Если блокировать эндоцитоз путем слабой фиксации антиген-представляющих клеток (например, формальдегидом) или ингибировать протеолиз в эндолизосомах и лизосомах (например, хлорохином), эти клетки уже не могут осуществлять процессинг чужеродного белка и представлять его Т-хелперам. Однако обработанные таким образом клетки еще способны представлять белок, если перед добавлением к клеткам расщепить его на небольшие пептиды (длиной 10-15 аминокислот).

Поразительное свойство антиген-представляющей клетки состоит в том, что она может подвергать процессингу и представлять соответствующему Т-хелперу практически любой антиген. Такое отсутствие антигенной специфичности указывает на то, что антиген-представляющие клетки, видимо, поглощают антиген путем жидкофазного, а не опосредованного рецепторами эндоцитоза (разд. 6.5.7). Если это так, тогда большинство поглощенных и разрушенных белков будут «своими» белками, пептидные фрагменты которых займут связывающие участки многих молекул MHC класса II. Как полагают, для активации Т-хелпера достаточно того, чтобы чужеродные пептиды присоединились к небольшой доле молекул MHC.

18.6.11. Т-хелперы стимулируют пролиферацию Т-лимфоцитов путем секреции интерлейкина-2 [42]

Активация Т-хелпера - сложный процесс, в нем участвуют различные секретируемые белки, которые носят название **интерлейкинов** и действуют как локальные химические медиаторы. Активация, видимо, начинается с того, что Т-клетка каким-то неизвестным образом побуждает антиген-представляющую клетку секретировать один или несколько интерлейкинов. Наиболее изученный из этих медиаторов **интерлейкин-1 (IL-1).** Комбинированное воздействие IL-1 (и, возможно, других интерлейкинов) и связывания антигена, однако, не стимулирует прямо пролиферацию Т-хелперов. Вместо этого оно приводит к стимуляции Т-клеткой ее собственной пролиферации - заставляет Т-клетку секретировать фактор роста, называемый **интерлейкином-2** (IL-2), и синтезировать для него рецепторы, которые будут находиться на клеточной поверхности. Именно связывание IL-2 с этими рецепторами стимулирует пролиферацию Т-клетки. Таким путем Т-хелпер может продолжать пролиферировать при участии *аутокринного механизма* (разд. 12.1.7), после того как он отойдет от поверхности антиген-представляющей

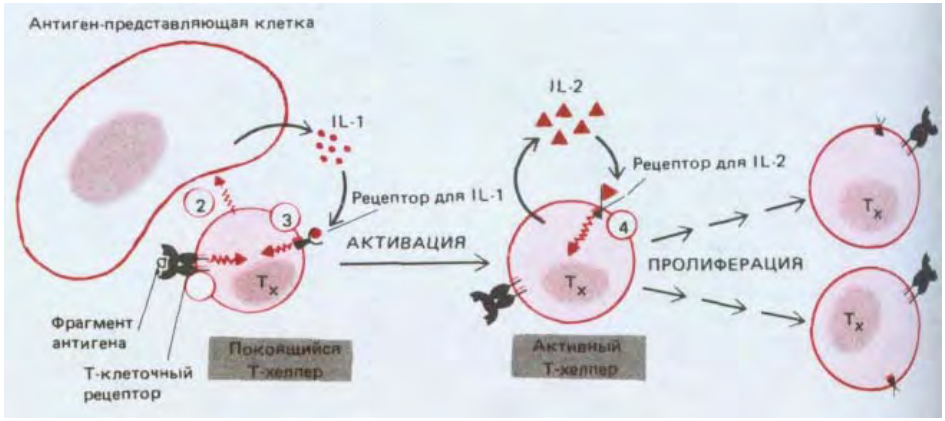


Рис. 18-55. Предполагаемая последовательность событий при стимуляции Т-хелперов антигеном, побуждающей эти клетки к пролиферации. Связывание Т-клетки с антигеном на поверхности антиген-представляющей клетки заставляет Т-клеточный рецептор запустить инозитолфосфолипидный сигнальный путь (разд. 12.3.9) (сигнал 1). В результате Т-клетка каким-то образом стимулирует антиген-представляющую клетку (сигнал 2). Тогда антиген-представляющая клетка секретирует интерлейкины, в частности интерлейкин-1 (IL-1), которые способствуют активации Т-клетки (сигнал 3). Активированная Т-клетка синтезирует рецепторы для интер-лейкина-2 (IL-2) и секретирует IL-2; связывание IL-2 с IL-2-рецепторами (сигнал 4) стимулирует рост и деление клетки. После устранения антигена прекращается в конце концов и образование IL-2 и IL-2-рецепторов; в результате пролиферация клеток останавливается.

клетки (рис. 18-55). Т-хелперы могут также помогать стимулировать пролиферацию любых других Т-клеток, включая цитотоксические Т-клетки, в которых была ранее индуцирована экспрессия рецепторов IL-2. Но, поскольку экспрессия рецепторов IL-2 строго зависит от стимуляции антигеном, это приводит к пролиферации не всех Т-клеток, а только тех, которые уже встретились с антигеном.

Стоило лишь выявить необходимые для пролиферации Т-клеток условия, как появилась возможность получать неограниченно пролиферирующие антиген-специфические линии Т-клеток в культуре путем непрерывного добавления IL-2 и периодической стимуляции клеток антигеном с целью поддерживать экспрессию рецепторов IL-2. Из таких линий можно было затем выделять одиночные клетки и получать клоны Т-клеток. Как мы уже видели, такие клоны сыграли решающую роль в исследовании Т-клеток. Например, они позволили выделить Т-клеточные рецепторы и их гены; кроме того, они широко использовались для изучения механизмов активации Т-клеток и роли Т-хелперов в стимуляции ответов других лимфоцитов.

18.6.12. Т-хелперы необходимы большинству В-лимфоцитов для ответа на антиген [43]

Т-хелперы нужны для выработки В-клетками антител к большинству антигенов. Это было впервые установлено в середине 60-х годов в экспериментах, в которых облученным мышам вместе с антигеном вводили клетки тимуса или костного мозга. Мыши, получившие только клетки костного мозга или только клетки тимуса, были неспособны вырабатывать антитела; однако, если вводилась смесь тех и других клеток образовывались большие количества антител. Позднее было показано что тимус поставляет Т-клетки, а костный мозг - В-клетки (рис. 18-56) Используя специфический хромосомный маркер для различения введенных Т- и В-клеток, удалось показать, что лимфоциты, секретирующие антитела, - это В-клетки. Был сделан вывод, что Т-клетки, вероятно. помогают В-клеткам реагировать на антиген.

Однако существуют антигены, в том числе многие полисахариды микроорганизмов, которые могут стимулировать пролиферацию созревание В-лимфоцитов без помощи Т-клеток. Такие независимые от Т-клеток антигены - это обычно высокомолекулярные полимеры с повторяющимися идентичными антигенными детерминантами. Много центровое связывание таких антигенов с мембраносвязанными молекулами антител - антигенными рецепторами В-клеток - может давать сигнал, достаточно сильный для прямой активации В-клеток. Имеются данные о том, что клетки, отвечающие таким образом на мультимерные

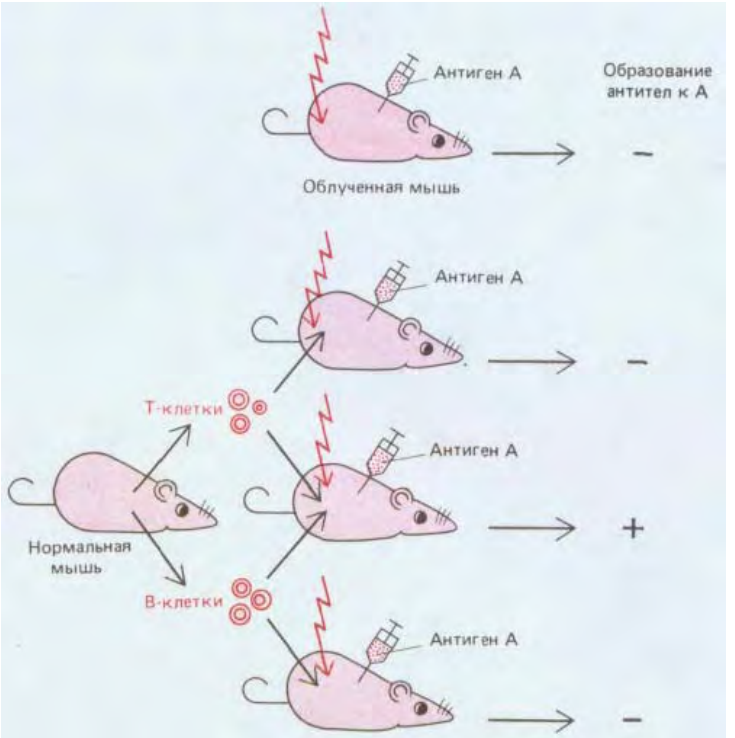


Рис. 18-56. Эксперимент, впервые показавший, что для образования антител животному, вероятно, необходимы как Т-, так и В-клетки. При использованных дозах облучения у мыши погибают те и другие.

антигены, составляют большей частью отдельную субпопуляцию В-клеток, которые эволюционировали в направлении реакции против микробных полисахаридов без помощи Т-клеток.

18.6.13. Т-хелперы помогают активировать В-клетки путем секреции интерлейкинов [44]

Будучи активирован чужеродным антигеном на поверхности специализированной антиген-представляющей клетки, соответствующий Т-хелпер может помогать активации В-клетки путем связывания с тем же самым чужеродным антигеном на ее поверхности. Антиген-представляющая клетка захватывает и представляет антигены неспецифически (см. выше), но В-клетка, как правило, представляет только тот антиген, который она специфически узнает. Антиген отбирается в результате его присоединения к специфическим мембраносвязанным антителам (антигенным рецепторам) на поверхности В-клетки; он поглощается с помощью опосредованного рецепторами эндоцитоза (разд. 6.5.7), а затем разрушается и вновь появляется на клеточной поверхности в виде пептидов, связанных с гликопротеинами MHC класса II для узнавания Т-хелпером. Таким образом, Т-хелпер узнает на В-клетке, которой он помогает, те же самые комплексы антиген-MHC, что и на антиген-представляющей клетке, первоначально активировавшей Т-клетку.

Специфический контакт между Т-хелпером и В-клеткой вызывает в цитоплазме хелпера внутреннюю перестройку, в результате которой центросома и аппарат Гольджи ориентируются в направлении В-клетки, как это происходит в цитотоксической Т-клетке при контакте с клеткой-мишенью (см. выше, рис. 18-47). В данном случае, однако, ориентация, по-видимому, дает возможность Т-хелперу направлять секрецию интерлейкинов на поверхность В-клетки (а также, возможно, сосредоточивать здесь мембраносвязанные сигнальные молекулы). Эти интерлейкины включают *IL-4,* который инициирует активацию В-клетки, *IL-5,* который стимулирует пролиферацию активированных В-клеток, и *IL-6,* вызывающий созревание активированных В-клеток и превращение их

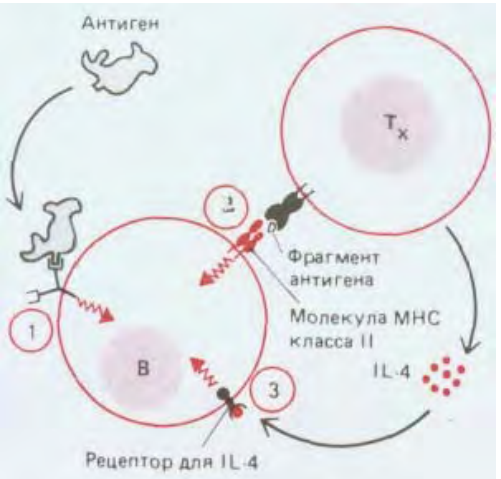


Рис. 18-57. В активации В-клеток на ранних ее этапах участвуют по меньшей мере три типа сигналов. Относительное значение этих сигналов не известно; оно может варьировать в зависимости от типа В-клеток и антигена. Сигнал 1 возникает при связывании антигена; в его передаче, по-видимому, участвуют инозитолфосфолипидный сигнальный путь (разд. 12.3.9). Этот сигнал активирует В-клетку и может индуцировать экспрессию рецепторов для некоторых интерлейкинов, вырабатываемых Т-хелперами. Затем В-клетка поглощает и разрушает антиген (на схеме не показано) и представляет небольшие фрагменты антигена в ассоциации с молекулами MHC класса II Т-хелперу. Дает ли связывание Т-клетки сигнал В-клетке (это показано на рисунке как сигнал 2) или служит лишь для того, чтобы направить секрецию интерлейкина-4 (IL-4) и других интерлейкинов (не показано) на поверхность В-клетки (сигнал 3), не ясно. Кроме активации В-клетки, сигнал 3 также стимулирует образование клеткой большего количества гликопротеинов MHC класса II, тем самым усиливая способность В-клеток воспринимать помощь Т-клеток. После того как В-клетка оказалась активированной, другие интерлейкины, вырабатываемые Т-хелперами (в частности, IL-5, IL-6 и γ-интерферон), помогают индуцировать пролиферацию В-клетки и ее созревание в клетку, секретирующую антитела (не показано).

в клетки, секретирующие антитела. Некоторые из этих и другие интерлейкины могут переключать В-клетки с выработки одного класса антител на выработку другого (разд. 18.4.7). Некоторые из сигналов, вероятно, участвующих в начальной активации В-клетки, показаны на рис. 18-57.

Каким образом сигналы передаются от активированных рецепторов клеточной поверхности внутрь клетки при стимуляции В- или Т-клеток антигеном или интерлейкинами? В отношении рецепторов для интерлейкинов ответ неизвестен. Однако есть веские данные в пользу того, что антигенные рецепторы и на В-, и на Т-клетках подают клетке сигнал. активируя инозитолфосфолипидный путь, который был рассмотрен в гл. 12 (разд. 12.3.9).

18.6.14. Некоторые Т-хелперы активируют макрофаги путем секреции интерферона [45]

Помощь Т-хелперов не ограничивается лимфоцитами. Те Т-хелперы, которые секретируют IL-2 при стимуляции антигеном, выделяют также и другие интерлейкины, например *γ-интерферон,* привлекающий и активирующий макрофаги, которые начинают более эффективно фагоцитировать и разрушать внедрившиеся микроорганизмы. Способность Т-клеток привлекать и активировать макрофаги особенно важна для защиты от некоторых микроорганизмов, способных оставаться живыми после поглощения их неактивированными макрофагами. Таков, например, возбудитель туберкулеза.

Инициируемая антигеном секреция γ-интерферона и других активирующих макрофаги интерлейкинов Т-хелперами лежит в основе обычной кожной туберкулиновой пробы. Если туберкулин (экстракт туберкулезных бактерий) ввести в кожу человеку, который был иммунизирован против туберкулеза или болел туберкулезом, в коже развивается характерный иммунный ответ. Его запускает в месте инъекции секреция интерлейкинов Т-хелперами памяти, реагирующими на туберкулин. Привлеченные интерлейкинами, в этом участке кожи собираются макрофаги и лимфоциты, что вызывает характерное припухание - положительную реакцию на туберкулин.

Другое важное действие γ-интерферона - индукция экспрессии гликопротеинов MHC класса II на поверхности некоторых клеток (таких, как клетки эндотелия), которые в обычных условиях их не экспрессируют. Это придает таким клеткам способность представлять антиген Т-хелперам. Таким способом Т-хелперы при необходимости могут мобилизовать дополнительные антиген-представляющие клетки.

Есть данные о том, что существуют по меньшей мере два подкласса Т-хелперов. Один из них, видимо, помогает главным образом В-клеткам и секретирует IL-4 и IL-5, а второй помогает другим Т-хелперам и макрофагам и выделяет IL-2 и γ-интерферон. Сведения о некоторых интерлейкинах, секретируемых Т-хелперами (или антиген-представляющими клетками), приведены в табл. 18-3.

18.6.15. Белки межклеточной адгезии стабилизируют взаимодействия между Т-клетками и их мишенями [46]

Специфическое связывание комплексов антиген-MHC на поверхности клетки-мишени с α/β-рецепторами антигена на поверхности Т-клетки часто бывает недостаточно сильным для того, чтобы произошло функциональное взаимодействие между этими двумя клетками. Различные белки межклеточной адгезии (см. разд. 14.3) на Т-клетках помогают стабилизировать такие взаимодействия, увеличивая общую силу связы-

Таблица 18-3. Свойства некоторых интерлейкинов

Интерлейкин	Другое название	Приблизительный мол. вес	Источник	Мишени	Действие
L-1	—	15000	Антиген-представляющие клетки	Т-хелперы	Способствует активации
IL-2	Фактор роста Т-клеток	15000	Некоторые Т-хелперы	Все активированные Т-клетки	Стимулирует пролиферацию
IL-3	Мульти-CSF (см. разд. 17.5.8)	25000	Некоторые Т-хелперы	Разные кроветворные клетки (см. разд. 17.5.8)	Стимулирует пролиферацию
IL-4	Фактор- 1 , стимулирующий В-клетки (BSF-1)	20000	Некоторые Т-хелперы	В-клетки, Т-клетки, тучные клетки	Способствует активации и стимулирует пролиферацию; увеличивает число молекул MHC класса II на В-клетках
IL-5	Фактор-2 роста В-клеток (BCGF-2)	50000 (димер)	Некоторые Т-хелперы, образующие IL-4	В-клетки, эозинофилы	Стимулирует пролиферацию и созревание
IL-6	Фактор-2, стимулирующий В-клетки	25000	Некоторые Т-хелперы и макрофаги	Активированные В-клетки, Т-клетки	Стимулирует созревание В-клеток в Ig-секретирующие клетки; способствует активации Т-клеток
γ-Интерферон		25000 (димер)	Некоторые Т-хелперы, образующие IL-2	В-клетки, макрофаги, эндотелиальные клетки	Индуцирует молекулы MHC класса II и активирует макрофаги

*** Интерлейкины** представляют собой секретируемые пептиды и белки, с помощью которых осуществляются локальные взаимодействия между лейкоцитами; они, однако, не связывают антиген. Интерлейкины, выделяемые лимфоцитами, называют также **лимфокинами.** Для всех перечисленных здесь белков известна последовательность аминокислот. Приведенные в таблице источники, клетки-мишени в способы действия относятся главным образом к иммунной системе; для большинства интерлейкинов имеется много других источников, мишеней и способов действия, поэтому более точное их название - **цитокины.**

вания клеток между собой. Ранее (разд. 14.2.17) мы уже обсуждали роль *белка, асоциированного с функцией лимфоцитов* (LFA-1), в том, чтобы помогать Т- и В-клеткам (а также другим лейкоцитам) приклепляться к другим клеткам и к внеклеточному матриксу. Т-клетки экспрессируют также белок клеточной поверхности CD2, который помогает им прикрепляться к соответствующим клеткам-мишеням, связываясь с комплементарным ему гликопротеином на поверхности клетки-мишени, называемым LFA-3.

К наиболее изученным белкам межклеточной адгезии Т-клеток относятся гликопротеины CD4 и CD8, которые экспрессируются на поверхности соответственно Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток. У обоих гликопротеинов имеются внеклеточные домены, гомологичные доменам иммуноглобулинов; как полагают, они связываются с инвариантными частями молекул MHC: CD4 с гликопротеинами MHC класса II, а CD8-С гликопротеинами класса I (рис. 18-58).

Некоторые из вспомогательных гликопротеинов, находящихся на поверхности Т-лимфоцитов, представлены в табл. 18-4.

18.6.16. Т-супрессоры главным образом подавляют функцию Т-хелперов [47]

Через несколько лет после того, как была открыта способность Т-лимфоцитов *помогать* В-клеткам в выработке антител, выяснилось, что Т-клетки могут также *подавлять (супрессировать)* ответ В-клеток

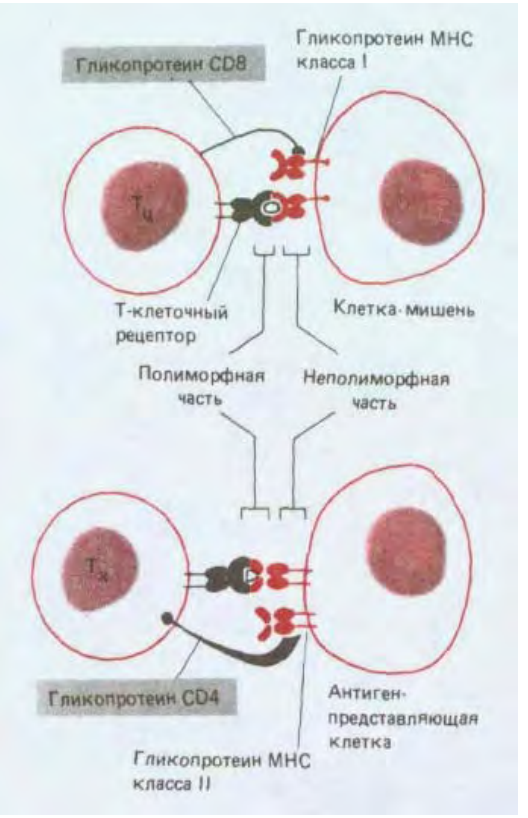


Рис. 18-58. Роль двух вспомогательных рецепторных белков, расположенных на поверхности Т-клеток. Гликопротеин CD8 на цитотоксических Т-клетках связывается, по-видимому, с молекулами MHC класса I, а гликопротеин CD4 на Т-хелперах - с молекулами MHC класса II. Полагают, что в обоих случаях происходит связывание с невариабельными частями молекул MHC. Эти белки межклеточной адгезии помогают стабилизировать связывание Т-клеточных рецепторов с комплексами антиген-MHC на поверхности клетки-мишени, особенно когда связывание слабое. В этих случаях антитела против вспомогательных рецепторных белков CD8 и CD4 ингибируют активацию Т-клеток.
Антитела против CD4 и CD8 широко используются для того, чтобы различать Т-хелперы и цитотоксические Т-клетки соответственно. Вирус, вызывающий СПИД (HIV), инфицирует Т-хелперы, связываясь первоначально с молекулами CD4 на поверхности этих клеток.

или других Т-клеток на антигены. Такая супрессия была впервые продемонстрирована у мышей: их можно было сделать ареактивными (толерантными) по отношению к бараньим эритроцитам путем повторных инъекций больших количеств таких эритроцитов. Когда Т-клетки от толерантных мышей вводили нормальным мышам, те тоже становились специфически толерантными к антигенам бараньих эритроцитов. Это означает, что толерантное состояние обусловлено в данном случае супрессией иммунного ответа Т-клетками. Последующие эксперимента с использованием поверхностных антигенных маркеров показали, что клетки, ответственные за этот эффект, представляют собой специализированный класс Т-лимфоцитов - так называемые **Т-супрессоры.** Но, как

Таблица 18-4. Вспомогательные гликопротеины на поверхности Т-клеток

Белок*	Другие обозначения	Приблизительный мол. вес	На каких клетках экспрессируется	Предполагаемая функция
CD2	T11	50000	На всех Т-клетках	Стимулирует адгезию между Т-клетками и клетками-мишенями путем связывания на клетках мишенях
CD3	Т3	γ-Цепь-25000 δ-Цепь-20000 ε-Цепь-20000 ζ-Цепь-16000	На всех Т-клетках	Способствует передаче сигнала при связывании комплекса антиген-MHC с рецепторам Т-клеток
CD4	Т4 у человека, L3T4 у мыши	50000	На Т-хелперах	Стимулирует адгезию к антиген-представляющим клеткам и В-клеткам, вероятно путем связывания с молекулами MHC класса II
CD8	Т8 у человека, Lyt2 и Lyt3 у мыши	60000 (гомодимер) 70 000 (гетеродимер)	На цитотоксических Т-клетках	Стимулирует адгезию к клеткам-мишеням, инфицированным вирусами, вероятно путем связывания с молекулами MHC класса I
LFA-1	—	α-Цепь-190000 β-Цепь- 95000	На большинстве лейкоцитов	Способствует межклеточной адгезии и адгезии клеток к матриксу

* CD означает *кластер дифференцировки* (cluster of differentiation), поскольку каждый из белков CD был первоначально определен как «антиген дифференцировки» Т-клеток, который узнается рядом моноклональных антител. Их идентификация явилась результатом крупномасштабной совместной работы, в которой было проведено сравнение сотен видов таких антител, полученных во многих лабораториях. Было найдено, что антитела составляют относительно немного групп (или «кластеров»), каждая из которых ; один-единственный белок клеточной поверхности.

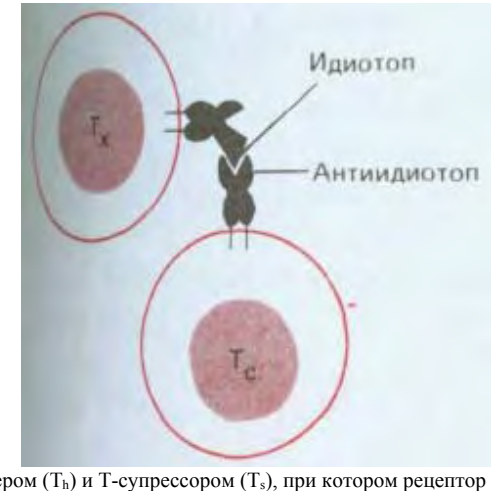


Рис. 18-59. Взаимодействие между Т-хелпером (T_h) и Т-супрессором (T_s), при котором рецептор одной I D клеток узнает идиотоп (антигенную детерминанту, ассоциированную с антиген-связывающим участком) рецептора другой клетки. Другая возможность состоит в том, что супрессорная клетка узнает идиотоп фрагмента рецептора хелперной клетки, экспонированного на поверхности этой клетки в ассоциации с молекулой MHC (не показано). В обоих случаях супрессорная клетка ингибирует функцию хелперной клетки; механизм ингибирования неизвестен.

мы увидим позже, не все формы иммунологической толерантности обусловлены Т-супрессорами.

Т-хелперы и Т-супрессоры, по-видимому, совместно контролируют активность В-клеток и цитотоксических Т-клеток - главных эффекторных клеток иммунной системы. Т-хелперы воздействуют на эти эффекторные клетки прямо, а Т-супрессоры, как полагают, косвенно - путем подавления функции Т-хелперов, от которых зависят эффекторные клетки, хотя механизм такого подавления неизвестен. Как Т-супрессоры узнают Т-хелперы, которые они супрессируют? В свете того, что нам известно о механизме узнавания чужеродных антигенов хелперами (разд. 18.6.10), кажется маловероятным, что на поверхности Т-хелперов будет достаточное количество чужеродного антигена (или фрагментов антигена) для его узнавания Т-супрессорами. Вместо этого можно полагать, что Т-супрессоры часто взаимодействуют с Т-хелперами путем узнавания антигенных детерминант, ассоциированных с антиген-связывающими участками Т-хелперного рецептора - так называемыми *идиотопами* (разд. 18.4.8), как показано на рис. 18-59.

В связи с открытием Т-супрессоров возник вопрос о том, участвуют ли они в естественной толерантности, супрессируя лимфоциты, реагирующие на «свое». Имеющиеся данные пока противоречивы, однако они позволяют предположить, что естественная толерантность обусловлена главным образом элиминацией таких лимфоцитов (так называемая *клональная делеция)* и не зависит от Т-супрессоров. Поскольку для ответа на антиген большинству В-клеток требуются Т-хелперы, в принципе для того, чтобы избежать ответов В-клеток на собственные макромолекулы, достаточно элиминировать реагирующие на «свое» Т-хелперы. Именно такая стратегия используется для многих «своих» антигенов. Например, у нормальных мышей не вырабатываются антитела к своему собственному компоненту комплемента С5. Однако образование таких антител В-клетками можно индуцировать, если нормальным мышам ввести Т-хелперы от мутантных мышей, не имеющих С5 (но идентичных нормальным во всем остальном). Таким образом, единственная причина, по которой нормальные мыши не образуют антител против этого обычного сывороточного белка, состоит в том, что у них отсутствуют или инактивированы Т-хелперы, узнающие С5.

Тем не менее такой механизм не может работать для всех собственных антигенов. Например, те собственные макромолекулы, которые могут активировать В-клетки без помощи Т-клеток, по-видимому, элиминируют узнающие их В-клетки; так же, видимо, действуют и «свои» макромолекулы, присутствующие в высокой концентрации. Аналогичным образом должны элиминироваться цитотоксические Т-клетки, которые могли бы реагировать против нормальных молекул на поверхности «своих» клеток, поскольку цитотоксические Т-лимфоциты могут в некоторой степени активироваться антигеном без Т-хелперов (хотя с помощью Т-хелперов они отвечают гораздо сильнее). Похоже, что Т-супрессоры играют главным образом поддерживающую роль в естественной толерантности и привлекаются к делу только в тех случаях, когда терпит неудачу первичный механизм клональной делеции.

18.6.17. Развивающиеся Т-клетки, которые сильно реагируют с собственными молекулами MHC, элиминируются в тимусе [48]

Как мы видели, первые данные о том, что гликопротеины MHC участвуют в узнавании антигена Т-клетками, были получены в экспериментах, показавших, что Т-клетки могут отвечать на антиген, ассоциированный с собственными молекулами MHC, но не с чужеродными

молекулами МНС, т. е. здесь проявляется *рестрикция МНС* (разд. 18.6.7), Вскоре после этого эксперименты с пересадкой тимуса показали, что Т-клетки в процессе своего развития в тимусе, по-видимому, «обучаются видеть» антиген в ассоциации с собственными, но не с чужеродными молекулами МНС. Один из экспериментов состоял в следующем. Мышь линии X облучали, чтобы убить все Т-клетки, и вводили ей свежий костный мозг как источник новых Т-клеток. Если затем такой мыши пересадить тимус от мыши линии Y, то в нем будут развиваться Т-клетки линии X. Оказалось, что в большинстве случаев образующиеся зрелые Т-клетки линии X узнают чежеродный антиген в ассоциации с гликопротеинами МНС линии Y, но не линии X. Простейшая интерпретация этих результатов состоит в том, что каким-то образом отбираются и пролиферируют те из развивающихся в тимусе Т-клеток, у которых имеются рецепторы, узнающие антиген в ассоциации с молекулами МНС, экспрессируемыми в тимусе. Из этой гипотезы следует, что в ходе такой положительной селекции происходит отбор цитотоксических клеток на узнавание молекул МНС класса I, а хелперных клеток - на узнавание молекул класса II. В пользу этого говорит и тот факт, что антитела к молекулам МНС класса II специфически блокируют развитие Т-хелперов, а антитела к молекулам класса I-развитие цитотоксических Т-клеток.

Такая интерпретация, однако, не вполне удовлетворительна, так как не объясняет, каким образом происходит селекция в. отсутствие тех чужеродных антигенов, которые позднее будут узнаваться Т-клетками. Одна из возможностей состоит в том, что для выживания и созревания Т-клеток им необходимо слабо связаться с собственными молекулами МНС, и поэтому происходит отбор Т-клеток на слабое узнавание собственных МНС, недостаточное само по себе для активации зрелых Т-клеток; активация могла бы происходить только в том случае, когда объединение чужеродного антигена с собственной молекулой МНС дает структуру, с которой Т-клеточный рецептор может связаться прочно.

Данные в пользу *положительной селекции* на слабое узнавание собственных МНС в тимусе менее убедительны, чем данные об *отрицательной селекции,* элиминирующей в тимусе те клетки, которые слишком сильно связываются с собственными молекулами МНС или с собственными МНС в ассоциации с другими собственными молекулами. Наиболее убедительные доказательства того, что сильно реагирующие с собственными МНС Т-клетки элиминируются в тимусе, были получены в генетических исследованиях на мышах. К одному из таких исследований привело случайное наблюдение: один из V-сегментов, кодирующих в геноме вариабельную область β-цепи Т-клеточного рецептора, придает любой экспрессирующей его Т-клетке способность к «сильному» узнаванию специфических молекул МНС класса II (обозначаемых H-2E) независимо от D- и J-областей β-цепи и от V-области α-цепи. (Это позволяет предположить, что V-сегменты для Т-клеточных рецепторов могли быть отобраны в ходе эволюции на способность кодировать рецепторы, связывающие молекулы МНС.) Не все линии мышей, однако, экспрессируют H-2E. У линий, не имеющих H-2E, Т-клетки со специфическим V-сегментом β-цепи выявляются как среди незрелых, так и среди зрелых лимфоцитов тимуса, а у линий, экспрессирующие H-2E, - только в популяции незрелых лимфоцитов. По-видимому, Т-клетки такого типа элиминируются еще до их созревания в тимусе.

Эксперименты с трансплантацией тимуса позволяют предполагать, что положительная селекция, с помощью которой объясняют рестрикцию МНС, и отрицательная селекция, придающая толерантность к собственным МНС, - это два независимых процесса. Положительная селекция происходит, видимо, на поверхности собственных эпителиаль-

ных клеток тимуса, а отрицательная - вероятно, на поверхности клеток, мигрирующих в тимус из костного мозга. Оба типа клеток экспрессируют на своей поверхности молекулы MHC как класса I, так и класса II.

Механизмы, ответственные за селекцию Т-клеток в тимусе, неизвестны. Положительная селекция происходит, возможно, через посредство сигналов для роста или выживания, которым эпителий тимуса снабжает слабо связывающие Т-клетки. В случае отрицательной селекции клетки, происходящие из костного мозга, могут действовать как «извращенные» антиген-представляющие клетки, которые не активируют, а убивают любую узнающую их Т-клетку. Обладающие таким свойством клетки, названные *клетками вето,* были выявлены в опытах in vitro.

Удивительная особенность развития Т-клеток в тимусе состоит в том, что более 95% клеток погибает, не покидая тимуса. Столь большие потери обусловлены, по-видимому, жесткой селекцией в ходе развития Т-клеток.

18.6.18. Некоторые аллельные формы молекул MHC неэффективны в представлении специфических антигенов Т-клеткам; это зависит от генов иммунного ответа (Ir) [49]

В отличие от генов MHC класса I, впервые обнаруженных благодаря их влиянию на отторжение трансплантатов, гены MHC класса II были открыты в связи с их ролью в Т-клеточных иммунных ответах на специфические растворимые антигены. Когда животных иммунизировали простым антигеном, некоторые из них давали очень сильный Т-клеточный ответ, другие же вообще не реагировали. Генетические исследования показали, что способность отвечать на данный антиген контролируется одним геном-геном **иммунного ответа** (Ir); ответы на разные антигены часто определялись разными генами *Ir.* Первыми были картированы гены *Ir,* контролирующие ответ Т-хелперов на антиген, они составили локусы MHC класса П. Гены *Ir,* контролирующие ответ цитотоксических клеток на антиген, были позднее картированы в области тех или иных локусов MHC класса I.

Эти наблюдения казались в высшей степени загадочными, пока не была открыта решающая роль гликопротеинов MHC в представлении антигенов Т-клеткам. Теперь их можно объяснить, просто предполагая, что у особей, генетически «не отвечающих» на какой-либо простой антиген (обычно с одной антигенной детерминантой), нет такой молекулы MHC, которая могла бы связать антигенную детерминанту и эффективно представить ее соответствующей Т-клетке. Это предположение получило сильную поддержку в результате исследований in vitro, показавших, что очищенные молекулы MHC класса II «отвечающего» животного могут связать соответствующий антигенный пептид, а генетически «не отвечающего» - не могут. В дальнейших исследованиях было установлено, что у молекул класса II имеется лишь один антиген-связывающий участок (как и у молекул MHC класса I-см. рис. 18-57), который может связывать весьма разнообразные пептиды со средней константой сродства *(K_a)* около 10^6 л/моль (ΔG = — 8,5 ккал/моль, что эквивалентно энергии образования примерно восьми водородных связей; см. разд. 3.1.1). При этом скорость связывания невелика (примерно в 10^5 раз меньше, чем при типичной реакции антитело-антиген), а будучи связанным, пептид освобождается со временем полужизни более суток. Возможно, что для освобождения пептида необходимо медленное конформационное изменение молекулы MHC.

В некоторых случаях генетической неспособности к ответу на специфические антигены действует, по-видимому, иной механизм. Определенные комбинации собственных молекул MHC с чужеродными пепти-

дами могут оказаться похожими на другие молекулы МНС собственного организма. Поскольку Т-хелперы, реагирующие с такими комбинациями, будут элиминироваться в процессе развития Т-клеток в тимусе путем отрицательной селекции (разд. 18.6.17), животное окажется генетически неспособным отвечать на такие чужеродные пептиды.

18.6.19. Гипотеза совместного узнавания МНС позволяет объяснить трансплантационные реакции и полиморфизм МНС

Гипотеза совместного узнавания МНС объясняет, почему столь многие Т-клетки отвечают на чужеродные молекулы МНС и тем самым вызывают отторжение трансплантата. Т-клетки могут так сильно реагировать с чужеродными гликопротеинами МНС потому, что эти молекулы (либо сами по себе, либо в виде комплекса с другими молекулами на поверхности чужеродной клетки) похожи на различные комбинации собственных молекул МНС с чужеродными пептидами. Так, например, некоторые клоны Т-клеток, реагирующие с вирусным антигеном, ассоциированным с собственной молекулой МНС класса I, реагируют также и с чужеродной молекулой МНС класса Г в отсутствие вирусного антигена.

Гипотеза совместного узнавания МНС позволяет также объяснить необычайный полиморфизм молекул МНС. В эволюционном противоборстве между микробами и иммунной системой позвоночных микробы будут проявлять тенденцию к изменению своих антигенов, чтобы избежать ассоциации с молекулами МНС. Если какое-нибудь изменение окажется в этом смысле эффективным, новая форма сможет широко распространиться и вызвать эпидемию или эпизоотию. При таких обстоятельствах те немногие особи вида-хозяина, у которых окажется новая молекула МНС, способная связываться с измененным антигеном микроорганизма, получат большое селективное преимущество. Кроме того, у особей, имеющих два разных аллеля для каждой молекулы МНС (т. е. у гетерозигот), будет больше шансов противостоять инфекции, чем у особей с идентичными аллелями в каждом данном локусе МНС. Таким образом, отбор будет способствовать усилению и поддержанию большого разнообразия молекул МНС в популяции.

Гипотеза совместного узнавания МНС дала по меньшей мере возможные ответы на многие вопросы, первоначально возникшие в связи с экспериментами по трансплантации органов, однако она породила новую проблему: каким образом весьма небольшое число разных молекул МНС данного животного (менее двух десятков) может связываться с набором разных пептидов, достаточно широким для того, чтобы обеспечить ответ Т-клеток практически на любой белковой антиген? Взаимодействия антигена с антителом и с гликопротеинами МНС класса I стали понятны в результате рентгеноструктурного анализа этих молекул. Такие исследования необходимо теперь распространить на взаимодействие между комплексом МНС-антиген и Т-клеточным рецептором. Технология рекомбинантных ДНК должна в скором времени обеспечить достаточные количества Т-клеточных рецепторов в растворимой форме, что сделает проекты такого рода реальными, В результате работ с использованием рекомбинантных ДНК уже было показано, что все эти белки - молекулы МНС, Т-клеточные рецепторы и антитела - имеют давнюю общую историю.

18.6.20. Молекулы, участвующие в иммунном узнавании, принадлежат к древнему «суперсемейству» [50]

Большинство гликопротеинов, при участии которых в иммунной системе происходит узнавание одной клетки другой или узнавание антигена, содержит родственные структурные элементы, и это позволяет предполагать, что кодирующие их гены имеют общую эволюционную историю. Это **«суперсемейство» Ig** включает *антитела, Т-клеточные рецепторы, гликопротеины* МНС, белки межклеточной адгезии *CD2, CD4* и *CD8,* некоторые из полипептидных цепей комплекса *CD3,* ассоциированного с Т-клеточными рецепторами, и различные *Fc-рецепторы* на лимфоцитах и других лейкоцитах. Все эти белки содержат один или большее число Ig-подобных доменов (гомологичных Ig-единиц). Пептидная цепь каждого из таких доменов обычно содержит около 100 аминокислот и, как полагают, свернута в характерную структуру, похожую на «сэндвич» из двух антипараллельных β-слоев, обычно стабилизированных консервативной дисульфидной связью (разд. 18.3.4). Многие из этих молекул представляют собой димеры или олигомеры большей величины, в которых гомологичные Ig-единицы разных цепей взаимодействуют между собой (рис. 18-60).

Каждая Ig-единица обычно кодируется отдельным экзоном. Кажется вероятным, что все сверхсемейство генов ведет свое происхождение от гена, кодирующего одну гомологичную Ig-единицу и сходного с генами, кодирующими Thy-1 или β_2-микроглобулин (см. рис. 18-53). Возможно, что эти белки участвовали в осуществлении межклеточных взаимодействий. Молекулы, сходные с Thy-1, были выделены из мозга кальмара, поэтому вполне вероятно, что соответствующий ген-предшественник возник еще до того, как позвоночные отделились от своих предков-беспозвоночных около 400 млн. лет назад. По-видимому, новые члены семейства возникали путем дупликаций экзонов и генов; аналогичные дупликации могли дать начало и множественным генным сегментам, кодирующим антитела и Т-клеточные рецепторы.

Поразительная способность к узнаванию делает иммунную систему почти уникальной среди клеточных систем; более сложной оказывается только нервная система. Обе системы состоят из очень большого числа фенотипически различающихся клеток, организованных в сложные сети. В пределах такой сети между отдельными клетками возможны как положительные, так и отрицательные взаимодействия, причем ответ одной клетки распространяется в системе и сказывается на многих других клетках. В отличие от сети нейронов, относительно жестко

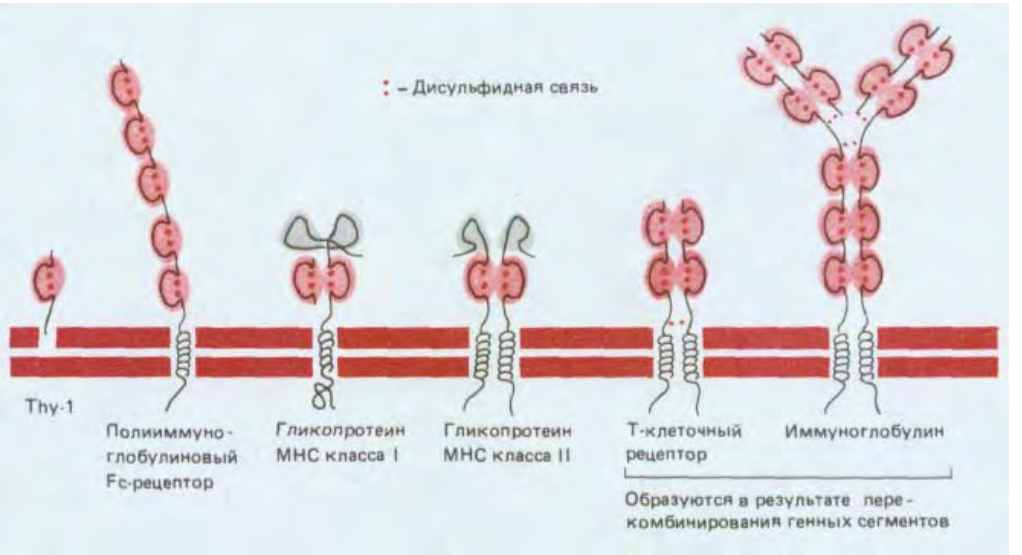


Рис. 18-60. Некоторые из мембранных белков, принадлежащих к *иммуноглобулиновому суперсемейству.* Гомологичные иммуноглобулиновые и иммуноглобулиноподобные домены выделены цветом; обратите внимание, что юнцы каждой из петель, образующих такой домен, соединены дасульфидными связями. Большинство доменов взаимодействует с гомологичными доменами ассоциированной полипептидной цепи. Кроме того, некоторые из доменов полипептидной цепи полииммуноглобулинового Fc-рецептора взаимодействуют друг с другом (не показано); этот рецептор связывает и димерный (см. разд. 18.2.5), и полимерный IgM, отсюда его название. Гликопротеин Thy-1 ковалентно связан с молекулой гликоизилированного фосфолипида, расположенной в мембране (см. разд. 8.6.13.). На рисунке не изображены вспомогательные белки CD4 и CD8 Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток соответственно, белковый комплекс CD3, ассоциированный с Т-клеточными рецепторами, и CD2 (см. табл. 18-4). Все эти белки тоже содержат иммуноглобулиноподобные домены. Иммуноглобулиновое суперсемейство включает, кроме перечисленных белков, также и белки клеточной поверхности, участвующие в межклеточных взаимодействиях вне иммунной системы, например молекулы адгезии нервных клеток (N-CAM-neural cell adhesion molecules, см. разд. 14.3.6).

фиксированной в пространстве, клетки, составляющие иммунологическую сеть, непрерывно перемещаются и лишь кратковременно взаимодействуют друг с другом. В следующей главе мы рассмотрим клети нервной системы позвоночных, которая особенно выделяется среди других клеточных систем своей сложной и хитроумной организацией.

Заключение

Существуют по меньшей мере три функционально различных подкласса Т-лимфоцитов: 1) цитотоксические Т-клетки, способные непосредственно убивать клетки, инфицированные вирусами; 2) Т-хелперы, выделяющие целый ряд локальных химических медиаторов (интерлейкинов), которые помогают В-клеткам в осуществлении гуморального иммунного ответ (образовании антител), стимулируют размножение активированных Т-клеток и активируют макрофаги; 3) Т-супрессоры, которые, по-видимому, в основном подавляют реакцию Т-хелперов. Т-хелперы и Т-супрессоры - главные регуляторы иммунных ответов.

Рецептор Т-клеток представляет собой антителоподобный гетеродимер, кодируемый генами, которые собираются из нескольких генных *сегментов в процессе развития Т-клеток в тимусе. Активация Т-клеток происходит, когда эти рецепторы связываются с фрагментами чужеродных антигенов, ассоциированными с гликопротеинами МНС на поверхности других клеток собственного организма. Такой процесс совместного узнавания МНС гарантирует, что Т-клетки узнают чужеродный антиген только в том случае, если он связан с соответствующей клеткой-мишенью. Существуют два основных класса молекул МНС: 1) молекулы класса I, имеющиеся на поверхности почти всех соматических клеток с ядрами, - они представляют фрагменты вирусных белков цитотоксическим Т-клеткам; 2) молекулы класса II, имеющиеся на поверхности В-клеток и специализированных антиген-представляющих клеток, - они представляют фрагменты чужеродных антигенов Т-хелперам. Тот факт, что определенные аллельные формы молекул МНС классов I и II неспособны представлять Т-клеткам определенные антигенные детерминанты, позволяет объяснить, почему эти молекулы столь полиморфны*

Литература

Общая

Golub E. S. Immunology: A Synthesis. Sunderland, MA; Sinauer, 1987.

Hood L. E., Weissman I. L., Wood W. B., Wilson J. H. Immunology, 2nd ed. Menlo Park CA; Benjamin-Cummings, 1984.

Male D., Champion W., Cooke A. Advanced Immunology. London. Gower, 1987. *Paul WE., ed.* Fundamental Immunology. New York. Raven, 1984. (Есть русский перевод: Пол У., ред. Иммунология, в трех томах. М.: Мир, 1987-1989.) *Roitt I. M., Brostoff J., Male D.K.* Immunology. London; Gower, 1985.

Цитированная

1. *Gowans J.L., McGregor D.D.* The immunological activities of lymphocytes. Pro] Allergy, **9,** 1-78, 1965.

2. *Greaves M. F., Owen J. J. T., Raff M. C.* T and B Lymphocytes: Origins, Propertie and Roles in Immune Responses. Amsterdam, Excerpta Medica, 1973.

3. *Cooper M., Lawton A.* The development of the immune system. Sci. Am., **231(5)** 59-72, 1974.

Owen J. J. T. Ontogenesis of lymphocytes. In: B and T Cells in Immune Recognition (F.Loor, G.E. Roelants, eds.), pp. 21-34. New York, Wiley, 1977.

4. *Möller G., ed.* Functional T Cell Subsets Defined by Monoclonal Antibodie Immunol. Rev., Vol. 74, 1983.

Raff M.C. Cell-surface immunology. Sci. Am., **234(5)**, 30-39, 1976. *Reinherz E.L., Schlossman S. F.* The differentiation and function of human lymphocytes. Cell, **19,** 821-827, 1980.

5. *Ada G. L.* Antigen binding cells in tolerance and immunity. Transplant. Rev., **5,** 105-129, 1970.

Ada G.L., Nossal G. The clonal selection theory. Sci. Am., **257(2)**, 62 69, 1987.
Burnet F. M. The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Nashville, TN, Vanderbilt University Press, 1959.
Wigzell H. Specific fractionation of immunocompetent cells. Transplant. Rev., **5,** 76-104, 1970.
6. *Pink J. R. L., Askonas B. A.* Diversity of antibodies to cross-reacting nitrophenyl haptens in inbred mice. Eur. J. Immunol., **4,** 426 429, 1974.
7. *Butcher E. C., Weissman I. L.* Lymphoid Tissues and Organs. In: Fundamental Immunology (W.F.Paul, ed.), pp. 109-127, New York, Raven, 1984. (Есть русский перевод: Батчер Э. С., Байссман И. Л. Лимфоидные органы и ткани. В кн: Иммунология (У. Пол, ред.), т. 1, с. 173-203. М.: Мир, 1987.)
Gallatin M., et al. Lymphocyte homing receptors. Cell, **44,** 673 680, 1986.
Gowans J. L., Knight E. J. The route of re-circulation of lymphocytes in the rat. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.), **159,** 257-282, 1964.
Sprent J. Mirgation and lifespan of lymphocytes. In: B and T Cells in Immune Recognition (F. Loor, G.E. Roelants, eds.), pp. 59-82. New York, Wiley, 1977.
Woodruff J. J., Clarke L.M., Chin Y.H, Specific cell-adhesion mechanisms determining migration pathways of recirculating lymphocytes. Ann. Rev. Immunol**., 5,** 201-222, 1987.
8. *Greaves M. F., Owen J. J. T., Raff M. C.* T and B Lymphocytes: Origins, Properties and Roles in Immune Responses, pp. 117-186. Amsterdam, Excerpta Medica, 1973.
Rajewsky K., Forster I., Cumano A. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. Science, **238,** 1088-1094, 1987.
9. *Billingham R. E., Brent L., Medawar P. B.* Quantitative studies on tissue transplantation immunity. III. Activity acquired tolerance. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.), **239,** 357-414, 1956.
Harris D. E., Cairns L., Rosen F. S., Borel Y. A natural model of immunologic tolerance. Tolerance to murine C5 is mediated by T cells and antigen is required to maintain unresponsiveness. J. Exp. Med., **156,** 567-584, 1982.
Lindstrom J. Immunobiology of myasthenia gravis, experimental autoimmune myasthenia gravis and Lambert-Eaton syndrome. Annu. Rev. Immunol., **3,** 109-132, 1985.
Nossal G. J. V. Cellular mechanisms of immunologic tolerance. Annu. Rev. Immunol., **1,** 33-62, 1983.
Owen R.D. Immunogenetic consequence of vascular anastomoses between bovine twins. Science, **102,** 400-401, 1945.
10. *Howard J.G., Mitchison N.A.* Immunological tolerance. Prog. Allergy**, 18,** 43-96, 1975.
11. *Davies D.R., Metzger H.* Structural basis of antibody function. Annu. Rev. Immunol., **1**, 87-118, 1983.
Kabat E. A. Structural Concepts in Immunology and Immunochemistry, 2nd ed. New York, Holt, Rinehart and Winston, 1976.
Nisonoff A., Hopper J. E ., Spring S. B. The Antibody Molecule. New York, Academic Press, 1975.
12. *Möller G., ed.* Lymphocyte Immunoglobulin: Synthesis and Surface Representation. Transplant. Rev., Vol. 14, 1973.
13. *Dutton R.W., Mishell R.I.* Cellular events in the immune response. The *in vitro* response of normal spleen cells to erythrocyte antigens. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **32,** 407-414, 1967.
Jerne N.K., et al. Plaque forming cells: methodology and theory. Transplant. Rev., **18,** 130-191, 1974.
14. *Edelman G.M.* The structure and function of antibodies. Sci. Am., **223(2),** 34-42, 1970. *Porter R. R.* Structural studies of immunoglobulins. Science, **180,** 713-716, 1973.
15. *Ishizaka T., Ishizaka K.* Biology of immunoglobin E. Prog. Allergy, **19,** 60-121, 1975.
Koshland M. E. The coming of age of the immunoglobulin J chain. Annu. Rev. Immunol., **3,** 425-454, 1985.
Morgan E. L., Weigle W. O. Biological activities residing in the Fc region of immunoglobulin. Adv. Immunol., **40,** 61-134, 1987.
Solari R., Kraehenbuhl J.-P. The biosynthesis of secretory component and ist role in the transepithelial transport of IgA dimer. Immunol. Today**, 6,** 17-20, 1985.
Underdown B.J., Schiff J.M. Immunoglobulin A: strategic defense initiative at the mucosal surface. Annu. Rev. Immunol**., 4,** 389-418, 1986.
Unkeless J. C., Scigliano E., Freedman V. Structure and function of human and murine receptors for IgG. Annu. Rev. Immunol., **6**, 251-282, 1988.
16. *Berzofsky J.A., Berkover I.J.* Antigen-antibody interactions. In Fundamental Immunology (W.E.Paul, ed.), pp. 595-644. New York, Raven, 1984. (Есть русский перевод: Берзофски Д.; Берковер А. Д. Взаимодействие антиген-антитело. В кн.: Иммунология (У. Пол, ред.), т. 3, с. 5-88. М.: Мир, 1989.)

17. *Capra J. D., Edmundson A. B.* The antibody combining site. Sci. Am., **236(1)**, 50-59, 1977.
Wu T. T., Kabat E. A. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med., **132,** 211-250, 1970.
18. *Sakano H., et al.* Domains and the hinge region of an immunoglobulin heavy chain are encoded in separate DNA segments. Nature, **277,** 627-633, 1979.
19. *Alzari P. M., Lascombe M.-B., Poljak R. J.* Three-dimentional structure of antibodies. Annu. Rev. Immunol., 6, 555-580, 1988.
Capra J.D., Edmundson A.B. The antibody combining site. Sci. Am., **236(1)**, 50-59, 1977.
20. *Dreyer W. J., Bennett J. C.* The molecular basis of antibody formation: a paradox Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **54,** 864-869, 1965.
Hozumi N., Tonegawa S. Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **73,** 3628-3632, 1976.
21. *Alt F. W., Blackwell T.K., Yancopoulos G.D.* Development of the primary antibody repertoire. Science, **238**, 1079-1087, 1987.
Leder P. The genetics of antibody diversity. Sci. Am., **246(5),** 72-83, 1982. *Tonegawa S.* The molecules of the immune system. Sci. Am., **253(4)**, 122-131, 1985.
22. *Gearhart P. J., Johnson N. D., Douglas R., Hood L.* IgG antibodies to phosphorylcholine exhibit more diversity than their IgM counterparts. Nature, **291,** 29-34, 1981.
Griffiths G. M., Berek C., Kaartinen M., Milstein C. Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. Nature, **312,** 271-275,
1984. *Möller G., ed.* Role of Somatic Mutation in the Generation of Lymphocyte Diversity. Immunol. Rev., Vol. 96, 1987.
Rajewsky K., Forster I., Cumano A. Evolutionary and somatic selection of the antibody repertoire in the mouse. Science, **238,** 1088-1094, 1987.
23. *Alt F. W., et al.* Ordered rearrangement of immunoglobulin heavy chain variable region segments. EMBO J., **3,** 1209-1219, 1984.
Yancopoulos G. D., Alt F. W. Regulation of the assembly and expression of variable region genes. Annu. Rev. Immunol., **4,** 339-368, 1986.
24. *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.
25. *Cebra J.J., Komisar J.L., Schweitzer P. A.* C_H isotype switching during normal B-lymphocyte development. Annu. Rev. Immunol., **2,** 493-548, 1984.
Shimizu A., Honjo T. Immunoglobulin class switching. Cell**, 36,** 801-803, 1984.
26. *Jerne N.K.* The immune system. Sci. Am., **229(1),** 52-60, 1973.
Jerne N. K. Toward a network theory of the immune system. Ann. Immunol. Inst. Pasteur (Paris), **125C,** 378-389, 1974.
Möller G., ed. Idiotype Networks Immunol. Rev., Vol. 79, 1984. *Rajewsky K., Takemori T.* Genetics, expression and function of idiotypes. Annu. Rev. Immunol., **1,** 569-608, 1983.
27. *Lachmann P. J.* Complement. In Clinical Aspects of Immunology, 4th ed. (P.J. Lachmann, D. Peters, eds.), pp. 18-49, Oxford U.K., Blackwell, 1982,
Müller-Eberhard H. J. Molecular organization and function of the complement system. Annu. Rev. Biochem., **57,** 321-348, 1988.
Reid K. B. M., Porter R. R. The proteolytic activation systems of complement. Annu. Rev. Biochem., 50, 433-464, 1981.
28. *Cooper N. R.* The classical complement pathway: activation and requlation of the first complement component. Adv. Immunol.**, 37,** 151-216, 1985.
29. *Muller-Eberhard H.J., Schreiber R.D.* Molecular biology and chemistry of the alternative pathway of complement. Adv. Immunol., **29**, 1-53, 1980.
30. *Müller-Eberhard H. J.* The membrane attack complex of complement. Annu. Rev. Immunol., 4, 503-528, 1986.
31. *Campbell R.D., Carroll M. C., Porter R.R.* The molecular genetics of components of complement. Adv. Immunol., **38,** 203-244, 1980.
Lachmann P.J., Hobart M.J. Genetics of complement. Trends Genet., **1,** 145-149, 1985.
Reid K. B. Activation and control of the complement system. Essays Biochem., **22,** 27-68, 1986.
32. *Allison J. P., Lanier L. L.* The structure, function and serology of the T cell antigen receptor complex. Annu. Rev. Immunol., **5,** 503-540, 1987.
Clevers H., Alarcon B., Wileman T., Terhorst C. The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic ensemble. Annu. Rev. Immunol., **6,** 629-662, 1988.
Davis M.M., Bjorkman P.J. T-cell antigen receptor genes and T-cell recignition. Nature, **334,** 395-402, 1988.
Hedrick S. M., Cohen D., Nielsen E. A., Davis M. M. Isolation of cDNA clones

marrow cells - a model for the two-cell theory of immunocompetence. Transplant. Rev., **1,** 92-113, 1969.
Davies A.J.S. The thymus and the cellular basis of immunity. Transplant. Rev.,**1,** 43-91, 1969.
44. *Chesnut R. W., Grey H. M.* Antigen presentation by B cells and its significance in T-B interactions. Adv. Immunol., **39**, 51-94, 1986.
DeFranco A. L. Molecular aspects of B-lymphocyte activation. Annu. Rev. Cell Biol, **3,** 143-178, 1987. *Kishimoto T., Hirano T.* Molecular regulation of B lymphocyte response. Annu. Rev. Immunol., **6,** 485-512, 1988.
Möller G., ed. 1L-4 and 1L-5: Biology and Genetics. Immunol. Rev., Vol. **102,**1988.
Paul W. E., Ohara J. B-cell stimulating factor-1/Interleukin 4. Annu. Rev. Immunol,
5, 429-460, 1987. *Cambier J.C., Ransom J. T.* Molecular mechanisms of transmembrane signaling in B lymphocytes. Annu. Rev. Immunol., **5,** 175-200, 1987.
45. *Möller G., ed.* Gamma Interferon. Immunol. Rev., Vol. 97, 1987.
Mosmann T. R., Coffman R. L. Two types of mouse helper T-cell clone implications for immune regulation. Immunol. Today**, 8,** 223-227, 1987.
Powrce F., Mason D. Phenotypic and functional heterogeneity of $CD4^+$ T cells. Immunol. Today, **9,** 274-277, 1988.
46. *Littman D. R.* The structure of the CD4 and CD8 genes. Annu. Rev. Immunol., **5,** 561-584, 1987.
Springer T.A., Dustin M.L., Kishimoto T.K., Marlin S.D. The lymphocyte-function associated LFA-1, CD2 and LFA-3 molecules: cell adhesion receptors of the immune system. Annu. Rev. Immunol.**, 5,** 223-252, 1987.
47. *Asherson G. L., Colizzi V., Zembala M.* An overview of T suppressor cell circuits. Annu. Rev. Immunol., **4,** 37-68, 1986.
Dorf M.E., Benacerraf B. Suppressor cells and immunoregulation. Annu. Rev. Immunol., 2, 127-158, 1984.
Gershon R. K. T-cell control of antibody production. Contemp. Top. Immunobiol, **3,** 1-40, 1974.
Harris D. E., Cairns L., Rosen F. S., Borel Y. A natural model of immunologic tolerance. Tolerance to murine C5 is mediated by T cells and antigen is required to maintain unresponsiveness. J. Exp. Med**., 156,** 567-584, 1982.
Mitchison N. A., Griffiths J. A., Oliveira D. B. G. Immunogenetics of suppression. Br. J. Clin. Pract, **40,** 225-229, 1986.
48. *Bevan M.* In a radiation chimera, host H-2 antigens determine the immune responsiveness of donor cytotoxic cells. Nature, **269,** 417-419, 1977.
Kappler J. W., Roehm N., Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell, 49, 273-280, 1987.
Sprent J., Lo D., Gao E.-K., Ron Y. T cell selection in the thymus. Immunol. Rev., 101, 5-19, 1988.
Sprent J., Webb S. Function and specificity of T cell subsets in the mouse. Adv. Immunol., **41,** 39-133, 1987.
von Boehmer H. The developmental biology of T lymphocytes. Annu. Rev. Immunol., **6,** 309-326, 1988.
49. *Alien P.M., Babbitt B. R., Unanue E.R.* T cell recognition of lysozyme: the biochemical basis of presentation. Immunol. Rev., **98,** 171-187, 1987.
Buus S., Sette A., Grey H. M. The interaction between protein-derived immunogenic peptides and Ia. Immunol. Rev., **98,** 115-142, 1987.
Mengle-Gaw L., McDevitt H. 0. Genetics and expression of murine I_A antigens Annu. Rev. Immunol., **3,** 367-396, 1985.
Schwartz R. H. Immune response (Ir) genes in the murine major histocompatibiliy complex. Adv. Immunol., **39,** 31-201, 1986.
50. *Williams A. F., Barclay A. N.* The immunoglobulin superfamily - domains for cell surface recognition. Annu. Rev. Immunol.**, 6,** 381-406, 1988.

19. Нервная система

Можем ли мы надеяться, что поймем работу человеческого мозга? Нервная система, состоящая примерно из 10^{11} клеток, число связей между которыми еще в тысячу раз больше, гораздо сложнее и, вероятно, во многих отношениях обладает большими возможностями, чем крупнейший из современных компьютеров. Однако современное понимание мозга настолько примитивно, что нельзя с уверенностью сказать, есть ли вообще смысл в подобном сравнении. Например, мы не знаем, сколько функционально различных категорий нервных клеток имеется в мозгу, и не можем сказать, как работают наши нейроны, когда мы слышим слова или протягиваем руку за каким-то предметом, не говоря уже о процессах, протекающих при доказательстве теоремы или сочинении стихов.

И все же, в то время как мозг в целом остается самым таинственным органом нашего тела, свойства отдельных нервных клеток, или *нейронов,* как это ни парадоксально, изучены лучше, чем свойства любых других клеток. По крайней мере на уровне клетки может быть выявлен ряд простых общих принципов, которые позволяют приблизиться к пониманию работы каких-то малых частей нервной системы. Например, существенный прогресс достигнут в объяснении клеточного механизма простейших поведенческих реакций и даже в области зрительного восприятия. Применительно к практике знание молекулярной биологии нейронов открывает возможности для биохимического контроля мозговых функций с помощью лекарственных препаратов и дает надежду, что будут разработаны более эффективные способы лечения многих психических заболеваний.

В этой главе мы сосредоточим внимание на нервной клетке и попытаемся показать, как изучение ее свойств помогает проникнуть в суть организации нейронов на более высоких уровнях.

19.1. Клетки нервной системы: строение и функция [1]

Нервная система обеспечивает быструю связь между отдаленными частями тела. Благодаря своей роли коммуникативной сети нервная система управляет реакциями на внешние раздражители, перерабатывает информацию и генерирует сложные комплексы сигналов для регулирования сложного поведения. Кроме того, нервная система способна самообучаться: по мере обработки и запоминания сенсорной информации о внешнем мире происходит надлежащая «подстройка» нервной системы, в результате чего изменяется характер последующих действий.

Основные пути передачи нервных сигналов были прослежены более ста лет назад, еще до того как стала понятна роль отдельных нервных клеток. На рис. 19-1 показан общий план организации нервных связей. Подобно большому компьютеру, нервная система позвоночного состоит из главного процессора - центральной **нервной системы,** включающей

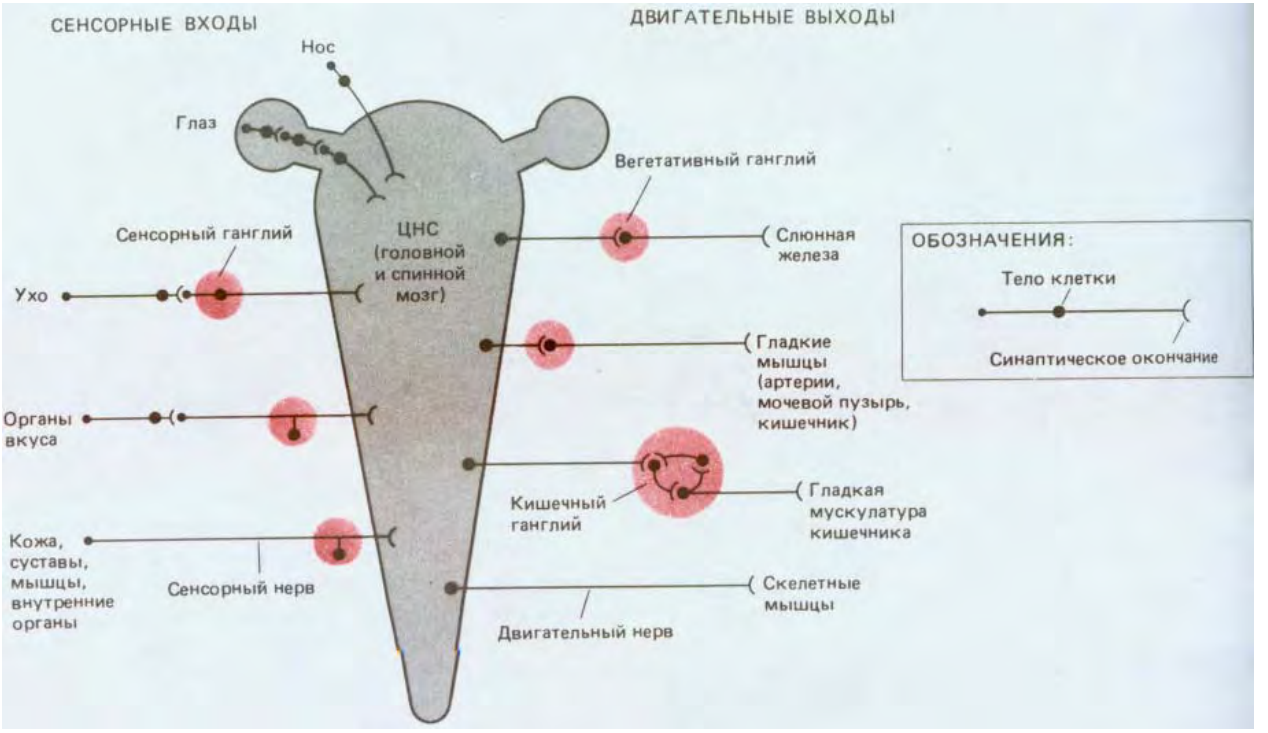


Рис. 19-1. Сильно упрощенная схема организации нервной системы позвоночного. Показано, как сенсорная информация передается с периферии в центральную нервную систему (ЦНС), а двигательные команды - из ЦНС на периферию. Передачу сенсорных и двигательных сигналов осуществляют нервные клетки, тела которых (показаны большими черными точками) во многих случаях сгруппированы в ганглиях (цветные кружки) за пределами ЦНС, а аксоны объединены в пучки и образуют нервы (черные линии). Нервы, ганглии и органы чувств вместе составляют *периферическую нервную систему.* Некоторые ганглии служат просто «передаточными станциями», а другие (особенно это касается вегетативных кишечных ганглиев, регулирующих перистальтику) представляют собой сложные системы связанных между собой нейронов, способных функционировать даже без всякого участия ЦНС. Вставочные нейроны, входящие в состав центральной нервной системы, не показаны.

головной и спинной мозг, - который с помощью «проводов», т. е. *нервов,* соединен с многочисленными периферическими структурами: органами чувств, доставляющими входную информацию, и мышцами (а также в меньшей степени железами), реализующими выходные команды. Имеются также связи с группами периферических нервных клеток-*ганглиями,* которые в одних случаях просто поддерживают коммуникацию между периферией и центром, а в других служат вспомогательными мини-компьютерами. У беспозвоночных имеется сходная организация, но центральная нервная система у них развита слабее, тогда как ганглии играют более значительную роль и более автономны.

У разных животных детальная структура нервных связей чрезвычайно сильно варьирует в пределах общей схемы; однако свойства отдельных нейронов во многом сходны независимо от того, идет ли речь о моллюсках, насекомых, амфибиях или млекопитающих.

19.1.1. Функция нервной клетки определяется длиной ее отростков [2]

Фундаментальная задача, стоящая перед **нейроном,** состоит в приеме и передаче сигналов. Выполнять эти функции нейрону позволяют его необычные размеры и форма: длина нервной клетки человека, соединяющей, например, спинной мозг с какой-либо мышцей стопы, может достигать одного метра. Каждый нейрон состоит из *тела* клетки (содержащего ядро) и расходящимися от него длинными тонкими отростками. Обычно это один длинный **аксон,** проводящий сигналы от тела клетки к отдаленным мишеням, и несколько более коротких ветвящихся **дендритов,** которые, подобно антеннам, принимают сигналы от аксонов других нервных клеток (рис. 19-2). Тело нейрона тоже принимает сигналы. Отдаленный конец аксона обычно ветвится, что позволяет передавать сигнал одновременно нескольким клеткам-мишеням. Степень ветвления дендритов тоже может быть очень высокой - в некоторых случаях один нейрон способен принимать до 100000 сигна-

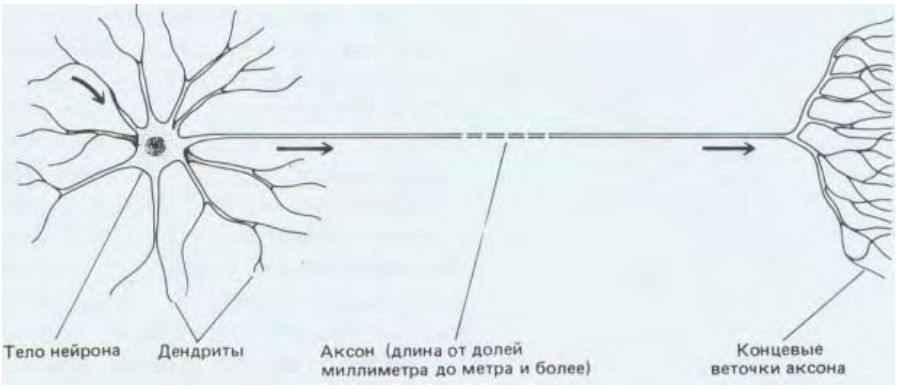


Рис. 19-2. Схематическое изображение типичного нейрона позвоночных. Стрелками указано направление передачи сигналов. Самые крупные нейроны достигают у человека длины около метра и имеют аксоны диаметром до *15* мкм.

лов. Характер ветвления аксонов и дендритов у нейронов функционально различных типов может быть поразительно разнообразным (рис. 19-3).

19.1.2. Нервные клетки передают электрические сигналы [3]

Значение сигналов, передаваемых нервной клеткой, зависит от того, какую роль играет эта клетка в работе нервной системы в целом. В *моторных (двигательных) нейронах* сигналы служат командами для сокращения определенных мышц. В *сенсорных (чувствительных) нейро-*

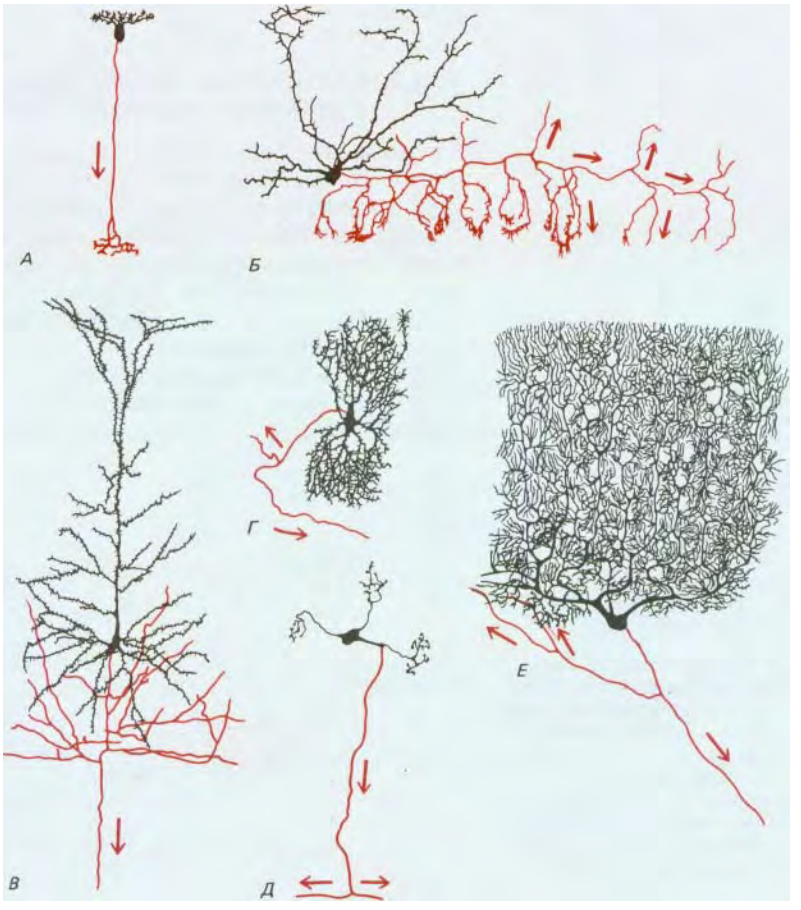


Рис. 19-3. Некоторые из многочисленных типов нервных клеток позвоночных, как они выглядят после окраски по Гольджи. Эта методика, включающая погружение ткани в раствор солей металлов, позволяет полностью окрашивать в черный цвет небольшую долю клеток, имеющихся в препарате, и дает возможность увидеть все разветвления клеточных отростков. От тела нейрона отходит множество дендритов, получающих входные сигналы от других клеток, и один тонкий ветвящийся аксон, передающий выходные сигналы в направлении, показанном стрелками. Аксоны представлены красным цветом, тело клетки и дендриты - черным. У клеток *А* и Б короткие аксоны, они изображены здесь полностью. У клеток В - *Е* аксоны очень длинные, и на рисунке показаны только их начальные участки. *А* - биполярная клетка из сетчатки ящерицы; Б-корзинчатая клетка из мозжечка мыши; В-пирамидная клетка из коры головного мозга кролика; Г-нейрон из ствола мозга человека; Д-одна из клеток-зерен мозжечка кошки; *Е*- клетка Пуркинье из мозжечка человека. Эта последняя клетка, имеющая широко разветвленную сеть дендритов, получает сигналы от более чем 100000 других нейронов; она представляет собой элемент мозгового механизма, регулирующего сложные движения. Рисунки сделаны в разных масштабах: длина биполярной клетки *(А)* около 100 мкм, тогда как изображенная на рисунке часть клетки Пуркинье (Е) имеет ширину около 400 мкм (длина ее аксона достигает нескольких сантиметров).

нах они передают информацию о раздражителях определенного та таких как свет, механическая сила или химическое вещество, воздействующих на тот или иной участок тела. В *интернейронах (вставочных нейронах),* связывающих один нейрон с другим, сигналы обеспечивают сложное взаимодействие и объединение информации из нескольких различных источников и участвуют в регуляции сложного поведения

Несмотря на различное значение сигналов, природа их во всех случаях одинакова и состоит в изменении электрического потенциала плазматической мембране нейрона. Связь осуществляется благодаря тому, что электрическое возмущение, возникшее в одном участке клетки, распространяется на другие участки. Эти возмущения затухают по мере удаления от их источника, если нет дополнительного усиления на пути следования сигнала. На коротких расстояниях затухание незначительно, и многие небольшие нейроны проводят сигналы пассивно, без усиления. Однако для дальней связи такого пассивного распространения недостаточно. Поэтому нейроны с более длинными отростками используй активный сигнальный механизм, составляющий одно из самых удивительных и характерных свойств нейрона. Электрический стимул, сила которого превышает определенную пороговую величину, вызывает «вспышку» электрической активности, распространяющейся с большой скоростью вдоль плазматической мембраны нейрона и поддерживаемо с помощью автоматического усиления на протяжении всего пути. Эта бегущая волна электрического возбуждения, называемая *потенций» действия* или *нервным импульсом,* способна передавать информацию без затухания от одного конца нейрона к другому со скоростью до 100 м/с и более.

19.1.3. Связь между нейронами осуществляется в синапсах с помощью химических сигналов [4] |

Сигналы, проводимые нейронами, передаются от одной клетки к другой в особых местах контакта, называемых **синапсами.** Обычно передача осуществляется, как это ни странно на первый взгляд, непрямым путем. Клетки электрически изолированы друг от друга: *пресинаптическая* клетка отделена от *постсинаптической* промежутком - *синаптической щелью.* Изменение электрического потенциала в пресинаптической клетке приводит к высвобождению вещества, называемого *нейромедиатором,* которое хранится в ограниченных мембраной *синаптических пузырьках* и высвобождается путем экзоцитоза. Нейромедиатор диффундирует через синаптическую щель и вызывает изменение электрофизиологического состояния постсинаптической клетки (рис. 19-4). Как



Рис. 19-4. Схема типичного синапса. Электрический сигнал, приходящий в окончание аксона клетки *А,* приводит к высвобождению в синаптическую щель химического посредника (нейромедиатора), который вызывает электрическое изменение в мембране дендрита клетки *В.* Широкая стрелка указывает направление передачи сигнала.

мы увидим позже, механизм передачи сигнала через такие *химические синапсы* более гибок и доступен для адаптации, чем прямая электрическая связь, осуществляемая через щелевые контакты (разд. 14.1.7), которая тоже используется, но гораздо реже.

Химический синапс - это место интенсивной биохимической активности, включающей распад, обновление и секрецию белков и других молекул. Однако биохимическим центром нейрона служит тело клетки, где заложены основные «инструкции» по синтезу белка. Поэтому нейрону необходима эффективная внутриклеточная система транспорта молекул из тела клетки к самым отдаленным участкам аксона и дендритов. Как же организована эта транспортная система и какие молекулы переносятся в действительности?

19.1.4. Вновь синтезируемые материалы переносятся из тела нервной клетки в аксоны и дендриты с помощью механизмов медленного и быстрого транспорта [5]

С помощью электронной микроскопии установлено, что тело типичного крупного нейрона содержит огромное количество рибосом, часть которых находится в цитозоле, а часть прикреплена к мембранам гранулярного эндоплазматического ретикулума (рис. 19-5, А). Хотя дендриты часто содержат небольшое количество рибосом, в аксоне их нет, и поэтому белки аксона должны синтезироваться на рибосомах тела клетки (рис. 19-5, Б). Потребности аксона значительны: например, толщина большого мотонейрона человека может достигать 15 мкм при длине

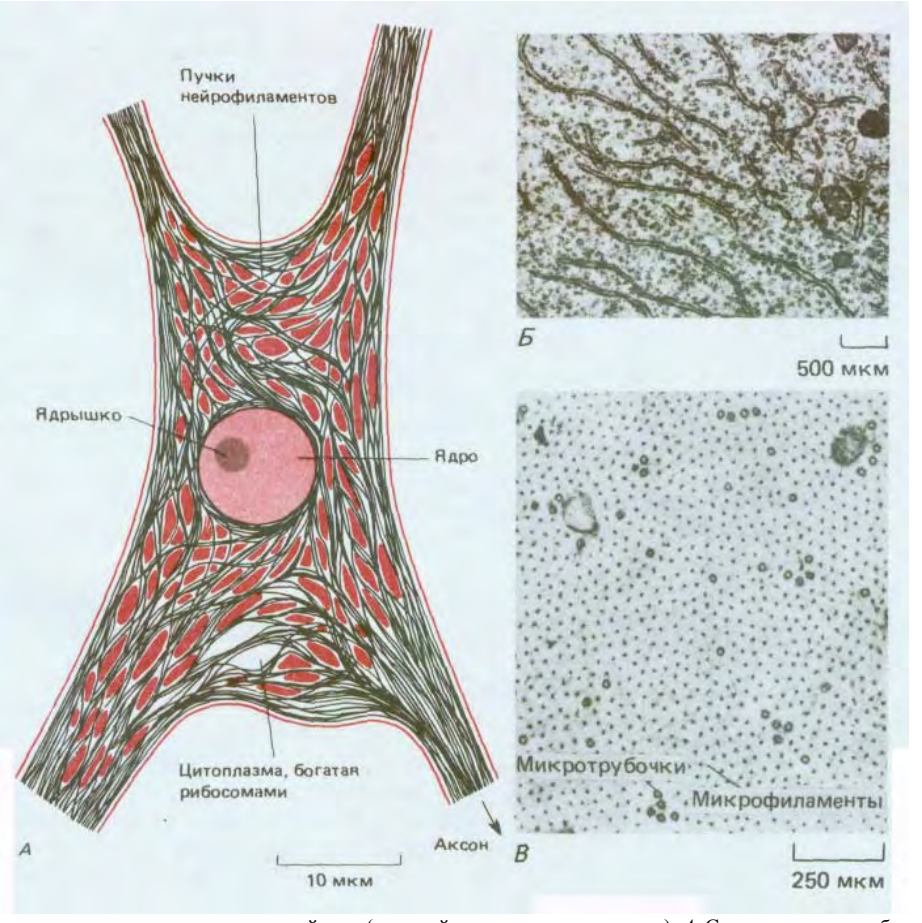


Рис. 19-5. Строение цитоплазмы типичного крупного нейрона (мотонейрона из спинного мозга). *А.* Схематическое изображение тела клетки при небольшом увеличении; видно, что участки цитоплазмы, богатые рибосомами, расположены между пучками нейрофиламентов и других белков цитоскелета. *Б.* Электронная микрофотография одного из таких богатых рибосомами участков; которые рибосомы прикреплены к гранулярному эндоплазматическому ретикулуму, другие ни с чем к связаны. *В.* Электронная микрофотография части поперечного среза аксона; можно видеть большое число микрофиламентов и микротрубочек, но рибосомы отсутсвуют. Мембранные пузырьки передвигаются, вероятно, вдоль ближайших микротрубочек с помощью механизма быстрого аксонного транспорта. (С любезного разрешения Jennifer La Vail *(Б) и* John Hopkins (В).)



Рис. 19-6. Нейрон как секреторная клетка, у которой место секреции (окончание аксона) расположено на большом расстоянии от места синтеза макромолекул (тела клетки). При такой организации необходим механизм быстрого аксонного транспорта. Из приведенной схемы не следует заключать, что все синаптические пузырьки транспортируются из тела нейрона: в большинстве нейронов они образуются в основном путем повторного использования мембраны в окончании аксона.

1 м, что соответствует объему примерно 0,2 мм^3, а это почти в 10000 раз больше объема печеночной клетки. Поскольку в таком нейроне только одно ядро, соотношение цитоплазмы к ДНК в нейроне намного выше, чем в любой другой клетке человеческого организма.

В аксоне в наибольших количествах содержатся белки, образующие микротрубочки, нейрофиламенты (класс промежуточных филаментов) и актиновые филаменты (рис. 19-5, *В).* Белки цитоскелета доставляются из тела клетки и движутся по аксону со скоростью от 1 до 5 мм в сутки. Это **медленный аксонный транспорт** (подобный вид транспорта имеется и в дендритах, содержащих несколько иной набор белков, связанных с микротрубочками - см. разд. 11.4.7). Другие белки цитозоля, включая многие ферменты, тоже переносятся с помощью медленного аксонного транспорта, механизм которого не ясен.

Нецитозольные материалы, необходимые в синапсе, такие как секретируемые белки и мембраносвязанные молекулы, перемещаются от тела клетки с помощью гораздо более быстрой разновидности аксонного транспорта. Эти белки и липиды переносятся от мест их синтеза в эндоплазматическом ретикулуме к аппарату Гольджи, расположенному вблизи ядра (часто у основания аксона). Отсюда эти молекулы, «упакованные» в мембранные пузырьки, переносятся путем быстрого **аксонного транспорта** со скоростью до 400 мм в сутки вдоль путей, образуемых в аксоне и дендритах микротрубочками (разд. 11.4.8). Таким же образом транспортируются митохондрии. Так как этим способом в аксонах и в дендритах перемещаются разные виды белков, полагают, что транспортируемые молекулы распределяются в теле клетки по различным транспортным пузырькам определенных типов (разд. 8.9.4).

К белкам, быстро переносимым по аксону, относятся и белки, предназначенные для высвобождения в синапсе, такие как *нейропептиды,* выделяемые многими нейронами в качестве нейромедиаторов, часто в сочетании с небелковыми медиаторами. С точки зрения внутренней организации нейроны можно представить как секреторные клетки, в которых место выделения секрета находится на громадном расстоянии от места образования белков и мембран (рис. 19-6).

19.1.5. Благодаря ретроградному транспорту поддерживается обратная химическая связь между окончаниями и телом нервной клетки [5, 6]

Быстрый аксонный транспорт необходим во время развития клетки для роста аксонов и дендритов, которые удлиняются путем добавления новой мембраны на их концах. Быстрый аксонный транспорт имеется и в нейроне, закончившем рост, у которого количество мембранного материала в кончиках отростков не увеличивается. В этом случае быстрый транспорт мембран от тела клетки, называемый *антероградным,* должен быть точно сбалансирован с *быстрым ретроградным*

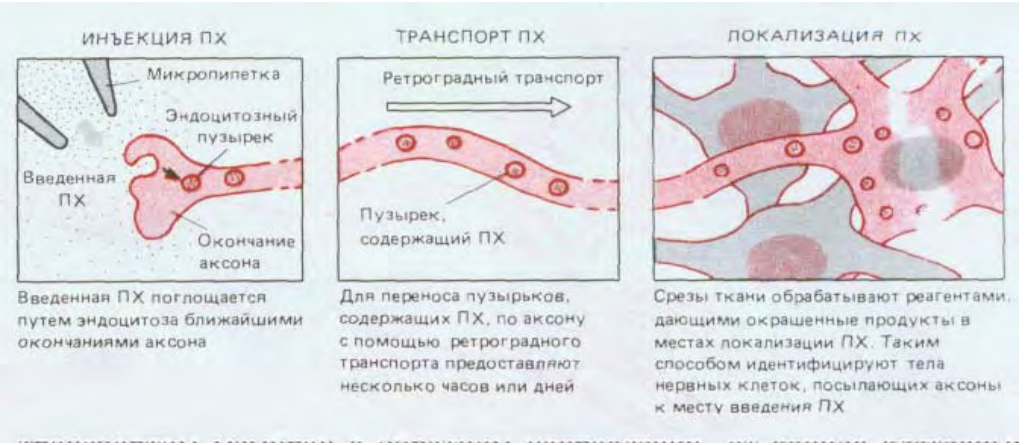


Рис. 19-7. Использование быстрого аксонного транспорта для идентификации и определения локализации отдаленных нервных клеток, аксоны которых оканчиваются в исследуемом участке. В качестве маркера наиболее широко используется фермент пероксидаза хрена (ПХ), так как его молекулы могут быть обнаружены в очень малых количествах по окрашенным продуктам реакции, катализируемой этим ферментом.

транспортом мембран в обратном направлении - от концов клеточных отростков. Механизмы двух встречных направлений быстрого транспорта сходны, но не идентичны. Быстрый ретроградный транспорт, скорость которого в два раза меньше скорости быстрого антероградного транспорта, осуществляется с помощью иных двигательных белков (разд. 10.4.9) и используется для переноса пузырьков несколько большей величины. Структуры, возвращающиеся в тело клетки, состоят частично из стареющих цитоплазматических органелл, например митохондрий, а частично из пузырьков, образующихся при интенсивном эндоцитозе, необходимом для восстановления мембраны в окончании аксона после высвобождения нейромедиатора (см. рис. 19-20). Молекулы, находящиеся во внеклеточной среде вокруг окончания аксона, могут захватываться этими эндоцитируемыми пузырьками и вместе с ними переноситься к телу клетки. Таким образом, биосинтетический аппарат, находящийся в теле клетки, способен «узнавать» об изменениях обстановки у окончания аксона и, как мы увидим позже, соответственно реагировать на них (разд. 19.7.10).

Ретроградный транспорт позволяет тем, кто изучает анатомию нервной системы, легко прослеживать нервные связи с помощью несложной методики, показанной на рис. 19-7.

19.1.6. Нейроны окружены глиальными клетками различного типа [7]

Вся нервная ткань, как периферическая, так и центральная, состоит из клеток двух основных классов. Главная роль принадлежит нейронам, но **глиальные клетки,** поддерживающие нейроны, превосходят их по численности: в мозгу млекопитающих их примерно в 10 раз больше, чем нейронов. Глиальные клетки окружают нейроны (как их тела, так и отростки) и заполняют пространство между ними. Наиболее изучены *шванновские клетки* из периферических нервов позвоночных и *олигодендроциты* из центральной нервной системы позвоночных. Эти клетки обвиваются вокруг аксонов, образуя изоляционный слой в виде *миелиновой оболочки* (разд. 19.2.4). Три других типа глиальных клеток цетральной нервной системы - это микроглия, эпендимные клетки и астроциты (рис. 19-8). *Микроглия* относится к несколько обособленному классу: эти клетки функционально близки к макрофагам (разд. 17.5.1) и, подобно им, происходят из кроветворной ткани. Все остальные глиальные клетки имеют общее эмбриональное происхождение с теми нейронами, с которыми они связаны, однако в отличие от большинства нейронов глия, как правило, не способна к электрическому возбуждению. Кроме того, в то время как нейроны после дифференцировки уже не могут делиться, большая часть глиальных клеток сохраняет эту способность на протяжении всей жизни.

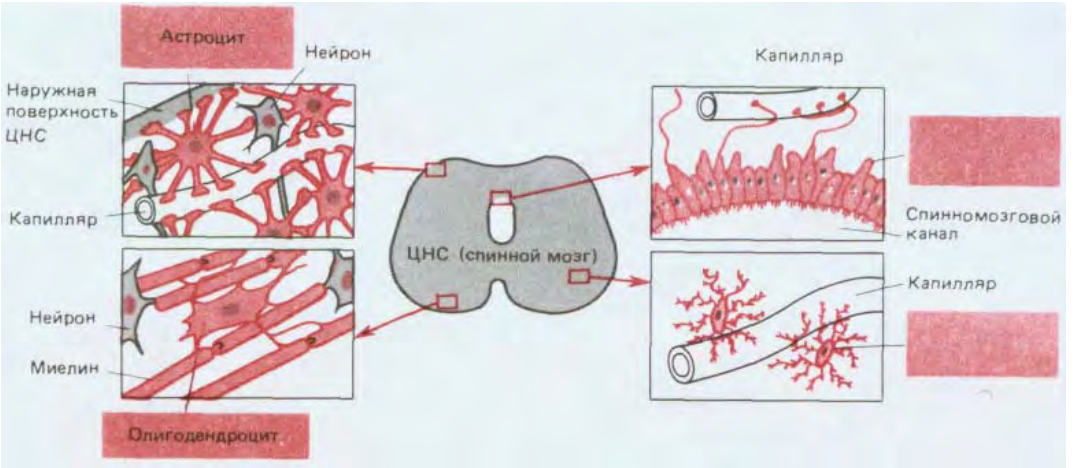


Рис. 19-8. Три основных класса глиальных клеток из центральной нервной системы позвоночных. Глиальные клетки выделены цветом. Астроциты, которые наиболее многочисленны, имеют множество радиально отходящих отростков. Некоторые из этих отростков оканчиваются на поверхности нейронов, а другие, с расширенными концами, образуют наружный поверхностный слой ЦНС, который окружает ее кровеносные сосуды и совместно с эндотелиальными клетками капилляров создает гематоэнцефалический барьер. Эпендимные клетки образуют ресничный эпителий, выстилающий центральные полости ЦНС, и отростки этих клеток, так же как и отростки астроцитов, часто оканчиваются на кровеносных сосудах. Олигодендроциты образуют вокруг аксонов ЦНС изолирующую миелиновую оболочку. Микроглиальные клетки по своим функциям и происхождению близки к макрофагам; они участвуют в реакции ткани на повреждение и инфекцию. Эти клетки обычно находятся вблизи кровеносных сосудов.

Эпендимные клетки выстилают внутренние полости головного и спинного мозга (рис. 19-8), а их эпителиальная организация напоминает нам о происхождении центральной нервной системы из эпителиальной трубки (разд. 19.7.1).

Астроциты (рис. 19-8) - самые многочисленные и разнообразные глиальные клетки, но и самые загадочные: их функция все еще в значительной части не выяснена, хотя кажется несомненным, что они играют важную роль в процессе построения нервной системы (разд. 19.7.2) и регулируют химический и ионный состав среды, окружающей нейроны, Например, одна из разновидностей астроцитов имеет отростки с расширенными концами, которые, будучи связаны соединительными комплексами вроде встречающихся в эпителиях (разд. 14.1), образуют изолирующий барьер на внешней поверхности центральной нервной системы. Другие отростки этих же астроцитов образуют сходные «концевые ножки» на кровеносных сосудах, эндотелиальные клетки которых случае капилляров и венул) соединяются здесь необычайно развитыми плотными контактами, так что создается *гематоэнцефалический барьер.* Этот барьер предотвращает проникновение из крови в ткань мозга водорастворимых молекул, если их не переносят специальные транс портные белки, находящиеся в плазматической мембране эндотелиальных клеток. Таким образом, нейроны оказываются в контролируемой и защищенной среде, что имеет решающее значение для молекулярного механизма передачи электрических сигналов.

Заключение

Нервные клетки, или нейроны, - это клетки с необычайно длинными отростками, передающими электрические сигналы в виде потенциалов действия - бегущих волн электрического возбуждения. Обычно от тела нервной клетки отходит несколько разветвленных дендритов и один длинный аксон. Как правило, сигналы воспринимаются дендритами и телом клетки, а затем распространяются по аксону и передаются другим клеткам в химических синапсах. Здесь электрический сигнал, приходящий в пресинаптическое окончание аксона, индуцирует секрецию нейромедиатора, который в свою очередь вызывает электрическое изменение в постсинаптической клетке.

Нейрон можно рассматривать как секреторную клетку, выделяющую свой секрет - нейромедиатор - на очень большом расстоянии от тем клетки, где синтезируются макромолекулы. Вновь синтезируемые секреторные белки и материал для построения мембраны переносятся по

аксону и дендритам благодаря быстрому аксонному транспорту, при котором мелкие мембранные пузырьки движутся вдоль путей, образуемых микротрубочками. Микротрубочки и другие компоненты цитоплазмы, не связанные с мембранами, перемещаются от тела клетки при помощи совершенно другого механизма медленного аксонного транспорта. Быстрый аксонный транспорт осуществляется также и в обратном, ретроградном, направлении, перенося мембранные пузырьки от окончаний аксона к телу клетки.

Нейроны окружены глиальными клетками, которые помогают различным образом регулировать химические и электрические свойства среды, окружающей нейроны.

19.2. Потенциал-зависимые ионные каналы и потенциал действия [3, 4, 8]

Как уже говорилось в гл. 6, разность потенциалов между внутренней и наружной сторонами плазматической мембраны **- мембранный потенциал -** зависит от распределения электрического заряда (разд. 6.4.15). Заряд переносят через мембрану нервной клетки малые неорганические ионы, главным образом Na^+, K^+, Cl^- и Ca^{2+}, которые проходят через липидный бислой по специфическим ионоселективным каналам, образуемым специальными трансмембранными белками (разд. 6.4.14). При открытии и закрытии ионных каналов распределение заряда изменяется и происходит сдвиг мембранного потенциала. Таким образом, передача сигналов нервными клетками зависит от **каналов с регулируемой проницаемостью.**

Наиболее важны два типа таких каналов: 1) *потенциал-зависимые каналы,* в особенности *натриевые, - они* играют ключевую роль во вспышке электрической активности, приводящей к распространению потенциалов действия по аксону; 2) *лиганд-зависимые каналы,* которые преобразуют внеклеточные химические сигналы в электрические,- от них зависит функционирование синапсов. Ионные каналы и их роль в передаче электрических сигналов уже были описаны в гл. 6 (разд. 6.4.14-6.4.17), и это послужит основой для дальнейшего рассмотрения передачи нервных сигналов в настоящей главе. Некоторые электрические законы, имеющие непосредственное отношение к нервным клеткам, представлены на схеме 19-1.

19.2.1. Изменение потенциала может распространяться в нервной клетке пассивно [3, 4, 8, 9]

Обычно потенциалы действия возникают у основания аксона и затем передаются по всей его длине. Для того чтобы понять механизм этой передачи, полезно вначале рассмотреть, как распространяется электрическое возбуждение по нервной клетке в отсутствие потенциалов действия. Как уже говорилось, такое *пассивное распространение* - явление весьма обычное, особенно в нейронах, у которых аксоны очень коротки или их нет совсем. Такие клетки часто не имеют или почти не имеют потенциал-зависимых Na^+-каналов и для передачи сигнала используют только пассивное распространение, связанное с плавно изменяющимися *локальными потенциалами.*

В состоянии покоя мембранный потенциал аксона имеет повсюду одинаковое отрицательное значение - внутренняя среда аксона электроотрицательна по отношению к внеклеточной среде. Как мы объяснили в гл. 6 (разд. 6.4.15), разность потенциалов зависит от значительных градиентов концентраций Na^+ и K^+, создаваемых Na^+-K^+-насосом. Благодаря *каналам утечки* K^+ мембрана в состоянии покоя проницаема

1. Изолированные слои заряда создают градиент потенциала.

Градиент потенциала между двумя сторонами клеточной мембраны, или *мембранный потенциал*, создается избытком положительного заряда на одной стороне мембраны и соответствующим избытком отрицательного заряда на другой. На каждой стороне мембраны заряд концентрируется в виде тонкого (< 1 нм) слоя.

2. Величина заряда, необходимая для создания данной разности потенциалов, определяется емкостью мембраны.

Величина заряда (в кулонах) на каждой стороне мембраны, необходимая для создания разности потенциалов в 1 В, называется *емкостью* мембраны (в фарадах).

Обычно емкость клеточной мембраны составляет около 1 мкФ/см^2 или 0,01 пФ/мкм^2. Следовательно, передвижение заряда в 0,001 пКл через 1 мк^2 площади мембраны изменит мембранный потенциал на 100 мВ.

ЕДИНИЦЫ

Заряд: кулоны (Кл); 1 Кл = $6{,}2 \cdot 10^{18}$ · заряд одного электрона

Потенциал: вольты (В)

Ток: амперы (А) (кулоны в 1 с)

Емкость: фарады (Ф) (кулоны на 1 В)

Проводимость: сименсы (См) (амперы на 1 В)

мВ – милливольт (10^{-3} В)

мФ – микрофарада (10^{-6} Ф)

нКл – нанокулон (10^{-9} Кл)

пСм – пикосименс (10^{-12} См)

3. Число ионов, образующих слой заряда на мембране, очень мало по сравнению с общим количеством ионов внутри клетки.

Один кулон соответствует заряду, переносимому примерно $6 \cdot 10^{18}$ одновалентными ионами; это означает, что заряд 0,001 пКл эквивалентен 6000 одновалентных ионов. Следовательно, при прохождении 6000 ионов натрия через 1 мкм^2 переносится достаточно заряда для того, чтобы сместить мембранный потенциал примерно на 100 мВ. Так как в 1 мкм^3 цитоплазмы содержится около $3 \cdot 10^7$ натриевых ионов, такое перемещение заряда обычно не оказывает заметного влияния на трансмембранные градиенты концентрации ионов.

4. Электрохимическая "движущая сила" представляет собой суммарное действие мембранного потенциала и концентрационного градиента.

При комнатной температуре для одновалентного положительно заряженного иона, такого как Na^+ или K^+, суммарная движущая сила, возникающая на мембране, пропорциональна

$$V - 58 \log_{10} (C_o/C_i),$$

где V – мембранный потенциал в милливольтах, а C_o и C_i – внеклеточная и внутриклеточная концентрации иона соответственно. "Движущая сила" для положительных ионов равна нулю, когда

$$V = 58 \log_{10} (C_o/C_i) \text{ мВ}.$$

Это самая простая форма *уравнения Нернста* (см. разд. 6.4.15). С его помощью устанавливают значение равновесного потенциала для данного положительного заряженного иона. Для аксона кальмара равновесные потенциалы для ионов натрия, калия и хлора, V_{Na}, V_K и V_{Cl}, равны соответственно +55 мВ, –75 мВ и –65 мВ. Суммарные движущие силы для этих ионов соответственно пропорциональны $V - V_{Na}$, $V - V_K$ и $V - V_{Cl}$.

5. Ионный ток пропорционален движущей силе, умноженной на проводимость мембраны.

Проходящий через мембрану ток, например ток натриевых ионов i_{Na} (в амперах) равен

$$g_{Na} (V - V_{Na}),$$

где g_{Na} – натриевая проводимость мембраны. Она пропорциональна числу открытых в данный момент натриевых каналов. Проводимость одного открытого натриевого канала равна примерно 4пСм для аксона кальмара, а в 1 мкм^2 мембраны содержится около 75 натриевых каналов.

6. Ток создает заряд.

Натриевая проводимость g_{Na} для мембраны аксона кальмара в момент пика потенциала действия равна 300 пСм; соответствующий натриевый ток i_{Na} близок к 5 пА/мкм^2.

При условии, что через мембрану проходят только ионы натрия, заряд, переносимый натриевым током, может составить 0,001 пКл/мкм^2, если максимальный натриевый ток сохраняется во время потенциала действия в течение 0,2 мс. Заряд такой величины уже способен изменить мембранный потенциал (см. выше пункты 1 и 2).

Схема 19-1. Электричество, ионы и мембраны: некоторые основные принципы.

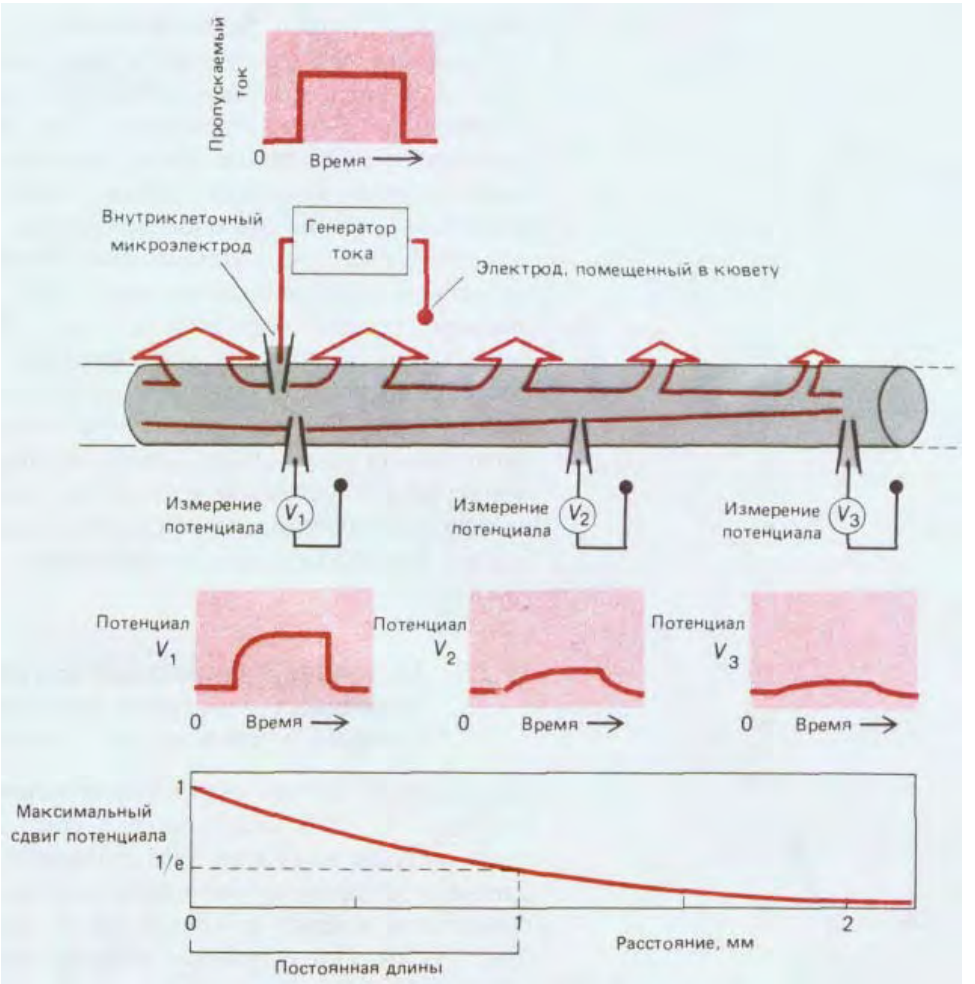


Рис. 19-9. Ток, вводимый в аксон через микроэлектрод, выходит наружу через плазматическую мембрану. Величина выходящего тока уменьшается экспоненциально с увеличением расстояния от микроэлектрода. Предполагается, что этот ток вызывает лишь подпороговую деполяризацию мембраны. На трех графиках под схемой показано, как смещение мембранного потенциала, вызванное коротким толчком тока, уменьшается с увеличением расстояния от источника возмущения. Расстояние, на котором сдвиг мембранного потенциала уменьшается в $1/e$ раз, называют постоянной длины. Постоянная длины варьирует в пределах примерно от 0,1 мм (для очень тонких аксонов с мембраной, относительно легко пропускающей ионы) до 5 мм (для очень толстых аксонов с относительно непроницаемой мембраной). В нашем примере эта постоянная равна 1 мм.

только для калия, поэтому мембранный потенциал покоя близок к равновесному калиевому потенциалу - обычно около —70 мВ (см. схему 19-1). Электрический сигнал может принимать форму *деполяризации,* когда падение потенциала на мембране уменьшается, или *гиперполяризации,* при которой оно возрастает. Чтобы объяснить механизм пассивного распространения электрического сигнала, рассмотрим, что происходит при локальной деполяризации аксона с помощью тока, пропускаемого через введенный в аксон электрод. Если сила тока мала, деполяризация будет *подпороговой:* практически все Na^+-каналы останутся закрытыми и потенциалов действия не возникнет. Быстро установится равновесное состояние, при котором ток, протекающий через микроэлектрод внутрь клетки, точно сбалансирован током (главным образом калиевым), вытекающим через мембрану. Часть тока будет выходить вблизи микроэлектрода, а часть, прежде чем выйти из клетки, пройдет некоторое расстояние внутри аксона в том или другом направлении. Поэтому сдвиг мембранного потенциала будет экспоненциально уменьшаться с увеличением расстояния от источника возмущения (рис. 19-9). Такого рода пассивное распространение электрического сигнала вдоль отростка нервной клетки аналогично распространению сигнала по телеграфному кабелю, лежащему на дне моря. По мере прохождения тока по осевому проводнику (цитоплазме) происходит некоторая утечка через слой изоляции (мембрану) в окружающую среду, в результате чего сигнал постепенно затухает. Поэтому электрические свойства, от которых зависит пассивное распространение сигналов, часто называют *кабельными свойствами* аксона.

Впрочем, аксоны как проводники намного хуже электрических кабелей, и для передачи сигналов на расстояния больше нескольких милли-

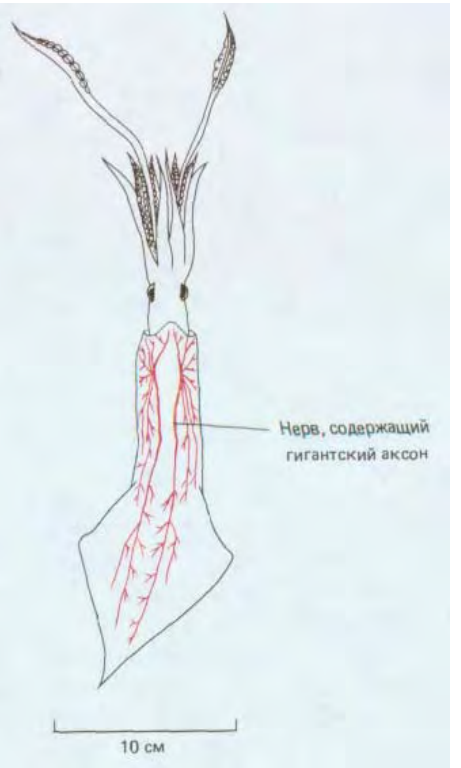


Рис. 19-10. Кальмар: показано расположение гигантских аксонов, большие размеры которых дали возможность провести первые эксперименты по изучению механизма потенциала действия. (H. Curtis, Biology, 4th ed. New York: Worth, 1983; Keynes R. D. The nerve impulse and the squid. Scientific American, December 1958.)

метров пассивного распространения уже недостаточно, особенно в тех случаях, когда сигнал слаб и непродолжителен. Это связано не только с утечкой тока, но также и с тем, что сдвиг мембранного потенциала, вызванный током, происходит не мгновенно, а требует некоторого времени. Необходимое время зависит от *емкости* мембраны, т.е. величины заряда, который должен накопиться по ту и другую сторону мембраны, чтобы произошло данное изменение мембранного потенциала (см. схему 19-1). Мембранная емкость обусловливает как замедление пассивной передачи сигналов вдоль аксона, так и искажение их. Например, резкий короткий стимул, приложенный в одной точке, на расстоянии нескольких миллиметров регистрируется уже как плавный, постепенно возрастающий и падающий потенциал с сильно уменьшенной амплитудой (см. рис. 19-9). Таким образом, для верной передачи сигналов на расстояния, превышающие несколько миллиметров, в дополнение к пассивным кабельным свойствам аксону необходим активный механизм, поддерживающий силу и форму сигнала на всем его пути. Таким автоматически усиливаемым сигналом служит *потенциал действия.*

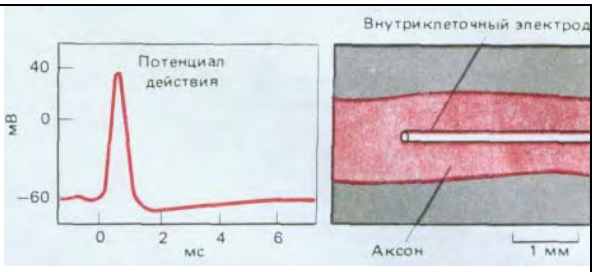
19.2.2. Потенциал-зависимые натриевые каналы генерируют потенциал действия; потенциал-зависимые калиевые каналы ограничивают его продолжительность [3, 4, 8,10]

Электрохимический механизм потенциалов действия был впервые установлен в 40-50-х годах нашего века. В то время еще не были разработаны методы изучения электрических явлений в небольших одиночных клетках, и поэтому эксперименты можно было проводить только на гигантской клетке, а точнее на ее части - гигантском аксоне кальмара (рис. 19-10). Последующие работы показали, что нейроны большинства животных проводят потенциалы действия таким же образом. На схеме 19-2 представлены некоторые из ключевых основополагающих экспериментов. Несмотря на значительные технические усовершенствования, сделанные с тех пор, логика первоначальных исследований продолжает служить моделью для современных работ. Решающим моментом стало понимание того, что проницаемость мембраны для Na^+ и K^+ изменяется при изменении мембранного потенциала; иными словами, в мембране имеются натриевые и калиевые каналы, зависимые от потенциала. Метод фиксации потенциала (рис. 19-11) дал возможность подробно изучить закономерности открытия и закрытия этих каналов при изменении мембранного потенциала и показал, что потенциал действия -прямое следствие этих закономерностей.

Потенциал действия возникает, когда мембрана мгновенно деполяризуется до уровня, превышающего определенный *порог.* Как уже говорилось в гл. 6, в результате такой деполяризации какого-то участка мембраны здесь откроются *потенциал-зависимые натриевые каналы,* что вызовет ток ионов Na^+ вниз по их электрохимическому градиенту; следствием будет дальнейшая деполяризация мембраны, в результате чего откроется еще большее число Na^+-каналов, и так далее, подобно цепной реакции, до тех пор, пока потенциал в этом участке мембраны не приблизится к натриевому равновесному потенциалу (см. схему 19-1). На этом этапе происходят два события, которые возвращают потенциал мембраны к первоначальному отрицательному значению: Na^+-каналы спонтанно переходят в закрытое, *инактивированное* состояние, а *потенциал-зависимые K^+-каналы открываются.* Эти калиевые каналы реагируют на изменение мембранного потенциала почти так же, как и натриевые, но менее быстро, и поэтому их иногда называют *медленными K^+-каналами.* Как только K^+-каналы открываются, выходящий калие-

1. Потенциалы действия регистрируются с помощью внутриклеточного электрода

Гигантский аксон кальмара достигает примерно 0,5 — 1 мм в диаметре и нескольких сантиметров в длину (рис. 19-10) . Электрод в виде стеклянного капилляра, заполненного проводящим раствором, может быть введен глубоко в цитоплазму по направлению оси клетки. С помощью такого электрода можно измерить разность потенциалов между цитоплазмой и наружной поверхностью клетки — мембранный потенциал — *во время* прохождения импульса. Импульс можно вызвать коротким электрическим раздражением одного из концов аксона. В каком конце аксона это происходит, не важно, поскольку возбуждение может распространяться в любом направлении; сила стимуляции, если она превысит определенный порог, тоже не имеет значения: потенциал действия подчиняется закону "все или ничего".



2. Потенциалы действия зависят только от свойств плазматической мембраны нейрона и трансмембранных градиентов концентрации Na^+ и K^+.

Как внутри, так и снаружи аксона наиболее многочисленны ионы Na^+, K^+ и Cl^-. Как и в других клетках, Na^+K^+ - насос поддерживает концентрационный градиент: концентрация ионов натрия внутри клетки примерно в 9 раз меньше, чем снаружи, тогда как внутри - клеточная концентрация K^+ почти в 20 раз выше по сравнению с внеклеточной средой. Какие ионы важны для потенциала действия? Размеры гигантского аксона кальмара настолько велики, что можно выдавить из него цитоплазму, словно зубную пасту из тюбика, а затем



наполнить его чистым раствором Na^+, K^+ и Cl или $SO^2{}_4^-$. Интересно то, что если концентрации Na^+ и K^+ внутри и снаружи близки к естественным (и только в этом случае), аксон будет проводить потенциалы действия нормальной формы, изображенной выше. Следовательно, существенную роль в передаче электрических сигналов клеткой должна играть мембрана. Наиболее важны ионы натрия и калия; трансмембранные градиенты их концентраций должны обеспечить энергию, необходимую для проведения потенциалов действия, так как все другие источники метаболической энергии, по-видимому, удаляются в процессе перфузии.

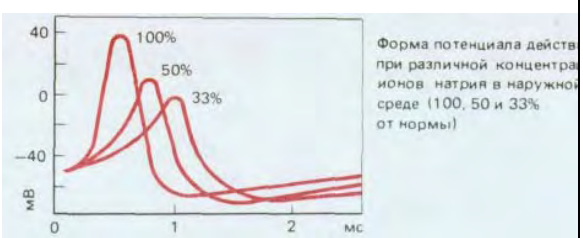


3. В состоянии покоя мембрана проницаема в основном для K^+; в момент прохождения потенциала действия она на короткое время становится проницаемой для Na^+ .

В состоянии покоя мембранный потенциал близок к равновесному калиевому потенциалу. При изменении внеклеточной концентрации К потенциал покоя изменяется приблизительно в соответствии с уравнением Нернста для K^+ (см. схему 19-1 и разд. 6.4.15). Следовательно, в состоянии покоя мембрана проницаема главным образом для K^+: основными путями для прохождения этих ионов через мембрану служат каналы утечки калия.

Изменение внеклеточной концентрации Na^+ не влияет на потенциал локоя. Однако высота пика потенциала действия изменяется приблизительно в соответствии с уравнением Нернста для Na^+. Значит, во время потенциала действия мембрана, по-видимому, проницаема преимущественно для ионов Na^+: открываются натриевые каналы.

После пика потенциала действия мембранный потенциал возвращается к отрицательной величине, которая зависит от внеклеточной концентрации К и даже ближе к равновесному калиевому потенциалу, чем потенциал покоя: мембрана утрачивает проницаемость для натрия, тогда как проницаемость для калия возрастает, т.е. натриевые каналы закрываются, а дополнительные калиевые открываются.



4. Метод фиксации напряжения дает возможность наблюдать, как мембранный потенциал контролирует открытие и закрытие ионных каналов.

Можно поддерживать мембранный потенциал на постоянном уровне по всей длине аксона, пропуская ток надлежащей величины через металлическую проволочку, введенную по оси аксона, и одновременно регистрируя мембранный потенциал с помощью другого внутриклеточного электрода (см. рис. 19-11) . Если мембранный потенциал внезапно отклонить от уровня покоя и вызвать продолжительную деполяризацию мембраны (*А),* то натриевые каналы начинают быстро открываться, и это продолжается до тех пор, пока проницаемость мембраны для ионов натрия не превысит проницаемость ее для калия; затем натриевые каналы спонтанно закрываются даже при неизменном мембранном потенциале. Калиевые каналы тоже открываются, но с некоторой задержкой, так что проницаемость мембраны для калия возрастает в то время, когда проницаемость для натрия уже снижается *(Б)* теперь эксперимент очень быстро повторить, возвратив на короткое мембранный потенциал к уровню покоя и вновь деполяризовав мембрану, то реакция мембраны будет иной: в результате продолжительной деполяризации натриевые каналы *инактивируются,* поэтому вторичная деполяризация уже не изменяет проводимость мембраны, как это происходит при первой деполяризации. Для выхода из такого состояния требуется относительно много времени — примерно 10 мс, пока мембрана реполяризуется (потенциал возвращается к уровню покоя) .

В нормальных условиях переход ионов натрия внутрь через открытые натриевые каналы вызывает "пик" потенциала действия, а затем инактивация натриевых каналов и открытие калиевых каналов возвращают мембрану в состояние покоя.



Схема 19-2. Некоторые классические эксперименты на гигантском аксоне кальмара.

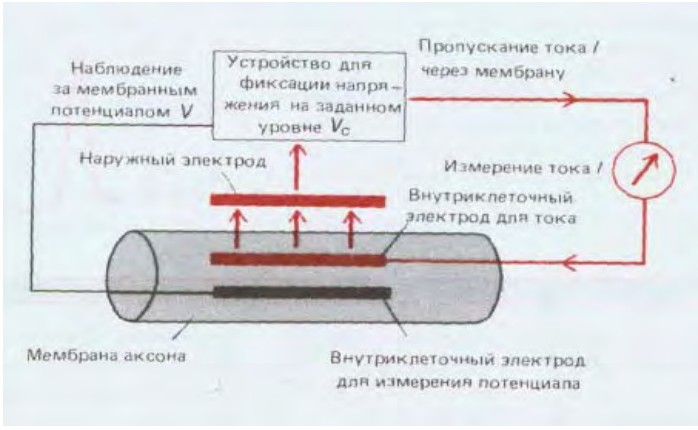


Рис. 19-11. Метод фиксации напряжения, с помощью которого изучают поведение ионных каналов, измеряя ток, протекающий через плазматическую мембрану, когда мембранный потенциал поддерживается на каком-либо постоянном уровне. Используются два внутриклеточных электрода - один для контроля мембранного потенциала, а другой для введения в клетку тока определенной величины. Ток, входящий в клетку через электрод, вытекает наружу через ионные каналы в плазматической мембране; на рисунке эта цепь выделена цветом. До тех пор пока мембранный потенциал имеет постоянную величину, ток 1, входящий в аксон через электрод, полностью уравновешивается суммарным током, вытекающим из клетки через всю поверхность аксона (в противном случае общий заряд внутри клетки изменился бы, что привело бы к сдвигу мембранного потенциала). Мембранный потенциал можно изменять, уменьшая или увеличивая ток, вытекающий наружу. Электронное устройство, фиксирующее напряжение, следит за мембранным потенциалом V и регулирует величину тока I таким образом, чтобы поддерживать V на постоянном уровне: любое небольшое отклонение от заданного значения V_c автоматически приводит к изменению величины тока, благодаря чему мембранный потенциал не отклоняется от фиксированного значения $V = V_c$. Для того чтобы выяснить, как изменяется поведение мембранных каналов с течением времени, нужно резко переключить потенциал с одного фиксированного уровня на другой и проследить за соответствующими токами с помощью осциллоскопа. Измеряя величину тока при разных концентрациях Na^+ и K^+ в среде, можно вычислить, какая часть трансмембранного тока переносится теми и другими ионами, и определить вклад в этот ток N^+-селективных и K^+- селективных каналов. Метод фиксации напряжения может быть приспособлен для анализа поведения отдельных молекул, образующих ионные каналы, которые находятся в маленьких участках мембраны, закрывающих отверстие микроэлектрода; в этом случае методику называют методом «пэтч-клампа».

вый ток быстро перекрывает по величине входящий натриевый ток и мембранный потенциал возвращается к уровню равновесного K^+-потенциала еще до полной инактивации Na^+-каналов. В результате реполяризации потенциал-зависимые калиевые каналы вновь закрываются, а инактивированные натриевые каналы переходят в первоначальное закрытое, но способное к активации состояние. Таким образом способность генерировать потенциалы действия может восстановиться в данном участке мембраны менее чем на одну тысячную секунды.

Последующие эксперименты показали, что не во всех нейронах продолжительность потенциала действия определяется потенциалзависимыми K^+-каналами. В частности, в миелинизированных аксонах млекопитающих (разд. 19.2.4) число таких каналов очень невелико и состояние покоя достигается просто в результате инактивации натриевых каналов. Но хотя наличие потенциал-зависимых калиевых каналов несущественно для проведения уже возникших потенциалов действия, позднее мы увидим (разд. 19.4.3), что эти каналы играют решающую роль в механизме первичного генерирования импульсов при раздражении тела нервной клетки.

19.2.3. Потенциалы действия обеспечивают быструю передачу сигналов на дальние расстояния [3, 4, 8, 11]

Благодаря кабельным свойствам аксона локальный приток большого количества ионов Na^+ во время потенциала действия приводит к возникновению продольных токов, деполяризующих смежные участи мембраны до порогового уровня, что в свою очередь вызывает и здесь возникновение потенциалов действия (рис. 19-12). Этот процесс распространяется вдоль аксона от одного возбужденного участка к другому со скоростью, которая у позвоночных может составлять от 1 до 100 м/с в зависимости от типа аксона.

Скорость проведения импульса зависит от кабельных свойств аксона: чем больше емкость мембраны, тем больший заряд нужен для деполяризации ее до порогового уровня, а чем больше внутреннее сопротивление цитоплазмы в аксоне, тем меньший ток может проходить через нее и тем больше времени требуется для накопления необходимого заряда Сопротивление и емкость единицы длины аксона определяются площадью поперечного сечения аксона, и простое вычисление показывает, что с увеличением диаметра (толщины) аксона скорость проведения импульсов возрастает. У кальмара и многих других беспозвоночных для быстрой передачи сигналов в ходе эволюции выработались аксоны. огромного диаметра. Однако у позвоночных столь же высокая скорость проведения сигналов достигается гораздо более экономным способом - путем изоляции поверхности многих аксонов *миелиновой оболочкой,*

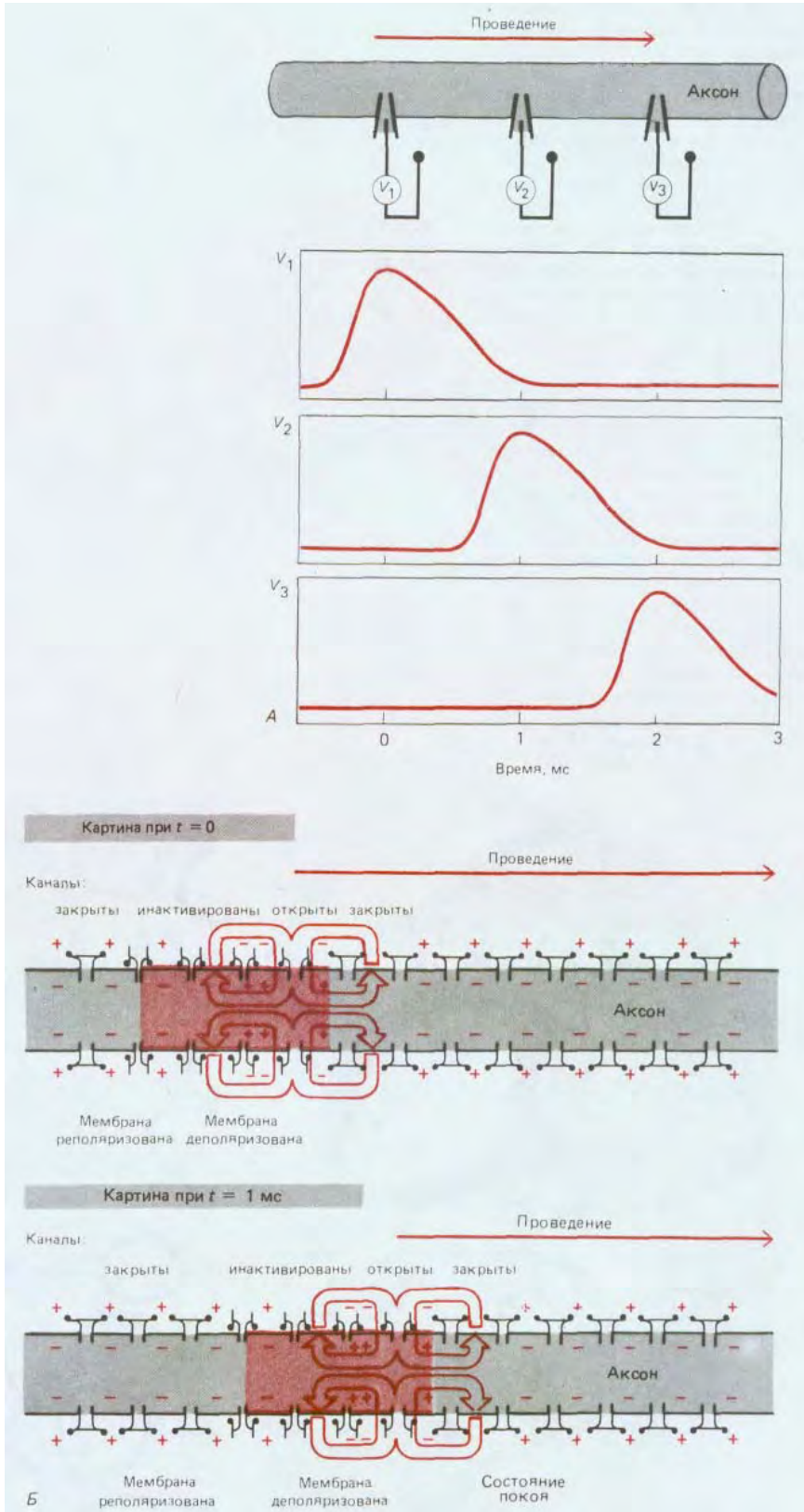


Рис. 19-12. Распространение потенциала действия *А.* Потенциалы, регистрируемые группой внутриклеточных электродов, расположенных вдоль аксона. *Б.* Конформационные изменения натриевых каналов и токи (показаны красным ютом), обусловливающие распространение сдвига мембранного потенциала. Участок аксона с деполяризованной мембраной выделен цветом.

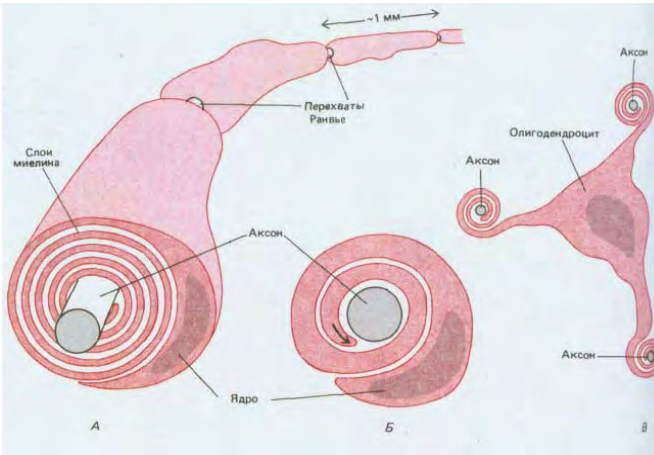
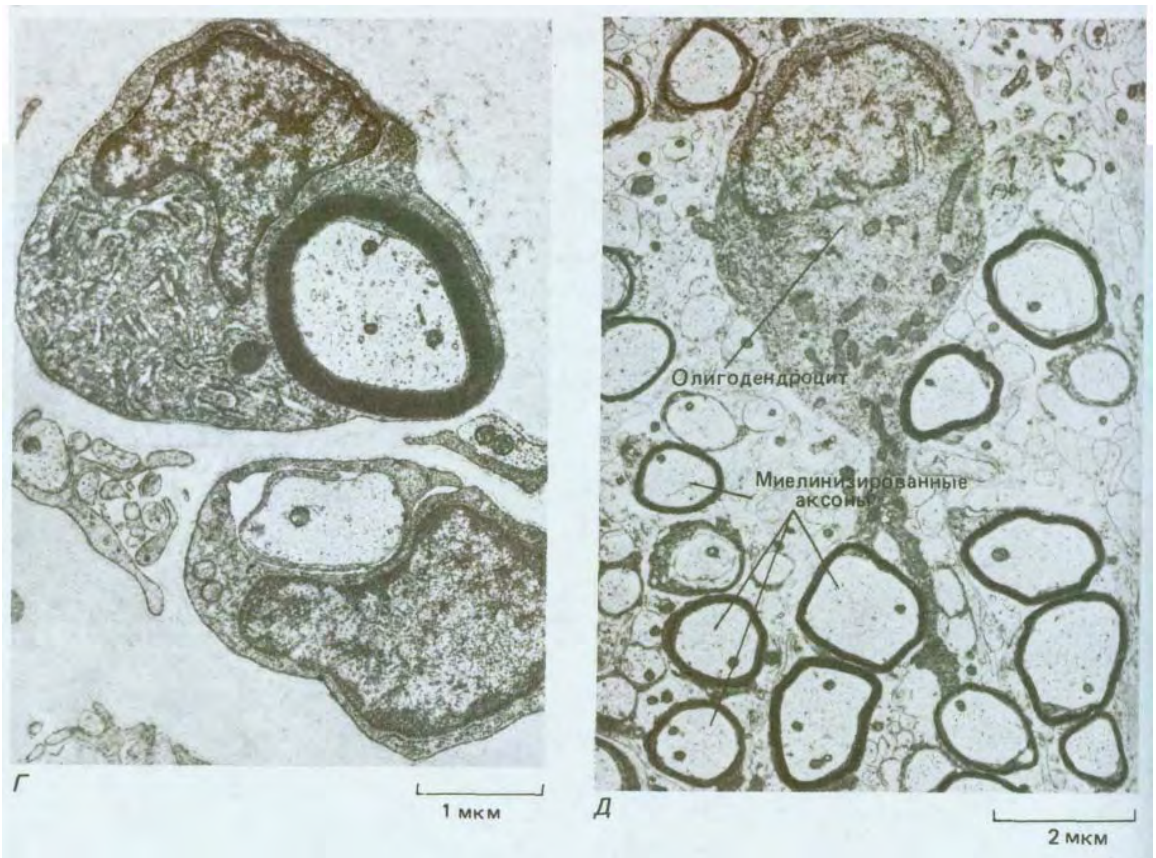


Рис. 19-13. *А.* Строение миелинизированного аксона. Плазматическая мембрана каждой шванновской клетки концентрическими слоями наматывается на аксон, образуя сегмент миелиновой оболочки длиной около 1 мм. Для большей ясности на рисунке слои миелина прилегают друг к другу не так плотно, как в действительности (см. *Г*). *Б.* Схематическое изображение шванновской клетки на ранней стадии образования миелиновой оболочки вокруг аксона во время его развития. Обратите внимание на то, что «наматывание» мембраны шванновской клетки на аксон осуществляется за счет роста внутреннего края (помеченного стрелкой). *В.* Схематическое изображение олигодендроцита, образующего миелиновые оболочки в центральной нервной системе. Один олигодендроцит миелинизирует несколько разных аксонов. *Г.* Срез нерва из ноги крысенка (электронная микрофотография). Видны две шванновские клетки: одна только начинает миелинизировать аксон, другая уже полностью сформировала почти зрелую миелиновую оболочку. *Д.* Олигодендроцит из спинного мозга котенка. Отходящие от него отростки миелинизируют по меньшей мере два аксона. [Г и *Д* - из C. Raine, in: Myelin (P. Morell, ed.), New York, Plenum, 1976.]



19.2.4. Миелинизация повышает скорость и эффективность проведения нервных импульсов у позвоночных [8, 12]

Миелиновую оболочку образуют специализированные глиальные клетки - *шванновские клетки* в периферической и *олигодендроциты* в центральной нервной системе. Плазматическая мембрана этих клеток слой за слоем по спирали плотно наматывается на аксон (рис. 19-13). Каждая шванновская клетка миелинизирует один аксон, образуя сегмент оболочки длиной около 1 мм, содержащий до 300 концентрических слоев; олигодендроциты формируют подобные сегменты оболочки одновременно у нескольких аксонов.

Изолирующий слой, образуемый миелиновой оболочкой, резко уменьшает емкость мембраны аксона и одновременно почти полностью предотвращает утечку тока через нее. Между двумя соседними сегментами миелина остается узкий незащищенный участок мембраны (рис. 19-14). Эти так называемые *перехваты Ранвье* шириной всего лишь около 0,5 мкм являются центрами электрической активности. Почти все натриевые каналы аксона сосредоточены в перехватах, где плотность этих каналов достигает нескольких тысяч на 1 мкм^2, тогда как в участках, прикрытых миелиновой оболочкой, их почти вовсе нет. Поэтому изолированные участки мембраны не способны возбуждаться, но обладают превосходными кабельными свойствами - низкой емкостью и высоким сопротивлением для утечки тока. Поэтому токи, связанные с потенциалом действия в области перехвата, эффективно направляются путем пассивного проведения к следующему перехвату, быстро деполяризуют мембрану и возбуждают очередной потенциал действия. Такое проведение называют *сальтаторным* - сигнал распространяется вдоль аксона, «перескакивая» с одного перехвата на другой. Миелинизация дает два главных преимущества: быстрее распространяется потенциал действия и сберегается метаболическая энергия, так как активное возбуждение происходит лишь на небольших участках в перехватах Ранвье.

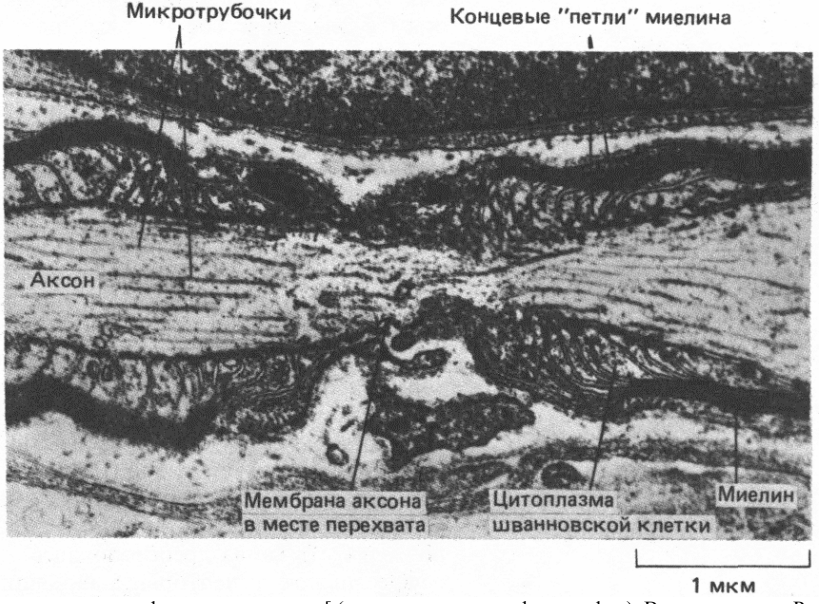


Рис. 19-14. Продольный срез аксона из периферического нерва [(электронная микрофотография). Виден перехват Ранвье, где остается открытым небольшой участок плазматической мембраны аксона между двумя соседними сегментами миелиновой оболочки. (С любезного разрешения Richard Bunge.)

Заключение

Передача электрических сигналов нервной клеткой основана на изменении мембранного потенциала в результате прохождения небольших количеств ионов через управляемые ионные каналы. Эти ионы перемещаются за счет энергии, большой запас которой создается благодаря работе натриево-калиевого насоса, поддерживающего высокие градиенты концентрации Na^+ и K^+ на мембране нервной клетки. В состоянии покоя мембрана нейрона благодаря каналам утечки K^+ более проницаема дм калия, чем для других ионов, и поэтому мембранный потенциал близок к равновесному калиевому потенциалу, составляющему примерно - 70 мВ. Потенциал действия возникает тогда, когда под влиянием короткого деполяризующего стимула открываются потенциал-зависимые натриевые каналы, так что мембрана становится более проницаемой для Na^+ а мембранный потенциал еще дальше смещается в сторону равновесного натриевого потенциала. Благодаря такой положительной обратной связи открывается еще больше натриевых каналов, что в конечном итоге приводит к возникновению потенциала действия, подчиняющегося закону «всё или ничего». На каждом данном участке мембраны потенциал действия быстро исчезает вследствие инактивации натриевых каналов, а во многих нейронах также вследствие открытия потенциал-зависимых калиевых каналов.

Распространение потенциала действия (импульса) вдоль нервного волокна определяется кабельными свойствами этого волокна. При локальной деполяризации мембраны и возникновении потенциала действия ток, проходящий через открытые натриевые каналы, пассивно распространяется и деполяризует соседние участки мембраны, где в свою очередь возникает потенциал действия. Во многих аксонах позвоночных высокая скорость и эффективность проведения импульсов достигается благодаря изоляции поверхности аксона миелиновой оболочкой, изменяющей кабельные свойства аксона и оставляющей открытыми лишь небольшие участки возбудимой мембраны.

19.3. Лиганд-зависимые ионные каналы и быстрая синаптическая передача [13]

Самый простой способ передачи сигнала от нейрона к нейрону - это прямое электрическое сопряжение через щелевые контакты. Главное преимущество таких **электрических синапсов** состоит в том, что сигналы передаются без задержки. С другой стороны, эти синапсы гораздо меньше приспособлены для регулирования и адаптации, чем **химические синапсы,** с помощью которых осуществляется большинство связей между нейронами. Электрическая связь через щелевые контакты была рассмотрена в гл. 14 (разд. 14.1.5-14.1.8), здесь же речь пойдет только о химических синапсах.

Химическая передача в синапсах основана на тех же принципах, что и химическая сигнализация с помощью водорастворимых гормонов (гл. 12). И в том и в другом случае клетка высвобождает вещество-посредник, которое воздействует на другую клетку или группу клеток, связываясь с мембранными белками-рецепторами. Однако в отличие от гормона химический посредник в синапсе **- нейромедиатор -** воздействует лишь на очень малых расстояниях.

В результате электрической стимуляции пресинаптическая клетка высвобождает путем экзоцитоза нейромедиатор (см. рис. 19-4). После того как нейромедиатор пересекает щель между пре- и постсинаптической клетками шириной обычно в долю микрометра, химический сигнал должен быть снова преобразован в электрический. Это преобразование осуществляют рецепторы, находящиеся в плазматической мембране

постсинаптической клетки. Бывают рецепторы двух типов - *связанные с каналами* и *не связанные с каналами* (рис. 19-15). Рецепторы, связанные с каналами, - это фактически *лиганд-зависимые каналы*. Конформация таких рецепторов сразу же после связывания нейромедиатора изменяется таким образом, что в мембране образуется открытый канал для определенных ионов и в результате проницаемость мембраны изменяется. Рецепторы этого типа служат основой самого обычного и наиболее изученного способа передачи сигналов в химических синапсах, при котором передача осуществляется очень быстро.

Рецепторы, не связанные с каналами, запускают такие же процессы, что и при воздействии водорастворимых гормонов и локальных химических медиаторов повсюду в организме (разд. 12.3). В таких рецепторах участки связывания нейромедиатора функционально сопряжены с ферментом, который в присутствии нейромедиатора обычно катализирует образование внутриклеточного посредника, например cAMP. В свою очередь этот посредник вызывает изменения в постсинаптической клетке, в том числе модификацию ионных каналов в клеточной мембране. В отличие от рецепторов, связанных с каналами, эти рецепторы, как правило, опосредуют относительно замедленные, но более продолжительные эффекты нейромедиаторов. Полагают, что активация таких рецепторов вызывает в нейронах изменения, которые сохраняются длительное время и лежат в основе научения и памяти (разд. 19.5.3).

В этом разделе будет рассмотрена быстрая синаптическая передача, использующая лиганд-зависимые ионные каналы. Специфические особенности синаптической передачи *с* участием рецепторов, не связанных с каналами, и роль таких рецепторов в долговременных синаптических изменениях будут обсуждаться в разд. 19.5.

19.3.1. Нервно-мышечное соединение - наиболее изученный синапс [14]

Плотность расположения нейронов в мозгу настолько высока, что экспериментировать на отдельных мозговых синапсах чрезвычайно трудно. Поэтому функции синапса были детально изучены главным образом на соединениях между нервом и скелетной мышцей лягушки и, в меньшей степени, на синапсах между гигантскими нейронами кальмара и других моллюсков.

Скелетные мышечные волокна позвоночных, подобно нервным клеткам, способны возбуждаться под действием электрического тока, и поэтому **нервно-мышечное соединение** (рис. 19-16) оказалось хорошей моделью химического синапса вообще. Двигательный нерв и иннервируемую им мышцу можно отделить от окружающей ткани и поддерживать в функционально активном состоянии в питательной среде определенного состава. Стимулируя нерв через наружные электроды, можно с помощью внутриклеточного микроэлектрода регистрировать ответ одиночной мышечной клетки (рис. 19-17). На рис. 19-18 сравнивается тонкая структура нервно-мышечного соединения и типичного синапса между двумя нейронами центральной нервной системы.

Нервно-мышечное соединение было главным объектом ряда продолжительных и плодотворных исследований, начатых в 50-х годах нашего века. Основой для первых экспериментов послужило открытие в начале 20-х годов того факта, что ацетилхолин, выделяемый при стимуляции блуждающего нерва, воздействует на сердце, замедляя его сокращения. Это явилось первым несомненным доказательством химической природы нервно-мышечной передачи, а вскоре после этого, в 30-х годах, было показано, что стимуляция двигательного нерва, иннервирующего скелетную мышцу, тоже приводит к высвобождению ацетилхолина, а ацетил-



Рис. 19-15. Воздействие нейромедиатора на постсинаптическую клетку может осуществляться при посредстве рецепторных белков двух фундаментально различных типов: рецепторов, связанных с каналами, и рецепторов, не связанных с каналами. Связанные с каналами рецепторы называют также лиганд-зависимыми каналами.

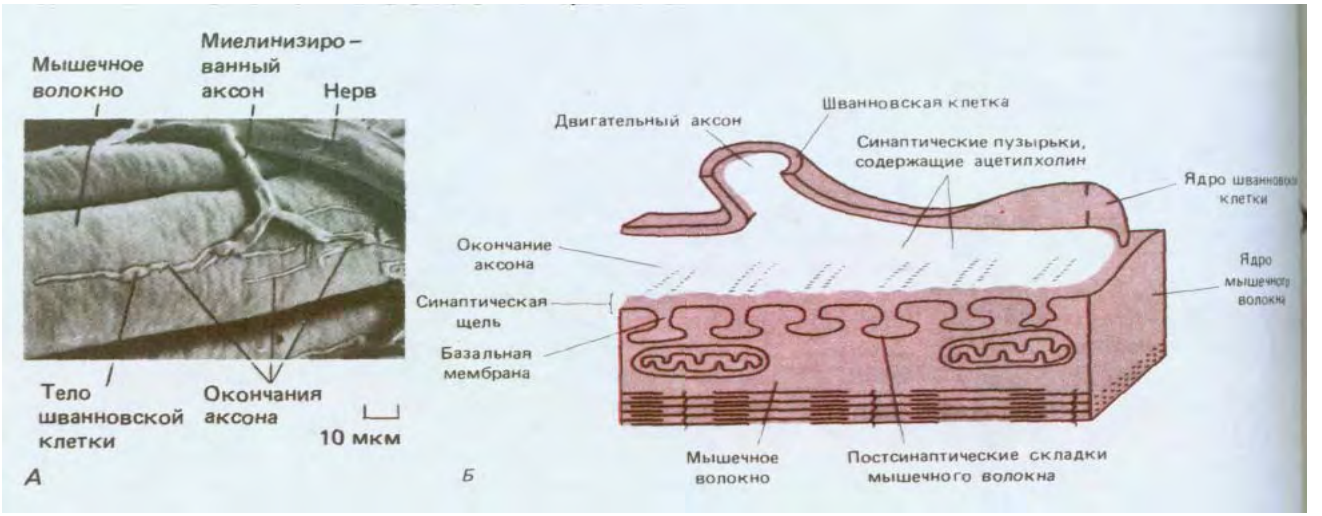


Рис. 19-16. Нервно-мышечное соединение у лягушки. *А.* Окончание одного аксона на клетке скелетной мышцы при малом увеличении. Электронная микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. *Б.* Схематическое изображение участка, помеченного на рисунке *А* красным прямоугольником. Показаны основные детали, видимые в трансмиссионный электронный микроскоп. Характер ветвления небольших окончаний аксона в области синапса варьирует в зависимости от вида животного и типа мышечного волокна. Из-за своеобразной формы окончаний аксона у млекопитающих нервно-мышечное соединение часто называют *концевой пластинкой. (A-J.* Desaki, Y. Uehara, J. Neurocytol, **10,** 101-110, 1981, с разрешения Chapman & Hall.)

холин в свою очередь заставляет скелетную мышцу сокращаться. Таким образом, ацетилхолин был идентифицирован как нейромедиатор в нервно-мышечном соединении. Но как же происходит высвобождение ацетилхолина и как он воздействует на мышцу?

19.3.2. За сопряжение потенциалов действия с высвобождением медиатора ответственны потенциал-зависимые кальциевые каналы [15]

В результате открытия и закрытия натриевых каналов нервный импульс распространяется вдоль аксона, пока не достигнет места контакта с мышечной клеткой. Здесь под его воздействием открываются *потенциал-зависимые каналы,* находящиеся в плазматической мембране окончания аксона, и ионы Ca^{2+} входят в аксон, в результате чего выделяется; ацетилхолин (рис. 19-19).

Как показали три простых наблюдения, для синаптической передачи необходим приток ионов кальция в окончание аксона. Во-первых, если в момент прибытия нервного импульса во внеклеточной среде вокруг окончания аксона эти ионы отсутствуют, то медиатор не высвобождается и передачи сигнала не происходит. Во-вторых, если через микропипетку искусственно ввести Ca^{2+} в цитоплазму нервного окончания, выход нейромедиатора происходит тотчас даже без электрической стимуляции аксона (это трудно осуществить на нервно-мышечном соединении из-за малых размеров окончания аксона, поэтому такой эксперимент был проведен на синапсе между гигантскими нейронами кальмара) В-третьих, искусственная деполяризация окончания аксона (тоже в синапсе между гигантскими нейронами) без нервного импульса и в условиях блокады натриевых и калиевых каналов специфическими токсинами

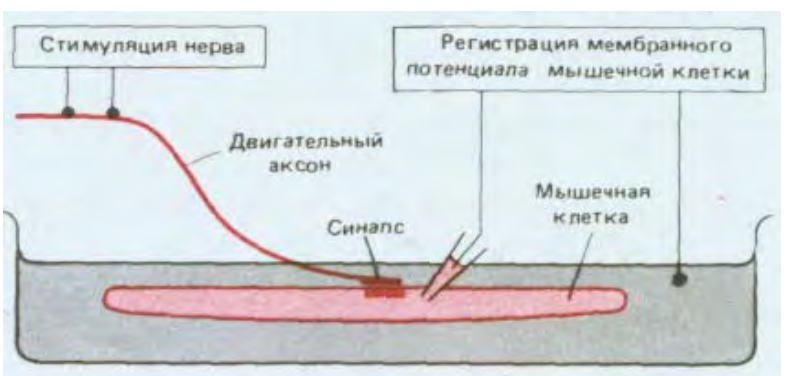


Рис. 19-17. Схема постановки эксперимента для изучения синаптической передачи в нервно-мышечном соединении.

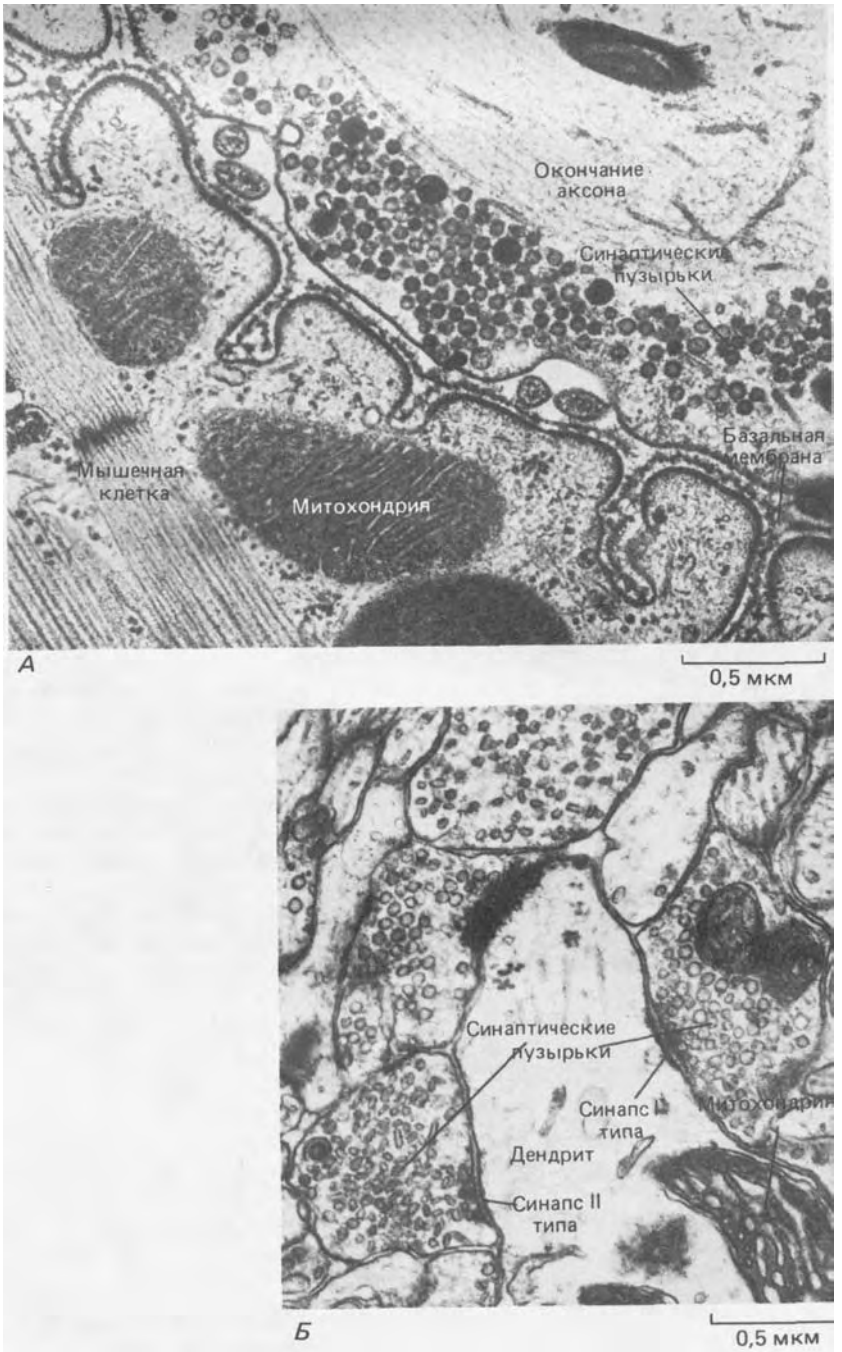


Рис. 19-18. *А*. Электронная микрофотография части нервно-мышечного соединения. *Б.* Электронная микрофотография небольшого участка мозга крысы. Здесь хорошо юны два синапса, где можно различить пре- и постсинаптические мембраны, синаптическую щель между ними и синаптические пузырьки в окончаниях аксонов, как 1 на фото А. Эти два синапса, показанные на фото Б, различаются величиной и формой синаптических пузырьков: в синапсе *типа I* пузырьки круглые, тогда как в синапсе *типа II* они уплощенные и, как полагают, содержат другой медиатор. Обратите внимание на характерное утолщение как постсинаптической, так (в меньшей степени) и пресинаптической мембраны; оно видно на обоих снимках. В мозговых синапсах между пре- и постсинаптическими мембранами нет базальной мембраны, хотя и здесь можно заметить некоторое количество внеклеточного материала. Отсутствие базальной мембраны - это главная структурная особенность, отличающая синапсы центральной нервной системы от нервно-мышечных соединений. (С любезного разрешения John Heuser *(А*) и i. Campbell, A. R. Lieberman *(Б).)*

вызывает переход Ca^{2+} внутрь окончания и высвобождение нейромедиатора. Но если деполяризация вызывает такой сдвиг мембранного потенциала, что электрохимическая сила, заставляющая Ca^{2+} входить внутрь, уменьшается до нуля, то высвобождения нейромедиатора не происходит.

Белок, образующий канал для перехода Ca^{2+} в клетку, - **потенциал-зависимый кальциевый канал** - играет исключительно важную роль. Он обеспечивает единственный известный способ преобразования электри-



Рис. 19-19. Важнейшие события, происходящие в химическом синапсе после прибытия импульса в окончание аксона.

ческих сигналов - кратковременных деполяризаций мембраны - в химические изменения внутри нейрона. Как видно из пояснений на схеме 19-1, потенциал-зависимые каналы для Na^+, K^+ или Cl^- с этой целью использоваться не могут: в результате одиночного нервного импульса через эти каналы проходят настолько малые ионные токи, что они лишь незначительно изменяют концентрацию ионов в цитозоле. Сам по себе поток ионов через кальциевые каналы тоже невелик, и обычно его вклад в электрический ток через мембрану мал. Но этот поток имеет весьма значительную величину относительно внутриклеточной концентрации свободного кальция, которая в норме поддерживается на уровне около 10^{-7} М, что соответствует менее 100 ионам Ca^{2+} в мкм^3. Благодаря мембранному потенциалу и сравнительно высокой внеклеточной концентрации кальция (обычно ~1-2 мМ) через один открытый кальциевый канал проходит несколько сотен ионов Ca^{2+} за 1 мс. Таким образом, когда в пресинаптическом окончании под влиянием нервного импульса открывается небольшое число потенциал-зависимых кальциевых каналов, внутриклеточная концентрация свободного кальция легко может повыситься в 10-100 раз. Поступающие свободные ионы Ca^{2+} действуют как внутриклеточные посредники и вызывают выделение нейромедиатора со скоростью, резко возрастающей по мере повышения концентрации Ca^{2+}.

Концентрация свободных ионов кальция возрастает лишь на короткое время, так как Ca^{2+}-связывающие белки, Ca^{2+}-изолирующие пузырьки и митохондрии быстро поглощают ионы Ca^{2+}, перешедшие в окончание аксона, а находящиеся в плазматической мембране кальциевые насосы, использующие энергию гидролиза АТР или натриевого электрохимического градиента, откачивают ионы кальция из клетки (см. разд. 6.4.7 и 12.3.7). Благодаря этому окончание аксона способно передать следующий сигнал сразу же, как только по аксону сможет прийти следующий нервный импульс.

19.3.3. Нейромедиатор быстро высвобождается путем экзоцитоза [16]

Окончание аксона в нервно-мышечном соединении заполнено тысячами одинаковых (~40 нм в диаметре) секреторных пузырьков, называемых *синаптическими пузырьками,* каждый из которых содержит ацетилхолин (см. рис. 19-18). Входящий в клетку кальций вызывает волну экзоцитоза, при котором пузырьки сливаются с пресинаптической мембраной, их содержимое выводится в синаптическую щель и воздействует на постсинаптическую клетку. Экзоцитоз происходит лишь в определенных участках, называемых *активными зонами,* которые расположены прямо на-

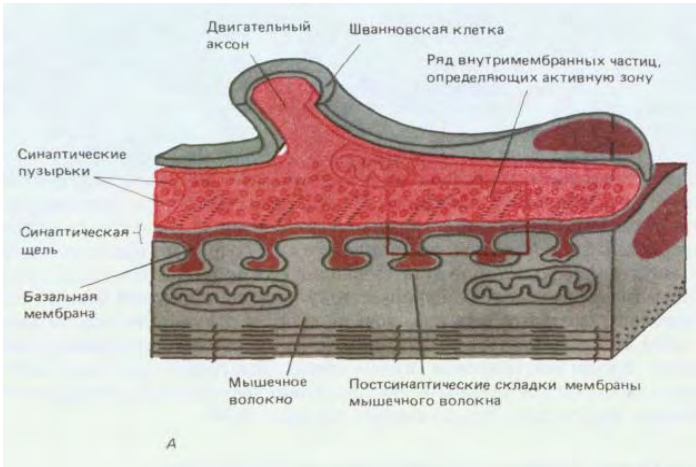
против рецепторов постсинаптической клетки; благодаря этому задержка в передаче сигнала, связанная с диффузией нейромедиатора через синаптическую щель, становится пренебрежимо малой. Впоследствии мембраны «разрядившихся» синаптических пузырьков извлекаются из пресинаптической плазматической мембраны путем эндоцитоза.

Имеются данные о том, что входящие в окончание аксона ионы Ca^{2+} не только запускают экзоцитоз, но и активируют Ca^{2+}-кальмодулин-зависимую протеинкиназу (Са-киназу II - см. разд. 12.4.3), фосфорилирующую в окончании аксона многие белки, в том числе *синапсин* /-белок, прикрепленный к поверхности синаптических пузырьков. Как полагают, в результате фосфорилирования синапсин I освобождается, благодаря чему пузырьки переходят в активную зону пресинаптической мембраны, где занимают место пузырьков, исчезнувших в результате экзоцитоза. Весь цикл событий, запускаемый одиночным нервным импульсом, был наглядно продемонстрирован путем очень быстрого замораживания области синапса и исследования препаратов в электронном микроскопе. Некоторые результаты представлены на рис. 19-20.

19.3.4. Нейромедиатор высвобождается «квантами» случайным образом [17]

Под действием одного нервного импульса из окончания аксона в нервно-мышечном соединении обычно высвобождается лишь несколько сотен из многих тысяч находящихся там синаптических пузырьков. Каждый пузырек, выбрасывая свое содержимое в синаптическую щель, вносит свой вклад в изменение мембранного потенциала постсинаптической мышечной клетки, и это можно регистрировать в помощью внутриклеточного электрода (рис. 19-21). Таким образом мембрана мышечной клетки деполяризуется до пороговой величины и генерирует потенциал действия. Это возбуждение распространяется по всей клетке (рис. 19-22), вызывая ее сокращение, как это описано в разд. 11.1.11.

Даже тогда, когда в окончание аксона не поступают импульсы, вблизи синапса наблюдаются случайные кратковременные сдвиги потенциала мышечной мембраны в сторону деполяризации. Эти так называемые **миниатюрные синаптические потенциалы** имеют примерно одинаковую амплитуду всего лишь около 1 мВ, что намного ниже порогового уровня. Возникают такие потенциалы случайным образом с достаточно низкой вероятностью, в среднем приблизительно раз в секунду (рис. 19-23). Каждый миниатюрный потенциал - это результат слияния одного синаптического пузырька с пресинаптической мембраной, т. е. результат выброса содержимого одного пузырька. Амплитуда, регистрируемая для данной мышечной клетки, более или менее постоянна, так как пузырьки содержат примерно одинаковое число молекул ацетилхолина - около 5000. Это минимальная порция, или «квант», выделяемого медиатора. Сигналам большей силы соответствуют величины, кратные этой основной единице. Ионы кальция, входящие в окончание аксона во время потенциала действия, повышают за доли миллисекунды частоту опорожнения пузырьков более чем в 10000 раз по сравнению с частотой спонтанного опорожнения в покоящемся окончании. Тем не менее процесс остается вероятностным, единичная стимуляция нерва не всегда производит в точности одинаковый постсинаптический эффект: если в среднем высвобождается 300 квантов медиатора, то в каждом отдельном случае число их может быть несколько большим или меньшим.



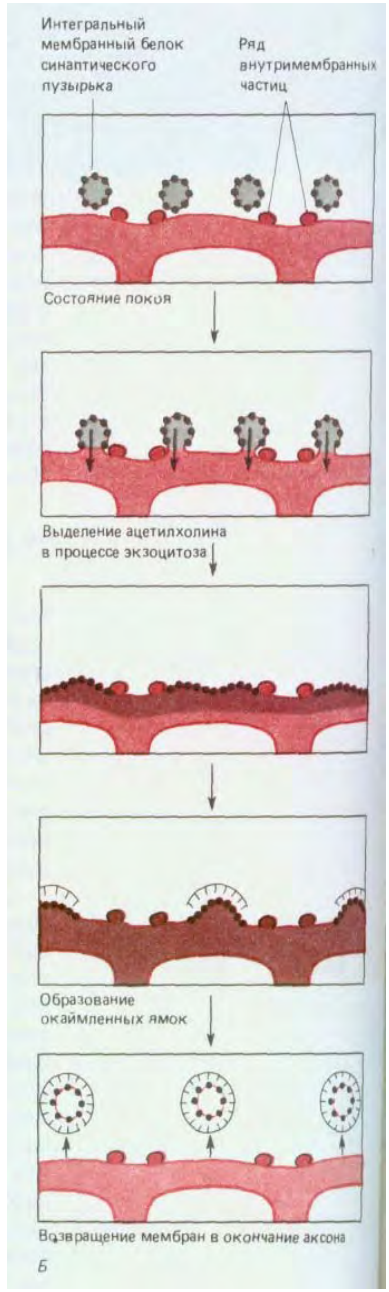


Рис. 19-20. Цикл событий, происходящих на мембране аксонного окончания в нервно-мышечном синапсе после стимуляции. Для того чтобы проследить за цепью событий, образцы ткани подвергали быстрому замораживанию через разные промежутки времени. Для упрощения задачи стимуляция осуществлялась в условиях, специально измененных таким образом, чтобы протекание всего процесса замедлялось в 5 10 раз, а число пузырьков, подвергающихся экзоцитозу, возрастало. *А.* Схематическое изображение нервно-мышечного соединения; показаны активные зоны, где происходит выделение нейромедиатора. *Б.* Область, обведенная рамкой на рисунке *А,* в увеличенном виде; схематически показаны события, происходящие в этой области через разные промежутки времени после стимуляции нерва.

В- 3. Мембрана, как она выглядит под электронным микроскопом (фото любезно предоставил John Heuser). Слева представлены электронные микрофотографии препаратов пресинаптической мембраны (со стороны цитоплазмы), полученных методом замораживания скалывания; справа микрофотографии тонких срезов. *В* и *Е*-состояние покоя. Г и *Ж*- слияние синаптических пузырьков с плазматической мембраной в активной зоне (отмечены рядами частиц, включенных в мембрану). *Д* и 3-возвращение мембран синаптических пузырьков через окаймленные ямки и окаймленные пузырьки. Как можно видеть, синаптические пузырьки начинают сливаться с плазматической мембраной через 5 мс после стимуляции *(Г,* Ж); каждая «пора» в плазматической мембране, видимая на фотографии Г, - результат слияния одного синаптического пузырька. Еще через 2 мс слияние завершается. Первые признаки восстановления мембраны становятся заметны примерно через 10 с, когда образуются окаймленные ямки (см. разд. 6.5.4), а затем еще через 10 с эти ямки начинают отшнуровываться с образованием окаймленных пузырьков *(Д, 3*). Эти пузырьки включают первоначальные мембранные белки синаптических пузырьков, а также молекулы, захваченные из внешней среды. Цикл заканчивается отделением от пузырьков окаймляющего их материала, заполнением их ацетилхолином и образованием обычных синаптических пузырьков с гладкой поверхностью. Эта схема, вероятно, позволяет объяснить удивительную однородность синаптических пузырьков по величине; их объем определяется размерами окаймлявшей их оболочки из клатрина (см. разд. 6.5.5).

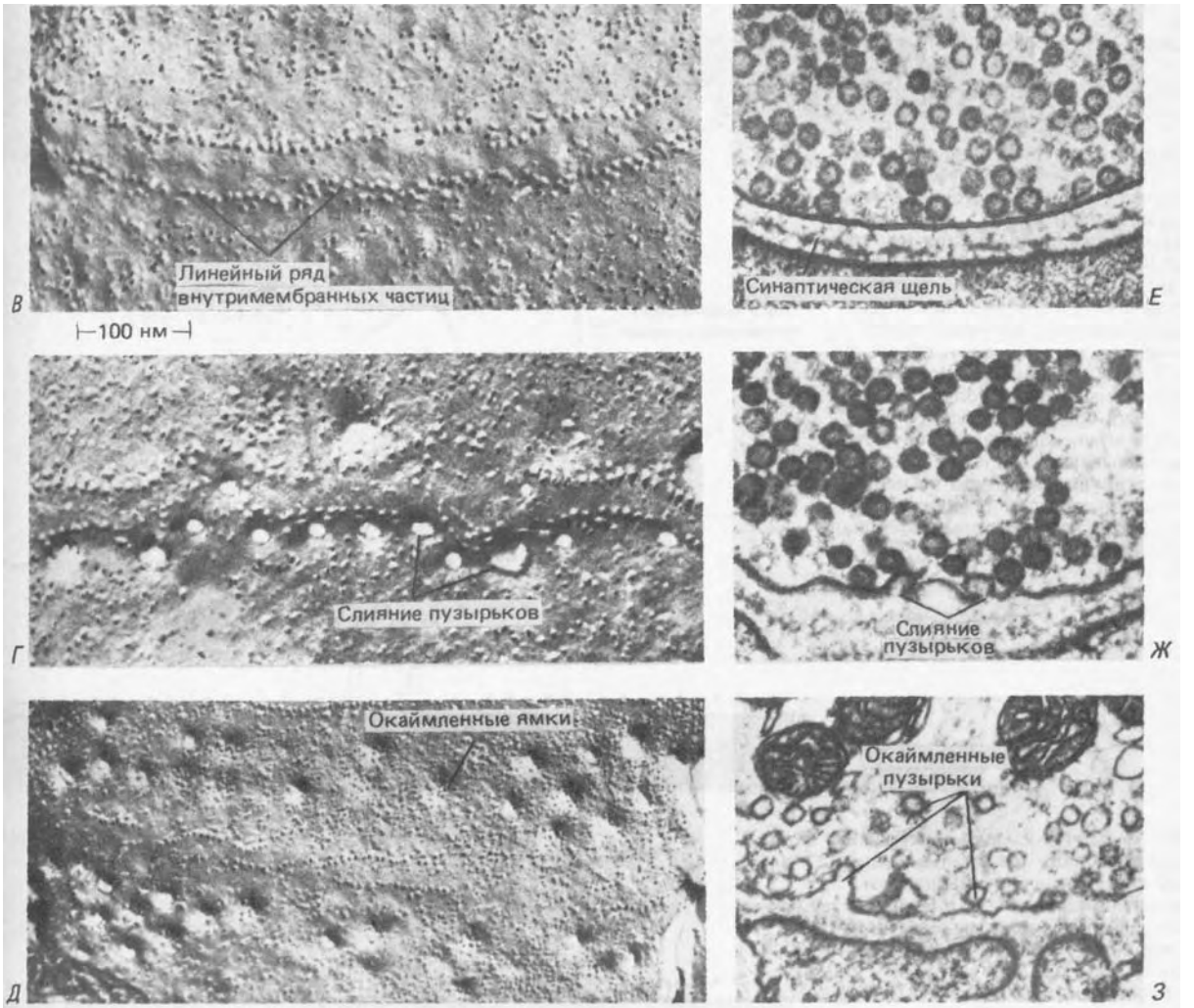


Рис. 19-20 *(продолжение)*. Дальнейшие данные об этом процессе регенерации могут быть получены при стимуляции нерва в присутствии таких электроноплотных маркеров, как ферритин. Эти маркеры быстро появляются внутри окаймленных пузырьков, а затем и в синаптических пузырьках. Следует отметить, однако, что эксперты относятся к подобным опытам скептически, считая некоторые из наблюдаемых явлений артефактом.

19.3.5. Лиганд-зависимые каналы снова преобразуют химический сигнал в электрический [18]

В синапсе мембрана мышечной клетки действует как *преобразователь* - превращает химический сигнал в форме нейромедиатора в сигнал электрический. Это преобразование осуществляется с помощью **лиганд-зависимых ионных каналов (т. е. рецепторов, связанных с каналами) -** белков, находящихся в постсинаптической мембране. Присоединение нейромедиатора к этим белкам вызывает изменение их конформации, и кана-



Рис. 19-21. Постсинаптический ответ на одиночный нервный импульс в нервно-мышечном соединении: кривая изменений потенциала в мышечной клетке лягушки, полученная, как и на рис. 19-17, с помощью внутриклеточного электрода, расположенного вблизи синапса. В норме постсинаптический потенциал (ПСП) - деполяризация, возникающая при прямом воздействии нейромедиатора на мембрану мышечной клетки, - достаточно велик для возбуждения потенциала действия, который может помешать эксперименту. «Чистый» ПСП, не осложненный нервным импульсом, можно получить при введении средних концентраций *кураре* во внеклеточную среду. Этот яд, связываясь с частью рецепторов и блокируя их реакцию на нейромедиатор, снижает величину ПСП до уровня, при котором потенциал действия не возникает.

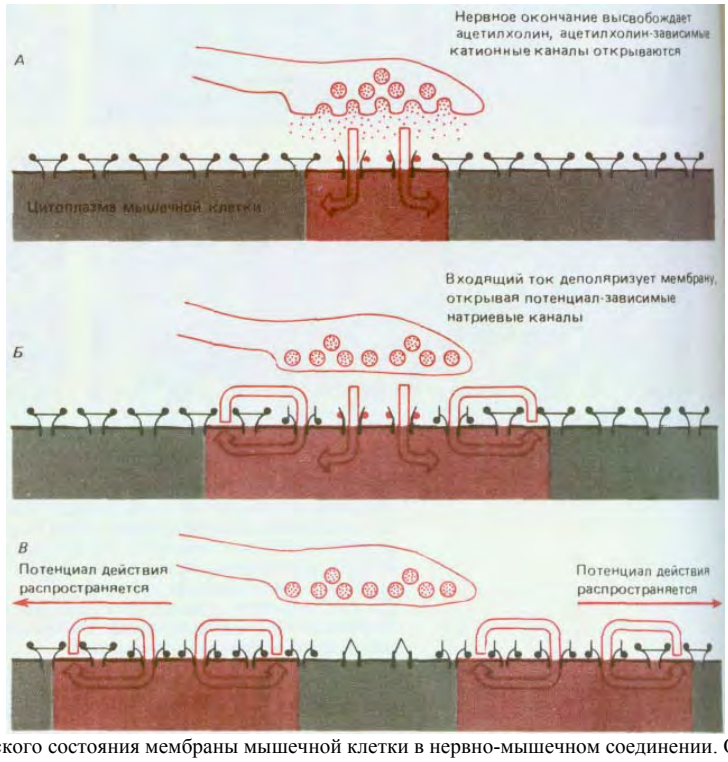


Рис. 19-22. Изменения электрического состояния мембраны мышечной клетки в нервно-мышечном соединении. Открытие ацетилхолин-зависимых ионных каналов *(А*) приводит к возникновению потенциала действия *(Б),* который распространяется вдоль мембраны мышечного волокна (В) и вызывает его сокращение.

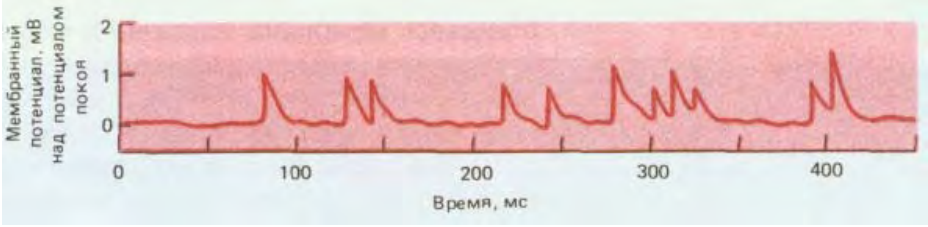


Рис. 19-23. Миниатюрные синаптические потенциалы (или «миниатюрные потенциалы концевой пластинки»), зарегистрированные в мышце лягушки с помощью внутриклеточного электрода, помещенного вблизи нервно-мышечного соединения. Каждый пик - это миниатюрный синаптический потенциал, возникающий в результате высвобождения медиатора из одного синаптического пузырька. (P. Fatt, B. Katz, J. Physiol., 117, 109-128, 1952.)



Рис. 19-24. Схема функционирования лиганд- и потенциал-зависимых каналов. Стрелками указаны причинно-следственные связи



Рис. 19-25. Реакция ацетилхолиновых рецепторов на ацетилхолин. При длительном воздействии высоких концентраций ацетилхолина рецептор переходит еще в одно, не показанное здесь состояние, в котором рецептор инактивирован и не открывается даже в присутствии ацетилхолина.

лы открываются, пропуская через мембрану ионы и изменяя тем самым мембранный потенциал. В свою очередь сдвиг мембранного потенциала, если он достаточно велик, заставляет потенциал-зависимые каналы открыться, и в результате возникает потенциал действия (рис. 19-24). В отличие от потенциал-зависимых каналов лиганд-зависимые каналы относительно нечувствительны к изменениям мембранного потенциала и поэтому не способны к самоусиливающемуся возбуждению типа «всё или ничего». Вместо этого они генерируют электрический сигнал, сила которого зависит от интенсивности и продолжительности внешнего химического сигнала, т. е. от того, сколько медиатора выводится в синаптическую щель и как долго он там остается. Как мы увидим позже, это свойство лиганд-зависимых каналов имеет большое значение для обработки информации в синапсах.

Постсинаптические лиганд-зависимые каналы обладают еще двумя важными свойствами. Во-первых, как рецепторы они, подобно ферментам, взаимодействуют лишь с определенными лигандами и поэтому реагируют только на один нейромедиатор - тот, который высвобождается из пресинаптического окончания; другие медиаторы не вызывают практически никакого эффекта. Во-вторых, как каналам им свойственна различная ионная специфичность: одни могут избирательно пропускать K^+, другие - Cl^- и т.д., в то время как третьи, например, могут быть относительно мало избирательны по отношению к различным катионам, но не пропускают анионов. Как мы увидим, природа постсинаптического ответа зависит от специфичной ионной проницаемости лиганд-зависимых каналов.

19.3.6. Рецептор ацетилхолина представляет собой лиганд-зависимый катионный канал [19]

Из всех лиганд-зависимых ионных каналов наиболее изучен канал, управляемый ацетилхолином (он же **рецептор ацетилхолина),** в мембране мышечного волокна. Его молекулярные свойства были рассмотрены в гл. 6 (разд. 6.4.18).

Так же как и потенциал-зависимый натриевый канал, рецептор ацетилхолина может находиться в одной из нескольких альтернативных конформаций (рис. 19-25). После связывания ацетилхолина канал в нем сразу же открывается и при связанном лиганде остается некоторое время открытым; это время случайным образом варьирует и составляет в среднем 1 мс или даже меньше в зависимости от температуры и от вида организма. В открытом состоянии канал одинаково проницаем для различных катионов, включая Na^+, K^+ и Ca^{2+}, но совсем непроницаем для анионов (рис. 19-26).

Так как в отношении катионов заметной избирательности нет, вклад каждого катиона в ток, проходящий через канал, зависит главным образом от концентрации данного катиона и от электрохимической

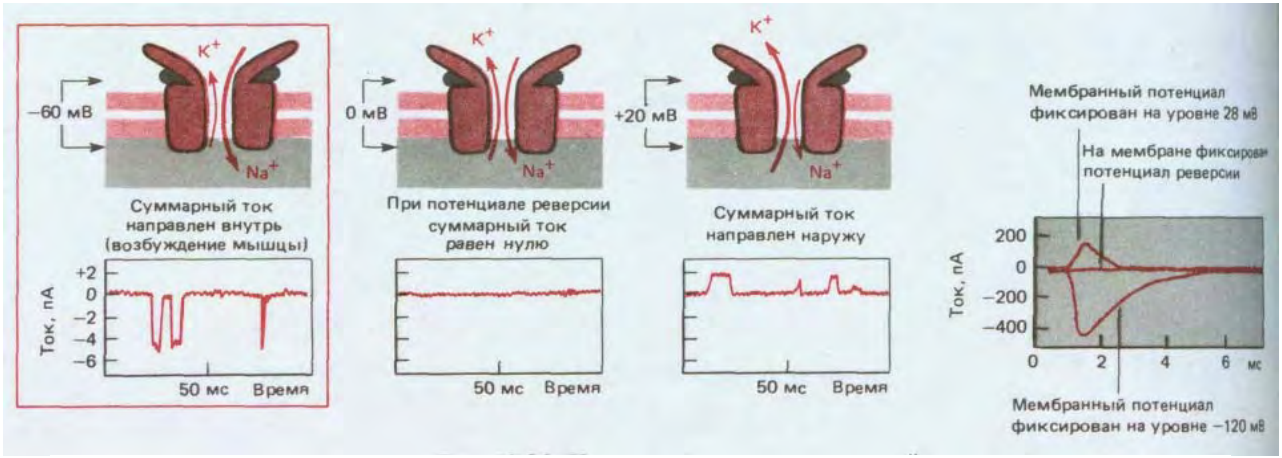


Рис. 19-26. Измерение тока через открытый канал ацетилхолинового рецептора при разных значениях мембранного потенциала. С помощью таких измерений можно установить ионную селективность каналов. Ток, переносимый через открытый канал ионами определенного вида, будет изменяться при изменении мембранного потенциала определенным образом в зависимости от вида иона и градиента его концентрации по обе стороны мембраны. Зная градиенты концентраций основных присутствующих ионов, можно определить ионную селективность канала путем простого измерения зависимости ток/напряжение; более полную информацию можно получить в результате повторных измерений при других концентрациях иона. *А.* Зарегистрированный с помощью метода пэтч-клампа ток, проходящий через одиночный канал, находящийся в растворе с фиксированной концентрацией ацетилхолина, при трех различных значениях мембранного потенциала. В каждом случае канал случайным образом переходит из закрытого состояния в открытое и обратно, но при некотором значении мембранного потенциала, которое называют *потенциалом реверсии,* ток равен нулю даже тогда, когда канал открыт. В данном случае потенциал реверсии близок к 0 мВ. *Б.* Такое же явление можно наблюдать, измеряя после одиночной стимуляции нерва общий ток через большое количество одиночных каналов с ацетилхолиновым рецептором, находящихся в постсинаптической мембране нервно-мышечного соединения. На графиках показаны изменения этого тока, измеренного с помощью внутриклеточных электродов в условиях фиксации напряжения. Каналы открываются при коротком воздействии ацетилхолина, но если мембранный потенциал поддерживается на уровне потенциала реверсии, то ток равен нулю. Поскольку открытые каналы проницаемы как для Na^+, так и для K^+, а значения электрохимических движущих сил для этих ионов различны, «нулевой ток» в действительности соответствует уравновешенным и направленным навстречу друг другу токам Na^+ и K^+. (Эти каналы проницаемы и для Ca^{2+}, но ток, переносимый ионами кальция, очень мал, так как их концентрация низка.) По величине потенциала реверсии и его чувствительности к концентрациям ионов во внешней среде можно судить об относительной проницаемости канала для разных ионов. Например, некоторые лиганд-зависимые каналы селективно проницаемы для Cl^-, и такие каналы можно идентифицировать по величине потенциала реверсии, равной —60 мВ, что близко к равновесному потенциалу Cl^-; при этом потенциал реверсии зависит от внеклеточной концентрации Cl^-, но не Na^+ или K^+. *(А* по данным B. Sakmann et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48,** 247-257, 1983; *Б по* данным K. L. Magleby, C. F. Stevens, J. Physiol., 223, 173-197, 1972.)

движущей силы. Если потенциал на мембране мышечной клетки соответствует уровню покоя, то суммарная движущая сила для K^+ близка к нулю, так как градиент заряда почти уравновешивается градиентом концентрации K^+. С другой стороны, для Na^+ направления градиентов заряда и концентрации совпадают, и их совместное действие направлено на перемещение ионов в клетку. (Это относится и к ионам кальция, хотя внеклеточная концентрация Ca^{2+} настолько ниже концентрации Na^+, что доля кальция во всем ионном токе, направленном внутрь клетки, невелика.) Поэтому открытие каналов в ацетилхолиновых рецепторах приводит в основном к значительному притоку ионов Na^+, что вызывает деполяризацию мембраны.

19.3.7. Ацетилхолин удаляется из синаптической щели в результате диффузии и гидролиза [20]

Для того чтобы состояние постсинаптической клетки успешно регулировалось сигналами, поступающими от пресинаптической клетки, постсинаптическое возбуждение должно быстро спадать, как только пресинаптическая клетка придет в состояние покоя. В нервно-мышечном соединении это достигается путем быстрого удаления ацетилхолина из синаптической щели с помощью двух механизмов. Во-первых, ацетилхолин рассеивается в результате диффузии, которая благодаря малым расстояниям происходит очень быстро. Во-вторых, ацетилхолин расщепляется *ацетилхолинэстеразой* на ацетат и холин. Этот фермент, выделяемый мышечными клетками, прикрепляется с помощью коллагеноподобного «хвоста» к базальной мембране, отделяющей нервное окончание от мембраны мышечной клетки. Одна молекула ацетилхолинэстеразы способна гидролизовать до 10 молекул ацетилхолина за 1 мс, поэтому весь медиатор удаляется из синаптической щели через несколько сотен микросекунд после его высвобождения из нервного окончания. Таким образом, период, когда ацетилхолин может связываться с рецепторами и переводить их в открытую конформацию, изменяя тем самым проводимость постсинаптической мембраны, очень короток (рис. 19-27). Благодаря этому временная картина пресинаптических сигналов четко отображается в картине постсинаптических ответов.

19.3.8. Быстрая синаптическая передача осуществляется с помощью небольшого числа нейромедиаторов [13, 21]

Вся структура нервно-мышечного соединения приспособлена для наиболее быстрой передачи сигналов. Для этого служат: миелинизированный двигательный аксон большого диаметра; активные зоны в окончании аксона, где синаптические пузырьки в любой момент готовы высвободить ацетилхолин точно напротив постсинаптических рецепторов; узкая синаптическая щель; лиганд-зависимые каналы постсинаптической мембраны, открывающиеся сразу же после связывания нейромедиатора; наконец, ацетилхолинэстераза в синаптической щели, быстро прерывающая передачу. Время задержки в синапсе между пиком пресинаптического потенциала действия и пиком постсинаптического импульса составляет около миллисекунды или меньше. Все больше данных свидетельствует о том, что в быстрых химических синапсах центральной нервной системы тоже, очевидно, используются лиганд-зависимые каналы и что в основе действия этих синапсов лежат те же структурные принципы: наличие активных зон, узкая синаптическая щель, локализация рецепторов напротив участков экзоцитоза. Кроме того, быстрая передача сигналов здесь также, видимо, опосредуется лишь небольшой группой нейромедиаторов. Однако это обобщение пока еще не вполне достовер-

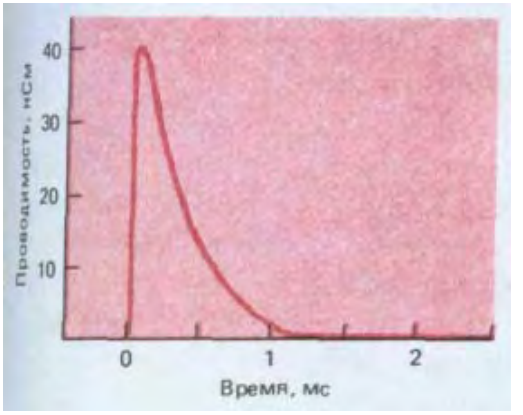


Рис. 19-27. Изменение проводимости постсинаптической мембраны в нервно-мышечном соединении лягушки, вызванное одним «квантом» ацетилхолина (содержимым одного синаптического пузырька). В момент пика проводимости бывает открыто примерно 1600 каналов, каждый из которых остается открытым в среднем в течение 400 мкс.

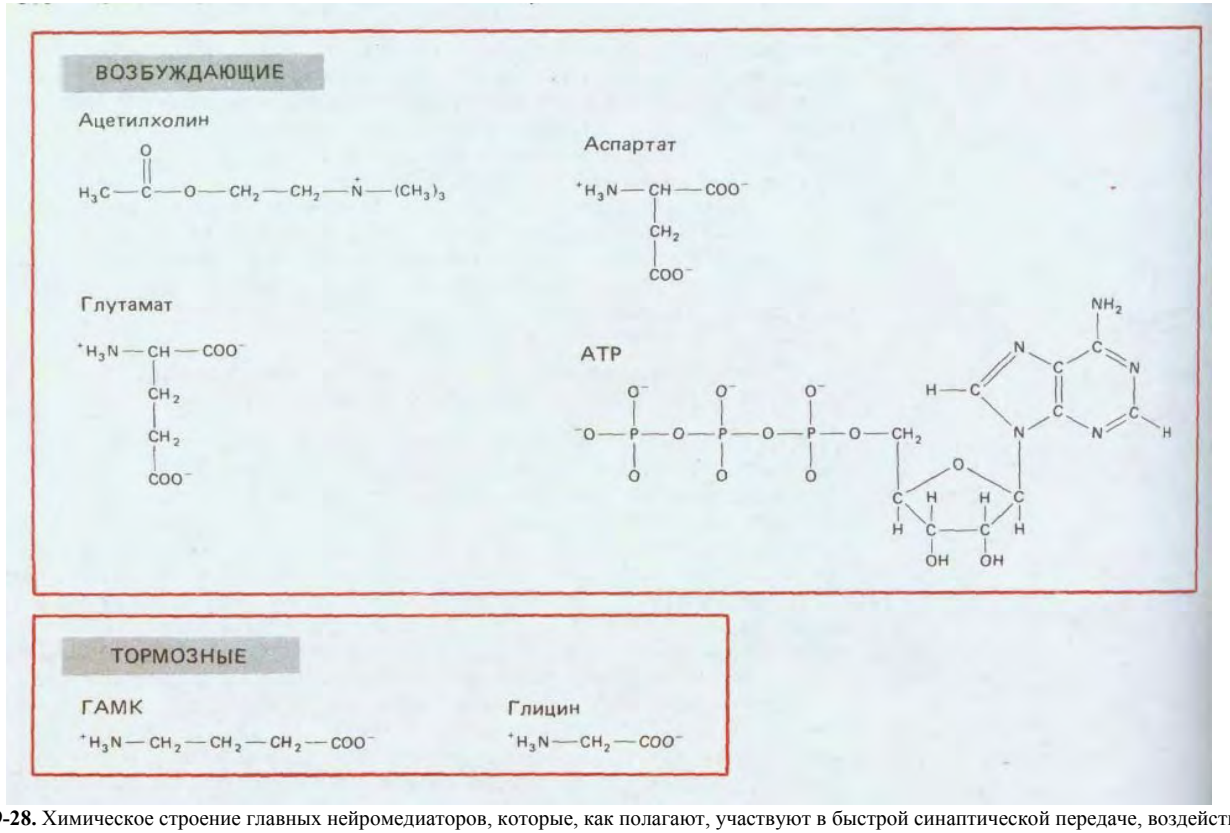


РИС. 19-28. Химическое строение главных нейромедиаторов, которые, как полагают, участвуют в быстрой синаптической передаче, воздействуя на рецепторы, связанные с каналами.

но: оказалось, что очень трудно с точностью установить, какой именно медиатор действует в данном синапсе.

Вероятно, быстрая синаптическая передача появилась очень давно, так как одни и те же нейромедиаторы используются эволюционно весьма далекими друг от друга видами животных - от моллюсков до млекопитающих. К числу быстродействующих медиаторов относятся ацетилхолин, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), глицин, глутамат и, вероятно, аспартат и АТР (рис. 19-28). Обычно каждый нейрон секретирует только один вид медиатора, общий для всех выходных синапсов данного нейрона (лишь иногда их может быть два). С помощью метода «пэтч-кламп» получены прямые данные о том, что рецепторы для ацетилхолина, ГАМК, глицина и глутамата связаны с каналами. В отношении других рецепторов это тоже весьма вероятно, но пока еще не доказано. Благодаря изучению последовательностей ДНК установлена гомологичность строения рецепторов ацетилхолина, ГАМК и глицина; это позволяет предполагать общее эволюционное происхождение всех лиганд-зависимых ионных каналов.

19.3.9 Ацетилхолин и глутамат опосредуют быстрое возбуждение, а ГАМК и глицин - быстрое торможение [19, 22]

Нейромедиаторы можно классифицировать по вызываемым ими эффектам. Как мы уже видели, ацетилхолин, воздействуя на соответствующий рецептор в мембране волокна скелетной мышцы, открывает катионный канал и деполяризует мембрану, приближая ее к порогу возникновения потенциала действия. Таким образом, этот рецептор опосредует *возбуждающий* эффект. По-видимому, и **глутамат** воздействует на рецепторы

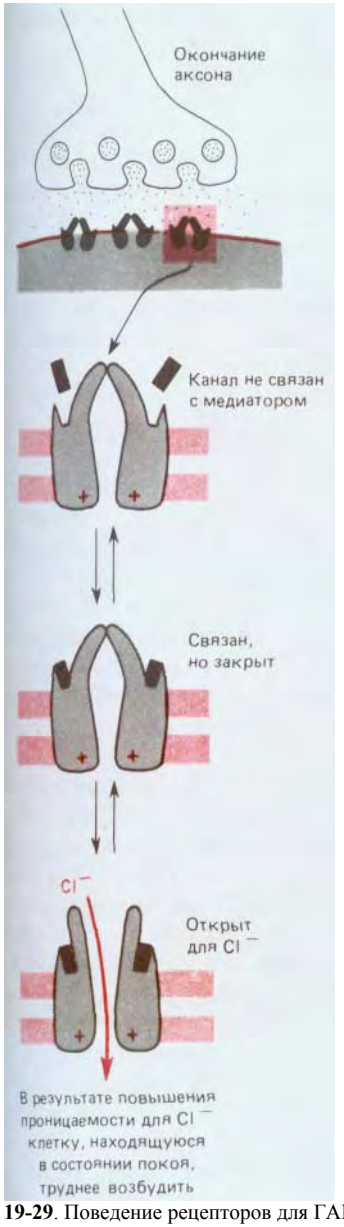


Рис. 19-29. Поведение рецепторов для ГАМК, связанных с каналами. При связывании ГАМК эти рецепторы образуют открытый канал, избирательно проницаемый для Cl^-. Таким путем они вызывают тормозный эффект: открытые Cl^--каналы удерживают мембранный потенциал вблизи равновесного потенциала для Cl^-, который в свою очередь близок к потенциалу покоя.

сходного типа. Показано, что в нервно-мышечных соединениях у насекомых глутамат служит возбуждающим медиатором; как полагают, это также главный возбуждающий медиатор в центральной нервной системе позвоночных, подобно тому как в их периферической нервной системе такую же роль играет ацетилхолин (выполняющий, кроме того, и важные центральные функции). *Аспартат* может воздействовать на те же рецепторы, что и глутамат, вызывая сходные эффекты. Есть данные в пользу того, что в синапсах на некоторых видах гладких мышц быстрым возбуждающим медиатором служит *ATP*.

В противоположность всем этим медиаторам ГАМК в глицин опосредуют быстрое *торможение.* Рецепторы, связывающие эти медиаторы, соединены с каналами, которые, открываясь, пропускают небольшие отрицательно заряженные ионы, главным образом Cl^-, но непроницаемы для положительных ионов. Концентрация Cl^- вне клетки намного выше, чем внутри, а равновесный потенциал Cl^- близок к нормальному потенциалу покоя или даже более отрицателен. Поэтому открытые хлоридные каналы удерживают мембрану в поляризованном или даже гиперполяризованном состоянии, тем самым затрудняя деполяризацию клетки и, следовательно, ее возбуждение (рис. 19-29). Полагают, что ГАМК и глицин - главные медиаторы, опосредующие быстрое торможение в центральной нервной системе позвоночных. Известно также, что ГАМК выполняет такую функцию и в нервно-мышечных соединениях у насекомых и ракообразных. Значение тормозных нейромедиаторов выявляется при воздействии ядов, блокирующих эффекты этих медиаторов; например, стрихнин, связываясь с глициновыми рецепторами и блокируя действие глицина, вызывает мышечные спазмы, судороги и смерть.

19.3.10. Для одного вида нейромедиаторов часто имеется несколько типов рецепторов [23]

Действие нейромедиатора зависит не только от его химической природы, но и от рецептора, который его связывает. В самом деле, часто один и тот же нейромедиатор присоединяется к рецепторам нескольких различных типов. Например, у позвоночных ацетилхолин оказывает противоположное воздействие на клетки скелетной и сердечной мышц, возбуждая первые и затормаживая вторые. В передаче этих двух эффектов участвуют разные ацетилхолиновые рецепторы. Полагают, что в тормозном эффекте, который развивается намного медленнее возбуждения скелетной мышцы, участвуют рецепторы, не связанные с каналами. Связанные с каналами рецепторы, участвующие в передаче быстрых возбуждающих эффектов ацетилхолина, называются *никотиновыми* рецепторами, так как они могут активироваться никотином. Рецепторы, не связанные с каналами и передающие медленные эффекты ацетилхолина, которые могут быть как тормозными, так и возбуждающими, называются *мускариновыми* рецепторами, поскольку активируются также мускарином (одним из грибных ядов). Помимо таких веществ, специфически активирующих определенные рецепторы (так называемых *агонистов),* имеются сильнодействующие рецептор-специфические блокаторы *(антагонисты),* избирательно подавляющие функцию ацетилхолиновых рецепторов того или другого типа. Например, кураре и α-бунгаротоксин специфически связываются с никотиновыми рецепторами, блокируя их активность, в то время как атропин действует таким же образом на мускариновые рецепторы. Другие агонисты и антагонисты проявляют специфичность по отношению к рецепторам других нейромедиаторов. Очень часто различные рецепторы исследуют, идентифицируют и локализуют при помощи агонистов и антагонистов, которые с ними связываются.

19.3.11. Синапсы служат важными мишенями для воздействия лекарственных веществ [23, 24]

Рецепторы нейромедиаторов играют важную роль как мишени для ядов и лекарственных препаратов. Змея парализует свою добычу с помощью α-бунгаротоксина, блокирующего никотиновые рецепторы ацетилхолина. Блокируя те же самые рецепторы с помощью кураре, можно вызвать расслабление мышц во время хирургических операций, в то время как сердце будет работать нормально, так как кураре не связывается мускариновыми рецепторами. Таким образом, различия в способности этих двух видов рецепторов ацетилхолина связывать определенные лиганды дает возможность осуществлять точно направленное лекарственное воздействие.

Большинство психотропных препаратов воздействует на синапсы, и при этом многие из них связываются специфическими рецепторами. Примером могут служить рецепторы ГАМК; наиболее изученные из них - $ГАМК_A$-рецепторы - представляют собой лиганд-зависимые хлоридные каналы, участвующие, как уже говорилось выше, в быстром торможении. На них воздействуют как бензодиазепиновые транквилизаторы (например, валиум и либриум), так и барбитураты, применяемые при бессоннице, состоянии беспокойства, эпилепсии. ГАМК, бензодиазепины и барбитураты кооперативно связываются тремя разными участками одного и того же рецепторного белка; вероятно, лекарственные препараты влияют на психику, снижая минимальную концентрацию ГАМК, еще достаточную для открытия хлоридных каналов, и усиливая тем самым тормозное действие ГАМК.

Синаптическую передачу можно нарушить и многими другими способами, например подавляя процессы расщепления медиатора или удаления его из синаптической щели. Имеются препараты, ингибирующие активность ацетилхолинэстеразы в нервно-мышечном соединении, что приводит к увеличению времени воздействия ацетилхолина на мышечную клетку. Это помогает уменьшить слабость у больных, страдающих myasthenia gravis, у которых понижено количество функционально активных рецепторов ацетилхолина (разд. 18.1.9). Другие нейромедиаторы, такие как ГАМК, не расщепляются в синаптической щели ферментами, а всасываются обратно пресинаптическими окончаниями или же близлежащими глиальными клетками. Как правило, в плазматической мембране нервных окончаний и глиальных клеток имеются специальные транспортные белки для активного поглощения нейромедиатора. Некоторые психотропные препараты либо блокируют, либо активируют этот процесс в синапсах определенных классов, что дает положительный клинический эффект.

Заключение

Нервные сигналы передаются от клетки к клетке через синапсы, которые могут быть электрическими (щелевые контакты) или химическими. В химическом синапсе в результате деполяризации пресинаптической мембраны под действием нервного импульса открываются потенциал-зависимые кальциевые каналы, что приводит к притоку ионов Ca^{2+}, которые в свою очередь вызывают высвобождение нейромедиатора из синаптических пузырьков путем экзоцитоза. Медиатор диффундирует через синаптическую щель и связывается рецепторными белками в мембране постсинаптической клетки. Из синаптической щели медиатор быстро удаляется путем диффузии, ферментативного расщепления или ж всасывания окончанием аксона или глиальными клетками. Рецептори, нейромедиаторов можно подразделить на связанные и не связанные

с каналами. Рецепторы, связанные с каналами (лиганд-зависимые ионные каналы) опосредуют быстрые постсинаптические эффекты, проявляющиеся в течение нескольких миллисекунд. Известно лишь небольшое число нейромедиаторов, взаимодействующих с такими рецепторами. В частности, ацетилхолин и глутамат (а также, вероятно, аспартат и АТР) открывают лиганд-зависимые каналы, проницаемые только для катионов, что ведет к возникновению быстрых возбудительных постсинаптических потенциалов, в то время как ГАМК и глицин открывают гомологичные каналы, пропускающие в основном ионы Cl⁻, и в результате возникают быстрые тормозные постсинаптические потенциалы. Все эти нейромедиаторы, а также многие другие, способны воздействовать и на рецепторы, не связанные с каналами, реализуя более медленные и более сложные эффекты.

19.4. Роль ионных каналов в совместной переработке информации нейронами [25]

В центральной нервной системе нейроны обычно принимают сигналы от множества пресинаптических клеток - их число может достигать тысячи или даже нескольких тысяч. Например, на типичном мотонейроне спинного мозга синапсы образуют тысячи нервных окончаний от сотен и, возможно, тысяч различных нейронов; тело нейрона и дендриты почти полностью покрыты синапсами (рис. 19-30). Некоторые из этих синапсов передают сигналы от головного мозга, другие доставляют сенсорную информацию от мышц и кожи, третьи сообщают результаты «вычислений», производимых вставочными нейронами спинного мозга. Мотонейрон должен интегрировать информацию, получаемую из этих многочисленных источников, и либо реагировать, посылая сигналы по аксону, либо оставаться в покое.

Мотонейрон служит типичным примером того, как отдельные нейро-

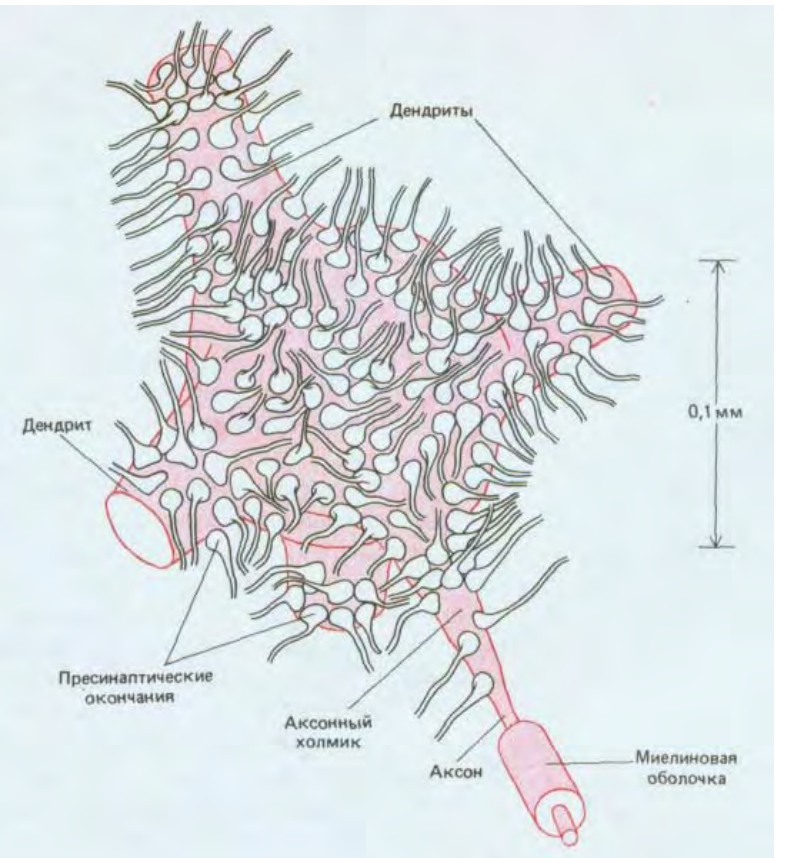


Рис. 19-30. Тело спинномозгового мотонейрона. Показана лишь небольшая часть из многих тысяч нервных окончаний, образующих на клетке синапсы и приносящих сигналы от других частей организма для регулирования ее импульсного разряда. Участки плазматической мембраны мотонейрона, не занятые синаптическими окончаниями, покрыты глиальными клетками (на рисунке не показаны).

ны участвуют в фундаментальной задаче вычисления правильного выходного сигнала в ответ на сложную совокупность входных сигналов. Из множества синапсов на мотонейроне одни будут стремиться возбудить его, а другие - затормозить. Хотя все окончания аксона данного мотонейрона выделяют один и тот же медиатор, мотонейрон имеет много различных рецепторных белков, сосредоточенных на разных постсинаптических участках его поверхности. В каждом из таких участков под действием пресинаптических импульсов открывается или закрывается определенная группа каналов, в результате чего в мотонейроне происходит характерное изменение потенциала - возникает **постсинаптический потенциал (ПСП).** Деполяризация соответствует *возбудительному ПСП* (возникающему, например, при открытии каналов для ионов натрия), а гиперполяризация - *тормозному ПСП* (появляющемуся, например, при открытии хлоридных каналов). ПСП, генерируемые разными синапсами на одном и том же нейроне, очень сильно варьируют по величине и по продолжительности. В одном синапсе на мотонейроне пришедший импульс может вызвать деполяризацию менее 0,1 мВ, а в другом - деполяризацию в 5 мВ. Но, как мы увидим, природа системы такова, что даже небольшие ПСП, суммируясь, могут давать большой эффект.

19.4.1. Сдвиг мембранного потенциала в теле постсинаптической клетки - это результат пространственной и временной суммации множества постсинаптических потенциалов [25, 26]

Хотя мембрана дендритов и тела большинства нейронов богата рецепторными белками, она содержит очень мало потенциал-зависимых натриевых каналов и поэтому относительно невозбудима. Одиночные ПСП, как правило, не приводят к возникновению потенциала действия. Каждый пришедший сигнал точно отображается величиной градуального ПСП, которая уменьшается по мере удаления от входного синапса. Если сигналы одновременно приходят к синапсам, находящимся на одном и том же участке дендритного дерева, то общий ПСП будет близок к сумме индивидуальных ПСП, причем тормозные ПСП будут учитываться с отрицательным знаком. В то же время суммарное электрическое возмущение, возникшее в одном постсинаптическом участке, будет распространяться на другие участки благодаря пассивным кабельным свойствам мембраны дендрита.

Тело нейрона, где сходятся все эффекты от ПСП, обычно невелико (менее 100 мкм в диаметре) по сравнению с дендритным деревом, длина ветвей которого может измеряться миллиметрами. Поэтому мембранный потенциал тела клетки и ближайших к нему частей отростков будет примерно одинаков - это будет совокупный результат эффектов, производимых всеми входными сигналами с учетом удаленности того или иного синапса от тела нейрона. Таким образом, можно сказать, что *суммарный постсинаптический потенциал* тела клетки - это результат **пространственной суммации** всех полученных стимулов. Если преобладают возбуждающие входные сигналы, то тело клетки деполяризуется, если тормозные - обычно гиперполяризуется.

В то время как пространственная суммация интегрирует эффекты сигналов, принятых разными участками мембраны, **временная** суммация объединяет сигналы, поступившие в разное время. Нейромедиатор, высвобождающийся после прибытия потенциала действия к синапсу, создает на постсинаптической мембране ПСП, который быстро достигает пика (благодаря кратковременному открытию лиганд-зависимых ионных каналов) и затем экспоненциально (что определяется емкостью мембраны) снижается до исходного уровня. Если второй импульс придет

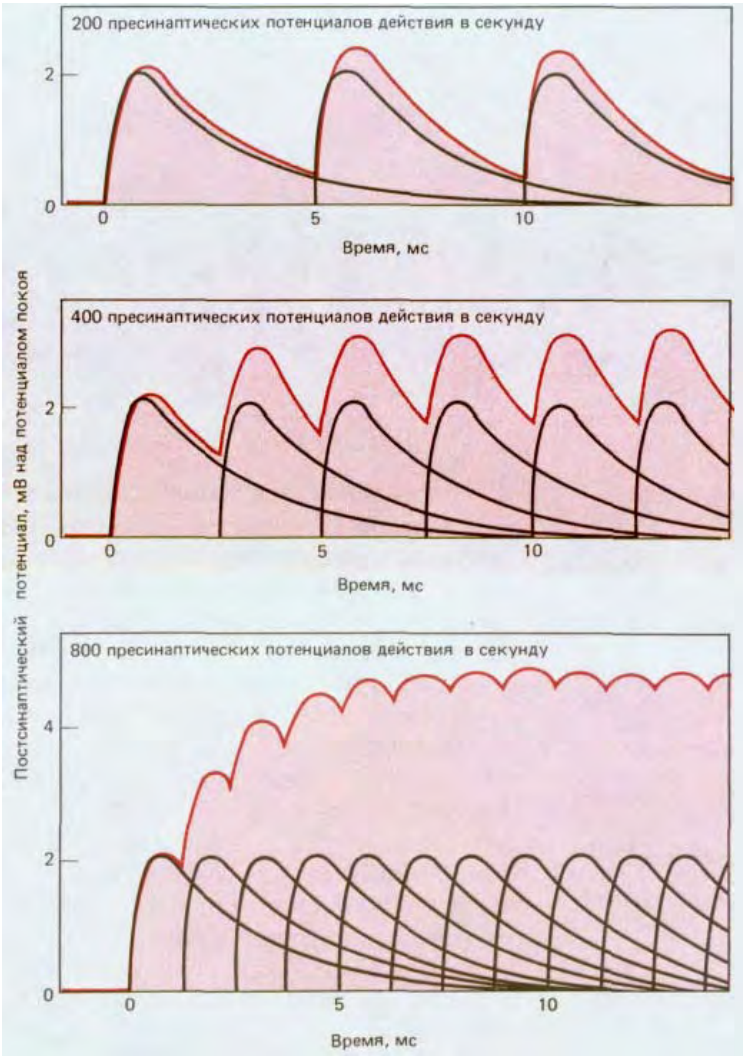


Рис. 19-31. Временная суммация. Перекрывающиеся черные кривые накрашенной области показывают индивидуальный вклад каждого из последовательных пресинаптических импульсов в суммарный постсинаптический потенциал.

до того, как первый ПСП полностью затухнет, то этот второй ПСП суммируется *с* оставшимся «хвостом» первого. Когда после некоторого периода покоя приходит длинный залп быстро повторяющихся импульсов, каждый последующий ПСП будет накладываться на предыдущий, давая в итоге большой ПСП, величина которого отражает частоту разряда пресинаптического нейрона (рис. 19-31). Таким образом, суть временной суммации состоит в том, что *частота* получаемых сигналов преобразуется в *величину* суммарного ПСП.

19.4.2. Для передачи информации на большие расстояния суммарный ПСП снова преобразуется в частоту нервных импульсов [27]

Благодаря временной и пространственной суммации мембранный потенциал тела одного постсинаптического нейрона регулируется частотой разрядов множества пресинаптических нейронов. В результате интеграции всех входных сигналов постсинаптическая клетка формирует определенный ответ, обычно в виде импульсов для передачи сигналов другим клеткам, нередко находящимся в отдаленных частях организма. Этот ответный сигнал отражает величину суммарного ПСП в теле клетки. Однако, хотя суммарный ПСП все время плавно изменяется, потенциалы действия имеют постоянную амплитуду и подчиняются закону «всё или ничего». Единственной переменной величиной при передаче сигна-

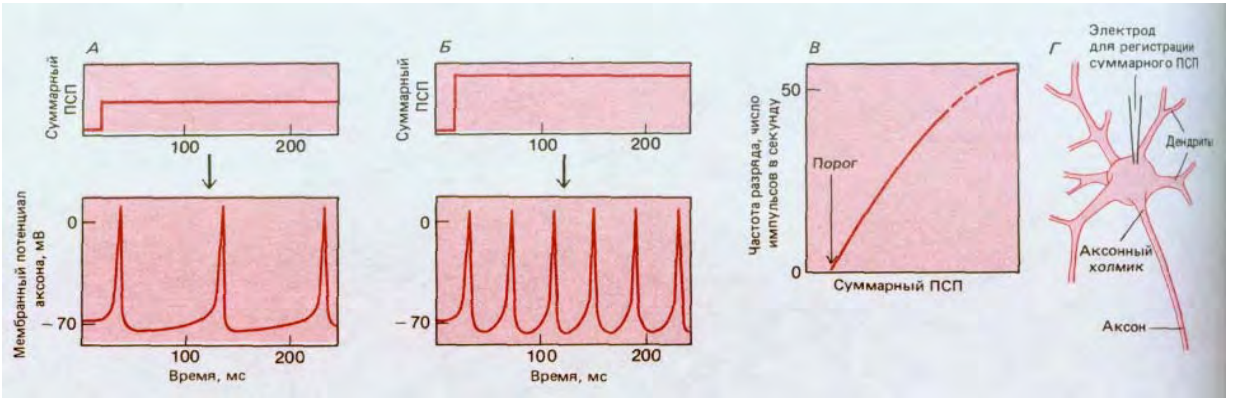


Рис. 19-32. Перекодирование суммарного ПСП в частоту импульсного разряда в аксоне. Из графиков *А и Б* видно, как частота импульсов в аксоне возрастает с увеличением суммарного ПСП; на графике *В* представлена общая зависимость. Г-способ измерения суммарного ПСП. *А* и *Б:* на верхних графиках - суммарная интенсивность синаптических стимулов, получаемых телом клетки; на нижних графиках соответствующие разряды, посылаемые по аксону. На верхних графиках показано, как выглядели бы ПСП, если бы импульсный разряд был каким-то образом блокирован.

лов с помощью импульсов остается временной интервал между последовательными импульсами. Поэтому для передачи информации на большие расстояния величина суммарного ПСП должна быть преобразована, или *перекодирована,* в *частоту* импульсного разряда (рис. 19-32) Такое кодирование достигается с помощью специальной группы потен циал-зависимых ионных каналов, сосредоточенных у основания аксона в области, называемой **аксонным холмиком** (см. рис. 19-30).

Прежде чем объяснить, как действуют такие каналы, необходимо сделать некоторые уточнения. Само по себе возникновение импульса приводит к резким изменениям мембранного потенциала всего тела клетки, который уже не будет прямо отражать суммарную синаптическую стимуляцию, получаемую клеткой. Поэтому очень трудно провести точный анализ кодирующего механизма. В последующем чисто качественном описании мы будем употреблять выражения «сила синаптической стимуляции» или «суммарный ПСП, имея в виду тот суммарный ПСП, который создавался бы при условии, что генерирование импульсов каким-то образом подавляется; и мы будем предполагать что именно этот основной суммарный ПСП и является причиной возникновения нервных импульсов.

19.4.3. Кодирование требует совместного действия различных ионных каналов [28]

Проведение нервных импульсов зависит главным образом, а во многих аксонах позвоночных почти полностью, от потенциал-зависимых натриевых каналов. Первоначально импульсы генерируются мембраной аксонного холмика, где таких каналов очень много. Но для осуществления особой функции кодирования мембрана аксонного холмика должна содержать еще по меньшей мере четыре класса ионных каналов - три избирательно проницаемых для ионов калия и один проницаемый для Ca^{2+}. Три разновидности калиевых каналов обладают различными свойствами - мы будем называть их *медленными, быстрыми* и Ca^{2+} - *зависимыми* калиевыми каналами. Кодирующие функции этих канала наиболее изучены на гигантских нейронах моллюсков, но те же принципы используются, по-видимому, и в других нейронах.

Чтобы понять, для чего нужны каналы нескольких типов, посмотрим, как будет вести себя мембрана нервной клетки, содержащая только один вид потенциал-зависимых каналов - натриевые каналы. При слабой синаптической стимуляции, не доводящей деполяризацию мембраны аксонного холмика до порогового уровня, потенциал действия не буди возникать. При постепенном усилении стимуляции порог будет достигнут, натриевые каналы откроются и возникнет потенциал действия.

В результате последующей инактивации натриевых каналов появившийся потенциал действия исчезнет. Прежде чем сможет возникнуть другой потенциал действия, натриевые каналы должны будут выйти из инактивированного состояния. Но для этого необходимо, чтобы величина мембранного потенциала вновь достигла большого отрицательного значения, а этого не произойдет, пока поддерживается сильный деполяризующий стимул (от ПСП). Поэтому для того, чтобы реполяризовать мембрану после импульса и подготовить клетку для проведения следующего импульса, нужен еще один вид каналов. Эту функцию выполняют **медленные калиевые каналы,** которые уже упоминались, когда речь шла о распространении потенциала действия (разд. 19.2.2). Эти каналы зависимы от потенциала и открываются при деполяризации мембраны так же, как и натриевые, но происходит это с некоторым запаздыванием. Открываясь во время спада потенциала действия, калиевые каналы пропускают ионы K^+ из клетки наружу, в результате чего устраняется эффект даже длительного деполяризующего стимула и мембранный потенциал возвращается к уровню равновесного калиевого потенциала. Этот потенциал настолько отрицателен, что натриевые каналы выводятся из состояния инактивации. Кроме того, прекращается и выход калия из клетки: реполяризация мембраны приводит к тому, что медленные калиевые каналы опять закрываются (так и не успев инактивироваться). Как только произошла реполяризация, деполяризующие стимулы от синаптических входов могут вновь поднять мембранный потенциал до порогового уровня и вызвать очередной потенциал действия. Благодаря этому непрерывная стимуляция дендритов и тела клетки приводит к многократно повторяющемуся возбуждению аксона.

Однако недостаточно только непрерывности разряда - нужно еще, чтобы его частота отражала интенсивность стимуляции. Детальные расчеты показывают, что простая система натриевых и медленных калиевых каналов не отвечает этому требованию. Если сила постоянного стимула ниже определенного порогового уровня, потенциалов действия не будет вовсе; если же сила стимуляции превысит порог, то сразу же начнется частая импульсация. Проблему решают **быстрые калиевые каналы** (называемые также *А-каналами).* Эти каналы тоже потенциал-зависимы и открываются при деполяризации мембраны, но специфическая зависимость их от потенциала и кинетика инактивации такова, что они снижают частоту разряда при уровнях стимуляции, которые лишь ненамного выше порога. Таким образом, быстрые калиевые каналы помогают устранить разрыв непрерывности в соотношении между интенсивностью стимула и частотой разряда; в результате частота импульсов пропорциональна силе деполяризующего стимула в очень широком диапазоне (см. рис. 19-32).

19.4.4. Адаптация уменьшает реакцию на постоянный стимул [29]

Обычно процесс кодирования видоизменяют еще два типа каналов, имеющихся в аксонном холмике. О них уже упоминалось - это *потенциал-зависимые кальциевые каналы* и *Ca^{2+}-зависимые калиевые каналы.* Первые подобны кальциевым каналам, участвующим в высвобождении медиатора из окончаний аксона: в области аксонного холмика эти каналы открываются при возникновении потенциала действия и пропускают Ca^{2+} внутрь аксона. Ca^{2+}-зависимые калиевые каналы отличаются от всех других каналов, описанных ранее. Они открываются при повышении концентрации кальция у внутренней поверхности мембраны нервной клетки.

Предположим, что сильный и продолжительный деполяризующий стимул приводит к длительной импульсации. В результате каждого

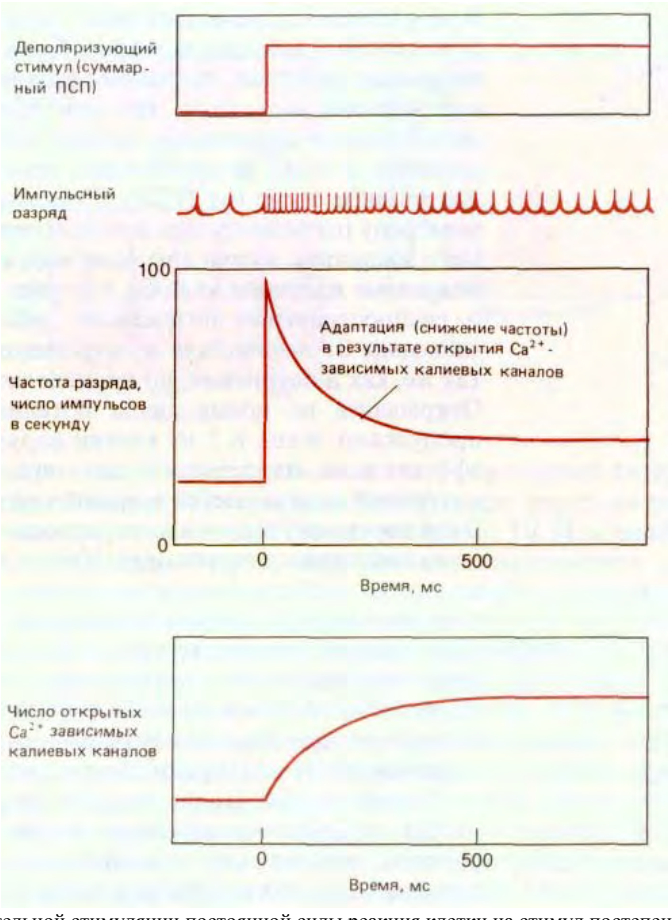


Рис. 19-33. Адаптация. При длительной стимуляции постоянной силы реакция клетки на стимул постепенно ослабевает, что выражается в уменьшении частоты импульсного разряда.

импульса в клетку через потенциал-зависимые кальциевые каналы переходит небольшое количество ионов Ca^{2+}, так что их внутриклеточная концентрация постепенно поднимается до высокого уровня. Это ведет к открытию Ca^{2+}-зависимых калиевых каналов, и проницаемость мембраны для калия повышается, что затрудняет деполяризацию и увеличивает интервалы между последовательными импульсами. Таким образом, при длительном воздействии постоянного стимула сила ответа нейрона постепенно снижается. Это явление, в основе которого могут лежать и другие механизмы, называют **адаптацией** (рис. 19-33). Благодаря адаптации нейрон, так же как и нервная система в целом, способен с высокой чувствительностью реагировать на *изменение* стимула, даже если оно происходит на фоне сильной постоянной стимуляции (разд. 19.6.8). Это одно из общих приспособлений, благодаря которым мы, например, не замечаем постоянного давления одежды на наше тело, но в то же время быстро реагируем на внезапное прикосновение.

19.4.5. Сигналы могут передаваться не только по аксонам [30]

В типичном нейроне, о котором говорилось выше, дендриты и аксон резко различаются между собой по строению и функции. Однако некоторые нейроны не соответствуют такой схеме, хотя молекулярные основы их функционирования те же. Например, у большинства беспозвоночных нейроны чаще всего имеют *униполярную* организацию: тело клетки связано одним-единственным «стебельком» с системой ветвящихся клеточных отростков, среди которых не всегда можно отличить дендриты от аксона (рис. 19-34). Функциональные отличия тоже мот быть «смазаны», что встречается и у позвоночных, и у беспозвоночных:

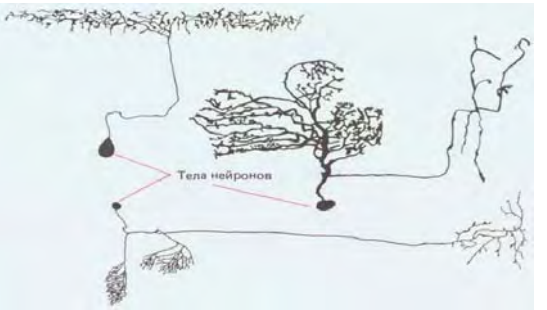


Рис. 19-34. Нейроны мухи. Строе-кие их типично для большинства нейронов беспозвоночных животных; тело клетки соединено с системой отростков при помощи стебелька, так что нет дендритов, отходящих прямо от тела. Сходной организацией обладают и сенсорные нейроны из спинномозговых ганглиев позвоночных. (N. Strausfield, Atlas of an Insect Brain, New York, Springer, 1976.)

отростки, которые по их строению можно отнести к дендритам, часто образуют как пре-, так и постсинаптические структуры и способны как принимать сигналы, так и передавать их другим клеткам. И наоборот, входные синаптические сигналы иногда воспринимаются «стратегическими» участками аксона - например, вблизи окончания, где эти сигналы могут усиливать или тормозить высвобождение нейромедиатора из данного окончания, не влияя на передачу в окончаниях других ветвей того же аксона (рис. 19-35). Пример этого важного механизма *пресинаптического торможения* и *пресинаптического облегчения* будет рассмотрен позже (разд. 19.5.4).

Синапсы, через которые дендриты передают стимулы другой клетке, играют важную роль в коммуникации между нейронами, расположенными друг от друга на расстоянии нескольких миллиметров или еще ближе. На такие расстояния электрические сигналы могут передаваться по дендриту пассивно от постсинаптического участка, где они были восприняты, до пресинаптического участка, где они регулируют высвобождение медиатора. Встречаются даже нейроны, совсем не имеющие аксона, не проводящие потенциалов действия и передающие все сигналы через дендриты. Более того, если дендритное дерево велико, то отдельные части его могут более или менее независимо использоваться для связи и обработки информации. Диапазон возможностей некоторых нейронов расширяется еще больше благодаря наличию в мембране дендритов потенциал-зависимых каналов, что позволяет дендритам проводить потенциалы действия. Таким образом, даже отдельный нейрон способен функционировать как очень сложное вычислительное устройство.

Заключение

Дендриты и тело типичного нейрона принимают множество различных возбуждающих и тормозных синаптических сигналов, которые подвергаются пространственной и временной суммации и создают суммарный постсинаптический потенциал тела клетки. Для передачи сигналов на большие расстояния величина этого потенциала преобразуется в частоту импульсного разряда при помощи системы ионных каналов в мембране аксонного холмика. Механизму такого кодирования часто свойственна способность к адаптации, и тогда клетка слабо реагирует на постоянный

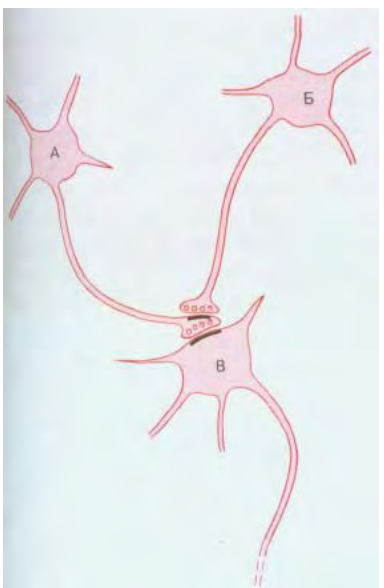


Рис. 19-35. *Аксоаксонный* синапс. Нейромедиатор, выделяемый окончанием аксона клетки *В,* воздействует на каналы в окончании аксона клетки *А,* изменяя тем самым число квантов нейромедиатора, поступающих на клетку *В* при возбуждении *Б.* Если возбуждение *Б* ослабляет силу стимуляции *В* клеткой *А,* то говорят, что *Б* осуществляет пресинаптическое торможение. Противоположный эффект называют пресинаптическим облегчением.

стимул, но чувствительна ко всякому изменению его силы. Существует много вариантов описанной общей схемы; например, не все нейроны дают ответ в виде потенциалов действия, дендриты могут быть не только *постсинаптическими, но и пресинаптическими, а аксон - не только пресинаптическим, но и постсинаптическим.*

19.5. Рецепторы, не связанные с каналами, и синаптическая модуляция [13, 31]

В тех синапсах, где используются рецепторы, связанные с каналами, нейромедиаторы опосредуют быстрые, простые и кратковременные эффекты и к тому же место их воздействия определено с большой точностью. Медиатор, выделяемый одним окончанием аксона, воздействует лишь на одну постсинаптическую клетку. В противоположность этому рецепторы, не связанные с каналами, могут вызывать медленные, сложные и продолжительные эффекты, нередко рассеянные в пространстве. В этом случае медиатор, выделяемый одним окончанием, может оказывать влияние сразу на несколько клеток, расположенных поблизости. Такие медленные эффекты часто приводят в качестве примеров *нейромодуляции,* так как они влияют на быстрые ответы, опосредуемые рецепторами той же клетки, связанными с каналами. В основе действия рецепторов, не связанных с каналами, лежат те же молекулярные механизмы, которые опосредуют действие гормонов и локальных химических медиаторов за пределами нервной системы; вероятно, многие рецепторы в обоих случаях идентичны.

Как уже говорилось в гл. 12 (разд. 12.3.1), расположенные на поверхности клетки рецепторы для сигнальных молекул, не связанные с каналами, подразделяют на две большие группы: 1) **каталитические рецепторы,** большей частью представленные тирозин-специфическими протеинкиназами, которые в результате присоединения лиганда активируются и фосфорилируют остатки тирозина во внутриклеточных белках; и 2) **рецепторы, связанные с G-белком,** передающие сигнал внутрь клети путем активации регулярного GTP-связывающего белка *(G-белка),* который в свою очередь активирует или инактивирует мембраносвязанный фермент или ионный канал. По-видимому, большая часть изученных нейромедиаторных рецепторов, не связанных с каналами, связана с G-белком, который участвует в передаче сигнала одним из трех способов:

1. G-белок может активировать или инактивировать аденилатциклазу, регулируя тем самым содержание циклического AMP в постсинаптической клетке. В свою очередь циклический AMP регулирует активность cAMP-зависимой протеинкиназы *(А-киназы* - см. разд. 12,4.1), которая наряду с другими белками-мишенями способна фосфорилировать ионные каналы плазматической мембраны, изменяя их свойства. Циклический AMP способен также влиять на некоторые ионные! каналы, непосредственно присоединяясь к ним.

2. G-белок может запускать инозитолфосфолипидный путь (разд. 12.3.9), активируя при этом протеинкиназу С (С-киназу) и вызывая выход Ca^{2+} в цитозоль постсинаптической клетки из содержащего кальций компартмента. С-киназа регулирует поведение ионных каналов, фосфорилируя их. Ионы Ca^{2+} могут влиять на поведение ионных каналов либо непосредственно, либо косвенно через Ca^{2+}-зависимую протеинкиназу, фосфорилирующую канал (разд. 12.4.3).

3. G-белок может взаимодействовать непосредственно с ионными каналами, заставляя их открываться или закрываться. В каждом случае определенные молекулы действуют в постсинаптической клетке как связующие звенья, или *внутриклеточные посредники,*

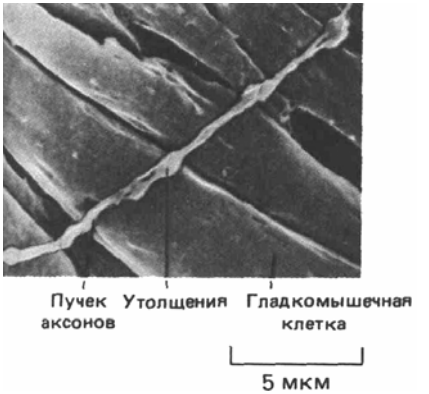


Рис. 19-36. Небольшой пучок вегетативных двигательных аксонов, иннервирующих гладкомышечные клетки мочеточника. Микрофотография, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. «Варикозные» расширения содержат синаптические пузырьки, наполненные нейромедиатором норадреналином. Синапсы здесь плохо различимы; ширина пространства между местом выделения медиатора и мембраной ближайшей мышечной клетки, на которую он должен воздействовать, может достигать 0,2 мкм. (S. Tachibana et al., J. Urol., **134,** 582-568, 1985. Copyright by Williams a. Wilkins, 1985.)

которые диффундируют в клетке и передают сигнал от рецептора другим клеточным компонентам. Чем больше этапов включает этот каскад внутриклеточных посредников, тем больше возможностей для усиления и регуляции сигнала (разд. 12.4.6).

Идентифицировано более 50 нейромедиаторов, взаимодействующих с рецепторами, не связанными с каналами, и вызывающих разнообразные и сложные эффекты. Некоторые из них, например ацетилхолин, могут присоединяться к рецепторам, связанным с каналами, тогда как другие, такие как нейропептиды (см. ниже), видимо, не способны к этому.

19.5.1. Рецепторы, не связанные с каналами, опосредуют медленные и рассеянные эффекты [32]

В то время как рецепторы, связанные с каналами, вызывают электрические изменения в постсинаптической клетке за несколько миллисекунд или еще быстрее, рецепторам, не связанным с каналами, для достижения эффекта требуется несколько сотен миллисекунд или более. Этого следовало ожидать, так как между первоначальным сигналом и конечным ответом должна пройти серия ферментативных реакций. Более того, часто сам сигнал «размыт» не только во времени, но и в пространстве.

Ярким примером может служить иннервация гладкой мускулатуры аксонами, выделяющими *норадреналин,* который активирует аденилатциклазу через посредство рецептора, связанного с G-белком. В этом случае медиатор высвобождается не из нервных окончаний, а из утолщений или узелков, расположенных вдоль аксона (рис. 19-36). В этих узелках содержатся синаптические пузырьки, но здесь нет активных зон, определяющих точные места выхода медиатора. Кроме того, сами узелки не прилегают к каким-то специализированным рецептивным участкам постсинаптической клетки; вместо этого медиатор диффундирует в широких пределах, воздействуя сразу на несколько клеток, расположенных вблизи (подобно локальному химическому медиатору - см. разд. 12.7). Вероятно, многие сигнальные молекулы, взаимодействующие с каталитическими или связанными с G-белком рецепторами в центральной нервной системе, действуют таким же паракринным способом. Действительно, многие из нейромедиаторов используются как гормоны или локальные химические медиаторы за пределами нервной системы: например, норадреналин, а также близко родственный ему *адреналин* выделяются в качестве гормонов из надпочечников.

Адреналин и норадреналин относятся к семейству **моноаминовых** медиаторов, выполняющих разнообразные функции как у позвоночных, так и у беспозвоночных и имеющих важное значение для медицины (рис. 19-37, *А).* Можно создать лекарственные препараты, которые будут препятствовать синтезу, поглощению или расщеплению определенных моноаминов или же взаимодействовать с некоторыми подгруппами их рецепторов. Некоторые из таких препаратов оказались полезными при лечении нервных и психических заболеваний. Например, при шизофрении часто с успехом используют препараты, блокирующие определенные виды дофаминовых рецепторов, а препараты, повышающие концентрацию дофамина в мозгу, резко улучшают двигательные функции при болезни Паркинсона (рис. 19-37, *Б).* При лечении глубоких депрессий часто бывают эффективны препараты, повышающие концентрацию норадреналина и/или серотонина в синапсах.

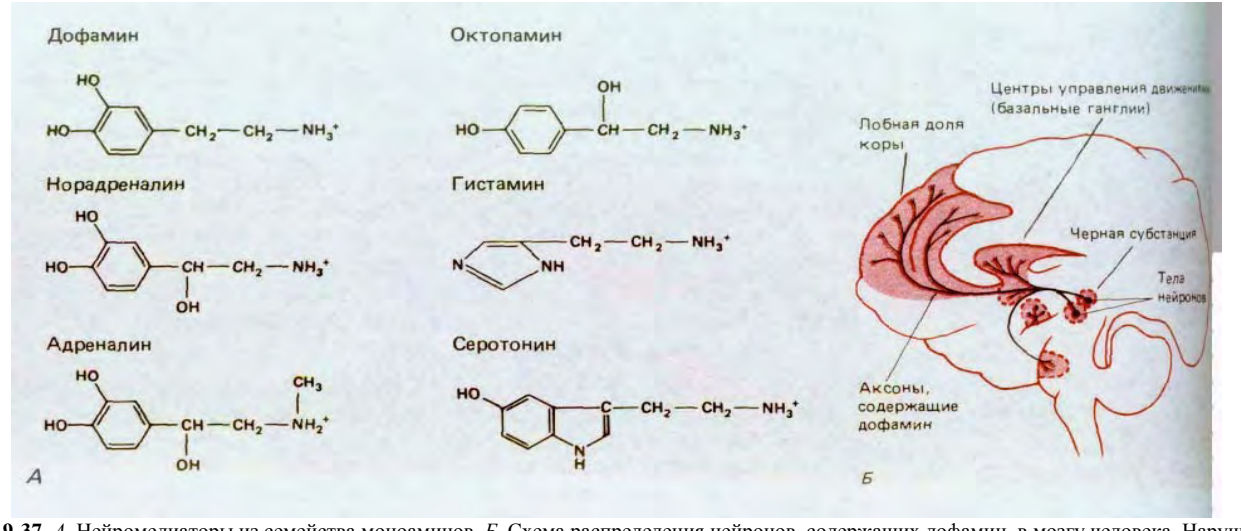


Рис. 19-37. *А.* Нейромедиаторы из семейства моноаминов. *Б.* Схема распределения нейронов, содержащих дофамин, в мозгу человека. Нарушение координации движений, наблюдаемое при болезни Паркинсона, связано с гибелью многих клеток, относящихся к определенной группе дофамин-содержащих нейронов (находящихся в substantia nigra). Симптомы заболевания можно смягчить с помощью лекарственных препаратов, способствующих синтезу дофамина и подавляющих его разрушение. Распределение нейронов, содержащих моноамины, можно выявить, обработав срезы ткани формальдегидом, который реагирует с моноаминами с образованием флуоресцирующих продуктов.

19.5.2. Самую большую группу нейромедиаторов образуют нейропептиды [32, 33]

Большая часть сигнальных молекул, используемых в различных часта организма, используется также и нейронами. В особенности это относится к небольшим белковым молекулам или пептидам, которые служат гормонами и локальными медиаторами для регуляции таких функций, как поддержание кровяного давления, секреция пищеварительных ферментов и пролиферация клеток.

За последние десять лет в изучении нейропептидов достигнута значительные успехи. Большую роль в этом сыграла иммуноцитохимия. Можно получить антитела к пептиду, обнаруженному в какой-либо ткани, а затем использовать эти антитела для поиска того же или иных структурно близких пептидов в других тканях организма. С помощью этого метода в нейронах были найдены пептиды, которые прежде не относили к пептидам нервной системы, а также многие новые разновидности пептидов. В большинстве случаев данные в пользу того, что эти нейропептиды (рис. 19-38) служат нейромедиаторами, убедительны, но все же недостаточны. Например, можно показать, что антитела к данному пептиду связываются определенными нейронами и окончаниями их аксонов, а сам пептид при локальном введении способен имитировать эффекты, вызываемые активностью этих нейронов. Иногда удается показать, и это более убедительно, что нейроны в активном состоянии секретируют определенный пептид, а эффект, вызываемый активностью этих нейронов, блокируется антителами к обнаруженному пептиду. По-видимому, нейропептиды играют особенно важную роль в регуляции таких ощущений и потребностей, как боль, наслаждение, голод, жажда и половое влечение.

Медиаторы непептидной природы синтезируются при участии ферментов, которые обычно находятся как в теле нейрона, так и в окончаниях аксона, поэтому запасы медиатора в синапсе могут восстанавливаться очень быстро даже в длинном аксоне. В отличие от этого нейропептиды образуются на рибосомах гранулярного эндоплазматического ретикулума в теле клетки и переносятся к окончаниям аксона с помощью быстрого аксонного транспорта, так что этот путь в длинном аксоне может занять сутки и больше. Нейропептиды образуются из более крупных белков-предшественников в результате их ферментатив-

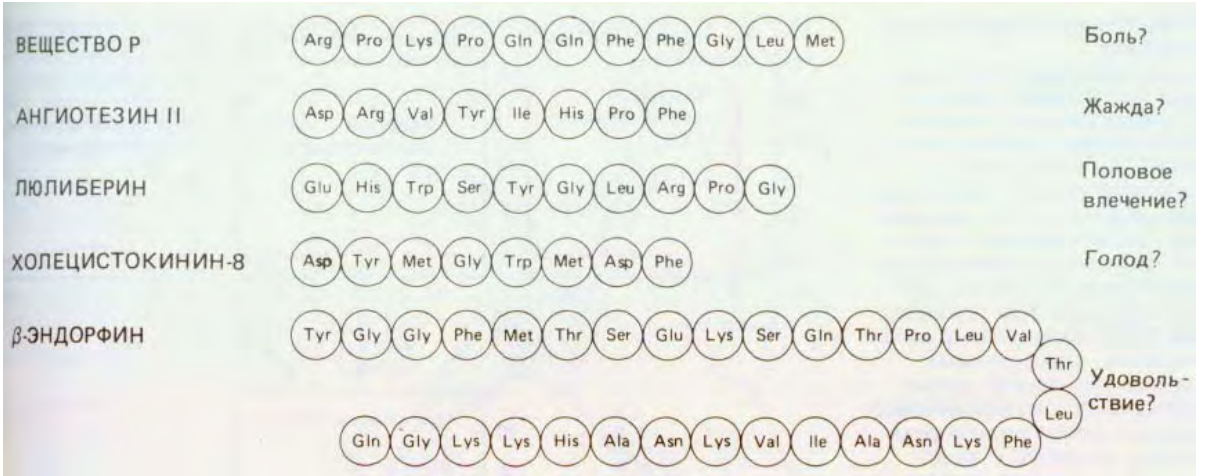


Рис. 19-38. Некоторые нейропептиды,. с указанием ощущений и мотиваций, в возникновении которых они, возможно, участвуют.

ного расщепления. Часто при расщеплении одной молекулы предшественника образуется несколько функционально активных пептидов; в этом случае белок-предшественник называют *полипротеином.* Синаптические пузырьки, заполненные нейропептидами, можно обычно распознать по их размерам: они крупнее пузырьков, содержащих ацетилхолин, аминокислотные медиаторы или моноамины.

Во многих синапсах нейропептиды секретируются одновременно с непептидным медиатором и действуют совместно, но различным образом. Например, окончания пресинаптического аксона в некоторых вегетативных ганглиях лягушки-быка содержат наряду с ацетилхолином пептид, близкий по строению к люлиберину (фактору, стимулирующему выделение лютеинизирующего гормона). Мембрана постсинаптической клетки содержит рецепторы по меньшей мере трех типов: 1) никотиновые (связанные с каналами) рецепторы для ацетилхолина, опосредующие быстрые сигналы; 2) мускариновые (связанные с G-белком) рецепторы для ацетилхолина, опосредующие более медленные эффекты; 3) рецепторы (вероятно, тоже связанные с G-белком) для пептида, сходного с люлиберином, опосредующие самые медленные эффекты (рис. 19-39, *А).* Действие люлиберинподобного гормона не только более замедленное по сравнению с ацетилхолином, но и более диффузное, поэтому пептидные молекулы, высвобождаемые в синапсе на какой-либо постсинаптической клетке, вызывают постсинаптические потенциалы и в других близлежащих клетках (рис. 19-39, Б).

Если (что кажется вероятным) и другие нейропептидные медиаторы обладают сходными свойствами, то нетрудно понять, почему необходимо такое большое число разнообразных нейропептидов. Поскольку пептиды легко диффундируют, места их воздействия не ограничены местами их выделения. Поэтому для того, чтобы пептиды, высвобождаемые из *разных,* но расположенных по соседству пресинаптических окончаний, воздействовали на разные постсинаптические мишени, пептиды и их рецепторы должны быть химически различными.

19.5.3. Стойкие изменения в поведении связаны с изменениями в специфических синапсах [34]

Эффекты, которые опосредуются рецепторами, не связанными с каналами, отличаются как длительностью, так и замедленным проявлением. Этим во многом определяется особая роль таких эффектов в регуляции поведения: они вызывают стойкое изменение в немедленном ответе нервной системы на приходящие извне сигналы и, вероятно, составляют основу по меньшей мере некоторых форм памяти. Это наиболее нагляд-

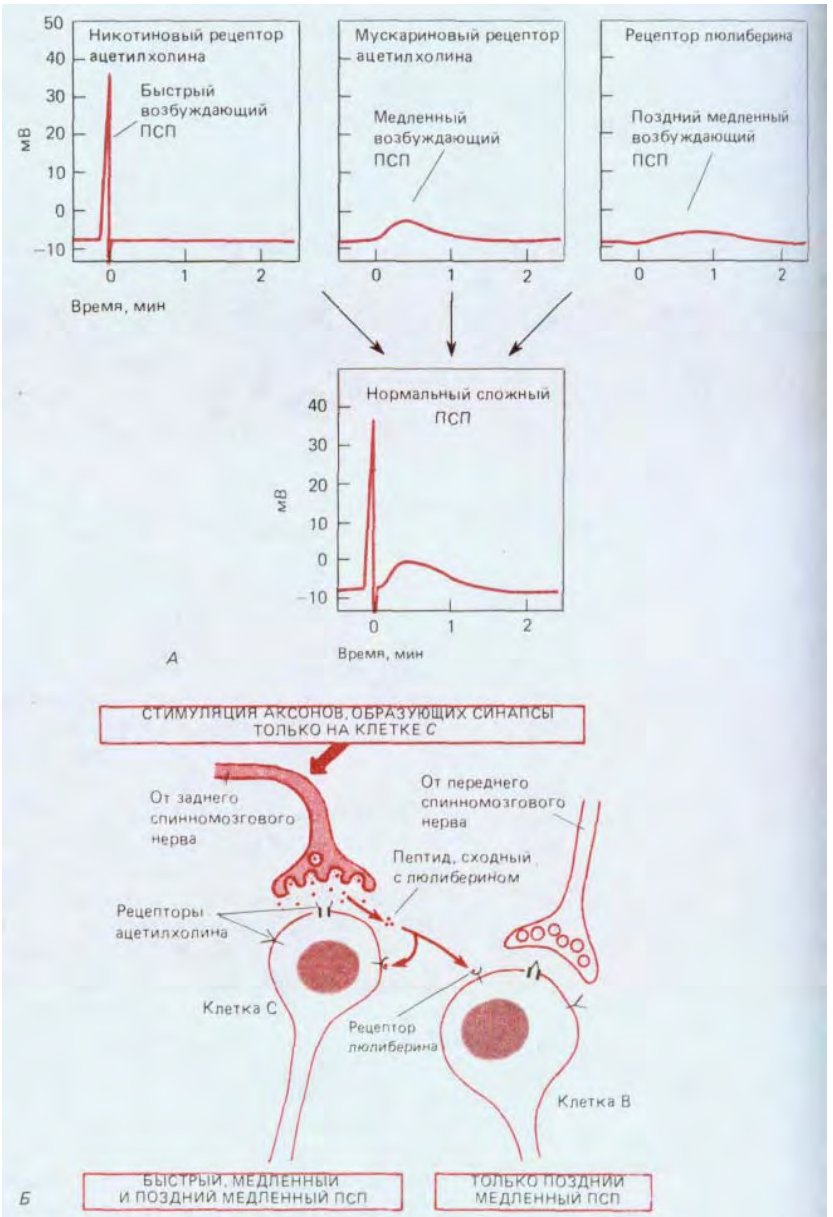


Рис. 19-39. Ответы на пептидный нейромедиатор.

А. Три составляющие постсинаптического потенциала, возникающего в клетке ганглия лягушки после стимуляции пресинаптического нерва. Из окончания пресинаптического аксона выделяются два нейромедиатора - ацетилхолин и пептид, очень сходный с люлиберином (гормоном, стимулирующим высвобождение лютеинизирующего гормона). Как правило, сложный ПСП представляет собой сумму ответов, опосредуемых рецепторами трех видов - двумя разновидностями ацетилхолиновых рецепторов и одним рецептором для пептида, сходного с люлиберином. Вклад каждой из трех составляющих можно оценить, блокируя с помощью специфических токсинов рецепторы, ответственные за две другие составляющие. Только быстрый возбуждающий ПСП, опосредуемый ацетилхолиновыми рецепторами, связанными с каналами, достаточно велик для того, чтобы вызвать потенциал действия. Две медленные составляющие, опосредуемые, вероятно, рецепторами, не связанными с каналами, изменяют возбудимость клетки, делая ее более восприимчивой к стимуляции, следующей сразу за первоначальным стимулом. *Б.* Схема эксперимента, проведенного на том же ганглии и демонстрирующего диффузный характер воздействия нейропептида, сходного с люлиберином. Этот пептид выделяется одновременно с ацетилхолином в синапсах, образуемых на одной группе клеток (С-клетках), но диффундирует на расстояние в десятки микрометров и вызывает более поздний медленный ПСП в других клетках *(В). (А - по* Y.N. Jan et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48,** 363-374, 1983.)

но продемонстрировано в опытах на морском брюхоногом моллюске аплизии *(Aplysia)* (см. рис. 19-49). У этого животного можно проследить связь приобретенных изменений в поведении с определенными нервными цепями и расшифровать молекулярные механизмы, лежащие в основе этих изменений.

Аплизия втягивает жабру в ответ на прикосновение к сифону (рис. 19-40). После многократных прикосновений у животного возникает **привыкание** и реакция исчезает. По своей биологической функции привыкание сходно с адаптацией, но оно развивается более медленно и, как мы увидим, связано с другим участком нервного пути. Какой-либо резкий раздражитель, например сильный толчок или удар электрическим током, снимает эффект привыкания и, наоборот, повышает чувствительность животного, так что оно теперь особенно энергично реагирует на

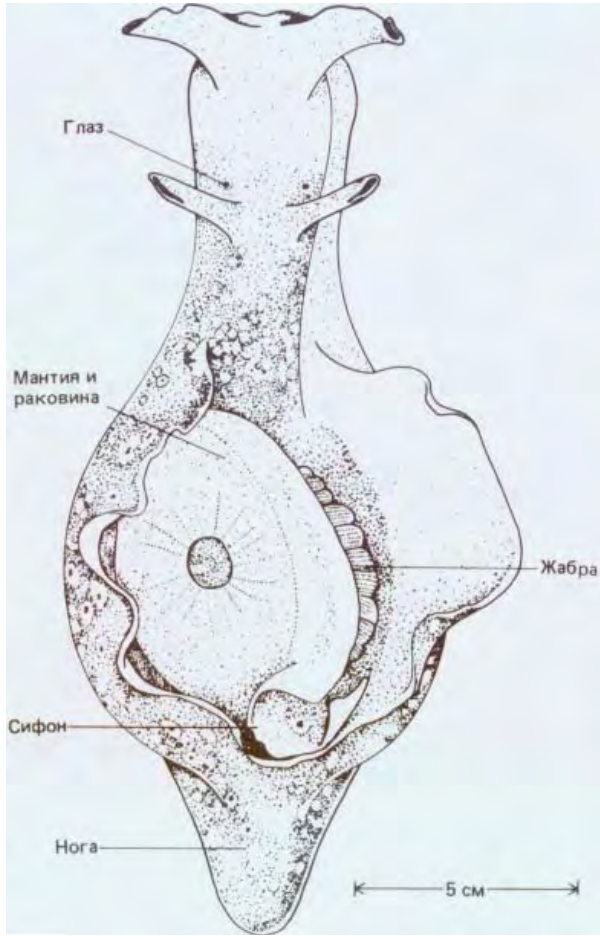


Рис. 19-40. Морская улитка *Aplysia punctata* (вид сверху). Лежащий сверху лоскут ткани отогнут, что позволяет видеть жабру, защищенную мантией и раковиной. (По J. Giart, Mem. Soc. Zool. France, **14,** 219, 1901.)

прикосновение к сифону. Этот эффект **сенситизации** сохраняется в течение многих минут или даже часов в зависимости от силы вызвавшего его стимула и представляет собой простую форму *кратковременной памяти.* Если воздействие болевого стимула повторяется в течение нескольких дней, сенситизация (т. е. проявление памяти) становится долговременной и сохраняется несколько недель. Описанные модификации поведения удалось связать с изменениями, происходящими в определенной группе синапсов нейронной сети, ответственной за рефлекс втягивания жабры. У аплизии имеются очень крупные (100 мкм) нейроны, которых сравнительно немного (~ 10^5), и их можно распознавать индивидуально по их внешнему виду и положению. Прикосновение к сифону приводит к возбуждению группы *сенсорных нейронов.* Эти нейроны образуют возбуждающие синапсы на *двигательных нейронах, ответственных за втягивание жабры.* В основе поведенческих феноменов лежат изменения в этих синапсах. Во время привыкания величина постсинаптического потенциала в упомянутых двигательных нейронах уменьшается при повторной стимуляции их сенсорными клетками. При сенситизации наблюдается обратный эффект - постсинаптический потенциал возрастает. И в том и в другом случае изменение величины потенциала - это результат изменения количества медиатора, высвобождаемого из пресинаптических окончаний возбужденных сенсорных нейронов. Таким образом, проблема сводится к вопросу о том, как регулируется высвобождение медиатора в этих синапсах.

19.5.4. За сенситизацию у аплизии ответственны рецепторы, связанные с G-белком [35]

Как уже отмечалось в разд. 19.3.2, количество высвобождаемого в синапсах нейромедиатора регулируется количеством ионов Ca^{2+}, входя-

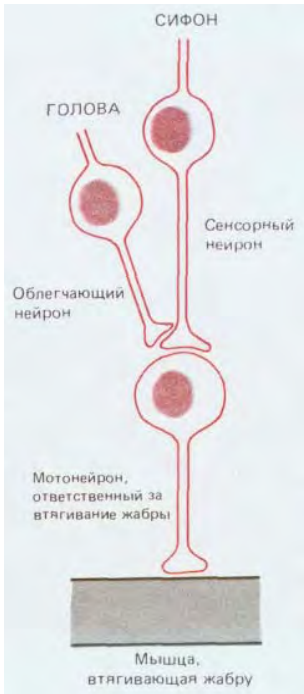


Рис. 19-41. Упрощенная схема нейронных путей, участвующих в привыкании и сенситизации по отношению к рефлексу втягивания жабры у аплизии. Показано только по одному нейрону из каждой группы.

щих в нервное окончание во время потенциала действия. В случае привыкания повторяющееся возбуждение сенсорных клеток модифицирует белки каналов в окончаниях их аксонов таким образом, что приток Ca^{2+} в клетку уменьшается и количество высвобождаемого медиатора снижается. Напротив, при сенситизации эти белки изменяются так, что поступление Ca^{2+} в клетку возрастает и выделение нейромедиатора повышается. Лучше всего изучены молекулярные механизмы изменений, происходящих при сенситизации.

При сенситизации, вызванной, например, ударами по голове, количество нейромедиатора, выделяемого сенсорными нейронами, изменяется в результате возбуждения еще одной группы нейронов, реагирующих на болевой стимул. Эти *облегчающие нейроны* образуют на пресинаптиче-

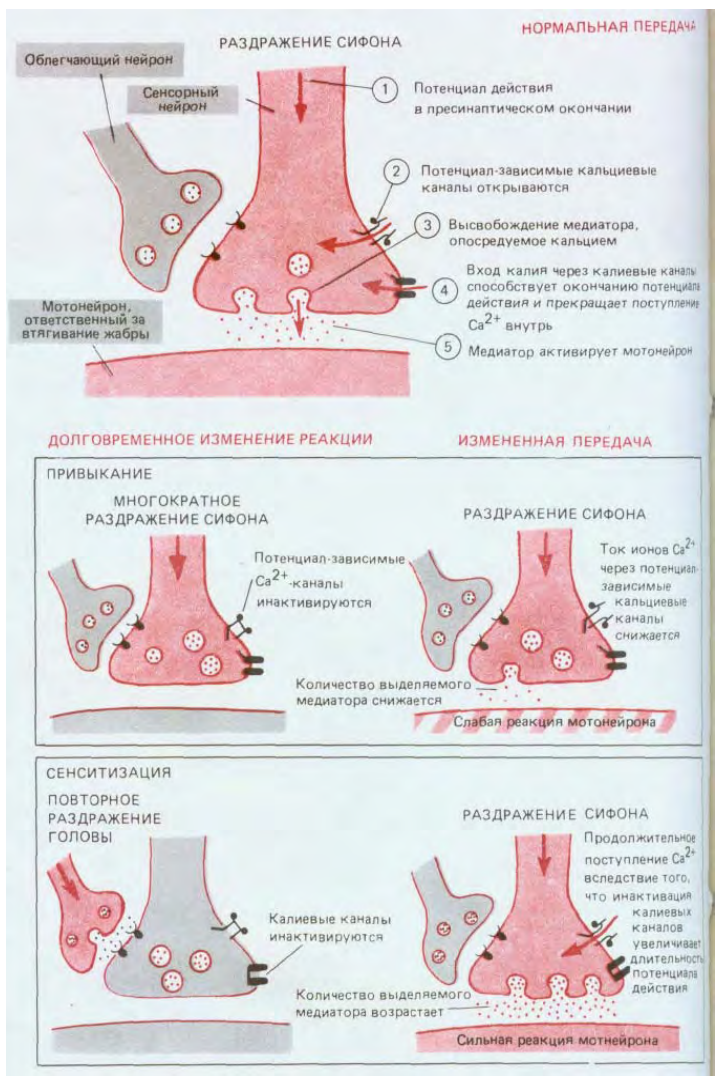


Рис. 19-42. Механизмы, лежащие в основе адаптации и сенситизации рефлекса втягивания жабры у аплизии. Электрически активные нейроны выделены цветом. На верхней схеме представлен нормальный механизм передачи от сенсорного нейрона к мотонейрону, участвующему во втягивании жабры. На обеих нижних схемах справа объяснен механизм возникновения в окончании сенсорного нейрона стойких изменений, лежащих в основе памяти, а слева показано, каким образом эти изменения влияют на синаптическую передачу от сенсорного нейрона к мотонейрону, ответственному за втягивание жабры. Представленное объяснение более достоверно для сенситизации, чем для адаптации.

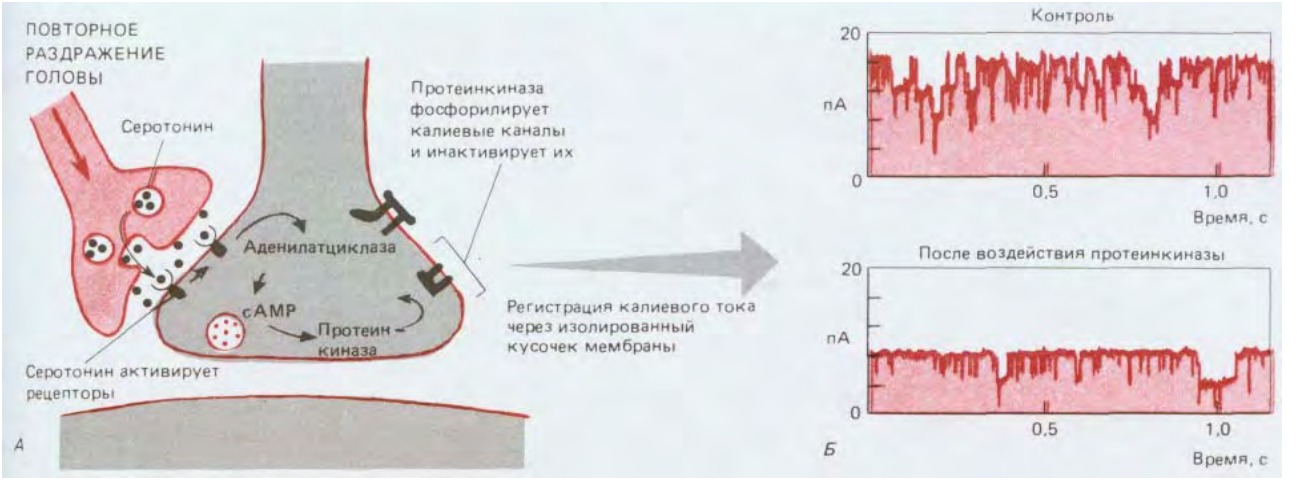


Рис. 19-43. *А.* Цепь событий, происходящих при сенситизации рефлекса втягивания жабры и приводящих к инактивации особого класса калиевых каналов (так называемых S-каналов) в окончании сенсорного нерва (см. рис. 19-42). *Б.* Записанные с помощью метода пэтч-клапма токи, проходящие через эти каналы во время их перехода из открытого состояния в закрытое и обратно. Участок мембраны, отделенный от клетки, содержит четыре канала, которые в контрольных условиях большую часть времени открыты. Когда в среду со стороны цитоплазмы добавляют каталитическую субъединицу cAMP-зависимой протеинкиназы (А-киназы), два из четырех каналов фосфорилируются и вследствие этого закрываются, тогда как оставшиеся два канала продолжают находиться большей частью в открытом состоянии; в результате ток, проходящий через данный участок мембраны, уменьшается по сравнению с контролем в два раза. (Данные метода пэтч-клампа перепечатаны с разрешения M.J. Schuster, J.S. Camardo, S. A. Siegelbaum, E.R. Kandel, Nature, **313,** 392-395, 1985. Copyright 1985 Macmillan Journals' Limited.)

ских окончаниях сенсорных нейронов синапсы (рис. 19-41), выделяющие серотонин (а также некоторые нейропептиды). Эффект облегчающих нейронов можно имитировать, воздействуя серотонином непосредственно на мембрану сенсорных нейронов, у которых окончания пресинаптического аксона содержат серотониновые рецепторы. Действие этих рецепторов опосредуется G-белком: серотонин, связываясь с рецепторами, активирует аденилатциклазу, в результате чего повышается внутриклеточная концентрация циклического AMP, который в свою очередь активирует А-киназу (разд. 12.4.1). Именно эта протеинкиназа изменяет электрические свойства мембраны сенсорного нейрона, фосфорилируя особую группу калиевых каналов (рис. 19-42).

Поведение таких калиевых каналов, называемых *S-каналами,* можно детально проследить с помощью метода пэтч-клампа (см. разд. 6.4.17). При связывании серотонина мембранными рецепторами эти каналы закрываются (рис. 19-43). Калиевые каналы закрываются таким же образом и в том случае, если содержащий их участок мембраны перенести в кювету с искусственной средой, где каналы подвергаются прямому фосфорилированию каталитической субъединицей А-киназы. Это заставляет предполагать, что фосфорилирование S-каналов (или тесно связанных с ними белков) способно надолго задержать каналы в закрытом состоянии. Так как в норме именно ток калиевых ионов помогает восстановить потенциал покоя, блокада S-каналов продлевает потенциалы действия, приходящие в окончание аксона. «Продленные» потенциалы действия удерживают потенциал-зависимые кальциевые каналы в открытом состоянии более длительное время, вследствие чего приток ионов кальция возрастает, а это в свою очередь ведет к опорожнению большего числа синаптических пузырьков; в результате в мотонейроне создается более значительный постсинаптический потенциал и происходит более энергичное втягивание жабры.

Эти эксперименты показывают, каким образом рецепторы, связанные с G-белком, могут передавать кратковременные сигналы, приводящие к стойким изменениям электрических свойств синапса и, следовательно, поведения животного. Фосфорилирование S-каналов представляет собой одну из форм памяти, но это лишь кратковременная память, которая легко стирается при воздействии фосфопротеинфосфатаз (дефосфорилирующих S-каналы) и ограничена временем жизни белков, образующих S-каналы. Механизм *долговременной памяти,* возникающей при повторном воздействии болевого стимула, не известен, но он отличается от кратковременной памяти: он требует синтеза новой РНК

и новых белков, а также, вероятно, изменений как в строении, и в химии пресинаптических окончаний (разд. 19.8.12).

Полагают, что циклический AMP и А-киназа тоже опосредуют подобные изменения, вероятно путем фосфорилирования других клеточных белков, которое может изменять экспрессию генов. Этот : пока не изучен в деталях, но один из промежуточных этапов в создании следов долговременной памяти, видимо, состоит в длительной активации А-киназы в результате снижения концентрации регуляторных субъединиц, ингибирующих этот фермент (см. разд. 12.4.1). Как полагают,

при высоких уровнях циклического AMP эти регуляторные субъединицы разрушаются, так как при связывании циклического AMP они отделяются от каталитических субъединиц и подвергаются протеолизу.

19.5.5. Ca^{2+} и циклический AMP-важные внутриклеточные посредники, участвующие в ассоциативном научении у позвоночных [36]

Рассмотренные выше явления привыкания и сенситизации - это лишь очень простые формы научения. Главная особенность более сложных типов научения, наиболее широко изучаемых психологами, - это их *ассоциативный* характер. Например, в знаменитых экспериментах Павлова собака научалась связывать звук колокольчика с получением пищи. Аплизия тоже способна к ассоциативному научению. Например, если сенситизирующий раздражитель (сильный электрический удар) постоянно воздействует одновременно с определенной мягкой стимул которая в норме вызывает лишь слабый рефлекс втягивания жабры, то животное начинает вести себя так, как если бы оно запомнило, что специфическая мягкая стимуляция связана с электрическим ударом, и оно сильно и специфически сенситизируется к слабому раздражителю. Полагают, что в этом случае участвуют те же группы нейронов, что и при простой сенситизации, описанной ранее. Одновременная стимуляция различных частей тела ведет к одновременному возбуждению сенсорных и облегчающих нейронов. Таким образом, когда потенциал действия приходит в окончания сенсорного аксона, открывая в них потенциал-зависимые кальциевые каналы, из облегчающих нейронов выделяется серотонин (или какой-либо нейропептид), вызывающий повышение концентрации циклического AMP внутри аксона. Циклический AMP и сам по себе вызывает простую сенситизацию; как полагают, приток Ca^{2+} усиливает этот эффект, приводя к гораздо более сильный сенситизации по сравнению с той, которая возникла бы в результате возбуждения облегчающих нейронов на фоне бездействия сенсорных нейронов.

Неясно, как далеко можно экстраполировать данные, полученные на аплизии. Вопрос, регистрируются ли следы памяти у других животных в виде пре- или постсинаптических изменений химической природы или структуры синапсов и вообще в синапсах, остается открытым. Однако эксперименты на мутантах плодовой мушки *Drosophila* позволяют предполагать, что молекулярные механизмы, подобные описанным у аплизии, лежат в основе многих других форм научения. Например, в норме дрозофилы могут научаться избегать специфического запаха, если этот запах неоднократно сочетался с получением электрического удара. Тех мушек, которые быстро забывают ассоциативную связь или вообще не способны ее усвоить, можно легко изолировать благодаря тому, что они не избегают участков с острым специфическим запахом. Таким способом удавалось отделить «бестолковых» и «забывчивых» мутантов. Две разновидности подобных мутантов, *dunce (dnc)* и *rutabaga (rut),* способны обучаться, но обладают поразительно короткой памятью - порядка не-

скольких десятков секунд в случае *dunce.* Оказывается, у *dunce* мутация затрагивает фосфодиэстеразу, расщепляющую циклический AMP, а у *rutabaga-*Ca^{2+}-зависимую аденилатциклазу, синтезирующую это вещество. Видимо, и слишком большие, и слишком малые концентрации циклического AMP препятствуют закреплению следов памяти. Другие мутанты, называемые *Ddc,* похоже, не способны научаться вообще: у них отсутствует ген, кодирующий ДОФА-декарбоксилазу, которая катализирует важный этап в синтезе серотонина и дофамина. У всех мутантов с нарушениями ассоциативного научения нарушен и процесс сенситизации. Очевидно, эти два процесса имеют общие механизмы, которые реализуются, так же как сенситизация у аплизии, через моноаминовый нейромедиатор (на начальном этапе) и фосфорилирование белков (регулируемое циклическим AMP и ионами Ca^{2+}) для получения стойкого эффекта.

19.5.6. У млекопитающих при обучении происходят изменения в гиппокампе, вызванные притоком Ca^{2+} через двояко регулируемые каналы [37]

Практически все животные способны к научению, но особенно хорошо, вероятно, обучаются млекопитающие (или нам просто приятно так думать?). В основе этих процессов могут лежать какие-то уникальные молекулярные механизмы. Полагают, что у млекопитающих особую роль играет *гиппокамп*- особый участок коры головного мозга: если он разрушен в обоих полушариях, то способность запоминать новые события резко падает, хотя прежние следы долговременной памяти сохраняются. В некоторых синапсах гиппокампа при многократно повторяющемся возбуждении возникают выраженные функциональные изменения. В то время как случайные единичные потенциалы действия не оставляют в постсинаптической клетке заметного следа, короткий залп следующих друг за другом разрядов приводит к **долговременной потенциации,** и последующие единичные импульсы, приходящие в пресинаптическое окончание, вызывают в постсинаптической клетке ответ значительно большей силы. В зависимости от числа и интенсивности залпов эффект сохраняется в течение нескольких часов, дней или недель. Потенциация возникает только в активированных синапсах: синапсы на той же самой клетке, оставшиеся в покое, не изменяются. Но если одновременно с тем, как одна группа синапсов получает залп последовательных импульсов, через *другой* синапс на той же клетке передается одиночный потенциал действия, то в этом последнем синапсе тоже возникает долговременная потенциация, хотя одиночный импульс, пришедший сюда в другое время, не оставит стойкого следа. Несомненно, этот механизм лежит в основе ассоциативного научения.

Правило, которому подчиняются происходящие в гиппокампе процессы, состоит в следующем: *долговременная потенциация происходит в тех синапсах, в которых пресинаптическая клетка возбуждается в тот момент, когда постсинаптическая мембрана сильно деполяризована* (в результате многократного возбуждения той же самой пресинаптической клетки или по другим причинам). Есть веские данные в пользу того, что это правило отражает поведение специфических ионных каналов в постсинаптической мембране. Деполяризующий ток, ответственный за возбудительный ПСП, возникает в основном обычным путем благодаря лиганд-зависимым ионным каналам, связывающим глутамат. Однако деполяризующий ток имеет также вторую, более загадочную составляющую, которая создается при участии особого подкласса каналов, связанных с глутаматными рецепторами: их называют *NMDA-рецепторами,* так как они селективно активируются синтетическим анало-

гом глутамата N-метил-D-аспартатом. Каналы, связанные с NMDA-рецепторами, имеют «двойные» ворота, открывающиеся только тогда, когда одновременно выполняются два условия: мембрана должна быть сильно деполяризована (это особенные потенциал-зависимые каналы, регулируемые внеклеточным Mg^{2+}), а к рецептору должен присоединиться медиатор глутамат. NMDA-рецепторы играют ключевую роль в долговременной потенциации. Если такие каналы селективно блокировать с помощью специфического ингибитора, то долговременной потенциации не происходит, хотя обычная синаптическая передача не нарушается. Под воздействием подобного ингибитора животное теряет способность к тому виду научения, который, как полагают, зависит от гиппокампа, но в остальном ведет себя почти нормально.

Каким образом NMDA-рецепторы обеспечивают столь поразительный эффект? Ответ, по-видимому, заключается в том, что эти каналы в открытом состоянии свободно пропускают Ca^{2+}, который около места своего поступления в постсинаптическую клетку действует как внутриклеточный посредник и вызывает локальные изменения, приводящие к долговременной потенциации. Потенциацию можно предотвратить, значительно снизив уровень Ca^{2+} путем введения в постсинаптическую клетку хелатирующего кальций вещества ЭГТА, и можно, наоборот, вызвать, искусственно повысив концентрацию ионов кальция. Природа долговременных изменений, вызываемых этими ионами, точно не известна, но полагают, что изменяется структура синапса.

Несмотря на различия в механизмах памяти у беспозвоночных и у млекопитающих (см. рассмотренные выше примеры), здесь можно усмотреть нечто общее. Нейромедиаторы, высвобождаемые в синапсах, могут не только передавать кратковременные сигналы, но и изменять концентрацию внутриклеточных молекул-посредников, активирующих каскады ферментативных реакций, что ведет к долговременному изменению эффективности синаптической передачи. Остается, однако, ряд важных неразрешенных вопросов. До сих пор не известно, каким образом подобные изменения сохраняются на протяжении недель, месяцев или всей жизни в условиях нормального обновления компонентов клетки. Как мы увидим позже, сходные вопросы возникают и при изучении развития нервной системы.

Заключение

В отличие от рецепторов, связанных с каналами, не связанные с ионными каналами рецепторы нейромедиаторов, присоединяя лиганд, запускают в постсинаптической клетке каскад ферментативных реакций. В большинстве изученных случаев первая реакция этого каскада ведет к активации G-белка, который либо прямо взаимодействует с ионными каналами, либо регулирует образование таких внутриклеточных посредников, как циклический AMP и Ca^{2+}. Эти посредники в свою очередь или непосредственно влияют на ионные каналы, или активируют киназы, фосфорилирующие различные белки, в том числе и белки ионных каналов. Во многих синапсах имеются как связанные, так и не связанные с каналами рецепторы, присоединяющие одни и те же или различные медиаторы. Если рецептор не связан с каналом, то опосредуемый им эффект, как правило, бывает замедленным и продолжительным и может влиять на эффективность последующей синаптической передачи, что составляет основу по меньшей мере некоторых форм памяти. Рецепторы, связанные с каналами и пропускающие в клетку Ca^{2+} (такие, как NMDA-рецептор), могут тоже быть ответственны за проявление долговременной памяти.

19.6. Прием сенсорной информации [38]

Выше было показано, как нервные клетки проводят, перерабатывают и регистрируют электрические сигналы, а затем посылают их мышцам, чтобы вызвать их Сокращение. Но откуда берутся эти сигналы? Имеются два типа источников: спонтанное возбуждение и сенсорные стимулы. Существуют спонтанно активные нейроны, например нейроны мозга, задающие ритм дыхания; весьма сложная картина самопроизвольной активности может генерироваться в одиночной клетке с помощью надлежащих комбинаций ионных каналов тех типов, с которыми мы уже встречались при обсуждении механизмов переработки информации нейронами. Прием сенсорной информации тоже основан на уже известных нам принципах, но в нем участвуют клетки весьма разнообразных и удивительных типов.

Органы чувств должны удовлетворять очень строгим требованиям - с высокой точностью различать стимулы разных типов, воспринимать изменения силы стимула в феноменально широких границах и обладать такой высокой чувствительностью, какую только допускают законы физики. Обонятельная клетка самца непарного шелкопряда способна обнаружить в воздухе одну-единственную молекулу специфического полового аттрактанта (так называемого *феромона),* выделяемого самкой на расстоянии мили от места нахождения самца. Глаз человека видит и при ярком солнечном свете, и в звездную ночь, когда освещение в 10^{12} раз слабее, и пять фотонов, поглощенных сетчаткой, воспринимаются как вспышка света.

Мы сконцентрируем внимание на двух органах чувств, в которых клеточные механизмы получения сенсорной информации начинают становиться понятными: на органах слуха и зрения позвоночных. Каждый из этих двух входов в нервную систему содержит высокоспециализированные **сенсорные клетки,** очень различные, но в обоих случаях обладающие необычайной избирательностью и чувствительностью в широком диапазоне стимулов. Но прежде чем переходить к деталям, полезно будет рассмотреть некоторые общие принципы.

19.6.1. Силу стимула отражает величина рецепторного потенциала [38, 39]

Любой сигнал, получаемый нервной системой, должен прежде всего превратиться в электрический. Превращение сигнала одного вида в другой называется преобразованием, поэтому все сенсорные **клетки-преобразователя.** В более общем смысле почти каждый нейрон является преобразователем: получая в синапсах химические сигналы, он преобразует их в электрические. Хотя одни сенсорные клетки реагируют на свет, другие на температуру, третьи на определенные химические вещества, четвертые на механическую силу или перемещение и т.д., во всех этих клетках преобразование основано на ряде основных принципов, которые уже рассматривались при обсуждении синаптической передачи с помощью нейромедиаторов. В некоторых органах чувств преобразователь составляет часть *сенсорного нейрона,* проводящего импульсы, а в других это часть *сенсорной клетки,* специально приспособленной для преобразования сигнала, но не участвующей в осуществлении дальней связи: такая клетка передает свои сигналы связанному с нею нейрону через синапс (рис. 19-44). Но в обоих случаях воздействие внешнего стимула вызывает в клетке-преобразователе электрический сдвиг, называемый **рецепторным потенциалом,** который аналогичен постсинаптическому потенциалу и тоже в конечном счете служит для регуляции высвобождения нейромедиатора из другой части клетки.

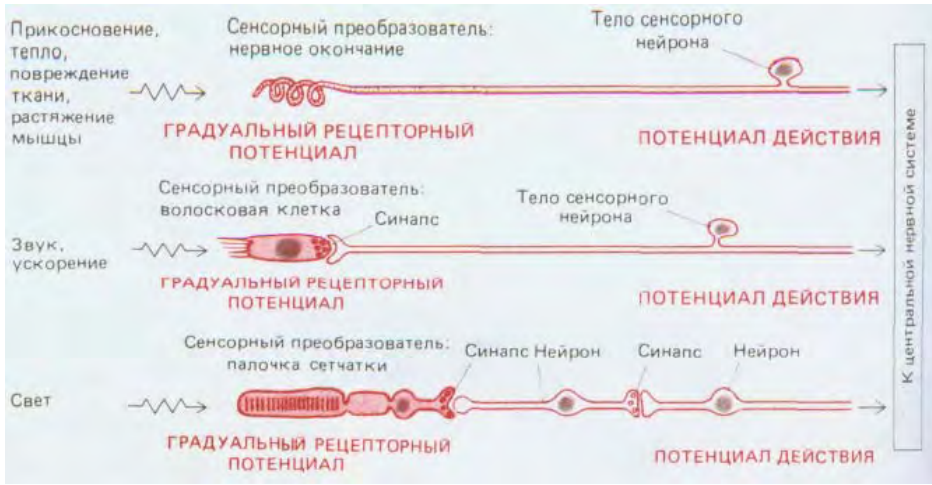


Рис. 19-44. Различные способы передачи сенсорной стимуляции нервной системе. В некоторых случаях сенсорный преобразователь составляет часть нервной системы (верхняя схема); в других случаях это отдельные сенсорные клетки (две нижние схемы). Во всех трех случаях возникающий в Сенсорном преобразователе градуальный рецепторный потенциал преобразуется в частоту импульсов, которые быстро передают сигнал в ЦНС.

Так же как в синапсе, внешние раздражители способны влиять на электрическое состояние клетки как непосредственно, воздействуя на ионные каналы, так и косвенно - через молекулы-рецепторы, запускающие синтез внутриклеточного посредника, который уже воздействует на ионные каналы. Как полагают (хотя здесь еще не все ясно), слуховые сенсорные клетки используют прямой механизм действия с участием рецепторов, связанных с каналами, а сенсорные клетки глаза - непрямой путь через рецепторы, связанные с G-белком.

19.6.2. Волосковые клетки внутреннего уха реагируют на отклонение стереоцилий [40]

Ухо предназначено не только для слуха: внутреннее ухо воспринимает также информацию о направлении силы тяжести и об ускоренном движении, поэтому оно необходимо для сохранения равновесия и координации движений. В основе всех сенсорных функций уха лежит *механорецепция,* а именно улавливание небольших смещений среды, окружающей сенсорные клетки. В случае звуковых волн эти смещения представляют собой быстрые вибрации, а восприятие ускоренного движения или силы тяжести связано с более медленными и плавными перемещениями. Все клетки внутреннего уха, ответственные за различные виды механорецепции, имеют характерное строение: на верхней поверхности такой клетки находится пучок гигантских микроворсинок, получивших название *стереоцилий* (рис. 19-45; см. также разд. 11.6.10). Поэтому такие клетки называют **волосковыми.**

У высших позвоночных все волосковые клетки находятся в эпителии *перепончатого лабиринта* внутреннего уха, где они образуют отдельные группы, или «пятна». Волосковые клетки каждой группы закреплены на месте с помощью промежуточных *поддерживающих клеток,* а сверху над ними нависает слой студенистого внеклеточного матрикса, соединенный с кончиками стереоцилий (рис. 19-46). При смещении слоя матрикса стереоцилий наклоняются, и в результате механической деформации волосковых клеток в них создается рецепторный потенциал (рис. 19-47), Специфические функции различных групп волосковых клеток определяются главным образом природой структур, которые окружают эти клетки и через которые передается силовое воздействие. В случае волосковых клеток, реагирующих на линейное ускорение и силу тяжести, нависающий матрикс оттягивается вниз благодаря плотным кристаллам карбоната кальция: при ускоренном движении головы или ее наклоне матрикс смещается относительно волосковых клеток и стереоцилий

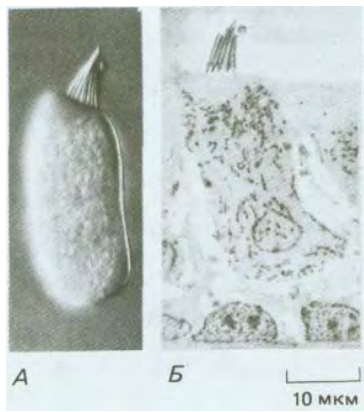


Рис. 19-45. *А.* Микрофотография сенсорной волосковой клетки, выделенной из внутреннего уха лягушки-быка. Можно видеть пучок стереоцилий, расположенный на верхушке клетки. *Б.* Микрофотография (полученная при малом увеличении с помощью трансмиссионного электронного микроскопа) волосковой клетки в естественном окружении опорных клеток. (A.J. Hudspeth, Science, **230,** 745-752, 1985. Copyright 1985 by the AAAS.)

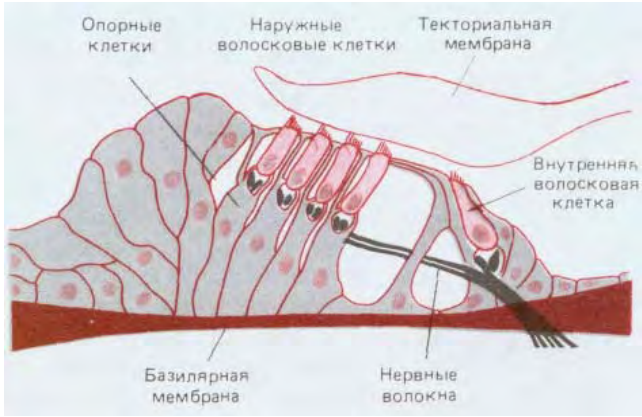


Рис. 19-46. Схематический поперечный разрез органа слуха (кортиева органа) во внутреннем ухе млекопитающих. Видно, что слуховые волосковые клетки находятся внутри сложных структур, образуемых опорными клетками; над слуховыми клетками нависает текториальная мембрана (слой внеклеточного матрикса). Полагают, что внутренние волосковые клетки ответственны в основном за слух - благодаря особому механизму преобразования, описанному в тексте. Эти клетки образуют синапсы с нейронами, передающими слуховые сигналы от уха к мозгу. В отличие от этого наружные волосковые клетки богато иннервированы дополнительной группой аксонов, передающих сигналы от мозга; функция этих клеток все еще загадочна. Имеются данные, позволяющие предполагать, что наружные волосковые клетки способны каким-то образом действовать как преобразователи в обратном направлении и составляют часть системы обратной связи, регулирующей передачу механических стимулов внутренним волосковым клеткам.

сгибаются. В отличие от этого волосковые клетки, чувствительные к вращательному ускорению, расположены так, что при повороте головы на нависающий матрикс воздействует боковая сила, вызванная током жидкости в полукружных каналах внутреннего уха.

Волосковые клетки, улавливающие звук в ухе млекопитающего, образуют наиболее сложно организованную систему (рис. 19-46). *Слуховые волосковые клетки* располагаются рядами на *базилярной мембране* - узкой и длинной упругой перегородке между двумя заполненными жидкостью спиральными каналами, идущими параллельно в особом отделе внутреннего уха, называемом *улиткой*. Звуковые волны вызывают вибрацию барабанной перепонки, и через крошечные косточки среднего уха эта вибрация передается жидкости в каналах улитки и далее базилярной мембране, колебания которой заставляют стереоцилии слуховых волосковых клеток наклоняться. Благодаря особому устройству улитки, разные участки которой резонируют в разной степени в зависимости от частоты звуковых волн, распределение активируемых волосковых клеток доставляет информацию о высоте звука.

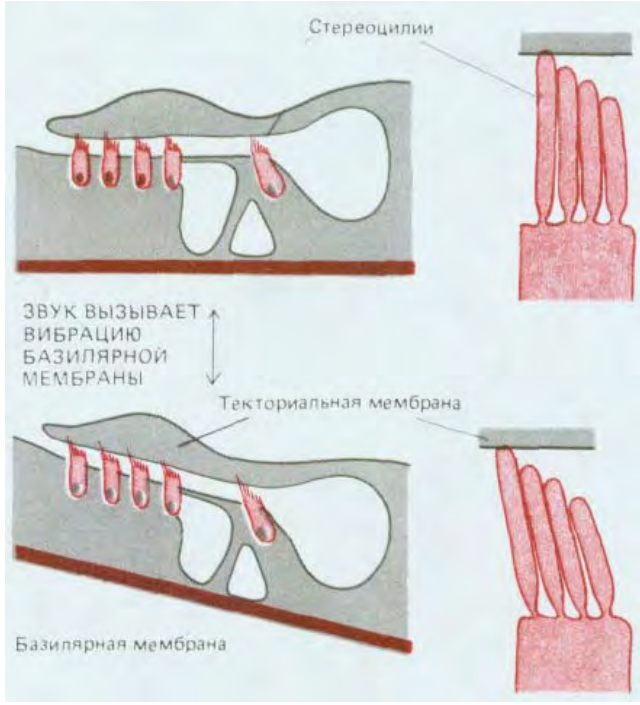


Рис. 19-47. Здесь показано, каким образом движение нависающего слоя внеклеточного матрикса (текториальной мембраны) отклоняет стереоцилии слуховых волосковых клеток во внутреннем ухе млекопитающих. Стереоцилии ведут себя как жесткие палочки с «шарнирным» прикреплением у основания. Верхушки пучков стереоцилии способны механически взаимодействовать с нависающим матриксом, либо непосредственно соприкасаясь с ним, либо через вязкую жидкость, находящуюся в промежутке между ними.

19.6.3. При наклоне пучков стереоцилий открываются механически регулируемые катионные каналы в их кончиках [40, 41]

При резком сдвиге слоя матрикса, нависающего над группой волосковых клеток, стереоцилий отклоняются в сторону на несколько градусов: при этом проницаемость клеточной мембраны изменяется и возникает направленный внутрь клетки ток, называемый *рецепторным током* (рис. 19-48). Величина ответа выходит на плато через 100-500 мкс, что соответствует времени, необходимому для открытия ацетилхолин-активируемого катионного канала в нервно-мышечном соединении, но гораздо меньше, чем нужно для возникновения электрических изменений при активации любого из известных рецепторов, не связанных с каналами. Поэтому кажется весьма вероятным, что механический стимул непосредственно открывает ионный канал. Как показали эксперименты с изменением внеклеточных концентраций ионов, *механически регулируемый ионный канал,* подобно рецептору ацетилхолина, практически одинаково проницаем для всех небольших катионов, и проходящий через него ток образуют главным образом ионы калия. (Ионная среда внутри уха несколько необычна, и на мембране волосковой клетки создается большой электрохимический градиент K^+.) Но в какой части волосковой клетки находятся такие каналы и как преобразование сигнала связано со сложным строением клетки?

На каждой клетке стереоцилий располагаются плотными рядами разной высоты (подобно трубам в органе) (см. рис. 19-45 и 19-49). Позади середины самого высокого ряда часто имеется одна настоящая ресничка, или *киноцилия,* которая всегда присутствует в период развития, хотя не принимает участия в преобразовании сигнала и иногда потом исчезает (как у слуховых волосковых клеток млекопитающих). Если с помощью микрозонда отклонять стереоцилий, то они будут вести себя как упругие палочки, связанные в пучок; при этом каждая палочка поворачивается вокруг точки прикрепления к поверхности волосковой клетки и скользит относительно соседних палочек, так что и кончики стереоцилий смещаются относительно друг друга. Как показывает электронная микроскопия, помимо бокового сцепления, связывающего стереоцилий в пучок, имеются еще тонкие нити, направленные более или менее вертикально от верхушки каждой более короткой стереоцилий к расположенной выше точке на ближайшей более длинной стереоцилий (рис. 19-49). Как показали опыты с микроэлектродом, максимальная деполяризация мембраны волосковой клетки наблюдается при таком наклоне стереоцилий, когда тонкие вертикальные нити сильнее всего натянуты. По-видимому, трансмембранный ток, возникающий в резуль-

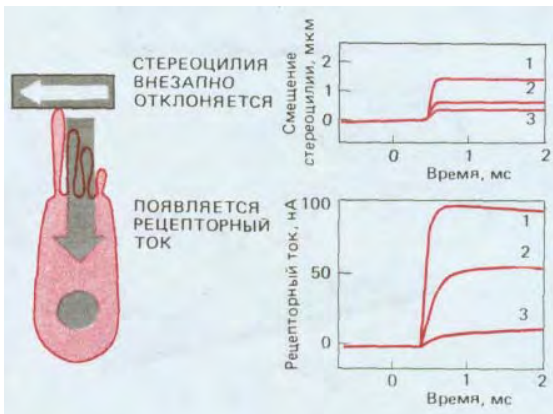


Рис. 19-48. Записи рецепторных токов (слева), входящих в волосковые клетки внутреннего уха лягушки-быка при внезапном отклонении пучков стереоцилий. Чем больше отклоняются стереоцилий, тем сильнее ток. (По данным D.P. Corey, A.J. Hudspeth, J. Neurosci., **3,** 962-976, 1983.)

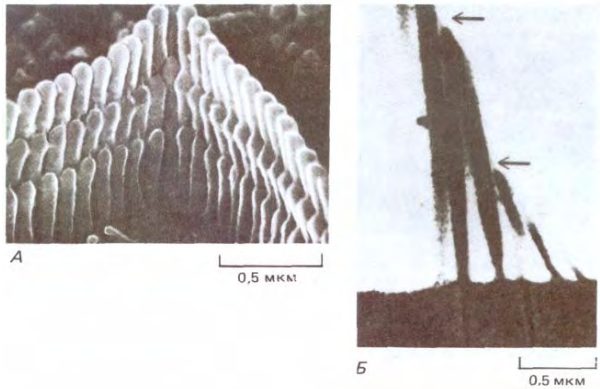


Рис. 19-49. *А.* Микрофотография слуховой волосковой клетки млекопитающего, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Видны тонкие филаменты, идущие от верхушек коротких стереоцилий к более длинным стереоцилиям следующего ряда. *Б.* Те же структуры, как они видны в трансмиссионном электронном микроскопе. Стрелками показаны филаменты. *(Б*- фотография M. P. Osborne; *А* и *Б* воспроизведены с разрешения J. D. Pickles, Prog. Neurobiol., **24,** 1-42, 1985. Copyright 1985, Pergamon Press plc.)

тате наклона стереоцилий и приводящий к появлению рецепторного потенциала, поступает в волосковую клетку вблизи верхушки стереоцилий. Таким образом, вся структура в целом предназначена для того, чтобы ионный канал на кончике стереоцилий открывался в результате механического натяжения, вызываемого наклоном пучка стереоцилий (рис. 19-50).

Механизм волосковых клеток удивительно чувствителен: самые слабые звуки из тех, какие мы только можем слышать, растягивают вертикальные нити, прикрепленные к верхушкам стереоцилий, в среднем на 0,04 нм, что вдвое меньше диаметра атома водорода. Анализ рецепторного тока показывает, что в стереоцилий, вероятно, находится от одного до пяти механически регулируемых каналов. Каждая слуховая волосковая клетка человека несет около сотни стереоцилий, а в одном ухе имеется около 3500 таких клеток, так что способность слышать нам обеспечивают менее 4 млн. молекул-преобразователей.

19.6.4. Фоторецепторы обладают высокой чувствительностью и способны к адаптации, но реагируют относительно медленно [42]

Чувствительность фоторецепторов в глазах позвоночных приближается к крайнему пределу, допускаемому квантовой природой света. Кроме того, диапазон восприятия чрезвычайно широк - от света максимальной переносимой яркости до едва заметного освещения. Но по сравнению со слуховыми преобразователями скорость реагирования фоторецепторов очень мала. При оптимальных условиях самому «быстрому» фоторецептору человеческого глаза требуется примерно 25 мс для достижения пика электрической реакции на вспышку света, что более чем в 100 раз больше времени реагирования типичной волосковой клетки. Вероятно, относительная медленность ответа фоторецептора связана с важными ограничениями, заложенными в природе механизма зрительного преобразования.



Рис. 19-50. Схема предполагаемого механизма, благодаря которому в результате наклона стереоцилий волосковой клетки открывается ионный канал. С помощью тонких механических измерений, подтверждаемых результатами регистрации электрического состояния одиночной волосковой клетки при отклонении пучка стереоцилий с помощью гибкого стеклянного зонда, можно действительно обнаружить ответ механически зависимых каналов на приложенную силу. С помощью этого метода можно показать, что сила, необходимая для открытия одного гипотетического канала, равна примерно $2 \cdot 10^{-13}$ ньютонов и что его «ворота» при этом перемещаются на расстояние около 4 нм.

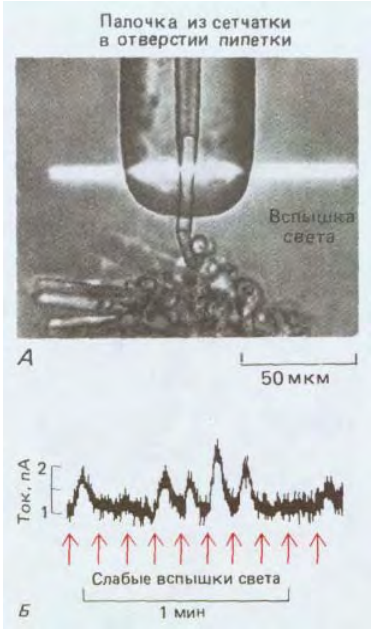


Рис. 19-51. Электрическая реакция палочки на одиночные фотоны. *А.* На микрофотографии показана методика проведения эксперимента. Отпрепаровывают кусочек сетчатки жабы, и наружный сегмент одной палочки всасывают в отверстие стеклянной микро-пипетки, которая затем служит электродом для регистрации тока, проходящего через мембрану палочки. *Б.* Запись изменений силы тока во время серии слабых вспышек света; число фотонов, поглощаемых клеткой при каждой вспышке, варьирует случайным образом, но оно всегда целое. Высокие пики на графике чаще всего соответствуют поглощению одного или двух фотонов, но многие вспышки не вызывают никакой реакции, так как поглощения фотонов не происходит. (D. A. Baylor et al, J. Physiol., 288, 589-611, 1979.)

19.6.5. Рецепторный потенциал, возникающий в палочке, - результат закрытия натриевых каналов [43J

Как уже говорилось в гл. 17 (разд. 17.2.2), в глазу позвоночных имеются два типа фоторецепторных клеток. **Колбочки** служат для цветового зрения и восприятия мелких деталей и требуют сравнительно сильной освещенности. **Палочки** обеспечивают монохроматическое зрение при слабом свете и могут дать измеримый электрический ответ на один-единственный фотон (рис. 19-51). Механизм действия палочек и колбочек, по-видимому, сходен, но палочки лучше изучены.

Палочка (рис. 19-52) состоит из *наружного сегмента,* содержащего световоспринимающий аппарат, *внутреннего сегмента,* где находится множество митохондрий, *ядерной области* и (в основании клетки) *синаптического тельца,* образующего контакт с нервными клетками сетчатки (см. рис. 17-6). Как это ни удивительно, но в темноте клетка очень сильно деполяризована; эта деполяризация удерживает потенциал-зависимые кальциевые каналы синаптического тельца в открытом состоянии, и переход ионов Ca^{2+} внутрь клетки приводит к непрерывному высвобождению медиатора. Деполяризация обусловлена тем, что в плазматической мембране наружного сегмента открыты натриевые каналы. При воздействии света эти каналы закрываются, так что рецепторный потенциал проявляется в форме *гиперполяризации,* приводящей к снижению притока Ca^{2+} и уменьшению скорости выделения медиатора (рис. 19-52). Так как медиатор оказывает тормозящее действие на многие из постсинаптических нейронов, эти нейроны при освещении растормаживаются и в результате возбуждаются. Скорость высвобождения медиатора фоторецепторами изменяется в соответствии с интенсивностью света: чем ярче свет, тем сильнее гиперполяризация и тем больше замедляется

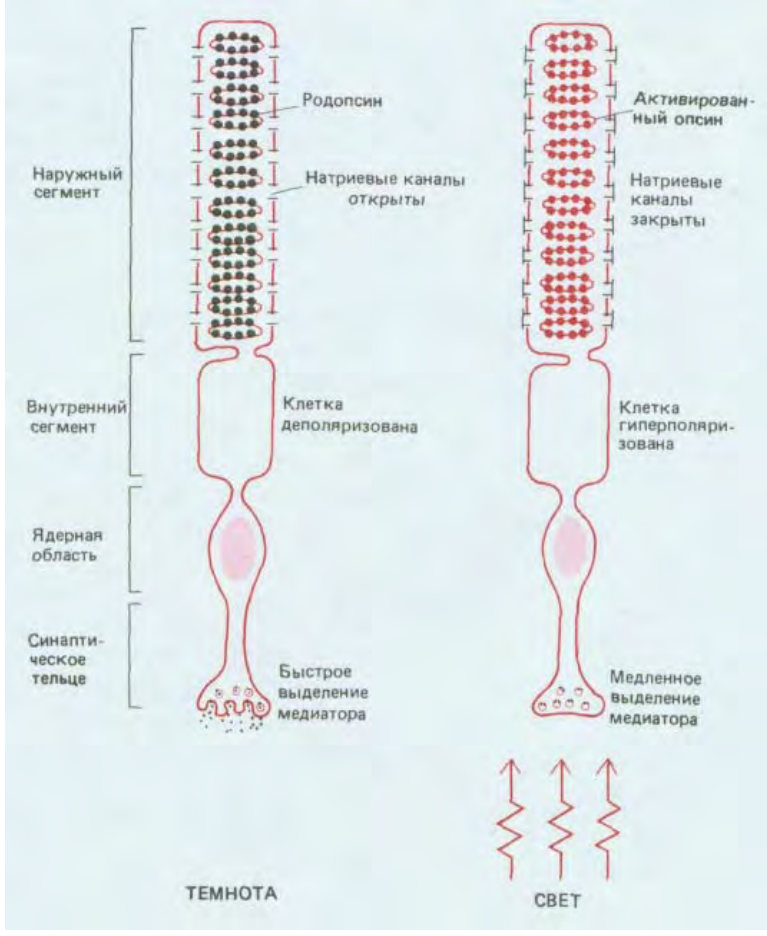


Рис. 19-52. Реакция палочки на освещение. Фотоны поглощаются случайным образом молекулами родопсина, находящимися в наружном сегменте. Это приводит к закрытию натриевых каналов в плазматической мембране и снижению скорости выделения медиатора из синаптического тельца.

выделение медиатора. При очень слабом фоновом освещении, когда клетка находится в наиболее чувствительном, «темноадаптированном» состоянии, поглощение одного фотона снижает приток натрия на миллион или более ионов Na^+, и гиперполяризация достигает ~1 мВ.

19.6.6. Фотоны изменяют конформацию молекул родопсина [43, 44]

Каким образом свет первоначально воспринимается клеткой и какова цепь событий, приводящих к закрытию натриевых каналов? Наружный сегмент, где происходят ключевые этапы преобразования светового сигнала, представляет собой цилиндр, содержащий около тысячи *дисков,* плотно упакованных в виде стопки (см. рис. 17-7). Каждый диск образован замктутой в пузырек мембраной, в которой находятся светочувствительные молекулы **родопсина;** плотность упаковки этих молекул составляет примерно 10^5 на 1 мкм^2. Молекула родопсина состоит из трансмембранного гликопротеина *опсина* (длиной 348 аминокислотных остатков) и ковалентно связанной с ним простетической группы 11 -*цис*-ретиналя, который и поглощает свет. При поглощении фотона 11-*цис*-ретиналь почти мгновенно изомеризуется в полностью-*транс*-ретиналь, изменяя при этом свою форму, что приводит к более медленному изменению конформации опсина. Все эти события занимают около 1 мс. Затем примерно через 1 мин полностью-*транс*-ретиналь отделяется от опсина в результате гидролиза связи между ними и выходит в цитозоль, где в конце концов снова переходит в 1 1-*цис*-форму; последняя соединяется с опсином, и таким образом происходит регенерация светочувствительной молекулы родопсина. Именно раннее конформационное изменение родопсина, вызванное светом, приводит к закрытию натриевых каналов. Но поскольку родопсин находится в дисках, т. е. на некотором расстоянии от каналов, для сопряжения этих событий необходим «посредник».

19.6.7. К закрытию натриевых каналов плазматической мембраны приводит снижение уровня циклического GMP в цитоплазме фоторецепторных клеток, вызванное светом [43, 44, 45]

При улавливании света палочкой происходит изменение внутриклеточной концентрации как Ca^{2+}, так и cGMP, поэтому любая из этих молекул могла бы в принципе служить внутриклеточным посредником. С помощью метода исследования небольших участков мембраны (разд. 4.2.3) установлено, что ключевым сигналом служит падение концентрации циклического GMP в цитозоле. В решающем эксперименте небольшой участок мембраны наружного сегмента отсасывали с помощью микроэлектрода, и тогда внутренняя сторона этого участка становилась доступной для воздействий (рис. 19-53). Когда в среду, омывающую

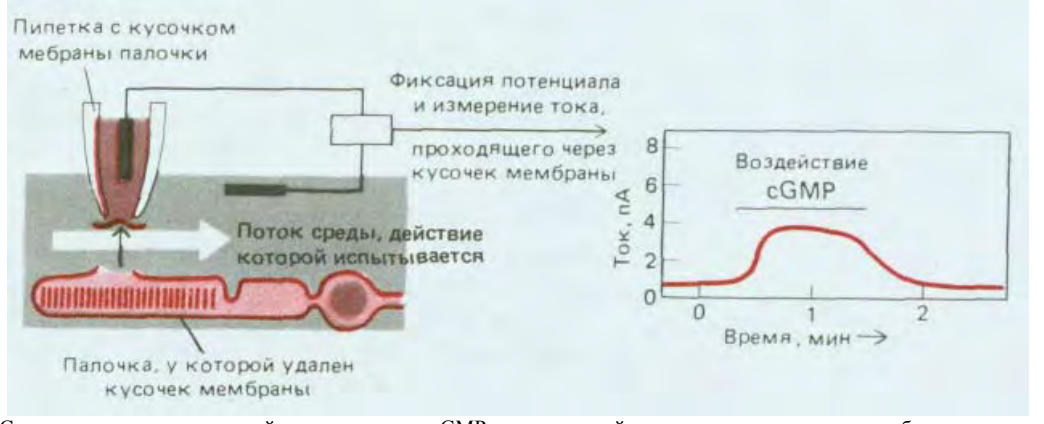


Рис. 19-53. Схема эксперимента, который показывает, что cGMP при его воздействии на плазматическую мембрану палочки со стороны цитоплазмы непосредственно контролирует открытие и закрытие ионных каналов. Относительно медленное увеличение и уменьшение тока при добавлении и удалении cGMP связано с тем, что для изменения состава омывающей среды требуется некоторое время. Скорость реакции каналов на cGMP слишком высока, чтобы ее можно было определить с помощью этой методики. (По E. E. Fesenko, S. S. Kolesnikov, A. L. Lyubarsky, Nature, **313,** 310-313, 1985.)



Рис. 19-54. Каскад ферментативных реакций, приводящий к возникновению рецепторного потенциала после поглощения одного фотона палочкой, адаптированной к темноте. Расходящимися стрелками указаны этапы, на которых происходит усиление.

кусочек мембраны, вводили циклический GMP, а к мембране прикладывали разность электрохимических потенциалов, появлялся ток ионов Na^+ после удаления циклического GMP ток прекращался, несмотря на высокую концентрацию Ca^{2+}. Таким образом, cGMP открывает натриевые каналы, а свет, вызывающий снижение концентрации cGMP, закрывает эти каналы. Обычно эффекты циклических нуклеотидов реализуются через фосфорилирование определенных белков активированной протеинкиназой (разд. 12.3.14), однако в палочках cGMP воздействует прямо на натриевые каналы, не позволяя им закрываться. Но каким образом вызванное светом изменение конформации родопсина снижает концентрацию cGMP в цитозоле палочки?

Поглощение одного фотона одной молекулой родопсина приводит к гидролизу многих молекул cGMP. Такое усиление эффекта достигается благодаря каскаду ферментативных реакций. Одна молекула активированного родопсина катализирует активацию G-белка, называемого *трансдуцином, с* очень высокой скоростью - примерно 1000 молекул в секунду. Трансдуцин гомологичен G_S-белку (разд. 12.3.4), который функционально сопрягает рецепторы с аденилатциклазой (а сам родопсин гомологичен таким рецепторам - см. разд. 12.3.12). Однако активированный трансдуцин не взаимодействует с аденилатциклазой, а активирует *cGMP-фосфодиэстеразу,* которая специфически гидролизует cGMP со скоростью около 4000 молекул в секунду, что приводит к быстрому снижению уровня cGMP. В результате всего этого каскада, занимающего примерно секунду, гидролизуется более 10^5 молекул cGMP на один поглощенный квант света, что приводит к кратковременному закрытию 250 натриевых каналов (рис. 19-54).

19.6.8. Фоторецептор адаптируется к яркости света [46]

Для возвращения фоторецептора в состояние покоя после возбуждения его светом каждая реакция ферментативного каскада, инициированного светом, должна быть «уравновешена» соответствующей реакцией инактивации. По-видимому, свет ускоряет как активирующие, так и инактивирующие реакции, но второй эффект проявляется чуть позднее, поэтому свет вызывает мгновенный положительный ответ, который затем очень быстро затухает. Такая запаздывающая инактивация не только помогает обеспечить короткий ответ на короткую вспышку света, но и дает возможность фоторецептору *адаптироваться:* свет постоянной яркости, вместо того чтобы просто приводить клетку в состояние насыщения с близкой к нулю концентрацией cGMP, вызывает два противоположных эффекта, которые почти гасят друг друга, что позволяет клетке реагировать на последующие изменения освещенности.

По-видимому, вызванное светом уменьшение концентрации Ca^{2+} играет решающую роль как в прекращении реакции на вспышку света, так и в адаптации. Если изменение концентрации Ca^{2+} искусственно задержать путем введения в фоторецептор Ca^{2+}-буфера, то электрический ответ на световую вспышку будет очень продолжительным и клетка будет слишком медленно адаптироваться к постоянному освещению. Если фоторецептор поместить в раствор, полностью блокирующий передвижение Ca^{2+} через плазматическую мембрану, то те же самые эффекты проявятся в еще большей степени, а адаптации не произойдет совсем. В норме каналы, через которые ионы натрия поступают в наружный сегмент фоторецептора, до некоторой степени проницаемы и для других катионов, включая Ca^{2+}. Свет, закрывая каналы, блокирует приток кальция, в то время как отток Ca^{2+} (опосредуемый в плазматической мембране палочки системой Ca^{2+}/Na^+ -антипорта) продолжается, в результате чего внутриклеточная концентрация ионов кальция падает,

Полагают, что это ускоряет те ферментативные реакции (в особенности синтез cGMP гуанилатциклазой), которые противодействуют вызываемому светом падению концентрации cGMP, помогая клетке адаптироваться.

19.6.9. Нейроны обрабатывают исходную информацию, доставляемую сенсорными рецепторными клетками [47]

Через сенсорные рецепторные клетки в нервную систему поступает огромный поток информации. Мозг должен переработать эту информацию и выделить значимые элементы: выхватить слова из хаоса звуков, различить лицо среди светлых и темных пятен и так далее. В этом заключается вторая стадия переработки сенсорной информации - переработка на уровне нейронов, гораздо более тонкая и сложная, чем та, что происходит в рецепторных клетках. Эта вторая стадия включает «вычисления», выполняемые сложно переплетенной сетью нейронов, где каждый нейрон обычно получает множество сигналов, среди которых есть и возбуждающие, и тормозные. Каждый нейрон генерирует выходной сигнал, несущий информацию о наличии или отсутствии каких-то специфических элементов в исходных данных, доставляемых рецепторными клетками. Например, определенные группы клеток в зрительных центрах мозга генерируют потенциалы действия, когда глаз видит прямую линию, определенным образом ориентированную в пространстве. Выходные сигналы от одной группы будут приняты другими нейронами, выполняющими следующий этап процесса, и так далее ко все более высоким уровням восприятия - вплоть до распознавания таких тонких и сложных вещей, как осмысленные слова и выражения лиц.

Для такой переработки информации необходима поразительно сложная организация анатомических связей между нервными клетками. Детали взаимоотношений между анатомией нервной системы и высшей нервной деятельностью выходят за рамки книги о биологии клетки. Но в чем все же заключаются основные механизмы, благодаря которым создаются сложные, но упорядоченные анатомические структуры? Рассмотрению этого вопроса будет посвящен следующий раздел главы.

Заключение

Специальные преобразователи превращают сенсорные стимулы в электрические сигналы. Например, у позвоночных волосковые клетки внутреннего уха представляют собой механорецепторы: на свободной поверхности каждой волосковой клетки имеется пучок стереоцилий (гигантских микроворсинок), и при наклоне таких пучков открываются ионные каналы, что ведет к изменению мембранного потенциала. Мембранный потенциал фоторецепторных клеток в глазу позвоночного изменяется при поглощении света молекулами родопсина, содержащимися в этих клетках. И в том, и в другом случае электрический сигнал, возникающий в сенсорной клетке вначале в форме рецепторного потенциала, передается соседним нейронам через химические синапсы. Однако два упомянутых класса клеток-рецепторов используют для выработки рецепторных потенциалов различные «стратегии»: в основе одной лежат рецепторные молекулы, связанные с каналами, а другая зависит от молекул-рецепторов, не связанных с каналами. В волосковых клетках физическая связь между стереоцилиями порождает механические силы, которые прямо воздействуют на ионные каналы в плазматической мембране, заставляя их быстро открываться или закрываться. В палочках сетчатки активированные светом молекулы родопсина инициируют каскад ферментативных реакций, в результате которых в цитозоле гидролизуется цикличе-

ский GMP, что в свою очередь ведет к закрытию натриевых каналов плазматической мембраны. Хотя механизм, основанный на каталитических реакциях, не может быть очень быстрым, он позволяет реагировать на один-единственный фотон.

19.7. Рождение, рост и гибель нейронов [48]

Проблема развития нервной системы уникальна. Каким образом аксоны и дендриты, отходящие от миллиардов нейронов, отыскивают надлежащих партнеров для связей так, чтобы создалась эффективно функционирующая сеть? Различного рода нейроны и сенсорные клетки, а также интернируемые мышцы чаще всего находятся у зародыша на значительных расстояниях друг от друга и первоначально не связаны между собой. Поэтому в первой фазе развития нервной системы различные ее части развиваются по собственным «локальным» программам в соответствии с принципами дифференцировки клеток, общими для всех тканей тела, о чем уже говорилось в гл. 16. В следующей фазе осуществляется тип морфогенеза, свойственный только нервной системе. На этом этапе создается хотя и предварительная, но уже упорядоченная схема связей между частями нервной системы с помощью аксонов и дендритов, растущих в нужных направлениях. Первоначально обособленные части могут теперь взаимодействовать друг с другом. В третьей, последней фазе, продолжающейся и в период взрослой жизни, возникшие ранее связи уточняются и совершенствуются в результате взаимодействия отдаленных компонентов с учетом электрических сигналов, передаваемых и получаемых этими компонентами.

19.7.1. Нейроны образуются в соответствии с определенными программами клеточного деления [48, 49]

Почти у всех животных от нематод до позвоночных образование нейронов, за редкими исключениями, подчиняется трем основным правилам: 1) зрелые нейроны не делятся; 2) после образования полного комплекта нейронов, свойственного взрослой особи, не остается никаких стволовых клеток, способных производить новые нейроны; 3) нейроны в каждой небольшой области развивающейся нервной системы формируются в соответствии с собственной программой деления, без влияния со стороны тех групп клеток, с которыми позднее образуются нервные связи.

У позвоночных нервная система развивается из двух клеточных комплексов эктодермального происхождения - *нервной трубки* (разд. 16.1.9) и *нервного гребня* (разд. 16.6,5). Из нервной трубки развивается центральная нервная система (головной и спинной мозг), тогда как нервный гребень служит источником большинства нейронов и поддерживающих клеток периферической нервной системы. Помимо этого из утолщений, или *плакод,* эктодермы головы развиваются некоторые сенсорные нейроны, в том числе иннервирующие ухо и нос (рис. 19-55).

Нервная трубка, о которой здесь в основном пойдет речь, вначале состоит из однослойного эпителия - в дальнейшем источника образования как нейронов, так и глиальных клеток центральной нервной системы (рис. 19-56). Позже этот эпителий утолщается и становится более сложным образованием со многими слоями клеток различного типа. Процесс пролиферации здесь был изучен с помощью ^{3}H-тимидина, который включается в клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла. Ткань фиксировали либо сразу после введения метки, чтобы установить, какие клетки делятся, либо на более поздней стадии, чтобы узнать, какие зрелые клетки образуются из тех клеток-предшественников, которые



Рис. 19-55. Схематическое изображение раннего (2,5 дня) куриного зародыша: показано, из каких структур образуется нервная система. Нервная трубка (выделена розовым цветом) уже закрылась, за исключением хвостового участка, и располагается под эктодермой, частью которой она была вначале (см. рис. 16-13). Нервный гребень (показан серым цветом) расположен вверху между крышей нервной трубки и эктодермой. Из утолщений на поверхности эктодермы - плакод - развиваются определенные группы сенсорных клеток и нейронов. На этой стадии уже практически завершилась инвагинация статоакустической плакоды и образовался слуховой пузырек - зачаток внутреннего уха и источник нейронов связанного с ним ганглия; в результате инвагинации обонятельной плакоды образуется выстилка носа, включая обонятельные нейроны, ответственные за восприятие запахов. Другие черепные плакоды дадут начало клеткам черепных сенсорных ганглиев, которые обеспечивают большую часть сенсорной иннервации головы и шеи. В отличие от других сенсорных клеток сенсорные клетки глаза развиваются из нервной трубки.

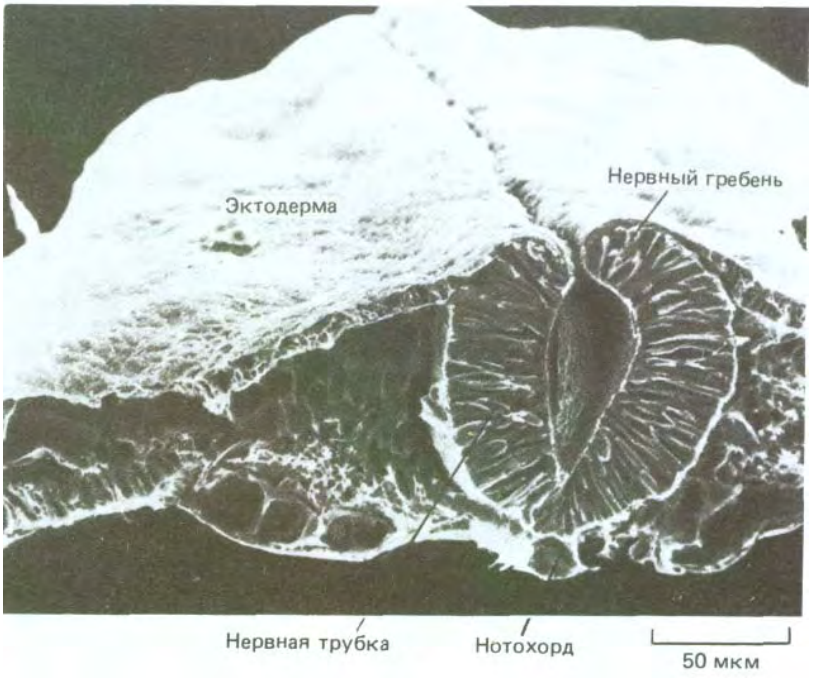


Рис. 19-56. Микрофотография поперечного среза двухдневного куриного зародыша, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Нервная трубка уже почти замкнулась и отделилась от эктодермы. На этом этапе эпителий нервной трубки состоит из одного клеточного слоя. (С любезного разрешения Jean-Paul Revel.)

делились в момент введения ^{3}H-тимидина. Такие исследования особенно успешно используются для определения «дат рождения» различных нейронов: так как нейроны, прошедшие дифференцировку, не делятся, каждый предшественник нейрона должен пройти свое последнее деление в определенный день перед началом своего созревания как нервной клетки. Оказалось, что как у позвоночных, так и у беспозвоночных «даты рождения» нейронов данного типа обычно приходятся на тот строго ограниченный период развития, после которого уже не образуется нейронов этого типа. Каждая область развивающейся нервной трубки имеет собственную программу деления клеток, и обычно нейроны, имеющие разные «даты рождения», предназначены для разных функций. Так как после завершения образования нервных клеток и начала формирования связей между НИМИ стволовые клетки прекращают свое существование, число нейронов в дальнейшем может меняться только в сторону уменьшения в результате отмирания клеток (см. ниже разд. 19.7.11).

19.7.2. Радиальные глиальные клетки образуют временный «каркас», направляющий миграцию незрелых нейронов [50]

Незрелый нейрон еще не образовавший аксона и дендритов, обычно мигрирует из места своего «рождения» в какой-нибудь другой участок. Такие миграции нейронов можно прослеживать с помощью ^{3}H-тимидина: метка включается в клетки-предшественники, проходящие последнее деление, после чего их меченые потомки могут быть обнаружены в других местах. Например, мотонейроны, которые будут иннервировать конечности, проходят последний митоз около просвета нервной трубки, а затем перемещаются к ее периферии и попадают в *вентральные рога* будущего спинного мозга (рис. 19-57).

Миграцию нейронов направляют специализированные элементы нервной трубки - *радиальные глиальные клетки* (рис. 19-58, *А*). Это сохранившиеся клетки первоначального столбчатого эпителия нервной трубки, которые все больше вытягивались, по мере того как стенка трубки утолщалась: каждая из этих клеток простирается от внутренней поверхности трубки до наружной. В некоторых участках развивающегося головного мозга приматов это расстояние может достигать 2 см. Трехмерная реконструкция по электронным микрофотографиям серийных срезов показывает, что незрелые мигрирующие нейроны тесно примыкают к радиальным глиальным клеткам и, видимо, как бы ползут по ним (рис. 19-58, *Б* и *В*).



Рис. 19-57. Участки, из которых развиваются мотонейроны спинного мозга, но данным ридиоавтографии после введения небольшой дозы тимидина, меченного тритием, на раннем этапе развития. На схемах показаны поперечные разрезы нервной трубки раннего эмбриона (слева) и относительно зрелого спинного мозга, развивающегося из нее (справа). На поздней стадии наибольшее количество метки содержат те клетки, которые в момент введения ^{3}H-тимидина проходили свою последнюю фазу синтеза ДНК. Для простоты на схеме зрелого спинного мозга показаны только мотонейроны, хотя в *сером веществе* имеется также много других нервных клеток. *Белое вещество* (не закрашено) содержит главным образом пучки аксонов, идущих вдоль спинного мозга и связывающих разные области серого вещества. (У взрослых особей эти области выглядят белыми, так как содержат большое количество миелина.) О том, как образуются глиальные клетки в процессе развития организма, см. в гл. 16.

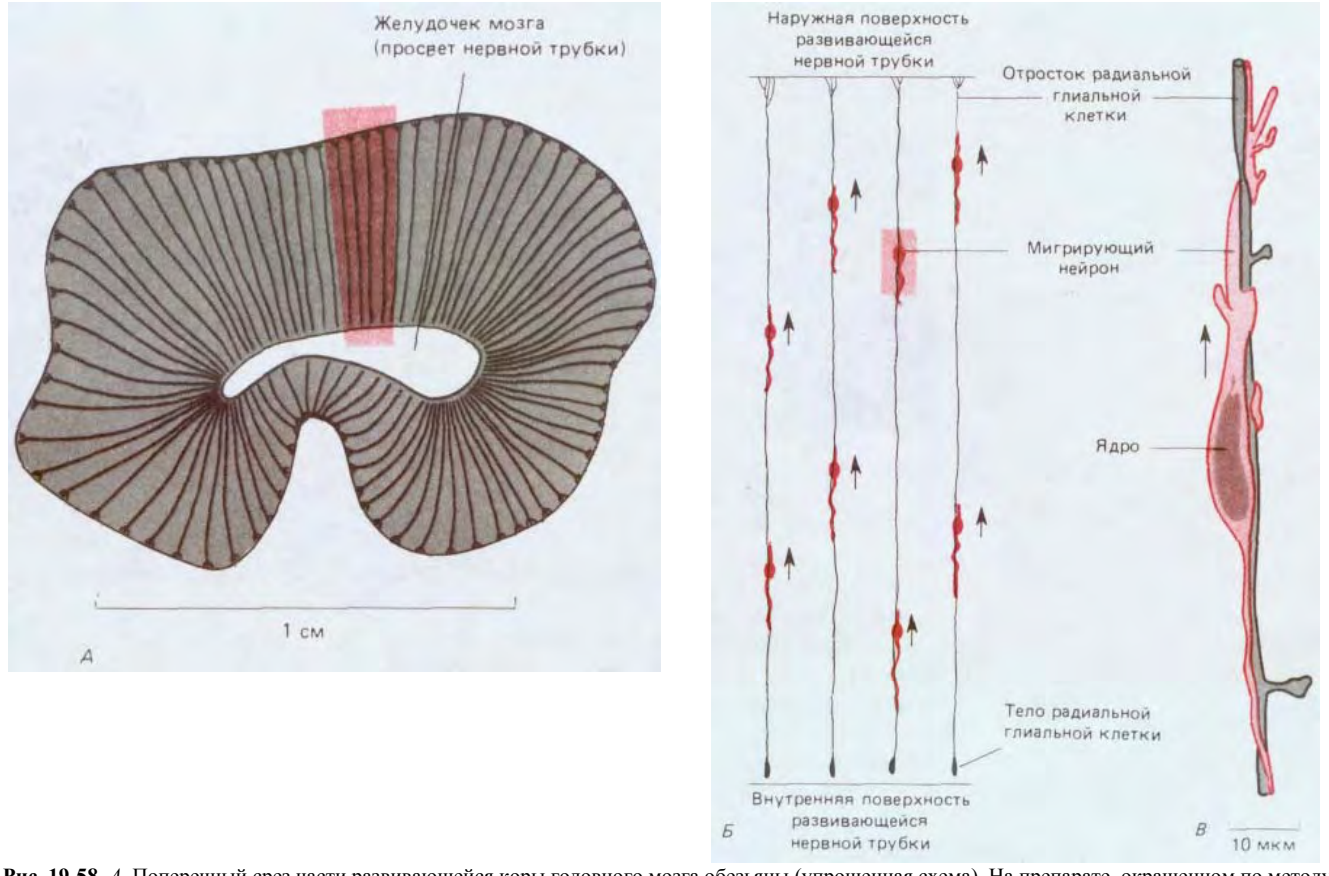


Рис. 19-58. *А.* Поперечный срез части развивающейся коры головного мозга обезьяны (упрощенная схема). На препарате, окрашенном по методу Гольджи, видны радиальные глиальные клетки, отходящие от просвета нервной трубки к ее наружной поверхности. *Б.* Более подробная схема области, выделенной розовым цветом на схеме *А*. Показаны незрелые нервные клетки, мигрирующие вдоль отростков радиальных глиальных клеток. *В.* Изображение одного из таких мигрирующих нейронов, основанное на реконструкциях по серийным электронно-микроскопическим срезам. (По P. Rakic, J. Comp. Neurol., **145,** 61-84, 1972.)

Радиальные глиальные клетки сохраняются в течение многих дней (у некоторых видов до нескольких месяцев) как популяция неделящихся клеток, ясно отличающихся от нейронов и их предшественников. Только к концу периода развития они в большинстве областей головного и спинного мозга исчезают; высказано предположение, что многие из них превращаются в астроциты, но это еще требует прямых доказательств. Таким образом, радиальные глиальные клетки можно рассматривать как вспомогательный аппарат развития - они необходимы в качестве «лесов» при построении сложных нервных структур, но в зрелой нервной системе почти нигде не сохраняются.

19.7.3. Тип нейрона и его будущие связи определяются временем его «рождения» [50, 51]

Существует определенная связь между «датой рождения» нейрона в центральной нервной системе млекопитающих и местом его окончательной локализации (возможно, это эволюционный «отголосок» жесткой связи между генеалогией клеток в развивающемся организме и конечной локализацией их у таких беспозвоночных, как нематоды - см. разд. 16.3). Например, в коре головного мозга нейроны располагаются слоями в соответствии с последовательностью их «рождения» благодаря такой миграции, при которой клетки, образовавшиеся позднее, мигрируют дальше клеток, образовавшихся раньше. По мере созревания клетки, расположенные в следующих друг за другом слоях коры, начинают различаться по форме, размерам и характеру связей с другими клетками. Так, малые пирамидные клетки, появляющиеся поздно, расположены



Рис. 19-59. Сравнение нейронных слоев в коре головного мозга нормальных мышей и мутантных мышей *reeler*. У мутантов нарушение миграции клеток приводит к инверсии нормальной взаимосвязи между «датой рождения» нейрона и его конечным положением. Тем не менее нейроны с измененным положением дифференцируются и устанавливают связи в соответствии с «датой рождения».

в одном из наружных слоев и посылают свои аксоны в другие области коры, тогда как большие пирамидные нейроны и клетки неправильной формы, появившиеся ранее, находятся во внутренних слоях и посылают аксоны за пределы коры большого мозга.

От чего зависят такие различия - от «даты рождения» или от места окончательной локализации? Ответить на этот вопрос помогают мыши мутантной линии *reeler*. У этих мутантов, названных так за нетвердую походку, нарушен механизм миграции нервных клеток: нейроны, образовавшиеся позднее, остаются во внутреннем слое, а ранние клетки переходят в наружный. Но, несмотря на инверсию в их расположении, дифференцировка кортикальных клеток соответствует времени их «рождения», т. е. клетки, образовавшиеся позже, становятся малыми пирамидными нейронами, а ранние клетки - большими пирамидными или же нейронами неправильной формы. Следовательно, в данном случае тип клетки определяется именно временем ее образования, а не окончательным местом (рис. 19-59). По-видимому, особенности нейронов и в самом деле обычно зависят главным образом от их происхождения и от места и времени образования.

В свою очередь присущие клетке особенности определяют характер ее будущих связей - это важное общее правило, которое будет подробнее рассмотрение позже (разд. 19.7.9). Поэтому у мышей *reeler* нейроны, изменившие местоположение, устанавливают связи (с незначительным числом ошибок) в соответствии с «датой рождения», а не с положением в коре мозга: аксоны малых пирамидных клеток направляются в другие участки коры, а аксоны больших пирамидных клеток и клеток неправильной формы - в области, лежащие за пределами коры. Для того чтобы понять, как устанавливаются такие избирательные связи, нужно будет сначала рассмотреть механизм образования аксонов и дендритов.

19.7.4. Аксоны и дендриты удлиняются благодаря конусу роста на их кончиках [52]

Как правило, аксон, а затем и дендриты начинают расти от тела нервной клетки вскоре после того, как нейроны попадают на свои окончательные места. Всю последовательность событий впервые наблюдали в интактной эмбриональной ткани, применяя окрашивание по Гольджи (рис. 19-60). Эта методика и другие методы, разработанные позднее, позволили выявить на конце растущего отростка нервной клетки своеобразное утолщение неправильной формы. Эта структура, называемая конусом **роста,** видимо, и прокладывает путь через окружающую ткань. Конус

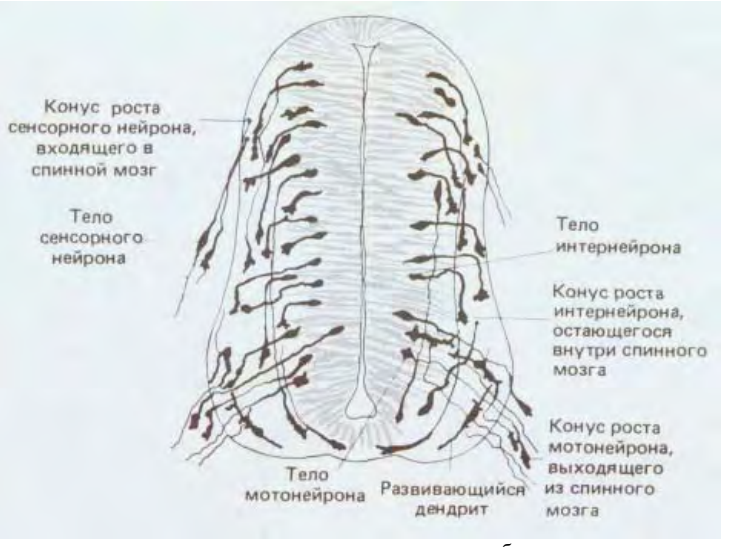


Рис. 19-60. Конусы роста в развивающемся спинном мозгу трехдневного куриного эмбриона, видимые на поперечном срезе, окрашенном по Гольджи. У большинства нейронов, по-видимому, пока только один длинный отросток - будущий аксон. Конусы роста вставочных нейронов остаются внутри спинного мозга, конусы роста мотонейронов выходят из него (чтобы направиться к мышцам), а конусы роста сенсорных нейронов прорастают в спинной мозг извне (оттуда, где расположены их тела). Многие клетки центральных областей спинного мозга у эмбриона еще делятся и пока не дифференцировались в нейроны и глиальные клетки. (S. Ramón y Cajal, Histologie du Systéme Nerveux de 1'Homme et des Vertébrés, Paris: Maloine, 1909 1911; reprinted, Madrid: C.S.I.C., 1972.)

роста служит одновременно и «локомотивом», и приспособлением, направляющим отросток по надлежащему пути.

Большая часть имеющихся ныне сведений о свойствах конусов роста получена при изучении нервной ткани в культуре. Эмбриональные нервные клетки in vitro выпускают отростки, которые трудно идентифицировать как аксоны или дендриты и которые получили поэтому нейтральное название *нейритов.* Конус роста на конце каждого нейрита продвигается со скоростью около 1 мм в сутки. Это широкая утолщенная часть нейрита, похожая на ладонь со множеством длинных тонких *микрошипиков,* или *филоподий,* напоминающих пальцы (рис. 19-61). Филоподии находятся в непрестанном движении: в то время как одни втягиваются обратно в конус роста, другие, наоборот, удлиняются, отклоняются в разные стороны, прикасаются к субстрату и могут прилипать к нему. «Перепонки» между филоподиями покрыты складчатой, как бы «гофрированной» мембраной (разд. 11.2.11). Как показывает электронная микроскопия, микротрубочки и микрофиламенты, имеющиеся в нейрите, в конусе роста оканчиваются, и широкая «ладонь» этого конуса заполнена уплощенными мембранными пузырьками, а также содержит митохондрии (рис. 19-62). В волнистых краях конуса роста и в филоподиях находится густая сеть актиновых филаментов. Все эти данные, полученные с помощью микроскопа, позволяют предпола-

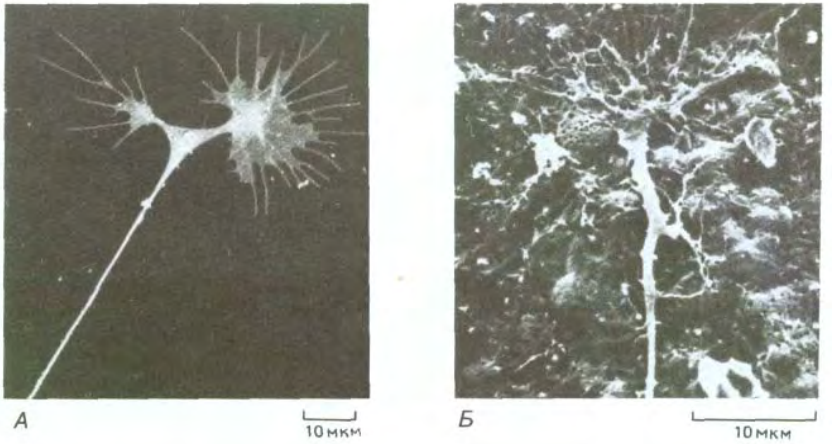


Рис. 19-61. Конусы роста: микрофотографии, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа. *А.* Конусы роста на конце нейрита куриного симптического нейрона в культуре. Бывший ранее единственным, конус роста недавно разделился на два. Обратите внимание на многочисленные филоподии и на то, что нейрит имеет вид натянутой струны в результате продвижения конусов роста, которые часто бывают единственными точками прочного сцепления с субстратом. *Б.* Конус роста сенсорного нейрона, «ползущий» по внутренней поверхности эпидермиса головастика *Xenopus* in vivo. *(А* - из D. Bray, Cell Behaviour [R. Bellairs, A. Curtis, G. Dunn, eds.] Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1982; Б - из A. Roberts. Brain Res., **118,** 526-530, 1976.)

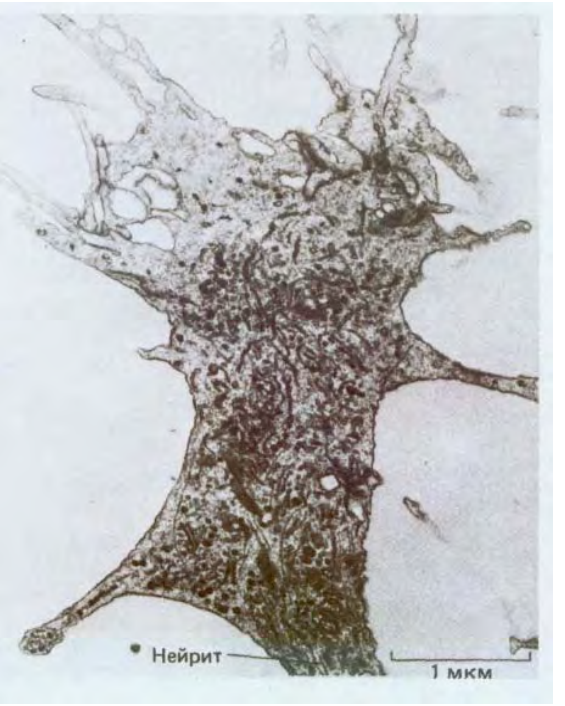


Рис. 19-62. Электронная микрофотография среза конуса роста. Видны многочисленные пузырьки неправильной формы, ограниченные мембраной. По-видимому, это связано с высокой интенсивностью экзоцитоза и эндоцитоза. (С любезного разрешения Gerald Shaw.)

гать, что конус роста продвигается вперед способом, напоминающим передвижение ведущего края таких клеток, как нейтрофилы и фибробласты (разд. 11.6.4).

19.7.5. В конусе роста скапливаются и используются материалы, необходимые для роста [53]

Конус роста служит не только «локомотивом» для удлинения нейрита, но и участком, где встраиваются новые компоненты растущей клетки (рис. 19-63). Поскольку в нейроне рибосомы сосредоточены главным образом в теле клетки, именно оно и должно быть местом синтеза белков, используемых для роста нейрита. В теле клетки синтезируются и новые мембраны, которые затем переносятся в форме мелких пузырьков к конусу роста с помощью быстрого аксонного транспорта (разд. 19.1.4). По мере поступления этих пузырьков в конус роста они включаются в плазматическую мембрану путем экзоцитоза. Хотя часть мембранного материала вновь поглощается при эндоцитозе и используется повторно, в общем итоге его количество при росте нейрита возрастает. Данные о таком способе роста были получены при наблюдении за передвижением мелких частиц пыли, прилипших к наружной поверхности растущего нейрона: частицы на поверхности самого конуса роста быстро продвигаются, тогда как частицы, находящиеся ближе к основанию нейрита, остаются неподвижными относительно тела клетки даже при удлинении отростка. «Рельсами» для быстрого аксонного транспорта служат микротрубочки (разд. 11.4.8); очевидно, мембранные пузырьки, передвигающиеся вдоль микротрубочек, доставляются к тем местам, где эти пути оканчиваются. Различные эксперименты позволяют предположить, что от микротрубочек зависит, где может образоваться конус роста, так как они способны регулировать доставку мембран.

В то же время и сами микротрубочки должны расти, так же как и остальной цитоскелет. С потоком медленного аксонного транспорта

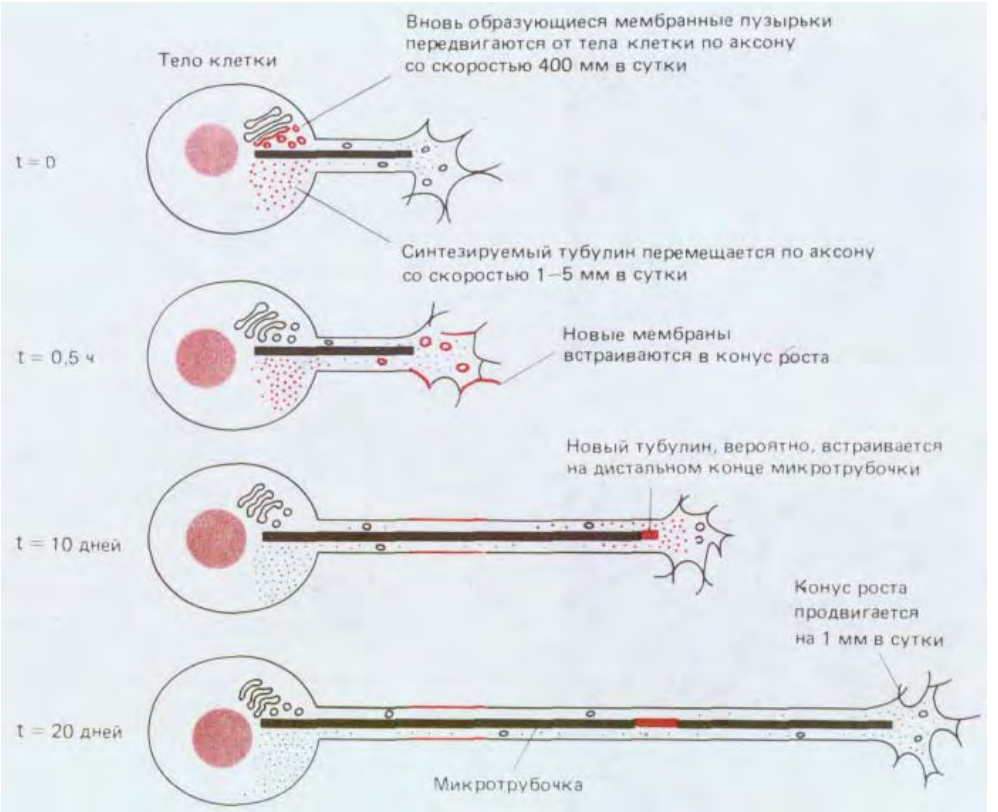


Рис. 19-63. На этих схемах показано, как транспортируется материал, необходимый для роста нейрита, из тела клетки к конусу роста, где происходит его включение. Для простоты показана только одна микротрубочка. Микротрубочки служат путями для быстрого аксонного транспорта мембранного материала. Тубулин переносится от тела клетки с помощью медленного аксонного транспорта. Место добавления субъединиц для удлинения микротрубочек еще точно не установлено.

(разд. 19.1.4) из тела клетки переносится тубулин, но еще не ясно, где происходит сборка субъединиц в микротрубочки. Известно, однако, что обычно микротрубочки ориентированы таким образом, что их плюс-концы (быстро растущие концы, см. разд. 11.4.2) направлены к конусу роста. Известно также, что конусы роста необычайно чувствительны к локальному воздействию препаратов, препятствующих сборке микротрубочек. Это позволяет думать, что микротрубочки удлиняются путем добавления субъединиц в конусе роста.

19.7.6. Движение конуса роста in vitro может направляться избирательной адгезией, хемотаксисом и электрическими полями [52, 54]

«Упрощенные» условия клеточной культуры дают возможность исследовать механизмы, которые могли бы направлять движение конусов роста у интактного животного. Конусы роста, так же как нейтрофилы и фибробласты, при выборе субстрата предпочитают поверхности, к которым они прилипают наиболее прочно (рис. 19-64). По мере продвижения вперед конусы роста непрерывно вытягивают микрошипики к участкам, лежащим впереди и сбоку. Некоторые из этих выступов могут прикоснуться к менее адгезивному субстрату и в этом случае относительно быстро втягиваются обратно; другие встречают более адгезивную поверхность и сохраняются дольше. По-видимому, микрошипики, словно щупальца, исследуют близлежащие поверхности и направляют конус роста по пути с наиболее сильными адгезивными свойствами.

Однако на продвижение конусов роста влияет не только адгезивность субстрата. Важна также форма поверхности - например, конусы роста, «прицепившиеся» к волокнам, будут склонны двигаться вдоль них (феномен, называемый "contact guidance"). Определенное влияние, видимо, оказывают и вещества, растворенные во внеклеточной жидкости.

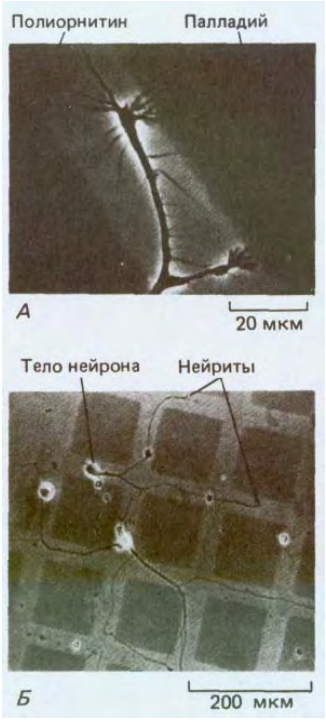


Рис. 19-64. Можно проследить за выбором субстрата конусом роста, культивируя клетки в чашке, поверхность которой сначала покрыта полиорнитином, а затем сверху нанесены квадраты из палладия. Так как поверхность клеток чаще всего заряжена отрицательно, клетки сильно прилипают к полиорнитину, который несет положительный заряд. Конусы роста продвигаются по «дорожкам» из полиорнитина и избегают палладия; но если клетке предоставлен выбор между палладием и еще менее адгезивным субстратом, они будут перемещаться по палладию. *А.* Фазовоконтрастная микрофотография при сильном увеличении, показывающая конусы роста на границе между двумя субстратами. *Б.* То же при меньшем увеличении; пути, выбираемые конусами роста, обозначены нейритами, которые тянутся за ними и остаются прикрепленными к полиорнитину. (P. Letourneau, Dev. Biol., **44,** 92-101, 1975.)

Если эмбриональный ганглий с сенсорными нейронами, которые будут иннервировать, например, челюсть, поместить в культуре на расстоянии около миллиметра от зачатка челюсти, нейриты будут расти преимущественно в сторону этого зачатка; это позволяет предположить, что ткань-мишень секретирует молекулы, вызывающие хемотаксический эффект. Электрическое поле тоже оказывает сильное направляющее воздействие, заставляя конусы роста в культуре нервной ткани продвигаться к катоду; электрическое поле в 7 мВ/мм уже эффективно.

Хотя подобные эксперименты in vitro показывают, какие факторы способны направлять движение конусов роста, они ничего не говорят о том, какой именно вид воздействия играет главную роль в развивающемся организме.

Ограничено ли продвижение конусов роста специфическими путями или эти пути выбираются путем проб и ошибок? Некоторые ответы удалось получить, исследуя поведение конусов роста в естественных условиях.

19.7.7. In vivo конус роста направляет движение нейрита по строго определенному пути ("pathway guidance") [55]

Обычно в живом организме конусы роста продвигаются к своим мишеням по строго определенным путям. Изучение действующих при этом механизмов у большей части позвоночных затруднено; несколько проще проводить исследования на некоторых беспозвоночных, например на прямокрылых насекомых, у которых можно детально проследить иннервацию развивающихся конечностей (рис. 19-65).

Сенсорные нейроны, иннервирующие у этих насекомых конечности, образуются у эмбриона из особых клеток в эпителии зачатков ног; тела нервных клеток остаются на периферии, а аксоны прорастают в центральную нервную систему по точно определенным зигзагообразным путям. Эти пути прокладываются в каждой конечности одним или двумя аксонами-пионерами, которые можно селективно окрасить с помощью антител или путем инъекции в тело клетки флуоресцентного красителя люциферина желтого. В результате можно увидеть, что на каждом повороте пути конусы роста «первопроходцев» вступают в контакт со специфическими клетками, которые служат чем-то вроде «дорожных указателей» (рис. 19-66). Конусы роста образуют на этих клетках временные щелевые контакты: если ввести в аксон краситель, то эти вспомогательные клетки тоже ярко окрасятся. Микрошипики, выпускаемые первыми конусами роста, достигают длины 50 или даже 100 мкм; этого достаточно, чтобы дотянуться до следующей клетки-указателя на пути аксона. Микрошипики, вступившие в контакт с такой клеткой, стабилизируются, а остальные втягиваются обратно. Таким образом конус роста продвигается шаг за шагом к центральной нервной системе. Если клетку-указатель разрушить лазерным лучом раньше, чем конус роста достигнет ее, то конус в этой точке «заблудится» (рис. 19-66). На тех участках пути, где в норме нет клеток-указателей, конус роста будет продвигаться в соответствии с адгезивностью базальной мембраны. лежащей под эпителием конечности (разд. 14.2.15). На всем пути конус роста продвигается благодаря специфическим молекулам на его поверхности, которые позволяют ему прилипать к соответствующему субстрату. Некоторые из этих адгезионных молекул уже идентифицированы.



Рис. 19-65. Микрофотография зародыша прямокрылого (вид снизу), полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Видны зачатки конечностей (показано стрелкой). **(D.** Bentley, H. Keshishian, Science, **218,** 1082-1088, 1982. Copyright 1982 by the AAAS.)

19.7.8. Конусы роста используют специфические адгезионные молекулы для сцепления с поверхностью клеток и внеклеточным матриксом [56]

Как только первые нейриты проложили путь, другие следуют за ними по принципу контакта: конусы роста прилипают к уже существующим нейритам и продвигаются вдоль них. Это универсальная тенденция, наблюдаемая как у позвоночных, так и у беспозвоночных. Поскольку существует сильная адгезия между нейритами и между нейритом и конусом роста, нервные волокна у взрослого животного оказываются сгруппированными в плотные параллельные пучки (фасцикулы). Таким же путем образуются крупные периферические нервы позвоночных, видимые невооруженным глазом (хотя впоследствии отдельные аксоны изолируются друг от друга оболочками из шванновских клеток). У позвоночных найдены специфические интегральные мембранные гликопротеины, обеспечивающие адгезию между нейритами. Примерами могут служить два хорошо изученных гликопротеина - так называемая *молекула адгезивности нервных клеток,* или *N-CAM* (разд. 14.3.6), и *гликопротеин* L_1, известный также как *молекула адгезивности нейрон-глия,* или *Ng-CAM.* Было показано, что антитела к этим белкам, относящиеся к суперсемейству иммуноглобулинов (разд. 14.3.6), подавляют тенденцию развивающихся нейритов к образованию пучков и нарушают нормальный рост аксона (в разной степени в разных частях нервной системы). N-CAM имеется не только у нейронов, но и у глиальных клеток, а во время развития и регенерации и на многих других клетках, включая мышечные. В последнем случае эти молекулы, возможно, помогают «притягивать» конусы роста мотонейронов в те области, где должны сформироваться синапсы.

Движение конусов роста направляется их прилипанием не только к поверхности других клеток, но и к различным компонентам внеклеточного матрикса. Важным примером может служить регенерация нерва.

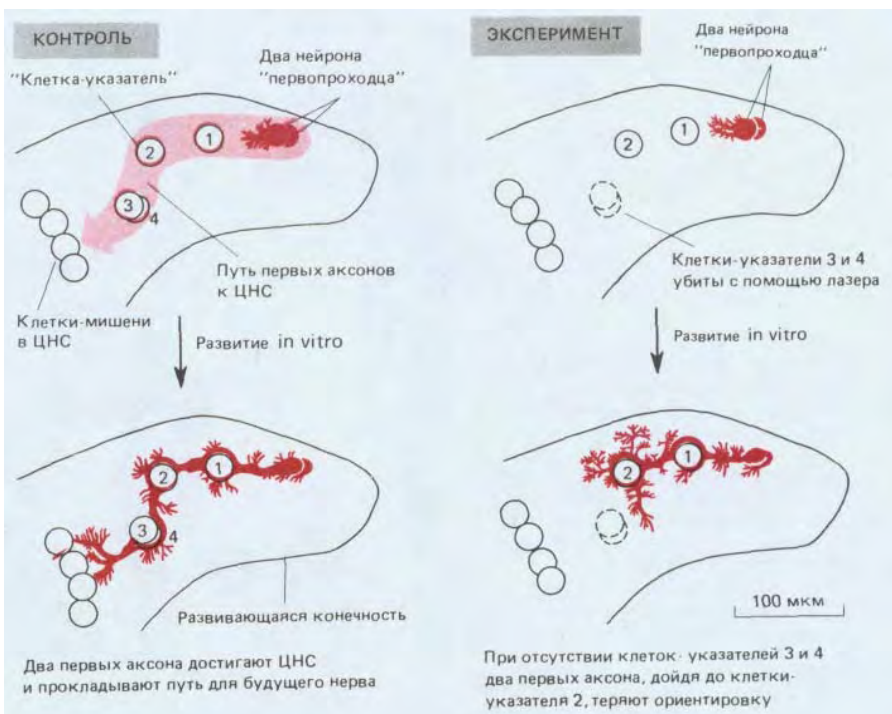


Рис. 19-66. В конечности у зародыша прямокрылого первые аксоны выбирают направление роста с помощью специальных клеток-«указателей». Если эти клетки разрушены, аксоны не способны выбрать верный путь. Позднее из клеток-указателей развиваются нейроны, аксоны которых направляются к ЦНС по путям, проложенным аксонами-первопроходцами. (По D. Bentley, M. Caudy, Nature, **304,** 62-65, 1983.)

Если перерезать периферический нерв, то аксоны обычно регенерируют с помощью конусов роста, образующихся на разрезанных концах. Эти конусы движутся по тоннелям из базальной пластинки, которую ранее создали шванновские клетки, одевавшие аксоны дистальной, дегенерировавшей части нерва. Имеются данные в пользу того, что ключевую роль в этом процессе играют *ламинин* (разд. 14.2.15) или комплекс ламинина с протеогликаном, содержащим гепарансульфат: они связываются с рецепторами, которые находятся в мембране конуса роста и относятся к семейству *интегринов* (разд. 14.2.17). Ламинин и упомянутый комплекс ускоряют рост нейритов in vitro, а антитела к комплексу подавляют регенерацию нервов in vivo.

Хотя белки, подобные N-CAM, Ng-CAM и ламинину, играют, по-видимому, важную роль в клеточной адгезии и в управлении миграцией конусов роста, свойства этих белков не дают ясного ответа на главный вопрос: почему одни конусы роста выбирают один путь, тогда как другие предпочитают другой?

19.7.9. Организация нервных связей определяется различиями в свойствах нейронов: теория нейронной специфичности [57]

В развивающейся конечности куриного зародыша, как и в других подобных случаях, конусы роста аксонов продвигаются по строго определенным путям (рис. 19-67). Эти пути на своем протяжении ветвятся, и разные ветви идут к разным мишеням. Поэтому в каждой из точек ветвления перед конусом роста встает проблема выбора одного из возможных направлений. Этот ряд последовательных выборов осуществляется в соответствии с точными правилами, и в результате создается высокоупорядоченная система соединений между нейронами и их клетками-мишенями. Такие соединения можно проследить при помощи метода с использованием пероксидазы хрена (разд. 19.1.5). Оказалось, что тела мотонейронов, иннервирующих одну и ту же мышцу, образуют компактную группу, расположенную у всех особей



Рис. 19-67. Зачатки крыльев восьмидневного куриного зародыша (световая микрофотография, препарат окрашен серебром, чтобы выявить расположение нервов). Сравните правое крыло с левым: нервы располагаются на обеих сторонах тела почти в точности симметрично, что указывает на существование эффективной системы, направляющей рост нервов. Отдельные конусы роста должны делать выбор в каждой точке разветвления пути, и этот выбор делается в соответствии со строгими правилами.

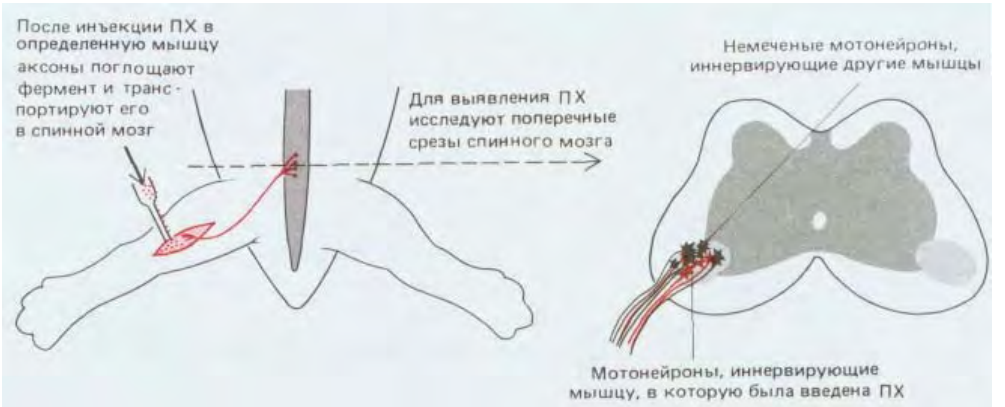


Рис. 19-68. Здесь показано, как можно использовать ретроградный перенос пероксидазы хрена (ПХ) для выявления спинномозговых мотонейронов, иннервирующих определенную мышцу. Для ясности размеры нейронов, изображенных на поперечном разрезе, преувеличены и показано только три нейрона. На самом деле к каждой мышце подходит нерв, содержащий отростки множества нервных клеток (обычно нескольких сотен), тела которых в спинном мозгу расположены тесной группой.

в одном и том же участке спинного мозга, а тела клеток, иннервирующих разные мышцы, находятся в разных участках (рис. 19-68).

Как же происходит выбор пути? Не попадают ли конусы роста в разные места назначения просто в зависимости от исходной позиции, подобно автомашинам на скоростном шоссе, где запрещено менять полосу движения? Чтобы проверить эту гипотезу, у раннего зародыша вырезали кусочек нервной трубки и перевертывали его на 180° еще до того, как начинался рост аксонов. Тогда мотонейроны, первоначально предназначенные для иннервации мышцы А, оказывались на месте нейронов для мышцы В, и наоборот. Как выяснилось, если перемещение не слишком велико, то конусы роста перемещенных нейронов все же приходят к мышцам, соответствующим первоначальному положению нейрона в нервной трубке, хотя для этого они вынуждены двигаться по измененным путям (рис. 19-69). Это означает, что нейроны, предназначенные для разных мышц, не эквивалентны (разд. 16.4.6): подобно нейронам головного мозга у мышей *reeler,* они различаются не только своим расположением, но и какими-то внутренними химическими особенностями. Такую неэквивалентность нейронов обычно называют **нейронной специфичностью.** Как уже говорилось в гл. 16, клетки соединительной ткани в различных областях зачатка конечности тоже неэквивалентны, так что различия между ними могли бы определять выбор того или иного пути тем или иным конусом роста.

В центральной нервной системе как у позвоночных, так и у беспозвоночных тоже, судя по имеющимся данным, определенные группы нейронов или глиальных клеток несут специфические метки, которые узнаются другими нейронами и тем самым помогают установить избирательные нервные связи. Но мы еще почти ничего не знаем о молекулах, участвующих в таких процессах как в центральной, так и в периферической нервной системе.



Рис. 19-69. Схематически представленный здесь эксперимент на курином зародыше показывает, что мотонейроны даже после их перемещения посылают свои аксоны к тем мышцам, которые соответствуют первоначальному положению этих нейронов в спинном мозгу зародыша. Обратите внимание, что аксоны мотонейронов, расположенных на разных уровнях спинного мозга, сближаются, образуя сплетение у основания конечности, а затем расходятся для иннервации различных мышц. Конус роста, проходящий через сплетение, должен выбрать один из многих путей.

19.7.10. Ткани-мишени выделяют нейротропные факторы, регулирующие рост и выживание нервных клеток [58]

В начальном участке пути движение конуса роста направляется тканями, в которых он перемещается; приблизившись к месту назначения, конус роста попадает под влияние мишени - часто еще до прямого соприкосновения с нею - благодаря действию нейротропных факторов, выделяемых клетками-мишенями. Как мы уже видели на примере ганглия, иннервирующего зачаток челюсти, такие факторы могут служить хемотаксическими аттрактантами для конусов роста. Однако еще важнее то, что от них зависит выживание конусов роста, ветвей аксона и целых нейронов.

Первым из нейротропных факторов был идентифицирован фактор роста нервов (ФРН), и в настоящее время он лучше всего изучен. Этот фактор был открыт случайно в ходе экспериментов с трансплантацией тканей и опухолей куриным эмбрионам. Трансплантаты одного вида опухолей необычайно обильно иннервировались и вызывали значительное разрастание определенных групп периферических нейронов в близлежащих областях. Такому влиянию подвергались нейроны только двух категорий: сенсорные и симпатические (подкласс периферических вегетативных нейронов, регулирующих сокращение гладкой мускулатуры и функцию экзокринных желез). Экстракты из опухоли стимулировали также рост нейритов в культуре этих нейронов. Дальнейшие исследования показали, что в культуре другой ткани-слюнной железы самца мыши - такой же стимулирующий фактор образуется в огромных количествах. Эта «игра природы» пока еще не разгадана, так как образование ФРН клетками слюнной железы не имеет видимой связи с главной функцией этого фактора, но так или иначе открылась возможность получать чистый ФРН в количествах, достаточных для выяснения его химической природы и изучения его функций. Оказалось, что активность связана с белком-димером, содержащим две идентичные полипептидные цепи из 118 аминокислотных остатков каждая. После того как ФРН был выделен в чистом виде, появилась возможность получать антитела, блокирующие его действие. Если антитела к ФРН ввести мыши, у которой развитие нервной системы еще не закончено, то большая часть симпатических нейронов и некоторые сенсорные нейроны погибнут.

Точно так же и в культуре ткани без ФРН симпатические нейроны и часть сенсорных нейронов погибают; если же ФРН присутствует, они выживают и образуют нейриты (рис. 19-70). Влияние на выживание нейронов и на образование нейритов - два разных эффекта ФРН. Это можно наглядно показать, если поместить клетки в средний отсек культуральной чашки, отделенный от двух боковых отсеков перегородкой, которая препятствует смешиванию сред, но допускает прорастание нейритов (рис. 19-71). Когда ФРН имеется во всех трех отсеках, нейриты прорастают во все три. Если в одном из боковых отсеков ФРН отсутствует, нейриты в него не прорастают. И наконец, если ФРН удалить из бокового отсека, в котором уже появились нейриты, то они уменьшаются и втягиваются до перегородки между отсеками. Клетки в центральном отсеке не смогут выжить и выпустить отростки, если ФРН не будет присутствовать здесь с самого начала; но если вначале во все отсеки добавить ФРН, а затем, после того как нейриты прорастут в боковые отсеки, убрать ФРН из центрального, то клетки выживают и рост нейритов в боковых отсеках продолжается.

Таким образом, ФРН не только оказывает локальное воздействие на отдаленные части клетки, поддерживая и стимулируя рост нейритов и конусов роста, но служит также фактором выживания для всей клетки в целом. При локальном воздействии на конус роста наблюдается прямой, быстрый эффект, не зависящий от связи с телом клетки; если

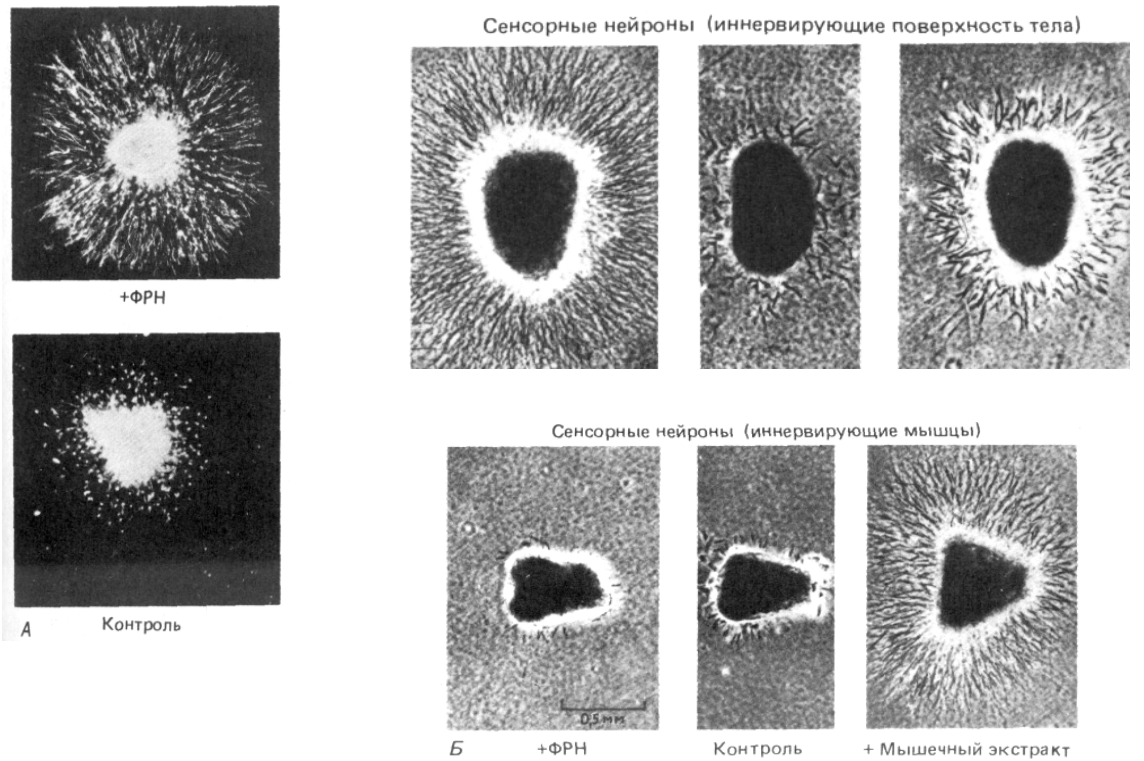


Рис. 19-70. А. Симпатический ганглий, культивируемый в течение 48 ч с ФРН (вверху) и без него (внизу) (микрофотография в темном поле). Нейриты прорастают из симпатических нейронов только в присутствии ФРН. Каждая культура содержит также шванновские клетки, мигрировавшие из ганглия, но ФРН на эти клетки не влияет. Б. Поведение сенсорных нейронов, которые росли 24 ч в среде с ФРН (слева), в контрольной среде без ФРН (в середине) и в среде, содержащей экстракт скелетной мышцы (справа) (фазовоконтрастные микрофотографии). Сенсорные нейроны, представленные в верхнем ряду, иннервируют главным образом поверхность тела (но, кроме того, посылают небольшое число отростков к скелетным мышцам и другим мишеням). Большая часть этих клеток реагирует на ФРН так же, как и симпатические нейроны, показанные на фото А. Сенсорные нейроны на фотографиях нижнего ряда в норме иннервируют скелетные мышцы (обеспечивая сенсорную обратную связь). Эти нейроны нечувствительны к действию ФРН, но сильно реагируют на добавление экстракта, приготовленного из скелетной мышцы. (А -с любезного разрешения Naomi Kleitman; Б из A.M. Davies. Dev. Biol., 115; 56-67, 1986.)

среду, содержащую ФРН, заменить средой без ФРН, то конусы роста уже через 1-2 мин прекратят движение. Помимо непосредственной реакции на ФРН конусы роста клеток, чувствительных к ФРН, поглощают его путем эндоцитоза, а затем ФРН в пузырьках переносится с помощью ретроградного аксонного транспорта к телу нейрона, где этот фактор (или какой-то внутриклеточный посредник), по-видимому, предотвращает гибель клетки.

19.7.11. В результате гибели клеток число выживших нейронов регулируется в соответствии с количеством ткани-мишени [59]

У позвоночных спинномозговые сенсорные ганглии образуются по сегментарной схеме, соответствующей ряду позвонков в позвоночнике. Каждый ганглий состоит из группы сенсорных нейронов, происшедших из нервного гребня и посылающих один нейрит наружу, к периферии тела, а другой - внутрь, к спинному мозгу. Вначале зачатки всех ганглиев одинаковы по размерам, но у взрослого животного ганглии тех сегментов тела, где прикреплены конечности, содержат гораздо больше нейронов, чем ганглии других сегментов (рис. 19-72). Такое различие обусловлено главным образом гибелью клеток: значительная часть нейронов во многих ганглиях погибает. Если на ранней стадии развития удалить зачаток конечности, то ближайшие к нему ганглии уменьшатся до размеров остальных; и напротив, если в грудную область зародыша пересадить еще один, добавочный зачаток конечности, то он будет иннервироваться и на этом уровне в ганглии сохранится необычно большое число нейронов. Полагают, что выживание нейронов ганглия в соответствии с количеством ткани-мишени в значительной степени

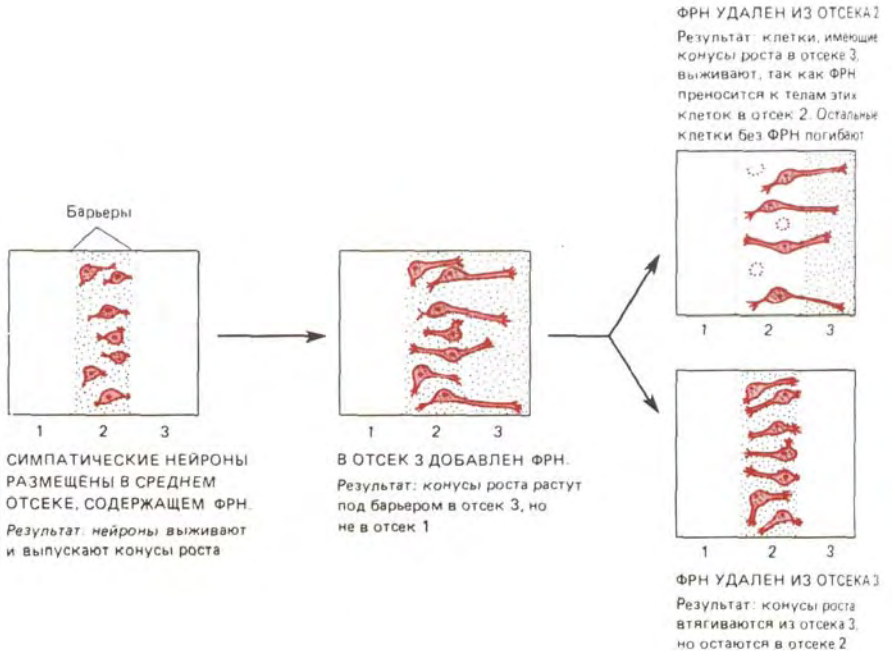


Рис. 19-71. Схема эксперимента на культуре ткани, доказывающего, что симпатические нейроны не только нуждаются для своего выживания в ФРН, но посылают конусы роста лишь туда и поддерживают нейриты лишь в тех областях, где имеется ФРН. Обратите внимание, что до тех пор, пока клетка имеет нейриты, доходящие до участков с ФРН, для выживания клетки не требуется присутствия ФРН в области ее тела.

опосредуется ФРН, выделяемым этой тканью. Если на определенной стадии развития в эмбрион ввести дополнительное количество ФРН, то многие из тех нейронов, которые в норме погибли бы, сохранятся, так же как и нейроны в области ампутированного зачатка конечности.

Может показаться, что образовывать избыточные нейроны, а затем частично уничтожать их с целью регулирования их числа слишком расточительно. И все же эта стратегия широко используется у позвоночных в процессах развития как сенсорных, так и моторных нейронов, как в центральной нервной системе, так и в периферической. Например, около 50% всех мотонейронов, иннервирующих скелетные мышцы, погибают в процессе развития зародыша в течение нескольких дней после установления контакта с мышцами-мишенями. По-видимому, выживание нейронов в этих системах регулируют разнообразные трофические факторы, вроде ФРН, выделяемые клетками-мишенями. Такая

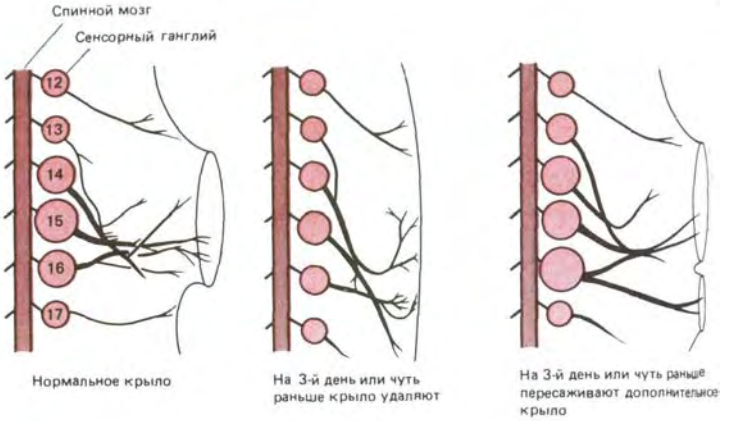


Рис. 19-72. Регуляция выживания нервных клеток в сенсорных спинномозговых ганглиях куриного эмбриона. Изображены ганглии и нервы 8-9-дневного зародыша. Размеры каждого ганглия соответствуют числу выживших нейронов, которое в свою очередь зависит от количества ткани, иннервируемой данным ганглием. (По V. Hamburger, J. Exp. Zool. 68: 449 -494, 1934 а. J.Exp. Zool., 80; 347-389, 1939.)

стратегия обладает рядом важных преимуществ. Во-первых, этот механизм позволяет автоматически корректировать отклонения в относительных размерах различных частей тела. Во-вторых, эти процессы облегчают эволюцию: если в результате мутаций изменится величина какой-то части тела, то число иннервирующих ее нейронов будет автоматически приспосабливаться к этому и не понадобится дополнительных мутаций, изменяющих программу образования нейронов. И наконец, небольшое число нейротропных факторов, таких как ФРН, могут регулировать количественное соответствие большого числа мишеней и источников их иннервации, даже если система связей очень сложна. Благодаря аксонному транспорту фактор, выделяемый данной мишенью, селективно переносится в тела нейронов, иннервирующих эту мишень, а не каких-либо других нейронов, которые могут быть расположены там же и имеют сходные рецепторы, но посылают аксоны в другие места. Таким образом, гибель клеток, регулируемая нейротропными факторами роста, может помогать установлению точного соответствия между числом клеток в различных частях нервной системы.

19.7.12. Нервные связи создаются и разрушаются на протяжении всей жизни [60]

Есть данные, что даже в нормальной, неповрежденной нервной ткани дендриты и окончания аксонов непрерывно втягиваются и отрастают вновь. Например, можно наблюдать, как определенные нейроны зрелого вегетативного ганглия мыши втягивают одни дендритные ветви и выпускают другие в течение месяца (рис. 19-73). В нормальных условиях такие изменения происходят медленно и в ограниченной степени, но если часть клеток-мишеней лишается иннервации, этот механизм включается на полную мощность. Это можно показать на примере скелетной мышцы, перерезав часть иннервирующих ее аксонов; тогда денервированные мышечные волокна, очевидно, выделяют способный к диффузии фактор, стимулирующий образование новых конусов роста из нервных окончаний, сохранившихся на соседних мышечных клетках (рис. 19-74). Этот фактор скелетных мышц пока не идентифицирован, но для гладких мышц показано, что аналогичную роль там играет ФРН. Денервация приводит к увеличению количества ФРН в гладкой мышце (по крайней мере отчасти из-за того, что теперь его поглощает и отводит меньшее число нервных окончаний); избыток ФРН стимулирует рост аксонов по направлению к мышце, и иннервация восстанавливается.

Очевидно, в интактном организме ФРН действует так же, как и в культуре in vitro, т. е. как фактор выживания, определяющий, будут ли клетки жить или погибнут, и как локальный стимулятор активности конусов роста, регулирующий ветвление концевых участков аксона. Первая функция имеет особое значение в период развития, а вторая важна на протяжении всей жизни; однако обе они приводят к одному результату: с их помощью иннервация приспосабливается к потребностям мишени. Сейчас появляется все больше данных о существовании других нейротропных факторов роста, выполняющих такие же функции по отношению к другим видам нервных клеток (см. рис. 19-70). В следующем разделе мы увидим, что такие факторы, вероятно, играют важную роль в регулирующем влиянии электрической активности на развитие систем нервных связей.

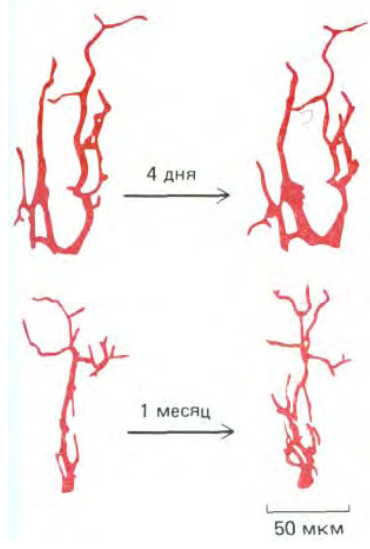


Рис. 19-73. Перестройка дендритов у нейронов верхнего шейного (вегетативного) ганглия мыши. У наркотизированного животного осторожно обнажали ганглий и для выявления дендритов вводили путем микроинъекции флуоресцентный краситель в тело одной из нервных клеток. Рану зашивали, а через несколько дней или недель операцию повторяли и снова вводили краситель в тот же самый нейрон. На верхних и нижних рисунках показаны два нейрона, повторно окрашенные через разные промежутки времени. Чем длиннее интервал между первой и второй инъекциями, тем больше изменений в картине ветвления дендритов. (Перепечатано с разрешения D. Purves, R. D. Hadley, Nature, 315, 404-406, 1985. Copyright 1985 Macmillan Fournals Limited.)



Рис. 19-74. Если перерезать часть аксонов, иннервирующих скелетную мышцу, то какая-то доля волокон этой мышцы лишится иннервации, тогда как у соседних волокон иннервация сохранится. Перерезанные аксоны дегенерируют, а оставшиеся аксоны, хотя они не были повреждены, начинают активно ветвиться в тех местах, где они лежат вблизи денервированного волокна. Через один или два месяца те из новых веточек, которые нашли путь к освободившимся участкам на денервированном мышечном волокне, образуют на нем стабильные синапсы и восстанавливают иннервацию, а все остальные веточки отмирают. Этот феномен позволяет предполагать, что денервированные мышечные волокна выделяют какой-то «фактор, способствующий прорастанию». (Воспроизведено с разрешения M.C. Brown, R. L. Holland, W. G. Hopkins, Ann. Res. Neurosci., 4, 17-42, 1981. Copyright 1981 by Annual Reviews Inc.)

Заключение

Развитие нервной системы удобно разделить на три этапа, которые частично перекрываются. На первом этапе нейроны образуются в соответствии с собственной программой клеточной пролиферации и вновь образующиеся клетки мигрируют из мест своего «рождения», чтобы упорядоченным образом расположиться в других участках. На втором этапе от клеток отрастают аксоны и дендриты, кончики которых продвигаются с помощью конусов роста. Конусы роста перемещаются по строго определенным путям, направляемые главным образом контактными взаимодействиями с поверхностью других клеток или с компонентами внеклеточного матрикса. Нейроны, предназначенные для связи с разными мишенями, ведут себя так, как если бы они обладали разными, только им присущими особенностями (нейронная специфичность), что может выражаться в различных свойствах клеточной поверхности, позволяющих конусам роста выбирать разные пути. В конце своего пути конус роста встречается с клеткой, с которой он должен образовать синапс, и оказывается под влиянием нейротропных факторов, выделяемых этой клеткой. Эти факторы регулируют ветвление аксона и передвижение конусов роста вблизи ткани-мишени и, кроме того, контролируют выживание нейронов, которым принадлежат конусы роста. С помощью этих двух эффектов нейротропные факторы, такие как фактор роста нервов (ФРН), регулируют плотность иннервации тканей-мишеней. На третьем этапе развития нервной системы, который будет рассмотрен в следующем разделе, образуются синапсы, а затем схема связей уточняется с помощью механизмов, зависящих от электрической активности.

19.8. Образование и уничтожение синапсов [61]

Встреча конуса роста с клеткой-мишенью - один из ключевых моментов в развитии нейронов: и конус роста, и клетка-мишень подвергаются трансформации, в результате которой устанавливается синаптическая связь. Но на этом процесс развития не заканчивается - многие из синапсов, образовавшихся вначале, позднее уничтожаются, а где-то на этой же клетке-мишени образуются новые. Такие локальные изменения схемы синаптических связей дают возможность исправлять ошибки в образовании связей и осуществлять «тонкую настройку»: первоначальная схема связей и осуществлять «тонкую настройку»: первоначальная схема связей приблизительно намечается с помощью факторов, направляющих миграцию конусов роста по специфическим путям к клеткам-мишеням; затем образуются предварительные синаптические соединения, позволяющие пре- и постсинаптическим клеткам взаимодейство-

вать; и наконец, первоначальные соединения пересматриваются и уточняются с помощью механизмов, использующих как нейротропные факторы, так и электрические сигналы в виде потенциалов действия и синаптических потенциалов. Поэтому внешние стимулы, способные возбуждать электрическую активность в нервной системе, могут влиять на развитие схемы нервных связей.

В этом разделе мы рассмотрим образование синапсов на молекулярном уровне, а также правила, определяющие, будет ли синапс образован или уничтожен, и роль электрической активности в регуляции этих процессов. Мы начнем с синапсов между мотонейронами и клетками скелетной мышцы, поскольку они лучше изучены.

19.8.1. Синаптический контакт приводит к специализации данных участков растущего аксона и клетки-мишени для функции передачи сигналов [62]

Ранние этапы образования нервно-мышечного синапса проще всего наблюдать в культуре. Здесь можно видеть, что значительная часть молекулярного механизма синаптической передачи существует еще до того, как конус роста достигнет мышечной клетки. По мере того как конус роста продвигается вперед, он при электрическом возбуждении тела нейрона выделяет небольшие количества ацетилхолина (рис. 19-75). Мембрана конуса роста уже содержит потенциал-зависимые кальциевые каналы для сопряжения электрического возбуждения с секрецией; эти каналы служат также для распространения нервных импульсов по эмбриональному нейриту (в котором поначалу нет натриевых каналов). Еще до того, как мышечная клетка иннервируется, она уже имеет ацетилхолиновые рецепторы (эмбрионального типа) и может реагировать на ацетилхолин деполяризацией и сокращением.

Относительно мало эффективную синаптическую передачу можно наблюдать уже через несколько минут после первого контакта конуса роста с мышечной клеткой. Однако для образования зрелого синапса и у конуса роста, и у клетки-мишени должна развиться структурная и биохимическая специализация - процесс, который обычно продолжается несколько дней. Конус роста прекращает движение, в нем накапливаются синаптические пузырьки, а в определенном участке образуются «активные зоны» для быстрого и узколокального высвобождения ацетилхолина (разд. 19.3.3). Ацетилхолиновые рецепторы на поверхности мышечной клетки концентрируются на синаптическом участке, а в других областях плазматической мембраны их становится мало. Как достигается такое перераспределение рецепторов для нейромедиатора? Этот

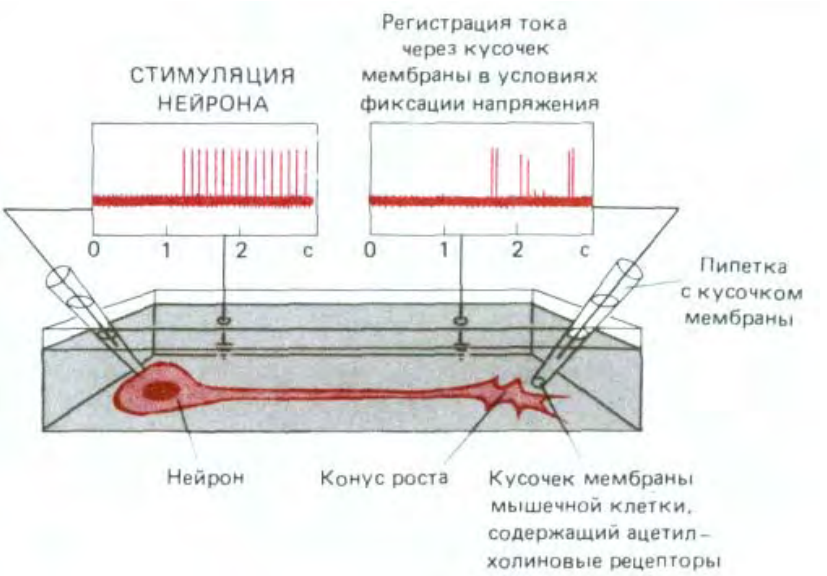


Рис. 19-75. Схема эксперимента, показывающего, что из конуса роста мотонейрона в ответ настимуляцию тела клетки высвобождаются порции ацетилхолина. Ничтожные количества выделяемого медиатора обнаруживают, измеряя его влияние на силу тока, протекающего через кусочек мембраны мышечного волокна, которая закрывает отверстие микропипетки и содержит множество рецепторов ацетилхолина. Из конуса роста ацетилхолин выделяется в гораздо меньших количествах и с меньшей регулярностью, чем из зрелого синаптического окончания.

вопрос касается не только мышечных клеток, но и нейронов: для успешной передачи сигналов и обработки информации нейроны тоже должны концентрировать определенные виды рецепторов и ионных каналов в определенных областях плазматической мембраны.

19.8.2. Рецепторы ацетилхолина диффундируют в мембране мышечной клетки и собираются в месте формирования синапса [63]

В зрелой мышечной клетке концентрация ацетилхолиновых рецепторов в области синапса в тысячу с лишним раз выше, чем на других участках мембраны. Эксперименты с гашением флуоресценции (разд. 6.2.9) показывают, что рецепторы в области синапса «привязаны» и не могут свободно передвигаться в плоскости мембраны. В отличие от этого в неиннервированной мышечной клетке зародыша рецепторы распределены по всей ее поверхности и способны диффундировать более свободно. Когда с мышечной клеткой образует контакт аксон мотонейрона, рецепторы ацетилхолина начинают скапливаться на участке мембраны, лежащем под окончанием аксона; а вновь синтезируемые рецепторы тоже включаются теперь в мембрану главным образом в области развивающегося синапса (рис. 19-76). Рецепторы становятся закрепленными на месте - возможно, в результате взаимной адгезии, а может быть, благодаря связыванию с цитоскелетом или с внеклеточным матриксом. Некоторые важные сведения относительно того, каким образом аксон «выбирает» место будущего синапса, получены при изучении регенерации нервно-мышечного соединения.

19.8.3. Место нервно-мышечного контакта отличается устойчивой специализацией базальной мембраны [64]

Каждую мышечную клетку окружает базальная мембрана (см. рис. 19-16 и 19-18, А). В случае сильного повреждения мышечное волокно дегенерирует и отмирает, а его остатки уничтожаются макрофагами. Однако базальная мембрана при этом сохраняется и служит как бы «формой», в которой из оставшихся стволовых клеток может образоваться новое мышечное волокно (разд. 17.6.3). Даже тогда, когда разрушено не только мышечное волокно, но и нервное окончание, место прежнего нервно-мышечного контакта все еще можно определить по неровной поверхности базальной мембраны в этом участке. Эта синоптическая базальная мембрана обладает особыми химическими свойствами, и можно получить антитела, которые будут избирательно связываться с ее поверхностью. Интересно то, что именно синаптическая базальная мембрана определяет локализацию остальных компонентов синапса. Значение базальной мембраны для образования нервно-мышечного соединения было продемонстрировано в серии экспериментов на амфибиях. После одновременного разрушения нерва и мышечной клетки когда остается лишь пустая оболочка из базальной мембраны, можно



Рис. 19-76. Скопление ацетилхолиновых рецепторов в том участке мембраны развивающегося мышечного волокна, где образуется синапс между окончанием двигательного аксона и клеткой. Это скопление отчасти обусловлено диффузией рецепторов из соседних участков мембраны мышечного волокна, а отчасти тем, что здесь в мембрану включаются вновь синтезируемые рецепторы. По-видимому, эти процессы не зависят от выделения из нервного окончания нейромедиатора, так как происходят и в присутствии веществ, блокирующих потенциалы действия в нервной клетке, и даже при наличии во внеклеточной среде высоких концентраций α-бунгаротоксина (компонент змеиного яда, который, связываясь с ацетилхолиновыми рецепторами, блокирует их взаимодействие с ацетилхолином). Рецепторы, скопившиеся в месте образования синапса, находятся как бы в ловушке-скорость обновления этих рецепторов здесь гораздо ниже, чем в других участках мембраны, и время жизни достигает пяти дней и более.

легко убедиться, что синаптический участок базальной мембраны специфически удерживает молекулы ацетилхолинэстеразы, которая в нормальном синапсе гидролизует выделяемый нервными окончаниями ацетилхолин. К тому же базальная мембрана удерживает в месте синапса и окончание аксона; если разрушить только мышечную клетку, оно остается связанным с базальной мембраной на протяжении многих дней. С другой стороны, удаление базальной мембраны с помощью коллагеназы приводит к тому, что окончание аксона отделяется даже при сохранности мышечной клетки.

В самом деле, по-видимому, базальная мембрана сама по себе способна направлять процесс регенерации окончания аксона. Это было продемонстрировано в следующем опыте: нерв и мышечную клетку разрушают, а затем дают возможность нерву регенерировать, и хотя чехол из базальной мембраны остается пустым, регенерирующий аксон отыскивает место первоначального синапса и образует здесь синаптическое окончание. Кроме того, базальная мембрана контролирует локализацию ацетилхолиновых рецепторов в месте синаптического соединения. Если разрушить нерв и мышечное волокно и дать возможность регенерировать мышце, а регенерацию нерва блокировать, то рецепторы ацетилхолина, синтезируемые регенерировавшей мышцей, локализуются преимущественно в области прежнего соединения, несмотря на отсутствие нерва (рис. 19-77). Как и следовало ожидать, экстракты, приготовленные из базальной мембраны нервно-мышечного соединения, содержат белок, называемый агрином, который способствует агрегации рецепторов в культуре мышечных клеток.

Очевидно, когда аксон контактирует с мышечной клеткой, он откладывает (или заставляет откладывать мышечную клетку) такие макромолекулы, как агрин, стабилизирующие синаптическое соединение. Однако базальной мембраны недостаточно для образования нервно-мышечного синапса: далеко не все встречи аксона с мышечной клеткой приводят к образованию синапса, и не все вновь образуемые синапсы абсолютно стабильны.



Рис. 19-77. Эксперимент, показывающий, что специфические свойства базальной мембраны нервно-мышечного соединения регулируют локализацию других компонентов синапса.

19.8.4. Восприимчивость мышечной клетки к образованию синапсов регулируется ее электрической активностью [63, 65]

Если у крысы перерезать нерв и передвинуть его конец так, чтобы он оказался над соседней нормальной мышцей, то перерезанные аксоны будут регенерировать и расти по поверхности этой мышцы; но до тех пор, пока нормальная иннервация этой мышцы не нарушена, чужеродные аксоны не будут вступать в контакт с отдельными клетками этой мышцы и образовывать на них синапсы. Если же перерезать нерв, в норме иннервирующий эту мышцу, то будут наблюдаться поразительные изменения. За несколько дней изменятся метаболизм и свойства мембраны мышечных клеток - в частности, будет синтезироваться и включаться в мембрану большое количество новых ацетилхолиновых рецепторов, что сделает клетку сверхчувствительной к ацетилхолину. В то же время мышечные клетки станут восприимчивыми к образованию новых синапсов с «чужими» аксонами, растущими на поверхности мышцы. Хотя эти аксоны предпочитают участки, где раньше находились синапсы, они смогут образовывать синапсы и на новых участках мышечных клеток. Как только синапсы будут сформированы, равномерное распределение ацетилхолиновых рецепторов исчезнет (как и в процессе эмбрионального развития)-они сохранятся в высоких концентрациях лишь в местах образования синапсов (рис. 19-78).

При денервации мышцы прекращается нормальная стимуляция этой мышцы со стороны нерва: к описанным выше изменениям приводит главным образом отсутствие электрической активности в мышечных клетках; оно же приводит и к выделению фактора, стимулирующего ветвление аксонов, о котором упоминалось раньше (разд. 19.8.4). Все эти эффекты денервации, в результате которых мышца становится более восприимчивой к образованию синапсов, можно воспроизвести с помощью местной анестезии интактного нерва, блокирующей проведение импульсов к мышце. И наоборот, если лишенную иннервации мышцу искусственно стимулировать через вживленные электроды, то чувствительность внесинаптических участков мембраны к ацетилхолину будет подавлена, так же как и образование новых синапсов. В норме электрическая активность, вызываемая нейроном, уже образовавшим синапс, «оберегает» клетку от нежелательной дополнительной иннервации.

Примерно таким же образом электрическая активность регулирует элиминацию синапсов во время развития. У зародыша позвоночных к неиннервированной мышце практически одновременно приходит много нервных окончаний, и вначале образуется немало лишних синапсов. Свойственная зрелой мышце иннервация, при которой на каждой мышечной клетке имеется только по одному синапсу, создается в результате двух разных процессов, разделенных во времени. Первый из них - это гибель избыточных мотонейронов, а второй - удаление лишних ветвей аксона (элиминация синапсов).



Рис. 19-78. Эксперимент на камбаловидной мышце крысы, который показывает, что денервированная мышечная клетка способна к образованию синапса после пересадки чужеродного нервного волокна. Обратите внимание, что в результате денервации распределение ацетилхолиновых рецепторов в мембране мышечной клетки изменяется: вновь синтезируемые рецепторы распределяются по всей клеточной поверхности, хотя в месте прежнего нервно-мышечного соединения концентрация рецепторов остается особенно высокой. После денервации изменяется и электрическая возбудимость мембраны, так как в мембране появляется новый класс потенциал-зависимых каналов, которые относительно устойчивы к действию тетродотоксина.

19.8.5. Электрическая активность мышцы влияет на выживание эмбриональных мотонейронов [59, 66]

Как уже отмечалось, примерно 50% мотонейронов зародыша погибает вскоре после образования синаптических контактов с мышечными клетками. Такую гибель лишних нейронов можно предотвратить, блокировав нервно-мышечную передачу (например, α-бунгаротоксином), или, наоборот, усилить, подвергнув мышцу прямой электрической стимуляции. Это позволяет предполагать, что электрическая активность мышцы регулирует образование в мышце нейротропного фактора, необходимого для выживания эмбриональных мотонейронов. Этот фактор, возможно, идентичен тому фактору, который, как полагают, вызывает рост аксонных окончаний по направлению к денервированной мышце. Когда мышца бездействует в результате блокирования синаптической передачи или из-за отсутствия иннервирующих аксонов, этот фактор образуется в больших количествах как сигнал о том, что клетка нуждается в иннервации. Электрическая активация мышцы под действием искусственных стимулов или в результате спонтанного возбуждения иннервирующих ее мотонейронов подавляет образование фактора, и часть незрелых мотонейронов зародыша гибнет в конкуренции за его оставшиеся малые количества.

19.8.6. Электрическая активность регулирует конкурентную элиминацию синапсов в соответствии с «правилом возбуждения» [61, 67]

Даже после гибели половицы эмбриональных мотонейронов на развивающейся мышце остается большой избыток синапсов. Каждый мотонейрон сильно ветвится, образуя синапсы на нескольких мышечных клетках, и каждая клетка чаще всего иннервируется отростками нескольких нейронов. Для того чтобы создалась система связей, присущая взрослому организму, необходима элиминация всех синапсов, кроме одного, на каждой мышечной клетке. Процесс элиминации синапсов во время развития был хорошо изучен на камбаловидной мышце (m. soleus) крысы, где к моменту рождения отдельная мышечная клетка иннервируется в среднем тремя мотонейронами. В последующие две-три недели каждый нейрон втягивает значительную часть своих терминальных ветвей, пока каждая клетка не будет иннервироваться одной-единственной ветвью одного мотонейрона (рис. 19-79). Если бы излишние ветви аксонов уничтожались случайным образом,

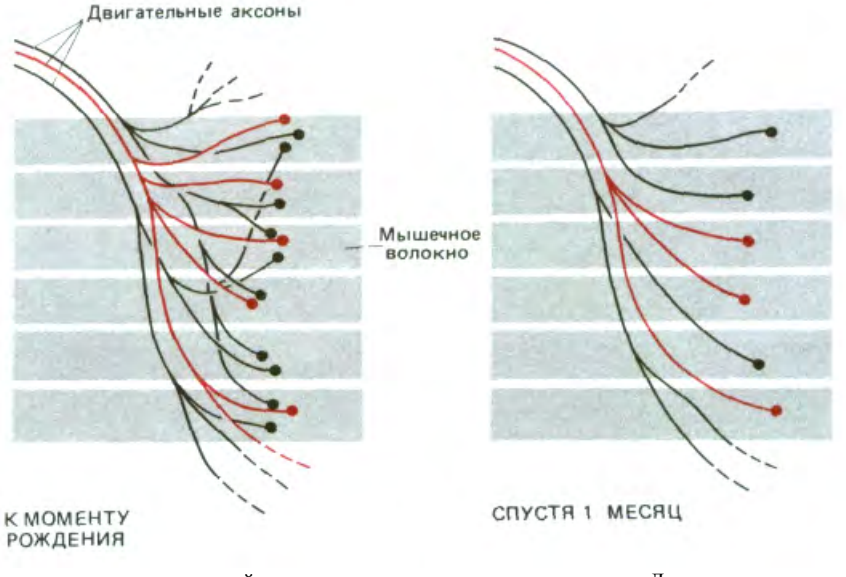


Рис. 19-79. Устранение лишних синапсов в скелетной мышце млекопитающего после рождения. Для ясности показаны далеко не все концевые ветви двигательных аксонов; на самом деле один аксон в зрелой мышце иннервирует своими разветвлениями несколько сотен мышечных волокон. Все аксонные ветви, иннервирующие одно незрелое мышечное волокно, обычно образуют синапсы на одном и том же небольшом участке мышечной клетки и конкурируют до тех пор, пока не останется лишь один синапс.



Рис. 19-80. Один из нескольких молекулярных механизмов, которые могли бы лежать в основе «правила возбуждения». Согласно представленной здесь гипотезе, сохранение синапса зависит от фактора роста нервов, выделяемого постсинаптической клеткой. Секрецию этого фактора вызывает локальная электрическая стимуляция, когда к синапсу приходит потенциал действия; в остальное время медиатор выделяется спонтанно, но с меньшей скоростью. Фактор роста поглощается окончанием аксона, которое только что было активировано, путем эндоцитоза вместе с мембранным материалом сразу после выделения медиатора (разд. 19.3.4). Окончания, поглощающие фактор роста, увеличиваются в размерах и накапливают вещества, укрепляющие синаптическую связь. Чем чаще осуществляется стимуляция мышцы, тем скорее истощаются внутриклеточные запасы фактора и тем реже происходит его спонтанное высвобождение без стимуляции. Поэтому неактивные нервные окончания, конкурирующие с активными, не могут получить необходимого количества фактора роста, постепенно сжимаются и в конце концов отмирают. Два окончания, активные в разное время, конкурируют за ограниченное количество фактора роста, содержащегося в постсинаптической клетке. Так как крупные окончания поглощают больше фактора роста и в результате становятся еще крупнее, конечный исход такой конкуренции может зависеть от незначительной разницы в первоначальных размерах окончаний. Согласно другой гипотезе, в результате стимуляции постсинаптической клетки происходит локальное выделение или активация протеазы, которая разрушает неактивные синапсы, в то время как активные синапсы каким-то образом защищены от действия этой протеазы.

то некоторые мышечные волокна могли бы совсем лишиться иннервации, тогда как на других сохранилось бы несколько синапсов. Тот факт, что на каждой клетке остается только один синапс, означает, что процесс элиминации синапсов носит конкурентный характер. Действительно, конкурентное устранение лишних синапсов во всех отделах нервной системы представляет собой один из важнейших механизмов, регулирующих развитие нервных связей и, как мы увидим позже, последующую модификацию этих связей под действием внешних стимулов. Хотя молекулярные механизмы конкурентной элиминации синапсов остаются непонятными, видимо, конкуренция в большинстве случаев подчиняется нескольким простым общим правилам, применимым как для нервно-мышечных, так и для межнейронных синапсов.

Во-первых, хотя сначала конкуренция и включает элемент случайности, но окончательный результат совершенно однозначен - нейрон либо выживает, либо полностью уничтожается. Во-вторых, обычно конкуренция происходит только между синапсами, находящимися относительно близко друг к другу на одной клетке-мишени. Таким образом, при нормальном развитии типичного волокна скелетной мышцы млекопитающего приходящие нервные окончания образуют синапсы на одном и том же небольшом участке и конкурируют между собой, пока не останется только один синапс. Если же искусственно вызвать образование нескольких синапсов на одном и том же волокне, но на расстоянии 1 мм и более друг от друга, то множественная иннервация сохранится.

В-третьих, и это самое важное, конкурентная элиминация синапсов зависит от электрической активности как в аксонах, так и в иннервируемых ими клетках. Например, она замедлится, если блокировать возбуждение развивающейся мышцы, воздействуя местноанестезирующим препаратом на нерв или α-бунгаротоксином - на нервно-мышечные соединения. В большинстве изученных до сих пор систем инактивация части иннервирующих аксонов приводит к тому, что оставшиеся активными аксоны начинают контролировать большее число клеток-мишеней. Это выглядит так, как будто в районе активного синапса стимулируемая клетка-мишень выделяет какой-то фактор, способствующий разрушению близлежащих синапсов, или, наоборот, перестает синтезировать вещество, необходимое для поддержания синапсов.

Но здесь есть один загадочный момент. Если в результате синаптической стимуляции клетки-мишени синапсы разрушаются, то почему тогда остаются и укрепляются те синапсы, через которые клетка получает стимуляцию? По-видимому, ответ можно найти в следующем правиле: всякое возбуждение клетки-мишени укрепляет те синапсы, где пресинаптическое окончание аксона было перед этим активно, и способствует гибели тех синапсов, где оно находилось в состоянии покоя.

Поэтому решающую роль играют временные отношения между

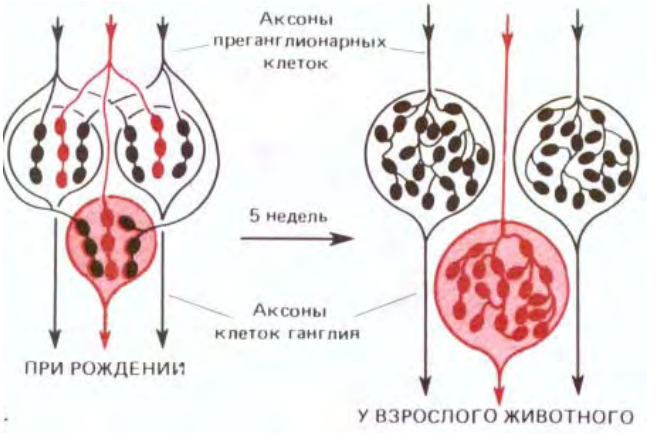


Рис. 19-81. Изменения в расположении синапсов на нейронах подчелюстного ганглия крысы, происходящие вскоре после рождения. Вначале каждая клетка иннервируется несколькими аксонами. Эти аксоны конкурируют до тех пор, пока в результате элиминации синапсов не останется лишь один аксон. Этот единственный аксон образует на клетке множество синапсов, которые уже не конкурируют между собой. (По D. Purves, J.W. Lichtman, Physiol. Rev., 58, 821-862, 1978.)

активацией аксона и клетки-мишени; когда несколько независимо активируемых нейронов образуют контакты с одной и той же клеткой, каждый из этих нейронов стремится укрепить свой синапс и содействовать элиминации синапсов, образованных другими нейронами.

Молекулярный механизм, лежащий в основе сформулированного выше «правила возбуждения», не ясен. На рис. 19-80 представлена одна из возможных гипотез, а в подписи к рисунку упоминается еще одно объяснение. Как бы то ни было, есть данные о том, что это правило справедливо для многих различных систем, и теперь мы рассмотрим его применительно к межнейронным синапсам.

19.8.7. Синхронно активные окончания аксонов образуют поддерживающие друг друга синапсы [68]

Одно из последствий «правила возбуждения» можно наблюдать в подчелюстном ганглии крысы, где каждый нейрон к моменту рождения иннервируется аксонами примерно от пяти пресинаптических нейронов, находящихся в стволе головного мозга. К концу первого месяца постнатальной жизни благодаря конкурентной элиминации синапсов каждый нейрон ганглия будет иннервирован уже только одним таким аксоном. Но к этому времени оставшийся аксон образует много новых концевых веточек, формирующих синапсы на других участках той же клетки, поэтому общее число синапсов будет больше, чем вначале (рис. 19-81). Очевидно, что ветви одного аксона должны обладать одним общим свойством, отличающим их от ветвей другого аксона такого же типа: все они будут возбуждаться одновременно. Но в соответствии с «правилом возбуждения» близкие друг к другу окончания, которые активируются одновременно, взаимно поддерживают образованные ими синапсы, в то время как окончания, возбуждающиеся независимо, конкурируют между собой.

19.8.8. Число сохраняющихся синапсов зависит от числа дендритов у постсинаптического нейрона [69]

Так как конкуренция синапсов за выживание отчасти определяется расстоянием между ними, окончательный результат зависит от строения постсинаптической клетки. Нейроны подчелюстного ганглия в структурном отношении атипичны - у них нет дендритов, поэтому синаптическая конкуренция происходит на близких друг к другу участках тела клетки и в результате остаются синапсы, образуемые только одним аксоном. У большинства других нейронов имеется много дендритов, так что они и у взрослых особей продолжают получать сигналы из разнообразных

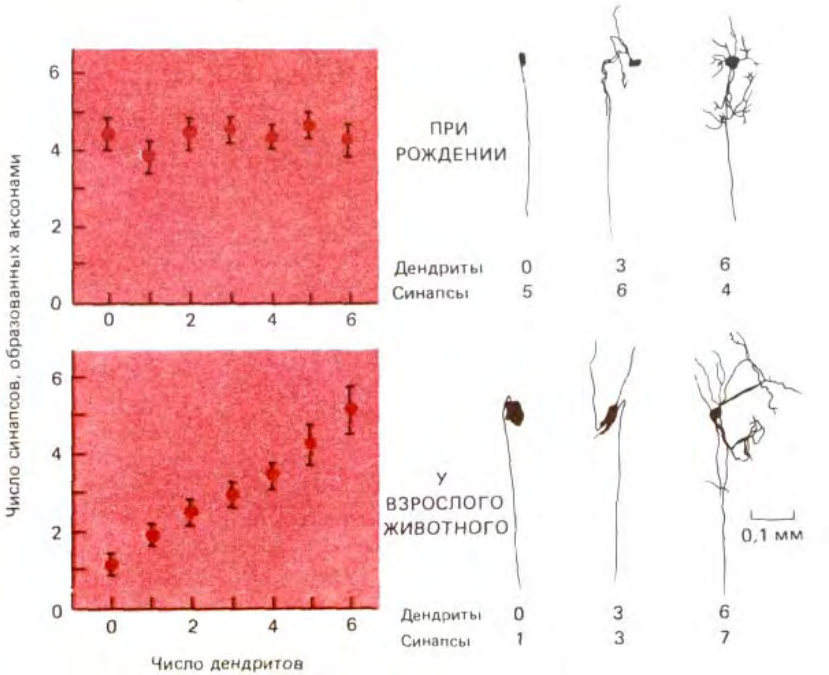


Рис. 19-82. Взаимосвязь между числом первичных дендритов и числом аксонов, образовавших синапсы на отдельных клетках, в ресничном ганглии кролика в процессе развития. При рождении среднее число входных синапсов не зависит от числа дендритов. У взрослых особей среднее число синапсов, «переживших» период конкурентной элиминации, пропорционально числу дендритов. Справа - отдельные клетки ганглия, на примере которых иллюстрируется эта взаимосвязь. (По D. Purves, R. I. Hume, J. Neurosci. 1: 441 -452, 1981, и R.I. Hume, D. Purves, Nature, 293, 469-471, 1981.)

источников, что существенно для выполнения ими интегрирующей функции. Роль дендритов в регулировании элиминации синапсов хорошо видна на примере ресничного ганглия кролика, где у некоторых нейронов много дендритов, а у других очень мало или нет совсем (рис. 19-82). При рождении все нейроны иннервированы одинаковым числом пресинаптических аксонов - примерно четырьмя или пятью. Но во взрослом организме клетки без дендритов получают сигналы только от одного аксона, тогда как число аксонов, иннервирующих другие клетки, возрастает прямо пропорционально числу дендритов. Однако синапсы на одном дендрите обычно образованы окончаниями одного и того же аксона. Поэтому, вероятно, каждый дендрит представляет собой отдельную и независимую территорию, так что синапсы на одном дендрите не конкурируют с синапсами на других дендритах. Так же как и в скелетной мышце, конкуренция носит локальный характер и зависит от асинхронности возбуждения.

Возможно, что наиболее глубокий смысл зависимости конкуренции синапсов от возбуждения раскрывается в тех случаях, когда стимулы от внешнего мира контролируют «настройку» анатомических связей между нейронами. Это особенно четко выявляется при изучении развития зрительной системы у позвоночных. Ниже будут рассмотрены соответствующие данные о млекопитающих.

19.8.9. У детенышей млекопитающих связи в зрительной системе подвержены влиянию сенсорного опыта [70]

В момент рождения зрительная система млекопитающего остается еще незрелой. Первые годы (у человека) или первые месяцы (у кошек или обезьян) представляют собой особый чувствительный (критический) период, когда система нервных связей подвергается настройке, и отсутствие нормального зрительного опыта в этот период может привести к серьезным и необратимым последствиям. Типичный пример этого - так называемый «ленивый» глаз как результат детского косоглазия. Дети, страдающие косоглазием, часто привыкают пользоваться только одним

глазом, так как другой постоянно косит и на его сетчатке редко получается точно сфокусированное изображение. Если косоглазие вовремя исправить и ребенок научится пользоваться обоими глазами, то в дальнейшем глаза будут функционировать нормально. Но если не скорректировать косоглазие в детстве, то неиспользуемый глаз почти полностью и навсегда утратит способность видеть, и уже никакие линзы не помогут - состояние, называемое амблиопией. При этом сам глаз остается нормальным: дефект находится в мозгу. Прежде чем перейти к объяснению природы этого дефекта, нужно рассмотреть некоторые анатомические особенности зрительной системы взрослых млекопитающих.

19.8.10. В зрительной системе млекопитающих активные синапсы стремятся занять место неактивных [71]

У таких млекопитающих, как человек или кошка, поля зрения двух глаз почти совпадают, и зрительные сигналы от них комбинируются в мозгу, что обеспечивает бинокулярное стереоскопическое зрение. Это возможно благодаря тому, что аксоны, передающие сигналы от эквивалентных областей двух сетчаток, образуют синапсы в одних и тех же участках мозга (рис. 19-83). В первичной зрительной зоне коры каждого из полушарий головного мозга имеются две упорядоченные «карты» (проекции) противоположной половины зрительного поля - одна от левого глаза, а другая от правого. Однако эти две проекции накладываются не совсем точно: входы от двух глаз разделены - они представлены узкими чередующимися полосками, так называемыми колонками глазодоминантности. Эта картина схематично представлена на рис. 19-83 и может быть продемонстрирована путем введения в один глаз радиоактивных аминокислот. Меченые молекулы поглощаются нейронами сетчатки и транспортируются по аксонам нервных клеток в кору мозга, каким-то образом проходя через синапсы в «передаточных станциях» - латеральных коленчатых телах. Например, на радиоавтографах срезов зрительной коры взрослой обезьяны ясно видно, что меченые полоски шириной около 0,5 мм, получающие информацию от «меченого» глаза, перемежаются немечеными полосками такой же ширины, получающими входные сигналы от «немеченого» глаза (рис. 19-84).

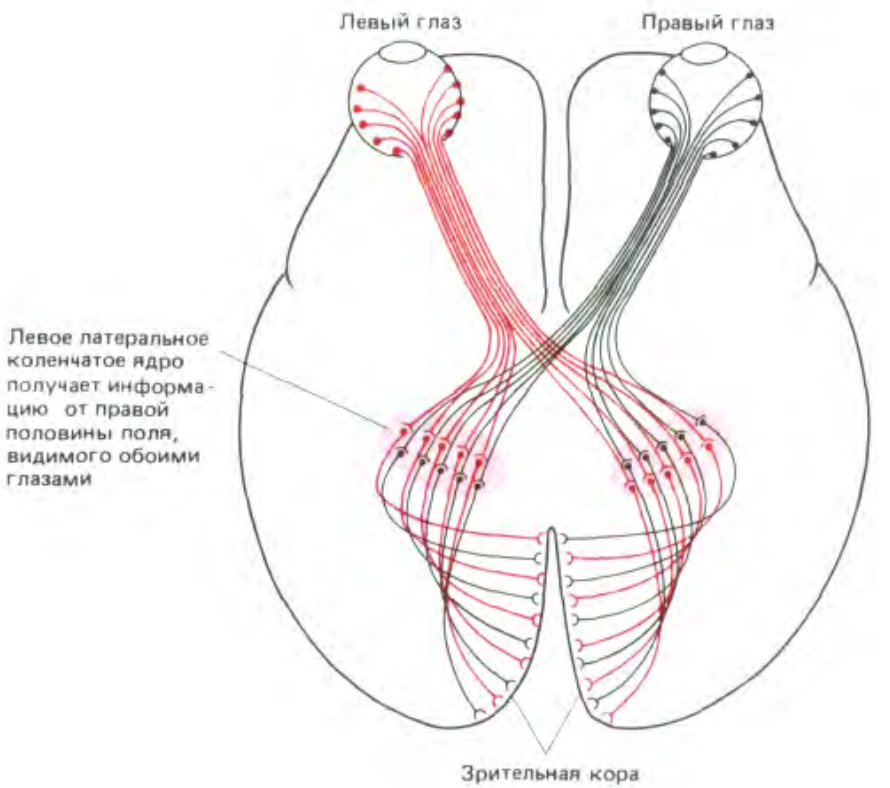


Рис. 19-83. Схема главных зрительных путей человека. Входные сигналы от правого и от левого глаза распределяются таким образом, что информация об одних и тех же участках поля зрения попадает в одни и те же области мозга. Обратите внимание, что вся информация от левой половины каждой сетчатки (т. е. от правой половины зрительного поля) поступает в левое полушарие мозга, а от правой половины обеих сетчаток - в правое полушарие.

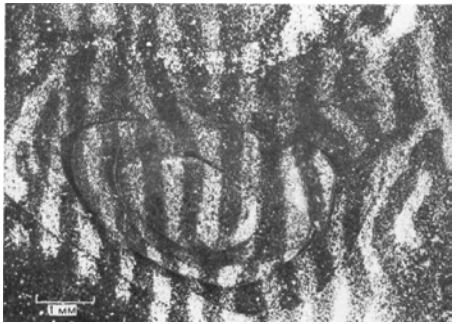


Рис. 19-84. Колонки глазодоминантности в зрительной коре мозга нормальной обезьяны. В один глаз вводили радиоактивный пролин, и животное жило еще 10 дней, в течение которых радиоактивная метка транспортировалась к участкам коры, получающим информацию от этого глаза. Затем приготовляли срезы коры, параллельные ее поверхности, и получали радиоавтограф. При исследовании радиоавтографа в темном поле зёрна, лежащие над радиоактивным участком, выглядят светлыми на темном фоне. Приводимое здесь изображение смонтировано из микрофотографий нескольких серийных срезов, проходивших через кору мозга на разной глубине. Колонки глазодоминантности, связанные с меченым глазом (светлые полосы), имеют ту же ширину, что и колонки, связанные с немеченым глазом (темные полосы). [D. H. Hubel, T. N. Wiesel, S. Le Vay, Philos. Trans. R. Soc. (Biol.), 278, 377-409, 1977.]

Однако в период развития, когда зрительные связи только начинают устанавливаться, никаких колонок глазодоминантности различить не удается: проекции двух сетчаток совпадают полностью. Лишь позднее (обычно в первые недели жизни) эти проекции разделяются на присущие взрослому организму чередующиеся полоски в результате конкурентной элиминации окончаний аксонов. По-видимому, процесс образования системы связей подчиняется «правилу возбуждения»: аксоны, передающие сигналы от соседних точек сетчатки одного глаза, обычно возбуждаются синхронно друг с другом, но асинхронно с аксонами, несущими сигналы от другого глаза. Аксоны, возбуждающиеся синхронно, взаимно поддерживают и укрепляют синапсы, образованные ими на данной корковой клетке, но вытесняют синапсы от других аксонов. Процесс разделения проекций на чередующиеся полосы можно остановить искусственной стимуляцией обоих зрительных нервов, заставляя аксоны, несущие информацию от левого глаза, возбуждаться строго одновременно с аксонами от правого глаза; с тем же результатом можно вместо этого подавлять электрическую активность путем инъекции тетродотоксина (блокирующего потенциал-зависимые натриевые каналы) в оба глаза.

Наиболее поразительные функциональные последствия наблюдаются тогда, когда в чувствительный период один глаз специально оставляют закрытым и тем самым лишают зрительной стимуляции. Когда позже глаз открывают, животное ведет себя так, как если бы этот глаз полностью или частично ослеп. На радиоавтографах видно, что колонки глазодоминантности, связанные с закрытым глазом, резко сузились, а колонки, связанные с нормальным глазом, расширились и заняли освободившееся место (рис. 19-85). Опять-таки в соответствии с общим правилом, синапсы, образованные неактивными аксонами, исчезли, тогда как активные аксоны укрепили и умножили свои синапсы. Благодаря такому процессу территория коры мозга предоставляется аксонам, несущим информацию, и не растрачивается на бесполезные аксоны. После того как чувствительный период закончился, этот эффект уже необратим. Таким образом, объем и сложность кортикального аппара-

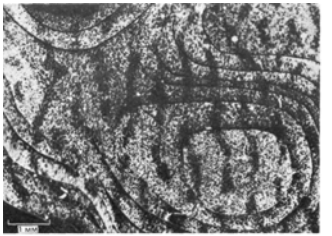


Рис. 19-85. Колонки глазодоминантности в коре обезьяны, один глаз которой был закрыт во время чувствительного периода. В другой глаз ввели радиоактивный пролин и затем приготовили радиоавтограф (см. подпись к рис. 19-84). Колонки глазодоминантности, связанные с глазом, лишенным зрительной информации (темные полосы), оказались суженными, а связанные с другим глазом-расширенными. Если ввести метку в глаз, который был закрыт, получится обратная картина: узкие светлые полосы будут чередоваться с широкими темными. [D. H Hubel, T. N. Wiesel, S. Le Vay, Philos. Trans. R. Soc. (Biol.), 278, 377-409, 1977.]

та - число нейронов и синапсов, с помощью которых взрослый организм будет обрабатывать сенсорную информацию,-зависят от сенсорной стимуляции, получаемой на раннем этапе жизни.

19.8.11. Для образования конвергирующих связей от обоих глаз необходима синхронная бинокулярная стимуляция [70, 71, 72]

Ранний зрительный опыт очень важен также для установления нервных связей, обеспечивающих бинокулярное зрение. Например, некоторые дети с неисправленным косоглазием все-таки используют оба глаза, но не вместе, а попеременно. В этом случае оба глаза сохраняют способность видеть, но восприятие глубины (стереоскопическое зрение) уже не развивается. Как показывает регистрация электрических ответов отдельных клеток мозга, это тоже можно объяснить влиянием возбуждения на судьбу синаптических связей.

Стереоскопическое зрение зависит от бинокулярно активируемых нейронов, т. е. нейронов, которые реагируют на конвергентные синаптические сигналы от обоих глаз. Такие нейроны можно выявить у подопытных животных, вводя микроэлектрод в зрительную кору мозга и наблюдая ответы отдельных клеток на стимуляцию того и другого глаза. Такие клетки обнаружены в определенных слоях зрительной коры, расположенных выше и ниже слоя, содержащего «монокулярные» нейроны, образующие четко выраженные колонки глазодоминантности. В норме у животного очень много «бинокулярных» нейронов. Но у животного, которое во время чувствительного периода было лишено синхронной бинокулярной стимуляции (из-за сильного косоглазия или потому, что ему поочередно закрывали на целый день то один глаз, то другой), таких нейронов почти не оказывается. Очевидно, входные связи от обоих глаз сохраняются у бинокулярных нейронов только в том случае, если стимуляция обоих глаз происходит синхронно. Если же синхронности нет, то аксоны, несущие информацию от одного глаза, будут конкурировать с аксонами, передающими сигнал тому же нейро-

ну, но от другого глаза; в результате у каждого нейрона в конце концов останутся входы только от одного глаза и возможность стереоскопического зрения будет утрачена.

19.8.12. Роль «правила возбуждения» в организации нервных связей с учетом индивидуального опыта [73]

Развитие бинокулярного зрения иллюстрирует общий организационный принцип: в результате синхронного возбуждения устанавливаются конвергентные связи. Это принцип, следующий из «правила возбуждения», помогает объяснить, каким образом в мозгу появляются нейроны, специфически реагирующие на определенные сложные комбинации ощущений, вызываемые объектами окружающего нас мира. Например, в мозгу приматов есть нейроны, которые, видимо, специфически возбуждаются при виде определенного лица. Иными словами, становится понятным, как мозг может в результате индивидуального опыта «настраиваться» таким образом, что его структура и функция отражают реально существующую взаимосвязь между отдельными феноменами внешнего мира. В этом смысле правило, по которому образуются и уничтожаются синапсы в ранний период жизни, представляет собой основу раннего обучения и памяти.

В этой главе уже высказывалось предположение, что в основе памяти лежит модуляция синаптической передачи в результате стойких химических изменений, происходящих в синапсах при связывании нейромедиаторов с рецепторами определенного типа. Имеет ли этот механизм какое-то отношение к описанным выше изменениям в системе синаптических связей в период развития? Видимо, по крайней мере в некоторых случаях химические и структурные изменения в синапсах тесно связаны между собой. Например, когда у аплизии вызывают долговременное привыкание или сенситизацию (разд. 19.5.3), повторяя определенные стимулы в течение нескольких дней, к химическим изменениям в синапсах добавляются еще изменения в размерах пресинаптических структур. Интересно также отметить, что у лягушек колонки глазодоминантности изменяются при введении агонистов или антагонистов NMDA-рецепторов, которые, как полагают, участвуют и в формировании следов памяти в гиппокампе (разд. 19.5.6).

Обо всем остальном, кроме приведенных выше данных, можно только строить гипотезы; память и механизмы образования и уничтожения синапсов еще во многом непонятны. Очевидно, однако, что эти проблемы относятся к ключевым вопросам биологии нервных клеток, и разрешение их, вероятно, позволит нам расширить и объединить наши представления о работе мозга на различных уровнях.

Заключение

Синапсы впервые образуются уже на ранних этапах развития, но первоначальная схема соединений подвергается длительной перестройке путем уничтожения старых синапсов и создания новых. При образовании синапса между мотонейроном и мышечным волокном происходят изменения в обеих клетках, а в разделяющей их базальной мембране накапливаются специфические вещества. Специализированная базальная мембрана нервно-мышечного соединения сохраняется после разрушения как двигательного аксона, так и мышечной клетки и регулирует восстановление компонентов синапса как в мышечном волокне, так и в окончании аксона при регенерации того и другого.

У млекопитающего при рождении на каждой мышечной клетке, как правило, имеется несколько синапсов, из которых все, крове одного,

впоследствии уничтожаются в результате конкуренции. Активация мышечного волокна в области одного синоптического соединения способствует уничтожению других синапсов, находящихся поблизости, но в данный момент неактивных. Когда пре- и постсинаптическая активность совпадает во времени, происходит укрепление синапса. Это так называемое «правило возбуждения», молекулярный механизм которого не ясен, позволяет, по-видимому, объяснить процессы образования и уничтожения синапсов во многих частях развивающейся нервной системы. В частности, это правило помогает понять, как происходит «настройка» системы синоптических связей в мозгу в соответствии с индивидуальным опытом животного.

Литература

Общая

The Brain, Sci. Am., 241(3), 1979.

Cooke I., Lopkin M., eds. Cellular Neurophysiology: A Source Book. New York: Holt, Rinehart and Winston, 1972.

Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.

Kandel E. R., Schwartz J. H. Principles of Neural Science, 2nd ed. New York: Elsevier, 1985.

Ktffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. R. From Neuron to Brain, 2nd ed. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.

Molecular Neurobiology. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 48, 1983.

Patterson P. H., Purves D. Readings in Developmental Neurobiology. Cold Spring Harbor, NY: Cold pring Harbor Laboratory, 1982.

Purves J., Lchtman J. M. Principles of Neural Development. Sunderland, MA: Sinauer, 1985.

Ramon y Cajal S. Histologie du Systeme Neryeux de 1'Homme et des Vertebres. Paris: Maloine, 1909-1911. (Reprinted, Madrid: Consejo Superior de Investigationes Cientificas, Instituto Ramon y Cajal, 1972.)

Цитированная

1. Bullock T.H., Orkand R., Grinnel A. Introduction to Nervous Systems, pp. 6 and 393-496. San Francisco: Freeman, 1977.

Nauta W. J. H., Feirtag M. Fundamental Neuroanatomy. New York: Freeman / Scientific American Library, 1986.

2. Ramon y Cajal S. Recollections of My Life (E. H. Craigie, trans.). In: Memoirs of the American Philosophical Society. Vol. 8. Philadelphia, 1937. Reprinted, New York: Carland, 1988.

Stevens C.F. The neuron. Sci. Am**., 241(3),** 48-59, 1979.

3. Hodgkin A. L., The Conduction of the Nervous Impulse. Liverpool, U. K.: Liverpool University Press, 1964.

4. Katz B. Nerve, Muscle and Synapse. New York: McGraw-Hill, 1966.

5. Bunge M. B. The axonal cytoskeleton: its role in generating and maintaining cell form. Trends Neurosci., **9**, 477-482, 1986.

Grafstein B., Forman D. S. Intracellular transport in neurons. Physiol. Rev**., 60**, 1167-1283, 1980.

Peters A., Palay S.L., Webster H., de F. The Fine Structure of the Nervous System. Philadelphia: Saunders, 1976.

Schwartz J.H. The transport of substances in nerve cells. Sci. Am., **242(4),** 152-171, 1980.

6. Jones E.G. Pathways to progress-the rise of modern neuroanatomical techniques. Trends Neurosci., **9**, 502-505, 1986.

LaVail J. H., LaVail M. M. Retrograde axonal transport in the central nervous system. Science, **176**, 1416-1417, 1972.

Schnapp B. J., Vale R, D., Sheetz M. P., Reese T. S. Single microtubules from squid axoplasm support bidirectional movement of organelles. Cell, **40**, 455-462, 1985.

Vale R. D. Intracellular transport using microtubule-based motors. Annu. Rev. Cell Biol., **3**, 347-378, 1987.

7. Goldstein G.W., Betz A.L. The blood-brain barrier. Sci. Am., **255(3),** 74-83, 1986.

KufflerS.W., Nicholls J.G., Martin A. R. From Neuron to Brain, 2nd ed., pp. 323-375. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.

Perry V. H., Gordon S. Macrophages and microglia in the nervous system. Trends Neurosci**., 11**, 273-277, 1988.

8. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, pp. 21-75. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
Kandel E. R., Schwartz J. H. Principles of Neural Science, 2nd ed., pp. 49 - 86. New York: Elsevier, 1985.
Kuffler S.W., Nicholls J.G., Martin A. R. From Neuron to Brain, 2nd ed, pp. 97-206. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
9. Hodgkin A. L., Rushton W. A. H. The electrical constants of a crustacean nerve fibre. Proc. R. Soc. Lond. (Biol.)., **133**, 444-479, 1946.
Roberts A., Bush B. M. H., eds. Neurones Without Impulses. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1981.
10. Baker P.P., Hodgkin A. L., Shaw T. The effects of changes in internal ionic concentrations on the electrical properties of perfused giant axons. J. Physiol., **164**, 355-374, 1962.
Chiu S. Y., Ritchie J. M., Rogart R. B., Stagg D. A quantitative desciption of membrane currents in rabbit myelinated nerve. J. Physiol**., 292**, 149 166, 1979.
Hodgkin A. L. Chance and design in electrophysiology: an informal account of certain experiments on nerve carried out between 1934 and 1952.
Hodgkin A. L., Huxley A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol., **116,** 449-472, 1952.
Hodgkin A.L., Huxley A. P., Katz B. Measurement of currnet-voltage relations in the membrane of the giant axon of Loligo. J. Physiol., **116**, 424-448, 1952.
Hodgkin A.L., Katz B. The cfflect of sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. J. Physiol., **108**, 37-77, 1949.
11. Hodgkin A. L., Huxley A. F. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J. Physiol., **117**, 500 544, 1952.
12. Bray G.M., Rasminsky M., Aquayo A.J. Interactions between axons and their sheath cells. Annu, Rev. Neurosci., **4**, 127-162, 1981.
French-Constant C., Raff M. C. The oligodendrocyte-type 2 astrocyte cell lineage is specialized for myelination. Nature, 323, 335-338, 1986,
Morell P., Norton W.T. Myelin. Sci. Am., 242(5), 88-118, 1980.
13. Brown D.A. Synaptic mechanisms. Trends Neuroci., **9**, 468-470, 1986.
Katz B. Nerve, Muscle and Synapse, pp. 97-158. New York: McGraw-Hill, 1966.
Kuffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. R. From Neuron to Brain, 2nd ed., pp. 207-320. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
14. Dale H. H., Feldberg W., Vogt M. Release of acetylcholine at voluntary motor nerve endings. J. Physiol., **86**, 353-380, 1936.
Fatt P., Katz B. An analysis of the end-plate potential recorded with an intracellular electrode. J. Physiol., **115**, 320-370, 1951.
Feldberg W. The early history of synaptic and neuromuscular transmission by acetylcholine: reminiscences of an eyewitness. In The Pursuit of Nature (A. L. Hodgkin, et al.), pp- 65-83. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1977.
15. Hill B. Ionic Channels of Excitable Membranes, pp. 76-98. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
Katz B., Miledi R. The timing of calcium action during neuromuscular transmission. J. Physiol., 189, 535-544, 1967.
Llinas R. Calcium in synaptic transmission. Sci. Am., **247(4)**, 56-65, 1982.
Miller R.J. Calcium signalling in neurons. Trends Neurosci., **11**, 415-419, 1988.
16. Couteaux R., Pecot-Dechavassine M. Vesicules synaptiques et poches au niveau des zones actives de la jonction neuromusculaire. Comptes Rendus Acad. Sci. (Paris) D, **271**, 2346-2349, 1970.
Heuser J. E., et al. Synaptic vesicle exocytosis captured by quick freezing and correlated with quantal transmitter release. J. Cell Biol. 81:275-300, 1979.
Hauser J. E., Reese T. S. Structural changes after transmitter release. Trends Neurosci., **11**, 458-464, 1988.
17. Del Castillo J., Katz B. Quantal components of the endplate potential. J. Physiol**, 124**, 560 573, 1954.
Fatt P., Katz B. Spontaneous subthreshold activity at motor nerve endings. J. Physiol., 117, 109-128, 1952.
18. Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, pp. 117-147. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
19. Lester H. A. The response to acetylcholine. Sci. Am., **236(2)**, 106-118, 1977.
Sakmann B., Bormann J., Hamill O. P. Ion transport by single receptor channels. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48**, 247-257, 1983.
20. Massoulie J.. Bon S. The molecular forms of cholinesterase and acetylcholinesterase in vertebrates. Annu. Rev. Neurosci., **5**, 57-106, 1982.
Taylor P., Schumacher M., MacPhee-Quigley K., Friedmann T, Taylor S. The struc-

ture of acetylcholinesterase: relationship to its function and cellular disposition. Trends Neurosci., **10**, 93-95, 1987.

21. Barnard E. A., Darlison M.G., Seeburg P. Molecular biology of the GABA-A receptor: the receptor/channel superfamily. Trends Neurosci., **10**, 502-509, 1987.

Grenningloh G., et al. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. Nature, **328**, 215-220, 1987.

Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, pp. 371-383. Sunderland, MA: Sinauer, 1984. (Evolution of channels.)

22. Gottlieb D.I. GABAergic neurons. Sci. Am., **285(2),** 38-45, 1988.

Mayer M. L., Westbrook G. L. The physiology of excitatory amino acids in the vertebrate central nervous system. Prog. Neurobiol., **28**, 197-276, 1987.

Sneddon P., Westfall D. P. Pharmacological evidence that adenosine triphosphate and noradrenaline are cotransmitters in the quinea pig vas deferens. J. Physiol., **347**, 561-580, 1984.

23. Snyder S.H. Drug and neurotransmitter receptors in the brain. Science, **224**, 22-31, 1984.

Nathanson N. M. Molecular properties of the muscarinic acetylcholine receptor. Annu. Rev. Neurosci., **10**, 195-236, 1987.

24. Bormann J. Electrophysiology of GABA-A and GABA-B receptor subtypes. Trend Neurosci., **11**, 112-116, 1988.

Snyder S.H. Drug and the Brain. New York: W. H. Freeman/Scientific American Books, 1987.

Tollman J. F., Gallager D. W. The GABAergic system: a locus of benzodiazepine action. Annu. Rev. Neurosci., **8**, 21-44, 1985.

25. Kuffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. Я From Neuron to Brain, 2nd ed., pp. 407-430. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.

26. Barren J. N. Motoneuron dendrites: role in synaptic integration. Fed. Proc., **34**, 1398-1407, 1975.

27. Coombs J. S., Curtis D. R., Eccles J. C. The generation of impulses in motoneurones. J. Physiol., **139**, 232-249, 1957.

Fuortes M. G. F., Frank K., Becker M. C. Steps in the production of motoneuron spikes. J. Gen. Physiol., **40**, 735-752, 1957.

28. Connor J. A., Stevens C. F. Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. J. Physiol., **213**, 31-53, 1971.

Hille B. Ionic Channels of Excitable Membranes, pp. 99-116. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.

Rogawski M. A. The A-current: how ubiquitous a feature of excitable cells is it? Trends Neurosci., **8**, 214-219, 1985.

29. Meech R. W. Calcium-dependent potassium activation in nervous tissues. Annu. Rev. Biophys. Bioeng., **7**, 1-18, 1978.

Tsien R. W., Lipscombe D., Madison D. V., Bley K.R., Fox A. P. Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. Trends Neurosci., **11**, 431-438, 1988. .

30. Bullock T. H., Horridge G. A. Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates, pp. 38-124. San Franciso: Freeman, 1965.

Llinas R., Sugimori M. Electrophysiological properties of in vitro Purkinje cell dendrites in mammalian cerebellar slices. J. Physiol., **305**, 197-213, 1980.

Shepherd G.M. Microcircuits in the nervous system. Sci. Am., **238(2),** 92-103, 1978.

31. Breitwieser G. E., Szabo G. Uncoupling of cardiac muscarinic and betaadrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. Nature, **317**, 538-540, 1985.

Levitan I. B. Modulation of ion channels in neurons and other cells. Annu. Rev. Neurosci., **11**, 119-136, 1988.

Nairn A. C., Hemmings H. C., Greengard P. Protein kinases in the brain. Annu. Rev. Biochem., **54**, 931 -976, 1985.

Pfaffinger P. J., Martin J. M., Hunter D. D., Nathanson N. M., Hille B. GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. Nature, **317**, 536-538, 1985.

32. Iversen L.L. The chemistry of the brain. Sci. Am., **241(3),** 118-129, 1979.

Snyder S.H. Drugs and the Erain. New York: W. H. Freeman/Scientific American Library, 1988.

33. Bloom F.E., Neuropeptides. Sci. Am., 245(4), 148-168, 1981.

Hokfelt T., Johanson O., Goldstein M. Chemical anatomy of the brain. Science, **225**, 1326-1334, 1984.

Jan V. N., Bowers C. W., Branton D., Evans L., L. Y. Peptides in neuronal function: studies using frog autonomic ganglia. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol**., 48**, 363-374, 1983.

Scheller R. H., Axel R. How genes control an innate behavior. Sci. Am., 250(3), 44- 52, 1984. (Neuropeptides in Aplysia).

34. Parley J., Alkon D. Cellular mechanisms of learning, memory, and information storage. Annu. Rev. Psychol., **36**, 419 494, 1985.

Kandel E.R. Small systems of neurons. Sci. Am., **241(3),** 60-70, 1979.

Morris R. G. M., Kandel E. R., Squire L. R., eds. Learing and Memory. Trends Neurosci., **11**, 125-181, 1988.

35. Greenberg S. M., Castellucci V. F., Bayley H., Schwartz J. H. A molecular mechanism for long-term sensitization in Aplysia. Nature, **329**, 62-65, 1987.

Montarolo P. G., el al. A critical period for macromolecular synthesis in long-term heterosynaptic facilitation in Aplysia. Science, **234,** 1249-1254, 1986.

Schwartz J. H., Greenberg S. M. Molecular mechanisms for memory: second-messenger induced modifications of protein kinases in nerve cells. Annu. Rev. Neurosci., **10**, 459-476, 1987.

Siegelbaum S. A., Camardo J. S., Kandel E. R. Serotonin and cyclie AMP close single K^+ channels in Aplysia sensory neurons. Nature, **299**, 413-417, 1982.

36. Dudai Y. Neurogenetic dissection of learning and short-term memory in Drosophila. Annu. Rev. Neurosci., **11**, 537-563, 1988.

Kandel E. R., et al. Classical conditioning and sensitization share aspects of the same molecular cascade in Aplysia. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol**., 48**, 821-830, 1983.

37. Biss T. V. P., Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. J. Physiol., **232**, 331 356, 1973.

Collingridge G. L., Bliss T.V.P. NMDA receptors their role in long-term potentiation. Trends Neurosci., **10**, 288-293, 1987

Cotman C. W., Monaghan D. T., Ganong A.H. Excitatory amino acid neurotransmission: NMDA receptors and Hebb-type synaptic plasticity. Annu. Rev. Neurosci, **11**, 61-80, 1988.

Lisman J.E., Goldring M.A. Feasibility of long-term storage of graded information by the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase molecules of the postsynaptic density. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 5320-5324, 1988.

Mishkin M., Appenzeller T. The anatomy of memory. Sci. Am., **256(6),** 80-89, 1987.

Morris R. G., Anderson E., Lynch G., Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. Nature, **319**, 774-776, 1986.

38. Barlow H. B., Mollon J. D., eds. The Senses. Cambridge, U. K.: Cambridge University Press, 1982.

Schmidt R. F., ed. Fundamentals of Sensory Physiology. New York: Springer, 1978.

Shepherd G. Neurobiology, 2nd ed., pp. 205-353. New York: Oxford University Press, 1988.

39. Katz B. Depolarization of sensory terminals and the initiation of impulses in the muscle spindle. J. Physiol., **111**, 261-282, 1950.

40. Hudspeth A. J. The cellular basis of hearing: the biophysics of hair cells. Science, **230**, 745-752, 1985.

Roberts W. M., Howard J., Hudspeth A. J. Hair cells: transduction, tuning, and transmission in the inner ear. Annu. Rev. Cell Biol**., 4**, 63-92, 1988.

Von Bekesy G. The ear. Sci. Am., **197(2),** 66—78, 1957.

41. Corey D.P., Hudspeth A.J. Compliance of the hair bundle associated with medianoelectrical transduction channels in the bullfrog's saccular hair cell. Neuron, **1**, 189-199, 1988.

Pickles J. O. Recent advances in cochlear physiology. Prog. Neurobiol., **24**, 1 -42, 1985.

42. Barlow H.B., Mollon J.D., eds. The Senses, pp. 102-164. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1982.

43. Baylor D.A., Lamb T.D., Yau K. W. Responses of retinal rods to single photons. J. Physiol., **288**, 613-634, 1979.

Schnapf J.L., Baylor D. A. How photoreceptor cells respond to light. Sci. Am, **256(4),** 40-47, 1987.

44. Stryer L. The molecules of visual excitation. Sci. Am., **257(1),** 32-40, 1987.

45. Fesenko E. E., Kolesnikov S.S., Lyubarsky A. L. Induction by cyclic GMP of cationic conductance in plasma membrane of retinal rod outer segment. Nature, **313**, 310-313, 1985.

Stryer L. The cyclic GMP cascade of vision. Annu. Rev. Neurosci., **9**, 87-119, 1986.

46. Koch K. W., Stryer L. Highly cooperative feedback control of retinal rod guanylate cyclase by calcium ions. Nature, **334**, 64-66, 1988.

Matthews H. R., Murphy R.L.W., FainG.L., Lamb T.D. Photoreceptor hight adaptation is mediated by cytoplasmic calcium concentration. Nature, **334**, 67-69, 1988.

Nakatani K., Yau K. W. Calcium and light adaptation in retinal rods and cones, Nature, **334**, 67-71, 1988.

47. Hubel D.H. Eye, Brain, and Vision. New York: W. H. Freeman / Scientific American Library, 1988.
Kuffler S. W., Nicholls J. G., Martin A. R. From Neuron to Brain, 2nd ed., pp. 19-96. Sunderland, MA: Sinauer, 1984.
Masland R. H. The functional architecture of the retina. Sci. Am., **255(6),** 102-111, 1986.
48. Cowan W.M. The development of the brain. Sci. Am**., 241(3),** 106-117, 1979.
Hopkins W. G., Brown M. C. Development of Nerve Cells and their Connections. Cambridge, U.K.: Cambridge University Press, 1984.
Parnavelas J. G., Stern C. D., Stirling R. V., eds. The Making of the Nervous System. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1988.
Purves D., Lichtman J. W. Principles of Neural Development. Sunderland, MA: Sinauer, 1985.
49. Alvarez-Buylla A., Nottebohm F. Migration of young neurons in aduit avian brain. Nature, **335**, 353-354, 1988.
Le Douarin N. M., Smith J. Development of the peripheral nervous system from the neural crest. Annu. Rev. Cell Biol., **4**, 375-404, 1988.
Stent G. S., Weisblat D. A. Cell lineage in the development of invertebrate nervous system. Annu. Rev. Neurosci., **8**, 45-70, 1985.
Williams R. W., Herrup K. The control of neuron number. Annu. Rev. Neurosci., **11**, 423-453, 1988.
50. Hollyday M., Hamburger V. An autoradiographic study of the formation of the lateral motor column in the chick embryo. Brain Res., **132**, 197-208, 1977.
Rakic P., Mode of cell migration to the superficial layers of the fetal monkey neocortex. J. Corp. Neurol., **145**, 61-84, 1972.
51. Caviness V.S. Neocortical histogenesis in normal and reeler mice: a developmental study based on [3H] thymidine autoradiography. Dev. Brain Res., **4**, 293-302, 1982.
McConnell S. K. Development and decision-making in the mammalian cerebral cortex. Brain Res. Rev., **13**, 1-23, 1988.
Rakic P. Specification of cerebral cortical areas. Science, 241, 170-176, 1988.
52. Bray D., Hollenbeck P. J. Growth cone motility and guidance. Annu. Rev. Cell Biol., **4**, 43-61, 1988. Harrison R.G. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. J. Exp. Zool., 9, 787-846, 1910.
Yamada K. M., Spooner B. S., Wessells N. K. Ultrastructure and function of growth cones and axons of cultured nerve cells. J. Cell Biol., **49**, 614-635, 1971.
53. Bamburg J. B. The axonal cytoskeleton: stationary or moving matrix? Thrends Neurosci., **11**, 248-249, 1988.
Bamburg J. R., Bray D., Chapman K. Assembly of microtubules at the tip of growing axons. Nature, **321**, 788-790, 1986.
Bray D. Surface movements during the growth of single explanted neurons. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **65**: 905-910, 1970.
Letourneau P. C., Ressler A. N. Inhibition of neurite initiation and growth by taxol. J. Cell Biol., **98**, 1355-1362, 1984.
54. Davies A. M. Molecular and cellular aspects of patterning sensory neurone connections in the vertebrate nervous system. Development, **101**, 185-208, 1987.
Kater S. B., Mattson M. P., Cohan C., Connor J. Calcium regulation of the neuronal growth cone. Trends Neurosci., **11**, 315-321, 1988.
Letourneau P. C. Cell-to-substratum adhesion and guidance of axonal elongation. Dev. Biol., **44**, 92-101, 1975.
Lumsden A. G.S., Davies A. M. Earliest sensory nerve fibres are guided to peripheral targets by attractants other than Nerve Growth Factor. Nature, **306**, 786-788, 1983.
Patel N., Poo M. M. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields. J. Neurosci., **2,** 483-496, 1984.
55. Bentley D., Caudy M. Navigational substrates for peripheral pioneer growth cones: limb-axis polarity cues, limb-segment boundaries, and guidepost neurons. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **48**, 573-585, 1983.
Berlot J., Goodman C. S. Guidance of peripheral pioneer neurons in the grasshopper: adhesive hierarchy of epithelial and neuronal surfaces. Science, **223**, 493-496, 1984.
Goodman C. S., Bastiani M. J. How embryonic nerve cells recognize one another. Sci. Am., **251(6),** 58-66, 1984.
56. Bixby J. L., Pratt R. S., Lilien J., Reichardt L. F. Neurite outgrowth on muscle cell surfaces involves extracellular matrix receptors as well as Ca^{2+}-dependent and independent cell adhesion molecules. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 2555-2559, 1987.
Chang S., Rathjen F. G., Raper J. A. Extension of neurites on axons is impaired by antibodies against specific neural cell adhesion molecules. J. Cell Biol., **104**, 355-362, 1987.

Jessell T. M. Adhesion molecules and the hierarchy of neural development. Neuron, **1**, 3 13, 1988.

Sanes J. R., Schaehner M., Covault J. Expression of several adhesive macromolecules (N-CAM, L1, Jl, NILE, uvomorulin, laminin, fibronectin, and a heparan sulfate protcoglycan) in embryonic, adult, and denervated adult skeletal muscle. J. Cell Biol., **102**, 420 431, 1986.

Tomaselli K.J., el al. N-cadherin and integrins: two receptor systems that mediate neuronal process outgrowth on astrocyte surfaces. Neuron, **1**; 33-43, 1988.

57. Lance-Jones C., Landmesser L. Motoneurone projection patterns in the chick hindlimb following early partial reversals of the spinal cord. J. Physiol., 302, 581-602, 1980. Landmesser L. The development of specific motor pathways in the chick embryo. Trends Neurosci., **7**, 336-339, 1984.

Sperrv R. W. Chemoaffinity in the orderly growth of nerve fiber patterns and connections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **50**, 703-710, 1963.

Udin S. B., Fawcett J. W. Formation of topographic maps. Annu. Rev. Neurosci., **11**, 289-327, 1988.

58. Campenot R. B. Local control of neurite development by nerve growth factor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 4516-4519, 1977.

Davies A., Lumsden A. Relation of target encounter and neuronal death to nerve growth factor responsiveness in the developing mouse trigeminal ganglion. J. Corp. Neurol**., 223**, 124-137, 1984.

Greene L. A. The importance of both early and delayed responses in the biologien actions of nerve growth factor. Trends Neurosci., **7**, 91 94, 1984.

Levi-Montalcini R., Calissano P. The nerve growth factor. Sci. Am., **240(6)**, 68-77, 1979.

59. Cowan W.M., Fawcett J. W., O'Leary D.D.M., Stanfield B. B. Regressive events in neurogenesis. Science, **225**, 1258 1265, 1984.

Davies A.M. Role of neurotrophic factors in development. Trends Genet., **4**, 139-144, 1988.

Hamburger V., Levi-Montalcini R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditons. J. Exp. Zool., **162**, 133-160, 1949.

Hamburger V., Vip J. W. Reduction of experimentally induced neuronal death in spinal ganglia of the chick embryo by nerve growth factor. J. Neurosci., **4**, 767-774, 1984.

Williams R. W., Herrup K. The control of neuron number. Annu. Rev. Neurosci., **11**, 423-453, 1988.

60. Brown M. C., Holland R. L., Hopkins W. G. Motor nerve sprouting. Annu. Rev. Neurosci., **4**, 17-42, 1981.

Davies A.M. The survival and growth of embryonic proprioceptive neurons is promoted by a factor present in skeletal muscle. Dev. Biol., **115**, 56-67, 1986.

Ebendal T.. Olson L., Seiger A., Hedlund K. O. Nerve growth factors in the rat iris. Nature, **286**, 25-28, 1980.

Purves D., Voyvodic J. T. Imaging mammalian nerve cells and their connections over time in living animals. Trends Neurosci., 10, 398 404, 1987.

61. Purves D., Lichtman J.W. Principles of Neural Development. Sunderland, MA: Sinaucr, 1985.

62. Hume R. I., Role L. W., Fischbach G. D. Acetylcholine release from growth cones detected with patches of acetylcholine receptor-rich membranes. Nature, **305**, 632-634, 1983.

Jarmillo F., Vtcini S.. Schuetze S. M. Embryonic acetylcholine receptors guarantee spontaneous contractions in rat developing muscle. Nature, **335**, 66 68, 1988.

Spitzer N. C. Ion channels in development. Annu. Rev. Neurosci., **2**, 363-397, 1979.

Young S. H., Poo M. M. Spontaneous release of transmitter from growth cones of embryonic neurones. Nature, **305**, 634-637, 1983.

63. Poo M.M. Mobility and localization of proteins in excitable membranes. Annu. Rev. Neurosci., **8**, 369-406, 1985.

Schuetze S. M., Role L. M. Development regulation of nicotinic acetylcholine receptors. Annu. Rev. Neurosci., **10**, 403-457, 1987.

64. Burden S. J., Sargent P. B., McMagan U.J. Acetylcholine receptors in regenerating muscle accumulate at original synaptic sites in the absence of the nerve. J. Cell Biol., **82**, 412-425, 1979.

Nitkin R. M., el al. Identification of agrin, a synaptic organizing protein from Torpedo electric organ. J. Cell Biol., **105**, 2471-2478, 1987.

Sanes J. R., Hall Z. W. Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. J. Cell Biol., **83**, 357 370, 1979.

65. Frank E., Jansen J. K. S., Lomo T., Westgaard R. H. The interaction between foreign and original motor nerves innervating the soleus muscle of rats. J. Physiol**., 247**, 725-742, 1975.

Jones R., Vrbova G. Two factors responsible for denervation hypersensitivity. J. Physiol., **236**, 517-538, 1974.

Lomo T., Jansen J. K. S. Requirement for the formation and maintenance of neuromuscular connections. Curr. Top. Dev. Biol., **16**, 253-281, 1980.

Lomo T., Rosenthal J. Control of ACh sensitivity by muscle activity in the rat. J. Physiol., **221**, 493-513, 1972.

66. Oppenheim R. W. Cell death during neural development. In: Handbook of Physiology, Vol. 1: Neuronal Development, (W. M. Cowan, ed.). Washington, DC: American Physiological Society, 1988.

Pittman R., Oppenheim R. W. Cell death of motoneurons in the chick embryo spinal cord. IV. Evidence that a functional neuromuscular interaction is involved in the regulation of naturally occurring cell death and the stabilization of synapses. J. Corp. Neurol, **187**, 425-446, 1979.

67. Brown M. C., Jansen J. K. S. Van Essen D. Polyneuronal innervation of skeletal muscle in new-born rats and its elimination during maturation. J. Physiol., **261**, 387-422, 1976.

Callaway E. M., Soha J. M., Van Essen D. Competition favouring inactive over active motor neurons during synapse elimination. Nature, **328**, 422—426, 1987.

O'Brien R.A.D., Ostberg A.J.C., Vrbova G. Protease inhibitors reduce the lose of nerve terminals induced by activity and calcium in developing rat soleus muscles in vitro. Neurosci., **12**, 637-646, 1984.

Ribshester R. R., Taxt T. Motor unit size and synaptic competiton in ral lumbrical muscles reinnervated by active and inactive motor axons. J. Physiol., **344**, 89 111, 1983.

68. Lichtman J. W. The reorganization of synaptic connexions in the rat submandibular ganglion during post-natal development. J. Physiol., **273**, 155-177, 1977.

Purves D., Lichtman J.W. Principles of Neural Development, pp. 271-328. Sunderland, MA: Sinauer, 1985.

69. Purves D. Modulation of neuronal competiton by postsynaptic geometry in autonomic ganglia. Trends Neurosci., **6,** 10-16, 1983.

70. Barlow H. Visual experience and cortical development. Nature, 258, 199-204, 1975. Wiesel T.N. Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. Nature, **299**, 583-591, 1982.

71. Fawcett J. W. Retinotopic maps, cell death, and electrical activity in the retinotectal and retinocollicular projections. In: The Making of the Nervous System (J.G. Parnavelas; C.D. Stern; R.V. Stirling, eds.), pp. 395-416. Oxford, U.K.: Oxford University Press, 1988.

Hubel D. H., Wiesel T.N. Ferrier lecture: functional architecture of macaque monkey visual cortex. Proc. R. Soc. Lond. Biol., **198**, 1 59, 1977.

Hubel D. H., Wiesel T.N., Le Vay S. Plasticity of ocular dominance columns in monkey striate cortex. Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol., **278**, 377-409, 1977.

Rakic P. Prenatal genesis of connections subserving ocular dominance in the rhesus monkey. Nature, **261**, 467-471, 1976.

Stryker M.P., Harris W.A. Binocular impulse blockade prevents the formation of ocular dominance columns in cat visual cortex. J. Neurosci., **6**, 2117-2133, 1986.

72. Hubel D. H., Wiesel T.N. Binocular interaction in striate cortex of kittens reared with artificial squint. J. Neurophysiol., **28**, 1041-1059, 1965.

Le Vay S.. Wiesel T. N., Hubel D. H. The development of ocular dominance columns in normal and visually deprived monkeys. J. Corp. Neurol, **191**, 1 51, 1980.

73. Baylis G. C., Rolls E. T., Leonard C. M. Selectivity between faces in the responses of a population of neurons in the cortex in the superior temporal sulcus of the monkey. Brain Res., **342**, 91-102, 1985.

Cline H. T., Debski E.A., Constantine-Paton M. N-methyl-D-aspartate receptor antagonist desegregates eye-specific stripes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**, 4342-4345, 1987,

Greenough W. T.. Bailey C. H. The anatomy of a memory: convergence of results across a diversity of tests. Trends Neurosci., **11**, 142-147, 1988.

Perrett D.I., Mistlin A.J., Chitty A.J. Visual neurones responsive to faces. Trends Neurosci., **10**, 358-364, 1987.

20. Особенности растительных клеток

Каждый из нас легко отличит растение от зверя или птицы. Более того, обычно нетрудно определить, какому организму - растительному или животному - принадлежит отдельная клетка, хотя иногда эта задача ставит в тупик. При внимательном исследовании клетки - ее цитоплазмы, органелл и, наконец, отдельных химических компонентов на первый план начинают выступать уже не различия, а черты сходства между двумя царствами живой природы. Лишь с помощью весьма тонких методов можно отличить митохондрии, ядра, рибосомы или составные части цитоскелета растительных клеток от соответствующих органелл клеток животных. Специфика растительной и животной жизни проявляется не в таких фундаментальных особенностях молекулярной организации живого, как репликация ДНК, биосинтез белков, окислительное фосфорилирование в митохондриях или конструкция клеточных мембран, а в более специализированных функциях клеток и тканей.

Исходя из сравнения последовательностей нулеотидов рибосомной РНК можно предположить, что в ходе эволюции эукариот дивергенция растений, дрожжей, беспозвоночных и позвоночных происходила относительно поздно (см. рис. 1-16). По-видимому, различия между растениями и животными накапливались примерно 600 млн. лет, и большая часть этих различий может быть сведена к двум важнейшим особенностям, приобретенным предками растений: способности связывать двуокись углерода в процессе фотосинтеза (см. гл. 7) и наличию жесткой клеточной стенки. Первое свойство дало растениям возможность самостоятельно создавать органические соединения, необходимые для их роста и метаболизма; второе свойство наложило жесткие ограничения на все поведение растений. В данной главе будут рассмотрены те особенности растительных клеток, которые определяются этими двумя свойствами.

20.1. Центральная роль клеточной стенки

Клеточная стенка в растительных тканях представляет собой сложный внеклеточный матрикс, окружающий каждую клетку. По сравнению с клетками животных, у большинства из которых на поверхности также имеется внеклеточный матрикс (см. разд. 14.2), стенка растительной клетки обычно гораздо толще, прочнее и, что самое главное, более жесткая. Большинство различий между растениями и животными в питании, переваривании, осморегуляции, росте, размножении, межклеточных связях, защитных механизмах, а также морфологии связаны со свойствами клеточной стенки. Например, приобретение стенкой растительной клетки такого свойства, как жесткость, обусловило потерю способности к передвижению. Неподвижный образ жизни сохранился у многоклеточных растений. Именно толстые клеточные стенки, хорошо различимые под микроскопом, позволили Роберту Гуку в 1663 г. впервые рассмотреть клетки и дать им то название, которым мы пользуемся до сих пор.

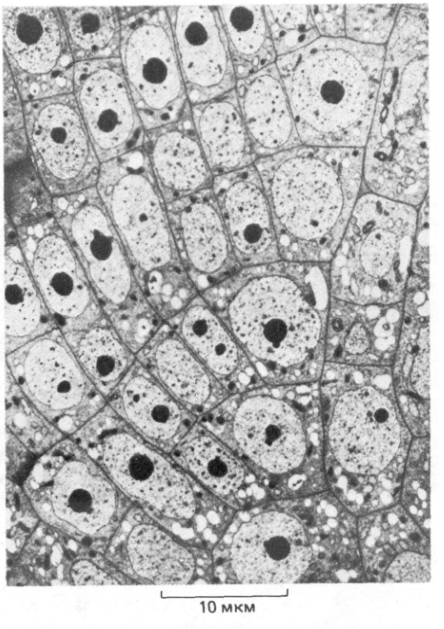


Рис. 20.1. Электронная микрофотография клеток кончика корня у камыша. Видна регулярная структура, обусловленная строгой последовательностью деления клеток с жесткими стенками. (С любезного разрешения B. Gunning.)

Клеточная стенка растения прежде всего защищает животное содержимое его клетки. Каждая такая стенка служит связующим звеном между своей и соседними клетками, обеспечивая единство и целостность всего растительного организма (рис. 20-1). Хотя при этом каждая клетка растения заключена в свою собственную «деревянную коробочку», возможность прямых контактов между клетками не утрачивается и они поддерживаются через плазмодесмы. Тысячи этих цитоплазматических канальцев, полость которых выстлана плазмалеммой, пронизывают клеточную стенку, соединяя соседние клетки и обеспечивая передвижение небольших молекул из клетки в клетку. Кроме того, вдоль клеточной стенки и сквозь нее циркулируют жидкости. Таким образом, у растений клеточная стенка осуществляет не только защитные и опорные, но и транспортные функции.

При специализации клетки растений образуют такие стенки, которые особенно хорошо приспособлены для выполнения конкретной функции. В данном разделе мы рассмотрим вопрос о том, какую роль в жизни растительной клетки играет окружающая ее клеточная стенка. Начнем с описания строения стенки.

20.1.1. Клеточная стенка образована волокнами целлюлозы, погруженными в полисахаридно-белковый матрикс [1]

Большинство вновь образуемых клеток в многоклеточном растении возникают в особых участках, которые называются меристемами (см. разд. 20.5.1). Эти новые клетки обычно малы по сравнению с уже дифференцированными. Увеличение их размеров возможно потому, что стенки таких клеток (первичные клеточные стенки, рис. 20-2) весьма

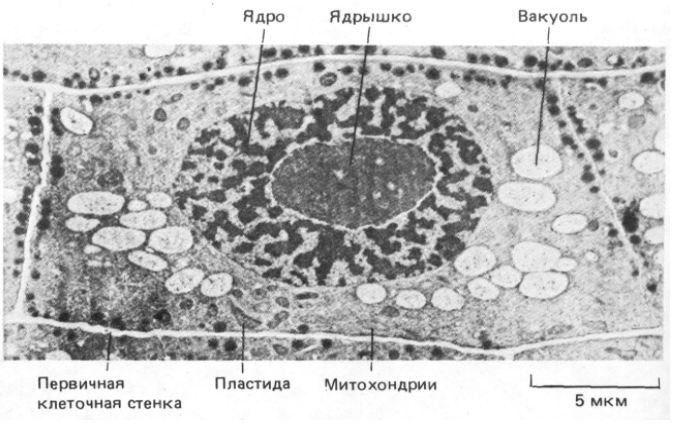


Рис. 20-2. Электронная микрофотография клетки из кончика молодого корешка лука. Видны основные органеллы и тонкая первичная клеточная стенка. (С любезного разрешения B. Wells.)

тонки и представляют собой полужесткие структуры. После прекращения клеточного роста стенке не надо больше расширяться. У зрелых (нерастущих) клеток может сохраняться первичная клеточная стенка, но гораздо чаще клетка наращивает дополнительно вторичную клеточную стенку. Это происходит либо путем утолщения первичной стенки, либо за счет откладывания на внутренней стороне этой стенки новых прочных слоев разного состава (см. разд. 20.1.7).

Хотя первичные клеточные стенки высших растений сильно различаются по составу и в деталях своей организации, все они построены по единому принципу, общему для внеклеточных матриксов: длинные волокна, обусловливающие прочность при растяжении, удерживаются вместе сетью из белка и полисахаридов, придающей устойчивость к сжатию. Тот же инженерный принцип (прочные волокна, устойчивые к натяжению, окруженные аморфным матриксом, устойчивым к сжатию) используется в конструкции костей животных (см. разд. 17.8); характерен он и для таких широко применяемых строительных материалов, как стеклопластики и железобетон. Фибриллы, входящие в состав

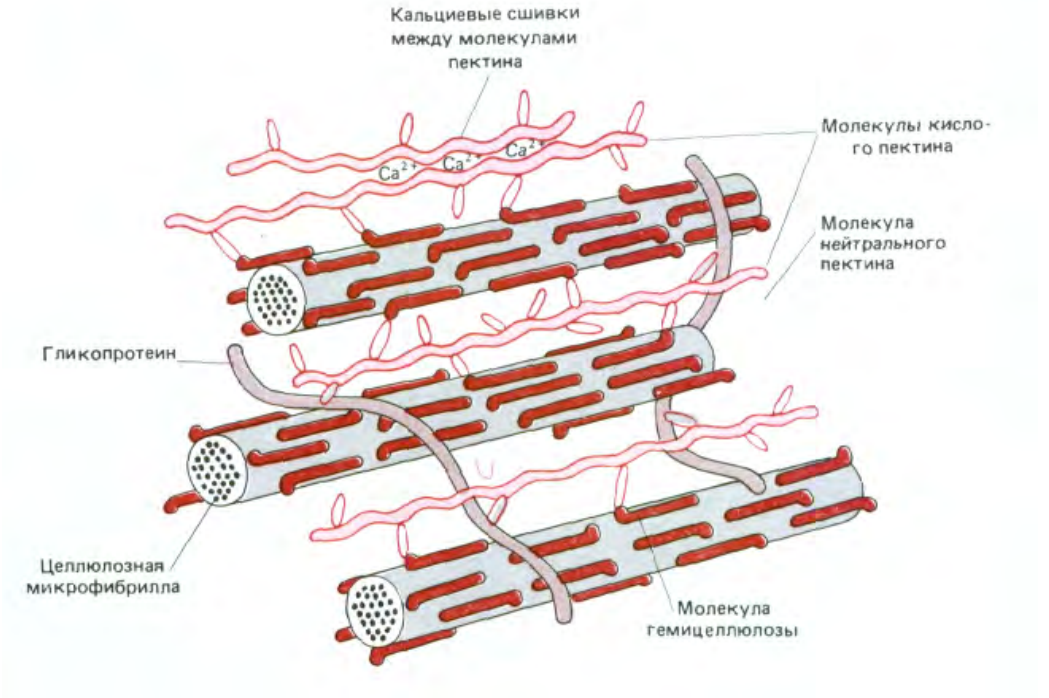


Рис. 20-3. Схема возможного соединения двух главных компонентов первичной клеточной стенки-целлюлозных микрофибрилл и матрикса. Молекулы гемицеллюлоз (например, ксилоглюканов) прикреплены к поверхности целлюлозных микрофибрилл водородными связями. Некоторые из этих молекул соединены поперечными сшивками, образованными короткими молекулами нейтральных пектинов (например, арабиногалактанов) и кислых пектинов (например, рамногалактуронанов). Гликопротеины плотно вплетены в ткань клеточной стенки.

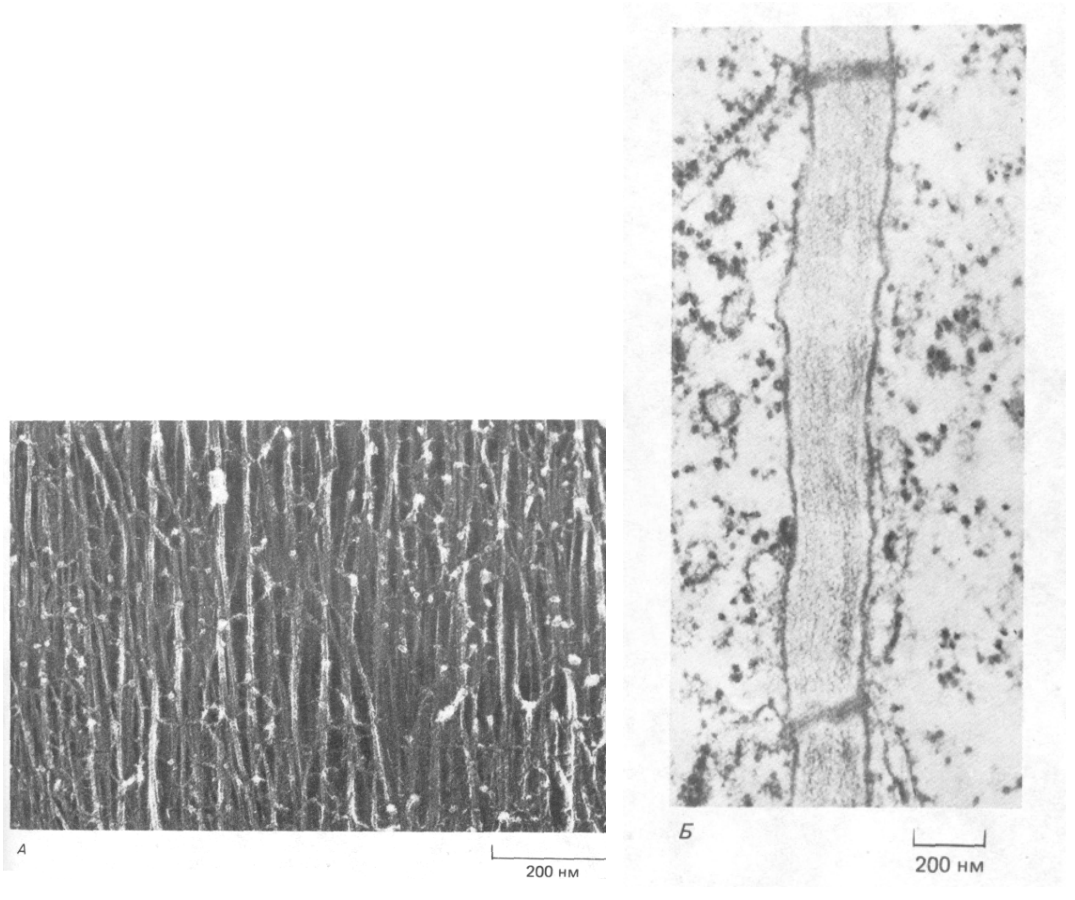


Рис. 20-4. А. Электронная микрофотография первичной клеточной стенки у моркови (препарат получен методом замораживания-скалывания и глубокого травления, см. разд. 4.1.11). Целлюлозные микрофибриллы соединены друг с другом сложной сетью из молекул матрикса. Сравните эту фотографию со схемой, приведенной на рис. 20-3. Б. Тонкий срез типичной первичной клеточной стенки. (А-с любезного разрешения B. Wells и K. Roberts; Б с любезного разрешения J. Burgess.)

клеточной стенки растений, обычно состоят из полисахарида целлюлозы - самого распространенного на Земле вида органических макромолекул. Матрикс же состоит в основном из двух других типов полисахаридов — гемицеллюлоз и пектинов, а также структурных гликопротеинов (рис. 20-3). Молекулы фибрилл и поперечного матрикса сшиты друг с другом с помощью ковалентных связей и нековалентных взаимодействий; при этом образуется необычно сложная структура, состав которой обычно специфичен для каждого из типов клеток (рис. 20-4). Известно строение основных молекул, образующих клеточные стенки у многих типов клеток, однако остается невыясненным, все ли эти виды молекул представлены в стенках клеток разных типов; не установлен и способ соединения молекул в трехмерной структуре.

20.1.2. Микрофибриллы целлюлозы соединены поперечными сшивками с молекулами гемицеллюлозы, пектина и гликопротеина, в результате чего образуется сложная сеть [1,2]

Молекула целлюлозы представляет собой неразветвленную цепь, содержащую не менее 500 остатков глюкозы, которые ковалентно соединены друг с другом β 1 → 4-глюкозидными связями, в результате чего вся молекула приобретает лентовидную структуру, стабилизированную внутримолекулярными водородными связями. Межмолекулярные водородные связи, соединяя смежные молекулы целлюлозы, содействуют скреплению этих молекул в параллельно лежащие тяжи, которые перекрываются и образуют пучок из 60-70 цепей, обладающих одинаковой

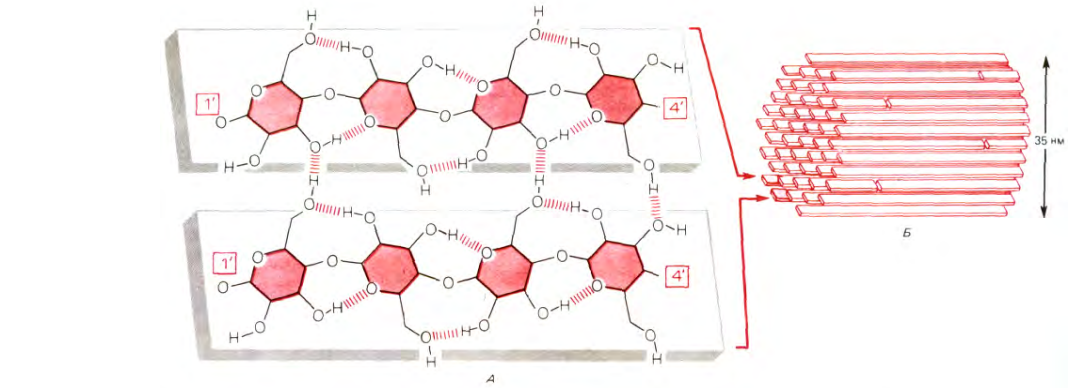


Рис. 20-5. Строение целлюлозы. А. Небольшой фрагмент двух молекул целлюлозы, каждая из которых состоит из длинной плоской цепи, составленной из остатков глюкозы, соединенных β1→ 4-связя-ми; эти цепи достигают в длину многих микрометров. Внутримолекулярные водородные связи стабилизируют каждую цепь, межмолекулярные водородные связи прочно сшивают между собой соседние цепи. Не указанные на рисунке водородные связи соединяют каждую цепь с цепями, лежащими над и под ней. Б. Целлюлозные микрофибриллы, состоящие из множества параллельно расположенных молекул целлюлозы, соединенных водородными связями. У большинства высших растений диаметр микрофибрилл составляет примерно 3,5 нм, однако у некоторых водорослей он может быть в 10 раз больше. Каждая молекула целлюлозы полярна (у молекулы есть 1'- и 4'-концы), все молекулы в каждой микрофибрилле имеют одинаковую полярность.

полярностью. Такие кристаллические агрегаты с упорядоченной структурой и длиной во много микрометров, называются микрофибриллами целлюлозы (рис. 20-5).

Гемицеллюлозы - это гетерогенная группа разветвленных полисахаридов, которые прочно связываются с поверхностью каждой целлюлозной микрофибриллы и друг с другом, покрывая таким образом эти микрофибриллы и способствуя объединению их в сложную сеть посредством водородных связей (см. рис. 20-3). Существует много различных гемицеллюлоз, однако любая из них имеет в основе длинный линейный остов, состоящий из молекул одного и того же моносахарида, соединен-

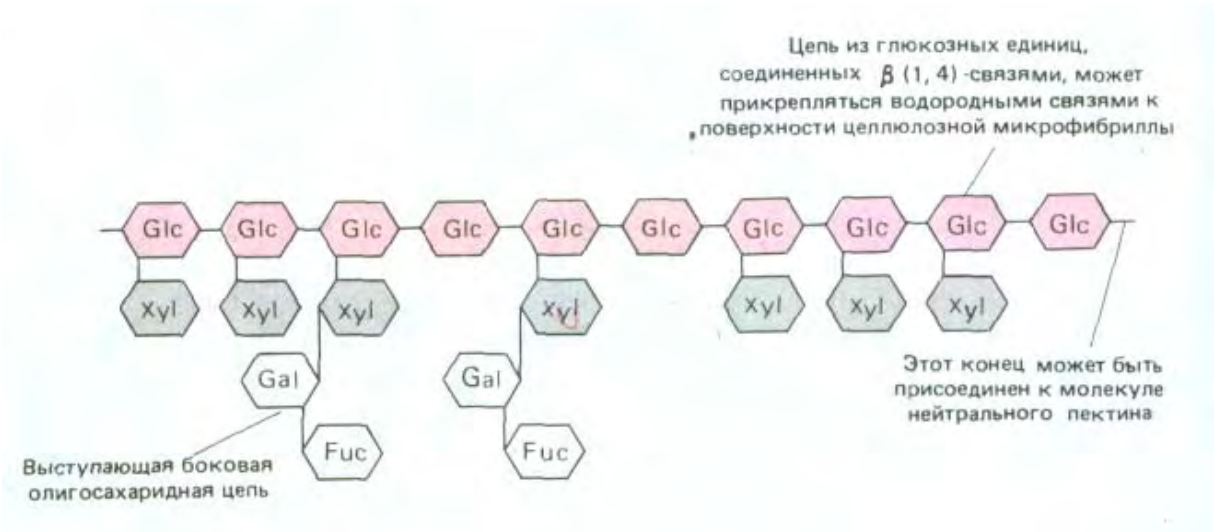


Рис. 20-6. Схема строения молекулы гемицеллюлозы из клеточной стенки типичного цветкового растения. Целлюлозоподобный остов молекулы состоит из остатков глюкозы и присоединен в клеточной стенке водородными связями к поверхности целлюлозной микрофибриллы. В данном случае изображен ксилоглюкан, в котором к глюкозным единицам осевой цепи присоединены остатки ксилозы; компонентами боковых олигосахаридных цепей могут быть и другие сахара, например, галактоза и фукоза.

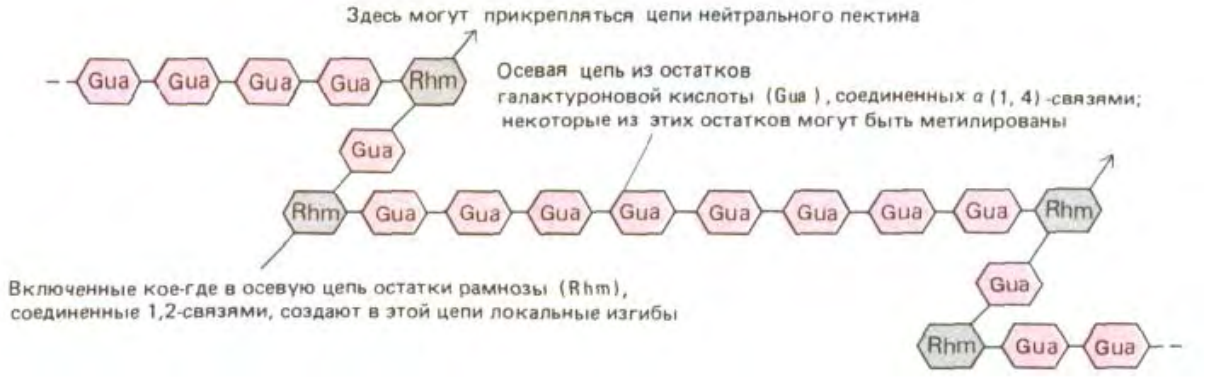


Рис. 20-7. Схема строения кислого пектина (рамногалактуронана) из клеточной стенки высшего растения. Показаны изломы линейной осевой цепи из отрицательно заряженных остатков галактуроновой кислоты. Эти изломы обусловлены присутствием остатков рамнозы, которые служат местами прикрепления нейтральных пектинов, связывающих кислые пектины с молекулами гемицеллюлозы (см. рис. 20-3).

ных связью β1→ 4; от этого остова отходят короткие боковые цепи из остатков Сахаров другого типа (рис. 20-6). Моносахариды как оси, так и боковых цепей специфичны для вида растения и стадии его развития Еще один важный полисахаридный компонент клеточной стенки - это пектины. Пектины представляют собой гетерогенную группу разветвленных полимеров, содержащих много отрицательно заряженных остатков галактуроновой кислоты (рис. 20-7). Благодаря своему отрицательному заряду пектины сильно гидратированы и активно связывают катионы. При добавлении ионов Ca^{2+} к раствору пектинов происходит сшивание последних с образованием полутвердого геля (поэтому-то пектин добавляют к фруктовым сокам, чтобы получить желе). Такое сшивание ионами Ca^{2+}, как полагают, играет определенную роль в объединении компонентов клеточной стенки. Особенно богата пектинами срединная пластинка - специализированная центральная область, обеспечивающая сцепление клеточных стенок соседних клеток (см. рис. 20-17). Этот слой

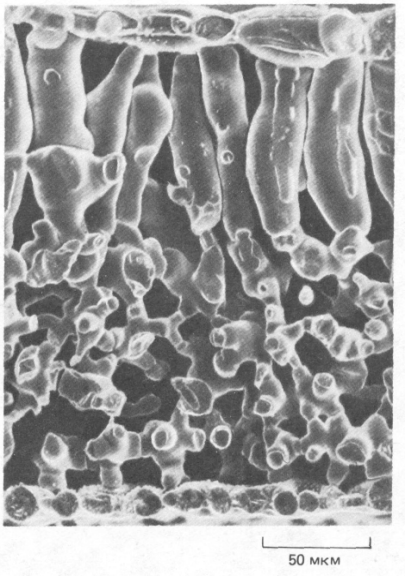


Рис. 20-8. Микрофотография листа бобового растения, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа методом замораживания-скалывания. Отчетливо видны верхний и нижний эпидермис. Между ними находятся многочисленные клетки мезофилла листа. По мере роста этих фотосинтезирующих клеток, их стенки отделяются друг от друга в определенных участках вдоль срединной пластинки, в результате чего образуется открытая сеть клеток, каждая из которых имеет неограниченный доступ к ресурсам двуокиси углерода в окружающем их достаточно большом воздушном пространстве. (C. E. Jeffree, N. D. Read, V.A. Smith, J. E. Dale, Planta, 172, 20-37, 1987.)

в некоторых местах прерывается, образуя межклеточные воздушные полости, характерные для многих растительных тканей (рис. 20-8).

Кроме описанных нами трех типов полисахаридов, первичная клеточная стенка содержит гликопротеины, которые могут составлять до 10% всей ее массы. Удалось осуществить клонирование ДНК, кодирующей основные гликопротеины, и определить последовательность ее нуклеотидов. Гликопротеины клеточной стенки необычны в том отношении, что они содержат много повторяющихся последовательностей аминокислот. До 30% их аминокислотных остатков представлены гидроксипролином, который образуется при пострансляционном гидроксилировании пролина (как и в коллагене, см. разд. 14.2.7). К боковым цепям гидроксипролина и серина присоединяются короткие олигосахаридные цепи; таким образом больше половины массы каждого гликопротеина приходится на углеводную часть. Выделить гликопротеины, не повредив всю структуру клеточной стенки, весьма трудно, следовательно, они прочно встроены в сложную трехмерную сеть полисахаридов, составляющих эту стенку. Считается, что гликопротеины действуют подобно клею, повышая прочность клеточной оболочки. Существенно, что содержание некоторых мРНК, кодирующих эти гликопротеины, резко возрастает в ответ на инфекцию или ранение.

Чтобы клетка растения могла увеличиваться в размерах или изменять свою форму, клеточная стенка должна растягиваться или деформироваться. Из-за своей кристаллоподобной структуры отдельные целлюлозные микрофибриллы неспособны растягиваться, следовательно, при подобных изменениях должно происходить скольжение микрофибрилл относительно друг друга и/или разделение соседних микрофибрилл. Как будет обсуждаться ниже, направление растяжения растущей клетки зависит от того, как расположены микрофибриллы целлюлозы, устойчивые к растяжению в первичной клеточной стенке (см. разд. 20.4.7).

20.1.3. Малые размеры пор в стенке растительной клетки ограничивают обмен макромолекулами между клеткой и окружающей средой [3]

Все клетки поглощают питательные вещества и выводят продукты своего метаболизма через плазматическую мембрану. У растительных клеток соответствующие молекулы должны проходить также и сквозь клеточную стенку. Поскольку матрикс клеточной стенки представляет собой сильно гидратированный полисахаридный гель (первичная стенка содержит по массе до 60% воды), вода, газы и небольшие водорастворимые молекулы быстро диффундируют через нее. (Даже в тех случаях, когда толщина клеточной стенки достигает 15 мкм, на ее долю приходится только 10% того сопротивления, которое испытывают молекулы воды, циркулирующие между цитоплазмой и окружающей клетку средой; за остальные 90% ответственна плазматическая мембрана.) Средний диаметр отверстий между «сшитыми» друг с другом макромолекулами, образующими большинство клеточных стенок, составляет около 5 нм. Этого достаточно, чтобы сильно замедлить продвижение любой глобулярной макромолекулы с молекулярной массой, превышающей 20000. Следовательно, растения вынуждены использовать в качестве питательных веществ небольшие молекулы. Маленькими и водорастворимыми должны быть и молекулы, опосредующие межклеточные сигналы. И действительно, у растений большинство известных сигнальных молекул, таких как регуляторы роста - ауксины, цитокинины и гиббереллины (см. разд. 20.5.8)-имеют молекулярную массу менее 500.



Рис. 20-9. Растительная клетка, лишенная стенки, т. е. протопласт, осмотически нестабильна, и при помещении в воду или гипотоническую внеклеточную жидкость, омывающую растительные клетки, набухает и лопается. Если же клетка окружена жесткой стенкой, она может набухать лишь в ограниченной степени. Давление, которое оказывает клетка на клеточную стенку, делает ее тургесцентной и обусловливает осмотическое равновесие; при этом вода больше не поступает в клетку (см. схему 6-1).

20.1.4. Высокая прочность клеточной стенки позволяет клеткам поддерживать избыточное внутреннее гидростатическое давление, называемое тургором [4]

Механическая прочность клеточной стенки позволяет клеткам растений выжить в окружающей среде, которая гипотонична по отношению к содержимому клетки. Внеклеточная жидкая среда высших растений включает водную фазу во всех клеточных стенках и в дополнение к ней жидкость в длинных трубочках, образуемых клеточными стенками отмерших клеток ксилемы (см. разд. 20.2.5). Эти трубочки несут воду (транспирационный ток) от корней к местам испарения, находящимся главным образом в листьях. Хотя внеклеточная жидкость содержит больше растворенных веществ, чем менее концентрированный раствор в окружающей растение среде (например, в почве), она все равно остается гипотоничной по отношению к внутриклеточной жидкости. Это легко продемонстрировать, разрушив клеточную стенку с помощью целлюлаз и других ферментов и наблюдая за поведением такой, лишенной стенок, клетки, называемой протопластом (см. рис. 20-71). Если этот округлый протопласт некоторое время находится в гипотонических условиях, он осмотическим путем набирает воду и лопается (рис. 20-9). Клетка, сохранившая свою оболочку, в такой же ситуации лишь немного разбухнет. Дело в том, что клетка создает свое внутреннее гидростатическое давление, которое поддерживает клеточную стенку подобно тому, как внутренняя камера, наполненная воздухом, подпирает покрышку велосипедной шины. Такое гидростатическое давление приводит к осмотическому равновесию и препятствует дальнейшему проникновению воды (подробное изображение осмоса см. на схеме 6-1).

Возникающее вследствие осмотического дисбаланса этих двух сред избыточное гидростатическое давление внутри растительной клетки, называемое тургорным давлением (или просто тургором), имеет для растений жизненноважное значение. Тургор - главная сила, растягивающая клетку в период ее роста; он в значительной мере ответствен также за жесткость живых растительных тканей (сравните увядший лист обезвоженного растения с упругими листьями растения, получающего достаточно воды).

20.1.5. Рост растительной клетки определяется как тургорным давлением, так и контролируемым образованием клеточной стенки [5]

Тургорное давление важно не только для создания упругости растительных тканей. Всякий раз, когда клеточная стенка уступает внутреннему тургорному давлению и растягивается, происходит необратимое увеличение объема клетки, иными словами клетка растет. Рост клетки происходит лишь тогда, когда тургорное давление внутри клетки превышает локальный предел прочности стенки. В принципе, в этом случае растение может использовать две стратегии для своего роста: либо повышать тургорное давление, либо ослаблять клеточную стенку в отдельных местах. Имеется надежное доказательство того, что растительная клетка выбирает вторую возможность и разнообразными способами ослабляет клеточную стенку (перемещая, например, в стенку ионы H^+ с помощью АТРазы, локализованной в плазматической мембране и накачивающей протоны). Хотя детали этого механизма не изучены, полагают, что локальное снижение pH приводит к уменьшению числа слабых связей, скрепляющих компоненты стенки; при этом макромолекулы, входящие в состав стенки, под влиянием тургорного давления скользят относительно друг друга. Чтобы еще больше облегчить рост стенки, осуществ-

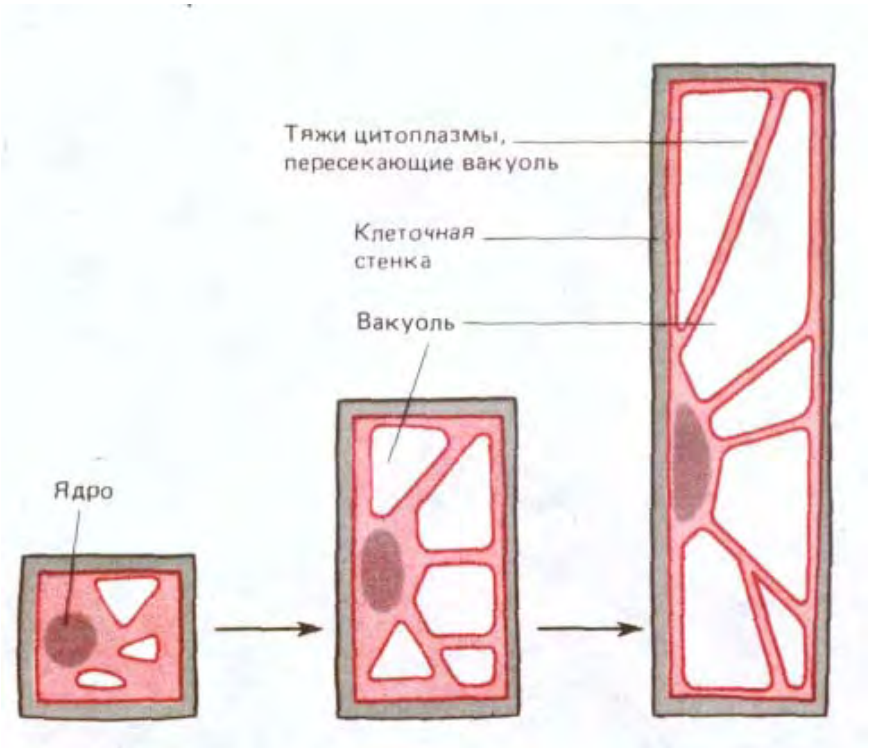


Рис. 20-10. Значительное увеличение размеров клетки может быть достигнуто и без увеличения объема цитоплазмы. Ослабление стенки обеспечивает растягивание клетки под действием тургора в определенном направлении, что сопровождается поглощением воды разбухающей вакуолью. В итоге цитоплазма превращается в тонкий периферический слой, соединенный с областью ядра тяжами, которые проходят через всю вакуоль и содержат пучки актиновых фила-ментов (см. рис. 20-53).

ляются и другие более сложные изменения, включая активацию ферментов, которые катализируют гидролиз гликозидных и других ковалентных связей.

В большинстве случаев увеличение объема клетки происходит неравномерно, в основном за счет увеличения объема вакуоли, а не цитоплазмы. Сохранение почти постоянного количества цитоплазмы, обогащенной азотом, снижает метаболические затраты на образование больших клеток (рис. 20-10). Это дает дополнительные преимущества растениям, для которых азот является лимитирующим питательным веществом. Для поддержания тургорного давления, необходимого для постоянного роста клетки, растущая вакуоль должна активно поглощать растворенные вещества, которые накапливаются в ней, поддерживая осмотическое давление.

Однако рост клетки растения - это гораздо более сложный процесс, нежели простое ее раздувание подобно воздушному шару: ведь клетка должна иметь соответствующую форму. Клеточный рост в действительности определяется двумя сложными процессами. Один из них, контролируемый по принципу обратной связи, заключается во взаимодействии двух событий - растяжения клеточной стенки и восстановления тургора. Другой подразумевает приобретение клеткой определенной формы за счет того, что некоторые области стенки остаются жесткими, тогда как другие ее участки размягчаются и растягиваются. Подобный контроль за формой клетки осуществляется благодаря некоторым событиям, происходящим в цитоплазме, что будет описано ниже (см. разд. 20.4.8).

20.1.6. Тургор регулируется по принципу обратной связи путем изменения концентраций внутриклеточных растворенных веществ [6]

Поскольку тургорное давление играет важнейшую роль в жизни растений, неудивительно, что у растительной клетки выработались тонкие механизмы, регулирующие его величину. Эта величина сильно варьирует в зависимости от вида растения и типа клетки, составляя всего пол-атмосферы у некоторых водорослей с крупными клетками и достигая 50 атмосфер в замыкающих клетках устьиц. Клетки способны повышать тургорное давление, увеличивая концентрации осмотически активных молекул в цитозоле - либо за счет накачивания их внутрь из внеклеточной жидкости через плазматическую мембрану, либо за счет расщепле-

ния осмотически неактивных полимеров, находящихся обычно в вакуолях. В обоих случаях изменение тургорного давления регулируется по принципу обратной связи.

Как же работают такие системы с обратной связью? Эксперименты указывают на то, что «детектор тургорного давления» в плазматической мембране индуцирует транспорт ионов (чаще всего это активное накачивание в клетку ионов K^+) в ответ на внезапное падение тургорного давления, тогда как резкое повышение тургора приводит к выводу ионов K^+. Эти процессы протекают очень быстро и, по-видимому, связаны с какими-то изменениями в специфических транспортных белках плазматической мембраны.

Связанные с мембраной «детекторы», вероятно, также способны изменять скорость синтеза осмотически активных веществ в цитоплазме и вакуоли, но эти изменения происходят гораздо медленнее. Системы, регулирующие величину клеточного тургора, особенно важны для растений, обитающих в среде с экстремальными или непостоянными осмотическими свойствами. Например, растения, произрастающие на засоленных почвах, для поддержания тургора должны накапливать в своих жидкостях очень высокие концентрации растворенных веществ. Поскольку накопление ионов, например K^+, в таких больших количествах, вероятно, повлияло бы на активность жизненно важных ферментов, клетки этих растений накапливают специальные органические вещества-полигидроксилированные соединения, такие как глицерол или маннитол, аминокислоты, например пролин, или же N-метилированные производные аминокислот, такие как глицинбетаин. Концентрация этих веществ в цитозоле может достигать очень высоких уровней (0,5 М), не влияя на метаболизм клетки. Вакуоль и ее содержимое самым непосредственным образом участвуют в регуляции тургорного давления в ответ на изменения окружающей среды (см. разд. 20.4.2).

В основе ограниченных движений растений также лежат регулируемые изменения тургора. Например, замыкающие клетки устьиц контролируют скорость газообмена между листьями и окружающим их воздухом, открывая или закрывая устьичные отверстия (рис. 20-11). В течение дня, когда устьица открыты, свет активирует насос, перекачивающий ионы K^+ в плазматической мембране замыкающих клеток; в результате притока ионов K^+ тургорное давление повышается, и замыкающие клетки набухают, открывая устьичное отверстие. Очень быстрые изменения тургора в клетках, расположенных на ключевых позициях, вызывают более заметные движения, к которым относятся, например, закрывание ловушек у насекомоядных растений и быстрое движение частей некоторых цветков при опылении. Изменения тургора, вызывающие эти движения, происходят в результате резкого повышения проницаемости

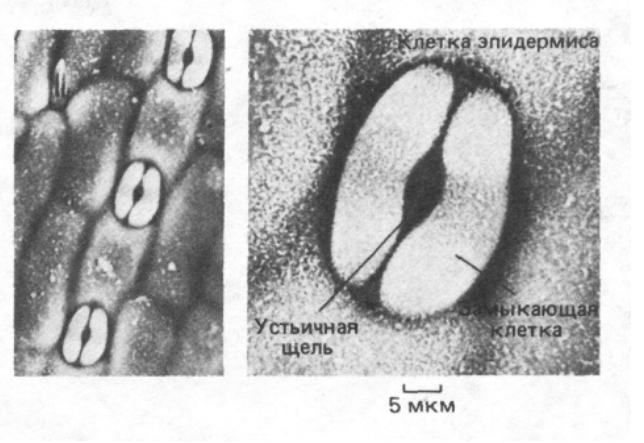


Рис. 20-11. Микрофотографии устьиц в эпидермисе листа тропического растения, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа при разном увеличении. Устьица - это поры, образуемые на поверхности листа двумя замыкающими клетками. Их движения, регулируемые тургором, определяют размер устьичной щели и, следовательно, интенсивности газообмена между листом и окружающей средой. У большинства растений устьица днем открыты, через них поступает двуокись углерода и через них же удаляются продукты фотодыхания. Ночью устьица обычно закрыты. Клетки эпидермиса снаружи покрыты водонепроницаемой восковой кутикулой (см. также рис. 20-18). (С любезного разрешения H. W. Woolhouse, GJ. Hills.)

мембран в клетках, расположенных в ключевых местах. Эти клетки действуют как «шарнир», регулируемый тургором. Каким образом слабое прикосновение к чувствительной поверхности приводит к тургорному взрыву в этих клетках пока неясно. Возможно, здесь задействованы ионные каналы с возникающим в них потенциалом действия.

20.1.7. При образовании специализированных клеток происходит модификация клеточной стенки [7]

Наземные растения сильно отличаются друг от друга по своему строению и способам размножения (рис. 20-12). Тем не менее все они построены на одинаковых принципах из небольшого числа типов клеток и тканей. План строения почти всех растений имеет в основе продольные модульные линии, причем типичный модуль состоит из стебля, листа и почки (см. рис. 20-58). Более того, все они содержат одни и те же специализированные типы клеток, которые всегда организованы в три основных типа тканей: *покровные* (обеспечивающие покрытие), *основные* (обеспечивающие опору и питание) и *проводящие* (обеспечивающие транспорт жидкостей) (рис. 20-13).

Основные типы клеток представлены на схеме 20-1. Все они формируются из клеток с *первичной клеточной стенкой* в результате их роста и последующей дифференцировки. По мере дифференцировки клеток первичная стенка усложняется, образуя *вторичную клеточную стенку*. В ряде случаев этот процесс сводится лишь к простому добавлению целлюлозных слоев, но иногда происходит откладывание новых слоев разного состава. Молекулы целлюлозы, откладываемые во вторичную стенку, как правило, намного длиннее (~ 15 000 остатков глюкозы), чем молекулы, входящие в состав первичной стенки (от 500 до 5000 остатков глюкозы). Более того, сильно гидратированные пектиновые компоненты, характерные для первичной клеточной стенки, в значительной мере замещаются другими полимерами, в результате чего вторичная стенка оказывается более плотной и не столь гидратированной как первичная.

Вторичная клеточная стенка несет основную механическую нагрузку, приходящуюся на растение. Она также представляет собой существен-

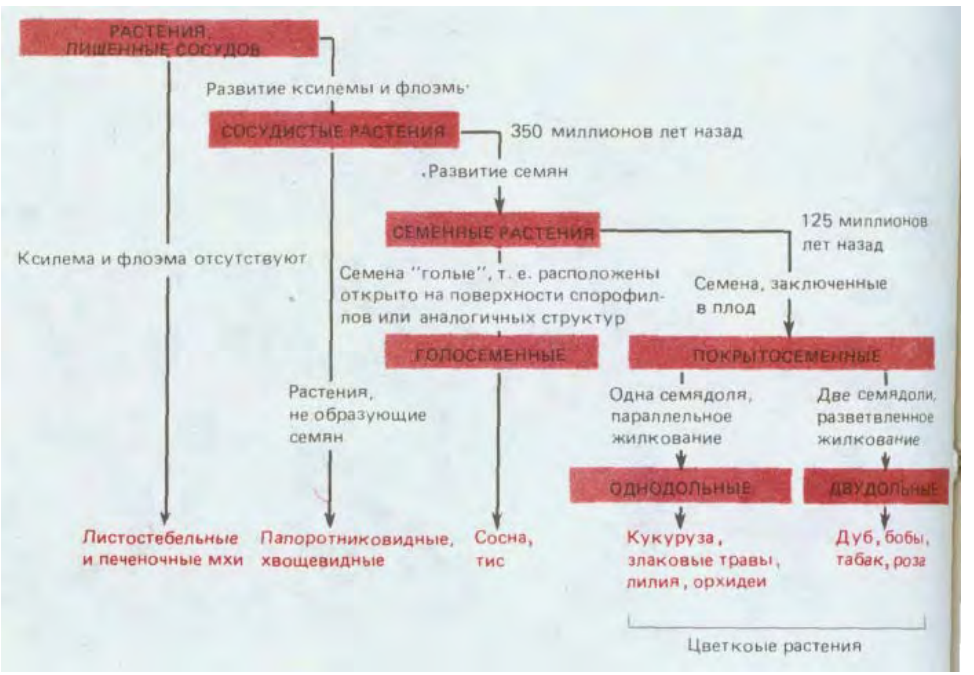
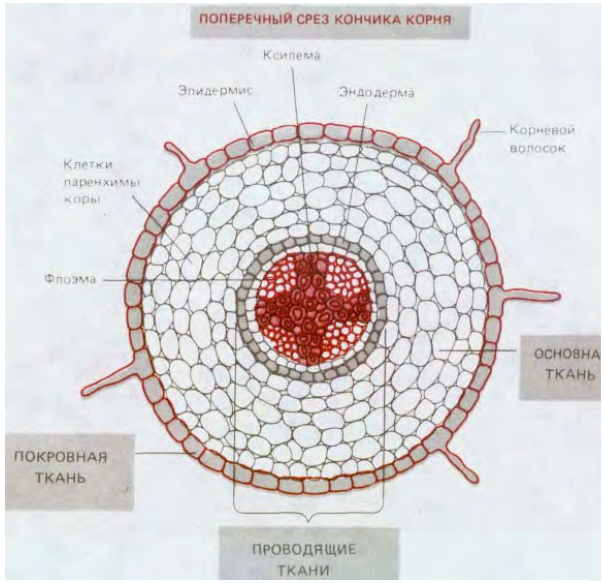


Рис. 20-12. Эволюция наземных растений. Все растения (за исключением водорослей) можно разделить на *сосудистые,* у которых транспорт осуществляется по проводящим тканям (ксилеме и флоэме), и *несосудистые* (например, мхи), которые невелики по размеру и устроены относительно просто. Как уже отмечалось, сосудистые растения появились на Земле примерно 350 млн. лет назад, когда возникли семена. Семя обеспечивает защиту развивающегося зародыша, который может оставаться в состоянии покоя, пока не будут обеспечены условия, необходимые для его дальнейшего развития. В связи с тем, что на Земле распространены в основном семенные сосудистые растения, в данной главе речь идет главным образом о них.

Рис. 20-13. В различных органах высших растений (листьях, стеблях и корнях) можно выделить три *системы тканей:* проводящую, основную (опорную) и покровную. Как видно на схематическом поперечном срезе кончика корня, *проводящие ткани* погружены в основную ткань, которую в свою очередь окружает покровная ткань. С некоторыми вариациями в расположении эти три системы формируют все части высшего растения. Каждая из них состоит из относительно небольшого числа основных типов клеток, часть из которых представлена на схеме 20-1.



ный компонент питания многих животных и основу таких материалов, как древесина и бумага. Форма и состав образовавшейся в итоге клеточной стенки, тесно связаны с функцией определенных специализированных типов клеток: каждый тип клеток отличается от другого по морфологии, например по устройству клеточной стенки зрелого пыльцевого зерна, которая специфична для каждого определенного вида растения (рис. 20-14).

Все значительные изменения как в составе, так и в строении первичной и вторичной клеточных стенок, отражают процессы, происходящие в цитоплазме; это лучше всего можно проиллюстрировать на примере развития сосудов ксилемы. В процессе дифференцировки клеток в молодых растущих тканях на стенках сосудистых элементов ксилемы

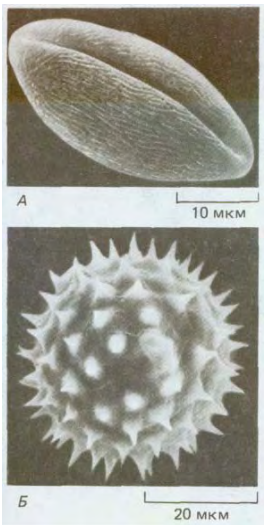


Рис. 20-14. Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа микрофотография пыльцевых зерен петунии *(А)* и подсолнечника *(Б).* Стенка образована спорополленином, сложным и очень прочным углеводородным полимером, который определяет характерную форму пыльцевых зерен. В стенке имеются поры, через которые при прорастании пыльцы пройдет пыльцевая трубка. (С любезного разрешения С. MacFarlane и С. Jeffree.)



Рис. 20-15. Микротрубочки в кортикальном слое клетки из развивающейся ксилемы побега гороха. Обработка флуоресцирующими антителами выявляет спиральное расположение микротрубочек, которые определяют участок клеточной стенки, подлежащей утолщению сначала за счет отложений целлюлозы, а затем и лигнина (см. схему 20-1). Клетка крупная, поэтому глубина фокусного расстояния позволяет увидеть лишь одну сторону спирального рисунка. (С любезного разрешения I. Roberts.)

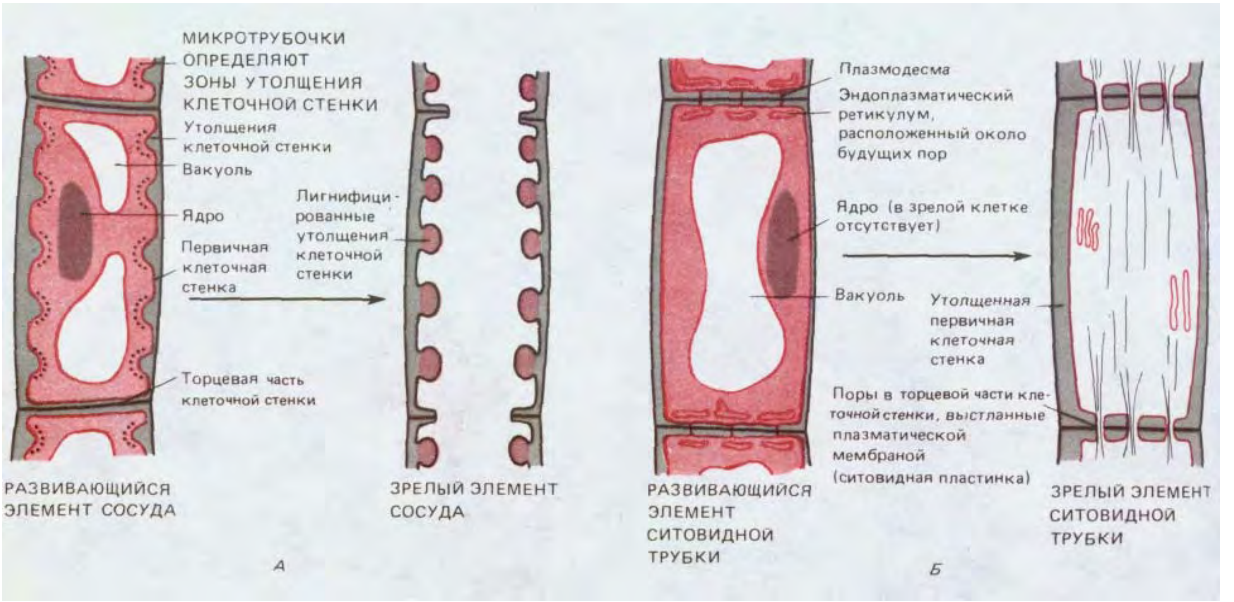


Рис. 20-16. Два примера возможных модификаций клеточной стенки при формировании специализированных клеток. *А.* Схематический продольный разрез развивающегося элемента малого сосуда ксилемы. В этой клетке образуются кольцевые утолщения, однако обнаруживаются и другие типы отложений. В конце концов протопласт и торцевая клеточная стенка исчезают и появляется сквозная трубка. Зрелый элемент, потеряв свой протопласт, отмирает. *Б.* Схематический продольный разрез через развивающийся элемент ситовидной трубки флоэмы. Первичная клеточная стенка утолщается и в торцевых ее участках появляются отверстия, т.е. образуется ситовидная пластинка, соединяющая соседние элементы трубки. Зрелые клетки сохраняют свою плазматическую мембрану, однако ядро и большая часть цитоплазмы утрачиваются.

образуются утолщения, в составе которых много целлюлозы. Их расположение определяется пучками цитоплазматических микротрубочек, которые лежат в кортикальном слое непосредственно под плазматической мембраной. Эти пучки микротрубочек обычно имеют вид спиралей или колец (рис. 20-15) и возникают при перегруппировке микротрубочек кортикального слоя цитоплазмы, в норме расположенных довольно равномерно (см. разд. 20.4.8). Это частный пример более общего правила, которое обсуждается ниже (см. тот же раздел), и согласно которому целлюлозные микрофибриллы, откладываемые вне клетки, располагаются параллельно микротрубочкам, лежащим в кортикальном слое цитоплазмы.

Утолщенные целлюлозные участки клеточной стенки развивающихся ксилемных клеток впоследствии укрепляются путем отложения *лигнина,* нерастворимого полимера, состоящего из ароматических фенольных единиц, которые образуют внутри клеточной стенки разветвленную сеть с поперечными сшивками и составляют основу древесины. В результате локального удаления материала из торцевой части клеточной стенки образуются жесткие сосуды с низким сопротивлением, которые используются для транспорта воды в ксилеме (рис. 20-16). Аналогичная значительная перестройка первичной клеточной стенки происходит при разви-

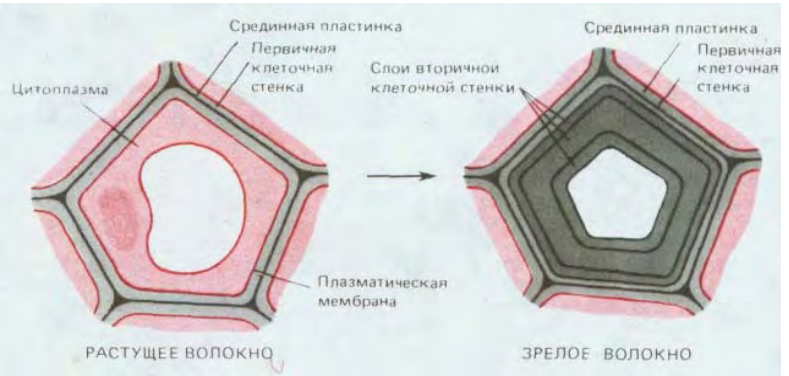


Рис. 20-17. Формирование вторичной клеточной стенки волокна (схематический поперечный разрез). В данном случае три новых слоя материала клеточной стенки откладывались в первичной стенке. Поскольку ориентация целлюлозных микрофибрилл в каждом слое различна, клеточная стенка в конструктивном отношении напоминает многослойную фанеру. У многих волокон образование вторичной клеточной стенки завершается гибелью клетки.

тии ситовидных трубок флоэмы в сосудистых тканях растения (см. рис. 20-16 и схему 20-1).

Вторичная клеточная стенка обычно откладывается между плазматической мембраной и первичной клеточной стенкой, иногда слои откладываются последовательно один за другим (рис. 20-17). Однако в определенных случаях особые макромолекулы откладываются либо *внутри* первичной стенки (как, например, лигнин в клетках ксилемы), либо на наружной ее поверхности. Например, эпидермальные клетки, покрывающие наружную поверхность растения, обычно имеют утолщенную первичную клеточную стенку, внешняя часть которой покрыта толстой водонепроницаемой *кутикулой,* защищающей растения от инфекции, механического повреждения, потери воды и вредоносного ультрафиолетового излучения (см. схему 20-1). Кутикула секретируется по мере дифференцировки эпидермальных клеток. Она состоит преимущественно из *кутина* (в коре из родственного ему вещества суберина), представлявшего собой полимер из жирных кислот с длинной цепью, который образует на поверхности растения обширную сеть с многочисленными поперечными сшивками. Слой кутина часто пропитывается смесью *восков,* которые, кроме того, и наслаиваются на него; воски являются эфирами спиртов с длинной цепью и жирных кислот (рис. 20-18). Кутикула растительной клетки по составу сильно отличается от кутикулы насекомых и ракообразных, построенной из белков и полисахаридов.

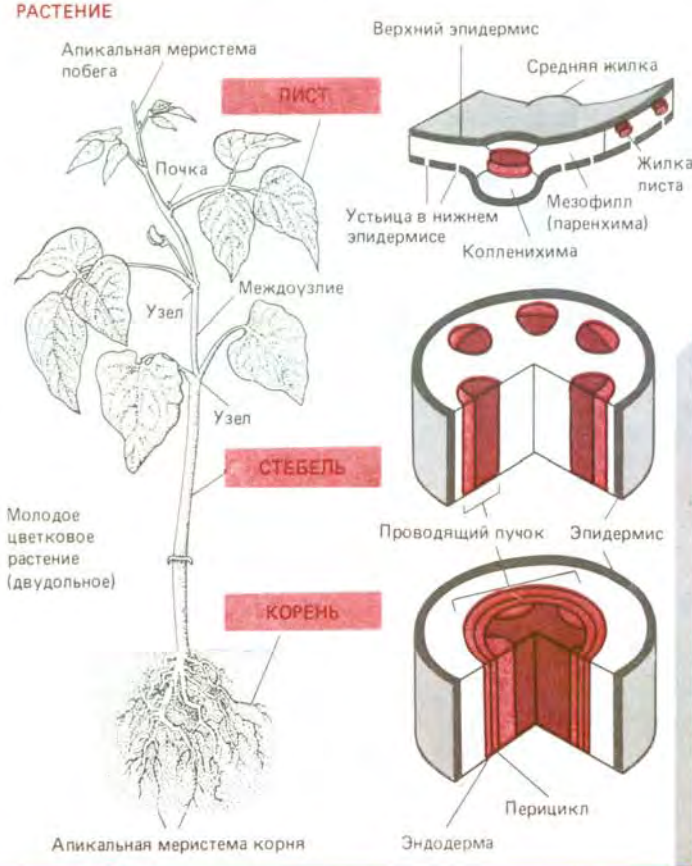
20.1.8. Даже зрелая клеточная стенка представляет собой динамичную структуру [8]

Состав и строение клеточной стенки взрослого растения не являются чем-то неизменным: составляющие части могут добавляться и удаляться, а связи между компонентами меняться. Локальное удаление материала стенки при развитии торцевых стенок в сосудах ксилемы и ситовидных трубок флоэмы представляют собой поразительный пример таких изменений (рис. 20-16).

Изменение клеточных стенок в уже зрелых клетках можно также проиллюстрировать на примере процессов, происходящих при потере части растения, например отмершего листа. При отмирании листа клеточные полимеры распадаются, а сахара, аминокислоты и ионы вновь используются растением. Кроме того, стареющий лист выделяет небольшие количества газа *этилена.* В зоне, расположенной между основанием черешка листа и стеблем (отделительный слой), клетки реагируют на сложные и еще плохо изученные комбинации этилена и других эндогенных регуляторов роста растений (см. рис. 20-67) образованием и секрецией ферментов, разрушающих клеточную стенку (пектиназа и целлюлоза). Эти ферменты действуют локально на определенный участок и частично растворяют клеточные стенки в отделительном слое (рис. 20-19). Одновременно с этим в слое клеток со стороны стебля откладывается водоустойчивый суберин, который защищает «рану», образующуюся после отделения листа в результате ферментативного переваривания.

Подобная локальная реакция клеток происходит и при созревании плодов. В этом случае низкие концентрации этилена (одна часть на миллион) стимулируют в клетках-мишенях плода (например, апельсина или банана) секрецию ферментов, расщепляющих белок и ослабляющих сцепление между соседними клетками. Это приводит к размягчению, т. е. «созреванию» плода.

РАСТЕНИЕ



Молодое цветущее растение, изображенное слева, состоит из органов трех основных типов: листьев, стебля и корня. В свою очередь каждый орган растения составлен из тканей, принадлежащих к трем системам: основной, покровной и проводящей (см. рис. 20–13).

Все три системы тканей в конечном итоге образуются в результате активного деления клеток апикальных меристем корня или побега и каждая из систем содержит относительно небольшое число типов специализированных клеток. На данной схеме изображены и кратко описаны эти три системы постоянных тканей и составляющие их клетки.

ТРИ СИСТЕМЫ ТКАНЕЙ

Деление, рост и дифференцировка клеток приводят к образованию систем тканей, обладающих специализированными функциями.

ПОКРОВНАЯ СИСТЕМА ( ). Это защитные наружные покровы растения, соприкасающиеся с внешней средой. Они способствуют проникновению воды и ионов в корни и регулируют газообмен в листьях и стеблях.

ПРОВОДЯЩАЯ СИСТЕМА. Флоэма ( ) и ксилема ( ) вместе образуют непрерывную проводящую систему, охватывающую все растения. Эти ткани проводят воду и растворенные в ней вещества от органа к органу, а также обеспечивают механическую прочность.

ОСНОВНАЯ СИСТЕМА. ( ). Обеспечивает опору растения и защиту его от механических повреждений, составляет большую часть массы молодого растения. Также выполняет функции синтеза и запасания питательных веществ.

ОСНОВНАЯ СИСТЕМА ТКАНЕЙ

включает три главных типа тканей — паренхиму, колленхиму и склеренхиму.

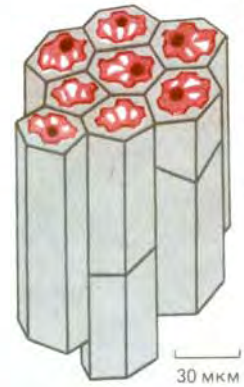
Клетки **паренхимы** имеются во всех тканевых системах. Это живые клетки, обычно способные к дальнейшему делению и обладающие тонкой первичной клеточной стенкой. Они выполняют самые разнообразные функции. Клетки апикальных и латеральных меристем побегов и корней поставляют новые клетки, необходимые для роста. Образование питательных веществ и их запасание происходит в фотосинтезирующих клетках листа и стебля, которые называются клетками мезофилла; запасающая паренхима составляет основу ткани большинства фруктов и овощей. Благодаря своей способности к делению, клетки паренхимы обычно служат исходными клетками для залечивания ран и регенерации.





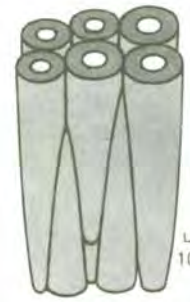
Передаточная клетка представляет собой специализированную клетку паренхимы. Ее легко узнать по причудливым выростам первичной клеточной стенки, направленным во внутреннее пространство клетки. Увеличение поверхности плазматической мембраны, связанной с этими стенками, облегчает быстрый транспорт растворенных веществ в клетку и из клеток проводящей системы.

Колленхима образована живыми клетками, которые сходны с клетками паренхимы за исключением того, что их клеточные стенки намного толще, а сами клетки имеют удлиненную форму и упакованы в длинные нитевидные фибриллы. Они могут растягиваться и обеспечивают механическую прочность удлиняющихся частей растения. Клетки колленхимы особенно часто встречаются под слоем эпидермиса в стебле.





Склеренхима как и колленхима укрепляет и поддерживает растение. Однако обычно она состоит из мертвых клеток с толстыми лигнифицированными вторичными стенками, которые не дают им растягиваться при росте растения. Существует два основных типа склеренхимы: *волокна* (см. рис. 10–17), которые часто образуют длинные пучки, и *склереиды*, представляющие собой более короткие разветвленные клетки, встречающиеся в оболочках семян и в плодах.



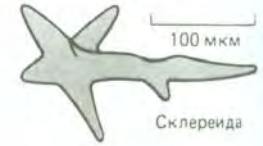


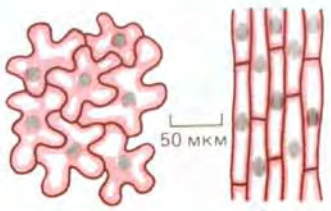
Схема 20-1. Типы клеток у высших растений.

ПОКРОВНАЯ СИСТЕМА ТКАНЕЙ

Эпидермис представляет собой первичный наружный покров растения, обладающий защитными функциями. Кроме того, клетки эпидермиса могут видоизменяться и образовывать устьица и различные волоски.



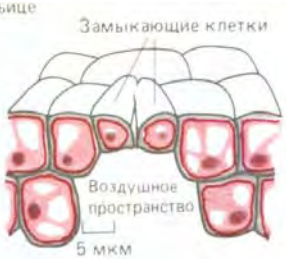
Эпидермис (обычно один слой клеток) полностью покрывает стебель, лист и корень молодого растения. Клетки эпидермиса живые, обладают толстой первичной стенкой и покрыты снаружи специальной кутикулой, на поверхности которой лежит восковой слой (см. рис. 20–18). Клетки самым разнообразным образом тесно связаны друг с другом.



Верхний эпидермис листа

Эпидермис стебля

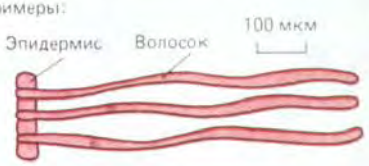
Устьице



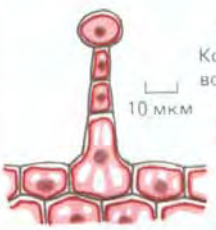
Устьица – это отверстия в эпидермисе, которые расположены преимущественно на нижней поверхности листа и регулируют газообмен в растении. Они образуются двумя специализированными клетками эпидермиса, которые называются замыкающими (см. рис. 20–11), и регулируют размер устьичной щели. Расположение устьиц в эпидермисе видоспецифично.

Волоски (или трихомы) – это выросты, образуемые клетками эпидермиса. Они бывают самой разнообразной формы и обычно обнаруживаются во всех частях растения. К функциям волосков относится всасывание, секреция и защита.

Примеры:



Молодые одноклеточные волоски в эпидермисе семени хлопчатника (см. рис. 20–45). При их росте клеточные стенки претерпевают вторичное утолщение за счет накопления в них целлюлозы и образуют хлопковые волокна.



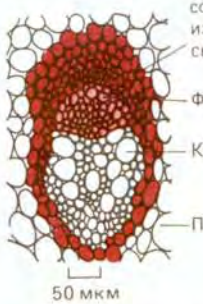
Многоклеточный секреторный волосок листа герани



Одноклеточные корневые волоски играют важную роль во всасывании воды и ионов.

Сосудистые пучки

В корнях обычно имеется единственный сосудистый пучок, а в стебле их несколько. Их расположение характеризуется строгой радиальной симметрией у двудольных и является более беспорядочным у однодольных.

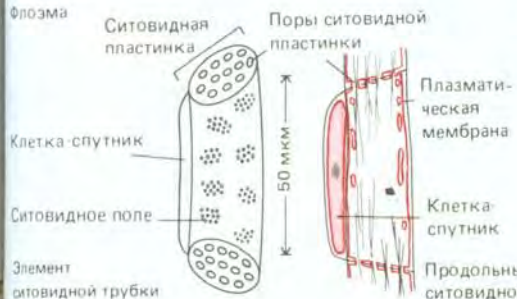


Типичный сосудистый пучок молодого стебля лютика

ПРОВОДЯЩАЯ СИСТЕМА ТКАНЕЙ

Флоэма и ксилема вместе образуют непрерывную проводящую систему, охватывающую все растения. У молодых растений они обычно связаны с клетками самых разнообразных типов, образуя *сосудистые пучки*. Как флоэма, так и ксилема являются сложными тканями. Их проводящие элементы связаны с клетками паренхимы, которые поддерживают элементы сосудов и обмениваются с ними материалом. Кроме того, группы клеток колленхимы и склеренхимы механически поддерживают эти пучки.

Флоэма

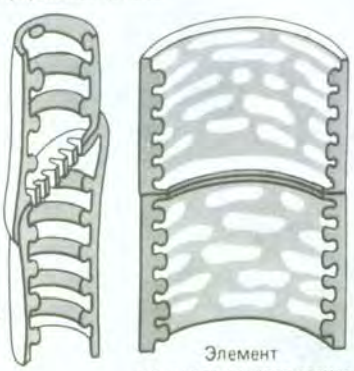


Флоэма обеспечивает транспорт растворенных органических веществ в растении. Главные проводящие клетки (элементы), соединенные встык одна за другой, образуют так называемые *ситовидные трубки*. Зрелые структурные элементы ситовидных трубок представляют собой живые клетки, сообщающиеся между собой через отверстия в торцевых участках их стенок, образовавшиеся из увеличившихся и модифицированных плазмодесм (эти участки называются ситовидными пластинками). Поскольку эти клетки в процессе созревания утрачивают ядро и большую часть цитоплазмы (хотя и сохраняют плазматическую мембрану), их функцию берут на себя связанные с ними *клетки-спутники*. Эти последние имеют и еще одну функцию, состоящую в активном переносе растворенных молекул питательных веществ как в элементы ситовидных трубок, так и из них через поры ситовидных полей.

Ксилема

Стенка, соединяющая отдельные элементы сосуда, из которых образуется трубка, может иметь несколько небольших отверстий. Однако в более старых сосудах эта стенка часто совсем отсутствует.

По ксилеме в растении переносится вода и растворенные в ней ионы. Главными клетками ксилемы являются изображенные здесь элементы сосудов. В зрелом состоянии это мертвые клетки, лишенные плазматической мембраны, стенки которых подверглись вторичному утолщению и сильной лигнификации. Как показано ниже, торцевые участки стенок в основном исчезают, в результате чего из последовательно расположенных элементов образуется очень длинная непрерывная трубка.



Элемент небольшого сосуда в кончике корня

Элемент крупного зрелого сосуда



Элементы ксилемы, образующие сосуд, тесно связаны с клетками ксилемной паренхимы, которые осуществляют активный транспорт некоторых растворенных веществ через плазматическую мембрану в элементы ксилемы и из них.

Схема 20-1. (Продолжение).

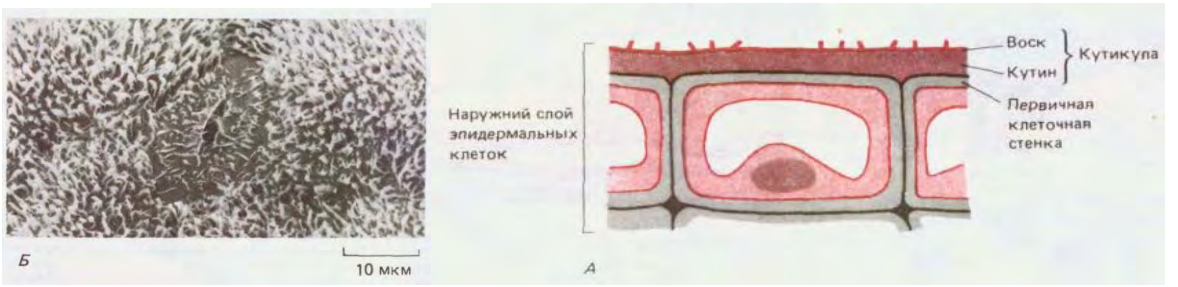


Рис. 20-18. *А.* Типичная зрелая клетка из эпидермиса листа (схематический разрез). На наружной поверхности толстой первичной клеточной стенки откладываются водонепроницаемые слои кутина и воска, в совокупности образующие кутикулу. Восковые отложения кутикулы зачастую создают на ее поверхности сложный рельеф. *Б.* Микрофотография нижнего эпидермиса листа гороха, полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа. Хорошо видны характерные особенности отложения воска вокруг устьичной щели. (С любезного разрешения P. Linstead.)

Заключение

Высшие растения состоят из огромного числа клеток, определенным образом скрепленных друг с другом окружающими их клеточными стенками. Многие характерные свойства растений прямо или косвенно связаны с наличием этих клеточных стенок. Состав и внешний вид клеточных стенок непосредственно определяются тем, к какому типу принадлежит данная клетка и каковы ее функции. Вместе с тем основные принципы построения всех клеточных стенок поразительно сходны: жесткие волокна целлюлозы погружены в матрикс, содержащий множество поперечных сшивок и состоящий из таких полисахаридов, как пектины и гемицеллюлозы, а также из гликопротеинов. Благодаря такому строению первичная клеточная стенка обладает большим запасом прочности при растяжении и способна пропускать лишь молекулы относительно небольшого размера. Если растительную клетку, лишенную клеточной стенки (протопласт), поместить в воду, то она осмотическим путем наберет воду, набухнет и лопнет. В то же время живое содержимое клетки, заключенное в оболочку, набухает и давит на последнюю, в результате чего возникает давление, известное под названием тургорного. Тургор строго регулируется и жизненно необходим как для увеличения размеров клетки, так и для механической жесткости молодого растения.

В формировании видового разнообразия высших растений участвует относительно небольшое число специализированных типов клеток, при образовании которых (например, сосудистых элементов двух проводящих тканей-ксилемы и флоэмы) клеточная стенка подвергается значительным изменениям. Определенные участки клеточной стенки могут быть укреплены. Часто это происходит путем добавления одного или более слоев, образующих вторичную клеточную стенку. Другие участки клеточной стенки могут избирательно удаляться, как это происходит с торцевыми стенками при образовании проводящей трубки сосуда из длинного ряда цилиндрических клеток. Эти изменения клеточной стенки контролируются временными и пространственными изменениями в цитоплазме развивающихся клеток. Клеточная стенка представляет собой динамическую структуру, состав и форма которой могут подвергаться заметным изменениям не только в процессе роста и дифференцировки клеток, но и после их созревания.

20.2. Перенос веществ между клетками

В предыдущем разделе мы говорили о том, что жесткая клеточная стенка порождает весьма специфические проблемы в связи с ростом и развитием растительных клеток. Кроме того, она сильно ограничивает

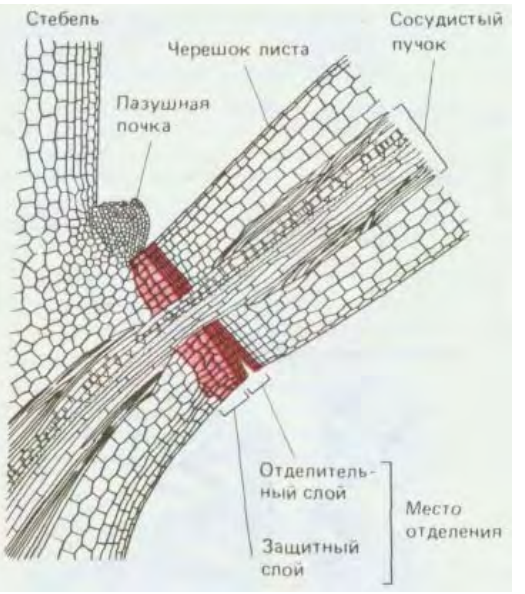


Рис. 20-19. Специализированные слои небольших клеток у основания черешка, при участии которых осуществляется листопад. Два или три слоя небольших клеток секретируют ферменты, обусловливающие деградацию клеточной стенки. Черешок отваливается от стебля в том месте, где клеточные стенки тоньше. Несколько лигнифицированных клеток пересекают весь отделительный слой листа. Остающиеся в зоне отделения клетки откладывают суберин, в результате чего над раной образуется защитный слой.

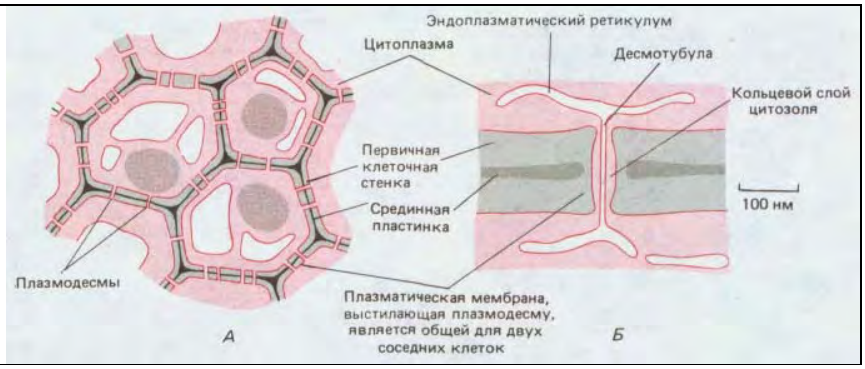


Рис. 20-20. *А.* Цитоплазматические каналы, называемые плазмодесмами, пронизывают клеточные стенки и соединяют в единое целое все клетки растения. *Б.* Плазмодесма выстлана плазматической мембраной, без перерыва переходящей в мембраны обеих соседних клеток. Обычно в просвете плазмодесмы находится тонкая цилиндрическая структура, так называемая десмотубула, которая является производным эндоплазматического ретикулума

возможности взаимодействия клеток, замурованных в ткани друг с другом и с окружающей их средой. Однако растительные клетки изобрели самые хитроумные способы преодоления этих ограничений. Непосредственная взаимосвязь клеток столь же важна для многоклеточных растений, как и для многоклеточных животных; поэтому возникли специальные канальцы, соединяющие цитоплазму растительной клетки с цитоплазмой соседних клеток (при этом обеспечивается контролируемый переход ионов и небольших молекул). Кроме того, у высших растений длинные тяжи цилиндрических клеток соединены друг с другом перфорациями, в результате чего образуются длинные трубки, обеспечивающие ток воды и питательных веществ.

20.2.1. Растительные клетки соединены между собой специальными цитоплазматическими мостиками, так называемыми плазмодесмами [9]

За исключением очень немногих специализированных видов клеток, все живые клетки у высшего растения соединены с соседними при помощи тонких цитоплазматических каналов, называемых **плазмодесмами,** которые пронизывают разделяющие их клеточные стенки. Как показано на рис. 20-20, в области каждой плазмодесмы плазматическая мембрана одной клетки без перерыва переходит в мембрану соседней клетки. Сама плазмодесма представляет собой цилиндрический выстланный мембраной канал диаметром от 20 до 40 нм. По оси канала из одной клетки в другую тянется цилиндрическая структура меньшего диаметра - *десмотубула,* просвет которой, по данным электронной микроскопии, сообщается с полостями эндоплазматического ретикулума обеих смежных клеток (рис. 20-21). Пространство между наружной поверхностью десмотубулы и мембранной выстилкой плазмодесмы заполнено цитозолем (рис. 20-20). Очень часто у обоих концов канала отмечается сужение этого кольцевого слоя цитоплазмы. Возможно, что эти сужения играют очень важную роль, так как именно здесь каждая из клеток в принципе имеет возможность регулировать переход молекул из одной клетки в другую.

Обычно плазмодесмы образуются вокруг элементов эндоплазматического ретикулума, который в ходе цитокинеза оказывается погруженным в новую клеточную стенку, разделяющую материнскую клетку (см. рис. 13-71). Но плазмодесмы обнаруживаются также и в стенках клеток, которые не являются сестринскими. Кроме того, количество плазмодесм может увеличиваться при росте клеток, свидетельствуя о том, что они могут образовываться de novo.

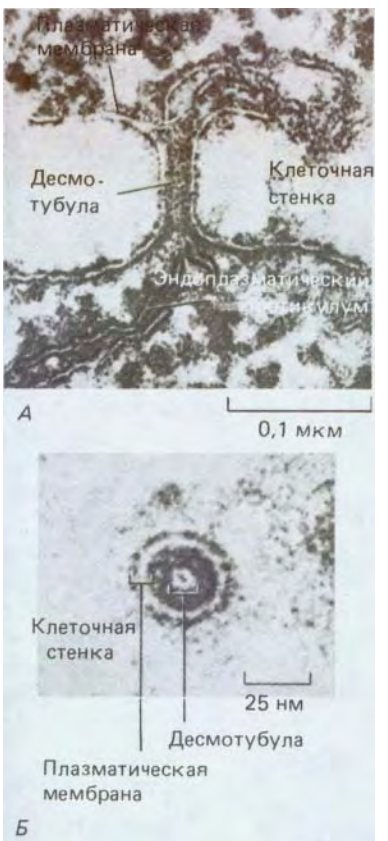


Рис. 20-21. Плазмодесмы на электронных микрофотографиях. *А.* Продольный срез плазмодесмы водного папоротника. Плазматическая мембрана выстилает пору и, не прерываясь, переходит из одной клетки а другую. Видны эндоплазматический ретикулум и связанная с ним центральная десмотубула. *Б.* Такая же плазмодесма на поперечном срезе. (С любезного разрешения R. Overall.)

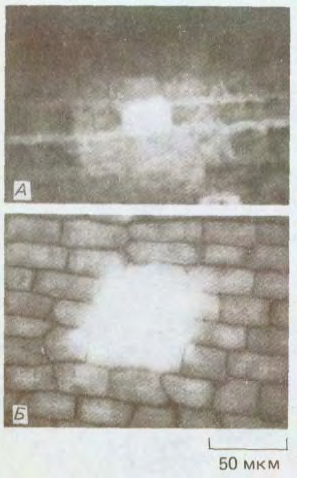


Рис. 20-22. Использование различных по размеру, флуоресцирующих пептидов для определения функционального размера каналов в плазмодесмах. *А.* Флуоресцирующий пептид с мол. массой более 850 дальтон. *Б.* Флуоресцирующий пептид с мол. массой менее 850 дальтон. В обоих случаях пептид вводили в одну клетку эпидермиса рдеста маленького. Обратите внимание, что пептид большого размера почти не продвинулся, тогда как меньший пептид проник во многие соседние клетки. (С любезного разрешения P. B. Goodwin.)

20.2.2. Плазмодесмы позволяют молекулам непосредственно переходить из одной клетки в другую [9, 10]

Что же еще, помимо характерной структуры, может служить свидетельством в пользу предполагаемой роли плазмодесм в межклеточной связи? На эту роль косвенно указывает тот факт, то плазмодесмы особенно многочисленны в стенках клеток, группирующихся в зонах интенсивной секреции, например в нектарниках цветков. У таких клеток на 1 мкм^3 поверхности клеточной стенки может приходиться 15 и более плазмодесм, тогда как у других клеток это число нередко бывает меньше единицы.

Наиболее прямые указания на межклеточный транспорт через плазмодесмы были получены в экспериментах с введением красителей и с пропусканием электрического тока. Так, например, флуоресцентные красители лишь с трудом проходят через плазматическую мембрану, однако после введения их с помощью микрокапилляра в одну из клеток листа элодеи они довольно быстро появляются в соседних клетках. Точно так же при подаче электрических импульсов внутрь одной из клеток эти импульсы регистрируются (хотя и в ослабленном виде) электродами в соседних клетках. Степень ослабления электрического сигнала зависит от плотности расположения плазмодесм и от числа клеток, находящихся между электродами. Кроме того, электрод, приложенный к наружной поверхности плазматической мембраны, не улавливает сигналов, поданных внутрь клетки; значит, они распространяются какими-то внутриклеточными путями.

Таким образом, представляется вероятным, что именно плазмодесмы обеспечивают транспорт растворенных веществ между соседними растительными клетками, подобно тому, как щелевые контакты обеспечивают межклеточный транспорт у животных (см. разд. 14.1.5). Данные, полученные при микроинъекции флуоресцентных красителей, соединенных с пептидами различных размеров, свидетельствуют о том, что по плазмодесмам могут перемещаться молекулы с массой, не превышающей 800 дальтон (рис. 20-22), что примерно соответствует ограничениям по размеру для щелевых контактов. Ряд данных свидетельствует о том, что транспорт через плазмодесмы регулируется сложным образом. Так, эксперименты по введению красителей показали, что, несмотря на наличие внешне нормальных плазмодесм, между некоторыми системами тканей перенос даже низкомолекулярных веществ затруднен. Например, передвижение краски не обнаруживается между клетками корневого чехлика и клетками кончика корня, или между клетками эпидермиса и коры как в корнях, так и в побегах. Механизмы, ограничивающие в этих случаях сообщение между клетками, остаются пока неизвестными, хотя имеются некоторые указания на то, что в них могут быть

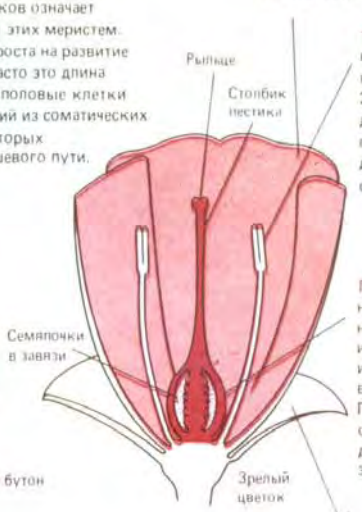


Рис. 20-23. На этой электронной микрофотографии видно, как мелкие сферические вирусные частицы переходят по плазме из одной клетки растения в другую. Диаметр этих растительных вирусов составляет 25 нм, что значительно превышает размер пептидов, не способных проходить через эти отверстия. (С любезного разрешения K. Plaskitt.)

ЦВЕТОК

У высших растений цветки, содержащие репродуктивные клетки, возникают из апикальных меристем вегетативных побегов (см. рис. 20–60 и рис. 20–62). Появление цветков означает прекращение дальнейшего вегетативного роста этих меристем. Сигналами для переключения с вегетативного роста на развитие цветка служат факторы окружающей среды, часто это длина светового дня и температура. Таким образом, половые клетки возникают на поздних стадиях развития растений из соматических клеток, в противоположность животным, у которых половые клетки возникают из клеток зародышевого пути.





Лепесток. Характерные структуры, похожие на лист, и обычно яркоокрашенные; способствуют опылению, привлекая, например, насекомых.

Тычинка. Тычинки содержат клетки, претерпевающие мейоз и образующие гаплоидные пыльцевые зерна (см. рис. 20–14), каждое из которых несет два спермия. Пыльца, попав на рыльце, прорастает, и пыльцевая трубка доставляет два неподвижных спермия к завязи.

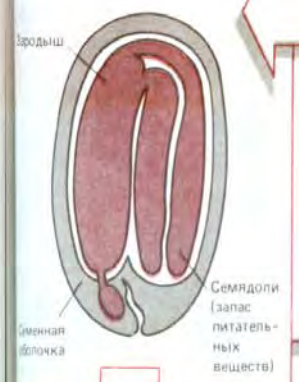


Плодолистик. Содержит одну или несколько завязей, каждая из которых несет семяпочки. В каждой семяпочке имеются клетки, претерпевающие мейоз и образующие зародышевый мешок, в котором содержится яйцеклетка. При оплодотворении один спермий сливается с яйцеклеткой, образуя диплоидный зародыш, а второй сливается с двумя другими клетками в зародышевом мешке, образуя триплоидный эндосперм (см. разд. 20.5.1).

Чашелистики представляют собой образования, похожие на листья, которые обеспечивают защиту цветка на ранних стадиях его развития.

СЕМЯ

Семя содержит зародыш, находящийся в состоянии покоя, запас питательных веществ и семенную оболочку. В конце развития семени содержание в нем воды может упасть с 90% до 5%. Семя обычно заключено в *плод*, ткани которого по своему происхождению являются материнскими.

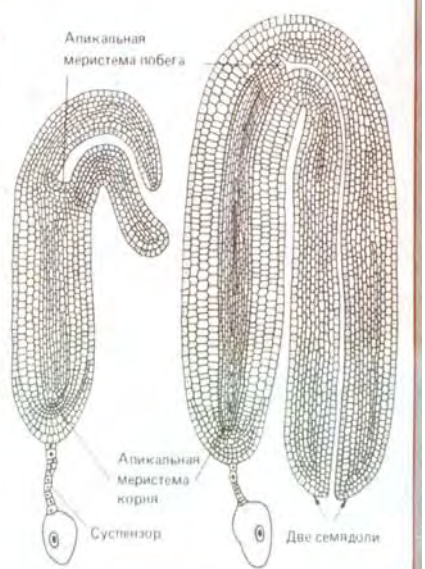


ЗАРОДЫШ



Оплодотворенная яйцеклетка внутри семяпочки растет и образует зародыш, используя питательные вещества, транспортируемые из эндосперма по суспензору (см. разд. 20.5.1). В результате сложной серии клеточных делений, показанных здесь на примере распространенного травянистого растения пастушьей сумки, образуется зародыш, имеющий апикальную меристему корня, апикальную меристему побега и одну (у однодольных) или две (у двудольных) семядоли.

На этой стадии развитие прекращается и семяпочка, содержащая зародыш становится семенем, приспособленным к распространению и выживанию.



ПРОРАСТАНИЕ

Для того чтобы зародыш возобновил свой рост, семя должно прорасти. Этот процесс зависит как от внутренних (состояние покоя), так и от внешних факторов, включая температуру, влажность и содержание кислорода. Запасы питательных веществ для ранних стадий прорастания могут содержаться либо в эндосперме (кукуруза), либо в семядолях (горох и бобы).

Вначале обычно из семени выходит первичный корень, чтобы обеспечить проросток водой. Семядоли могут выйти из под земли как у фасоли, изображенной здесь, либо остаться в земле, как у гороха. В обоих случаях семядоли впоследствии засыхают.

Теперь апикальная меристема может проявить свою способность к постоянному росту, образуя типичную картину чередующихся узлов, междоузлий и почек (см. разд. 20.5.2).

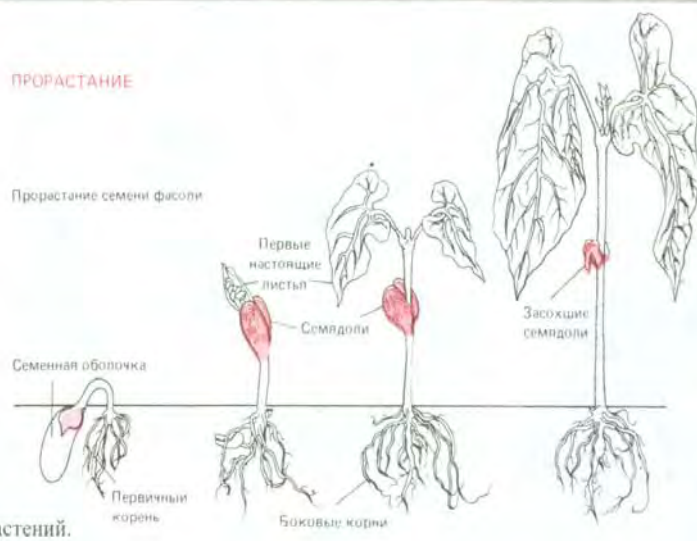


Схема 20-2. Особенности раннего развития цветковых растений.



Рис. 20-24. Сильно схематизированное изображение группы растительных клеток, соединенных плазмодесмами. Плазматическая мембрана, которая выстилает плазмодесмы, разделяет весь объем растения на два компартмента: внеклеточный и внутриклеточный (симпласт). Для большей ясности клеточные органеллы на схеме не показаны.

задействованы ионы Ca^{2+} и фосфорилирование белка. С другой стороны, показано, что определенные вирусы растений способны вызывать расширение плазмодесм, обеспечивая себе возможность передвижения из клетки в клетку (рис. 20-23). Например, установлено, что у вируса табачной мозаики транспорт через плазмодесмы зависит от одного-единственного вирусного белка (P30) с молекулярной массой 30000: дефектный вирус, неспособный перемещаться из клетки в клетку в обычном растении, вполне успешно делает это в трансгенном растении табака, содержащим соответствующий ген.

20.2.3. У высших растений биологические жидкости разделены на два больших компартмента - внутриклеточный и внеклеточный

Плазмодесмы соединяют плазматическую мембрану и цитоплазму соседних клеток, превращая их в сложное сообщество живых протопластов. Поэтому все тело растения можно рассматривать как систему из двух компартментов: 1) внутриклеточного - так называемого симпласта, состоящего из объединенного множества протопластов (включая и протопласты ситовидных трубок флоэмы) и ограниченного объединенной плазматической мембраной всех живых клеток и 2) внеклеточного, или **апопласта,** включающего все клеточные стенки и мертвые пустые проводящие ксилемы, а также находящуюся в тех и в других воду (рис. 20-24). Оба компартмента имеют свои собственные транспортные системы, однако в определенных точках они могут сообщаться между собой, а также подвергаться локальной модификации для обеспечения контроля протекающих между ними обменных процессов.

20.2.4. Фотосинтезирующие и поглощающие клетки связаны друг с другом сосудистыми тканями, в состав которых входит ксилема и флоэма [11]

Многоклеточная организация у растений, как и у животных, делает возможным разделение функций, при котором различные типы клеток дополняют друг друга благодаря специализации, приобретаемой ими в процессе дифференцировки. Две важнейшие специфические для растений функции осуществляются **фотосинтезирующими клетками,** которые содержат хлоропласта и служат для всего организма источником органических веществ, в частности сахарозы, и **всасывающими** клетками, которые поглощают из окружающей среды воду и растворенные минеральные вещества. У большинства высших растений эти две функции не могут выполняться одними и теми же клетками, поскольку для первой из них необходим свет, а вторая осуществляется в толще почвы и темноте. Для каждого из этих процессов требуется и ряд других условий. Фотосинтез, например, должен протекать в особой микросреде. где строго регулируется относительная влажность и содержание двуокиси углерода. Достигается это с помощью устьиц - особых отверстий в покрытом кутикулой эпидермисе листа, которые способны открываться и закрываться в зависимости от тургора замыкающих клеток (см. рис. 20-11). С другой стороны, для эффективного поглощения веществ из почвы нужна очень большая всасывающая поверхность, которую обеспечивают корни; необходимы также мембранные транспортные системы, к которым часто добавляются транспортные системы симбиотических микроорганизмов. Таким образом, фотосинтезирующие и всасывающие клетки питают друг друга, а вместе - снабжают все остальные части растения минеральными и органическими веществами, необходимыми для процессов биосинтеза. Чтобы обеспечить дальний транс-

порт этих веществ, фотосинтезирующие и всасывающие ткани связаны с *ксилемой* и *флоэмой,* которые образуют разветвленную сеть проводящих элементов. Каждый из них состоит из цепей цилиндрических клеток, соединенных своими концами и образующих трубочки (см. схему 20-1 и рис. 20-16).

20.2.5. Вода и растворенные в ней соли передвигаются по ксилеме [12]

Ксилема - сложный компонент системы проводящих тканей. Зрелые элементы сосудов ксилемы представляют собой погибшие клетки, лишенные цитоплазмы. Боковые стенки их сильно лигнифицированы, и на их внутренней стороне имеются вторичные утолщения. Эти трубочки обеспечивают перенос воды и растворенных в ней неорганических ионов от корней к остальным частям растения (рис. 20-25). Ксилема также осуществляет опорную функцию, особенно у древесных растений. Ток жидкости в ксилеме направлен в одну сторону - к местам испарения влаги. Вода насасывается в трубочки, похожие на капилляры, благодаря испарению. Лигнин откладывается вокруг сосудов ксилемы таким образом, что получаются очень устойчивые к сжатию структуры, что весьма важно для трубочек, несущих жидкость, находящуюся под отрицательным давлением. Без подобного укрепления длинные трубочки попросту бы слиплись, как тонкая соломка для коктейлей.

По сосудам ксилемы транспортируются главным образом минеральные соли и азотсодержащие соединения, которые, вероятно, поступают сюда в результате активной секреции их клетками корневой паренхимы.

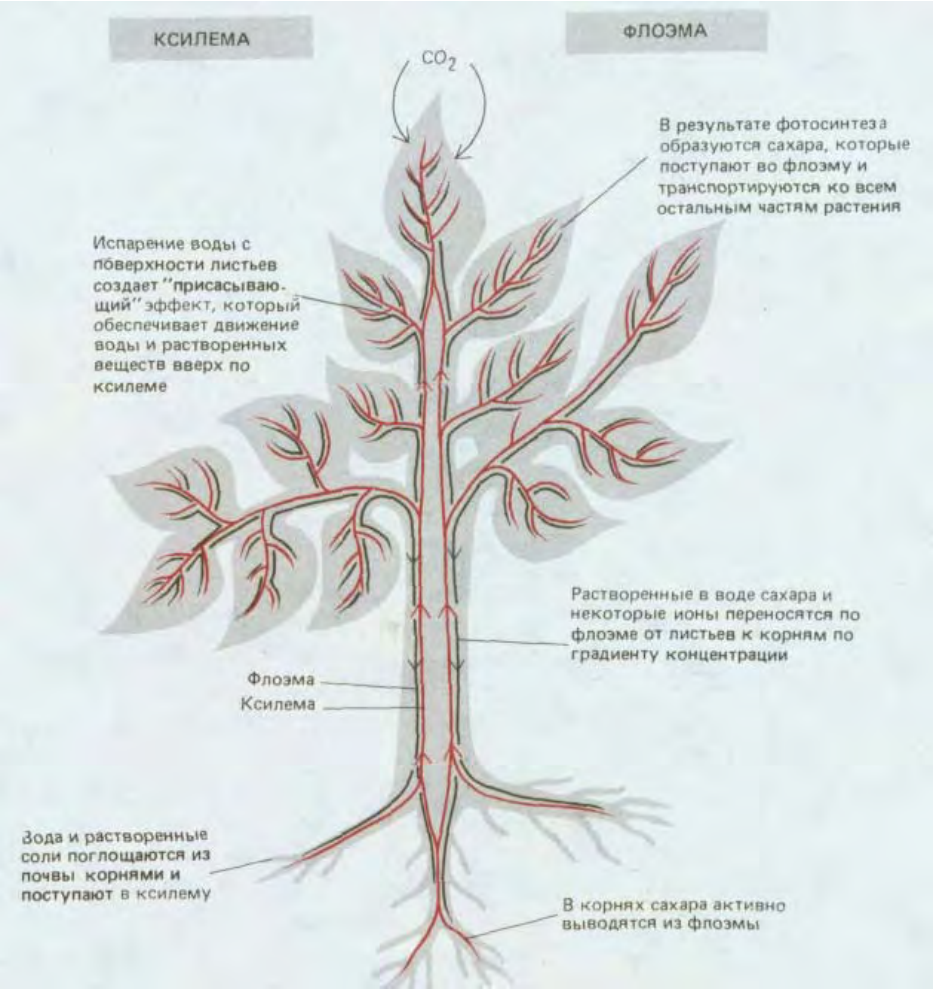


Рис. 20-25. Две главные проводящие системы - ксилема и флоэма, с их помощью вода и растворенные в ней вещества транспортируются по всему растению. Это сильно упрощенная схема, в частности на ней не отражен интенсивный водный обмен, происходящий между ксилемой и флоэмой через боковые стенки.

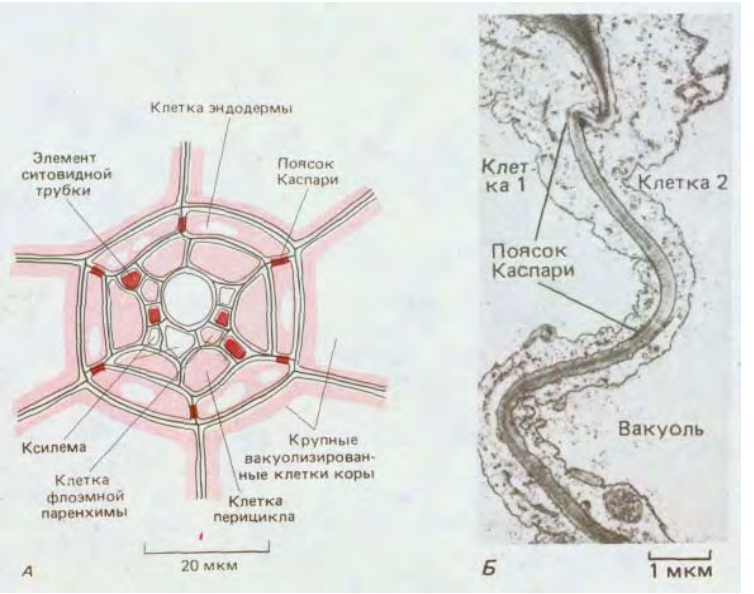


Рис. 20-26. *А.* Проводящая сеть низкоорганизованного растения, водного папоротника *Azolla* (схематический поперечный разрез осевой части корня). У этого растения картина расположения проводящих структур чрезвычайно проста: имеются четыре сосуда ксилемы и четыре элемента ситовидных трубок флоэмы. У большинства высших растений распределение клеток проводящих тканей гораздо сложнее. Обратите внимание на то, что ксилема и флоэма окружены клетками эндодермы и что пояски Каспари, занимающие в эндодерме стратегические позиции, препятствуют утечке воды из сосудистой системы через апопласт. *Б.* Поясок Каспари между двумя эндодермальными клетками корня, аналогичными представленным на рис. *А*. В отличие от обычной первичной клеточной стенки, поясок Каспари имеет гладкую текстуру из-за высокого содержания кутина; гидрофобные свойства кутина делают эти участки клеточной стенки непроницаемыми для воды, (Б - по B. Gunning, M. Steev, Ultrastucture and Biology of Plant Cells. London: Arnold 1975.)

Утечка растворенных веществ в обратном направлении через апопласт на входных участках ксилемы блокируется так называемыми *поясками Каспари,* которые по своей функции аналогичны плотным контактам между соседними эпителиальными клетками животных (рис. 20-26). На выходе проводящих путей ксилемы особые паренхимные клетки, снабженные специфическими транспортными белками, локализованными в мембране, перекачивают растворенные вещества в фотосинтезирующие ткани. Большая часть растворителя (воды), проходящего по сосудам ксилемы, в конце концов испаряется, главным образом с поверхности фотосинтезирующих тканей листа.

Так как накачивание растворенных веществ в ксилему корней происходит непрерывно, оно может вызвать осмотический поток, обеспечивающий доставку растворенных веществ к листьям и побегам даже в тех случаях, когда погодные условия затрудняют испарение. Капельки воды, которые можно увидеть на кончиках листьев луговых трав ранним утром, выделяются именно благодаря этому феномену корневого давления, обусловленного осмосом. (Описание некоторых типов клеток, участвующих в этом процессе, см. на схеме 20-1.)

20.2.6. Сахара переносятся под действием давления, возникающего во флоэме [13]

Флоэма представляет собой сложный комплекс клеток проводящей ткани, обеспечивающий транспорт растворенных органических веществ, главным образом сахарозы, из фотосинтезирующих клеток листа к остальным частям растения (см. рис. 20-25). Основной проводящий компонент флоэмы - это *ситовидная трубка* ~ длинная колонка из живых цилиндрических клеток, которые сообщаются друг с другом через отверстия в торцевых участках их клеточных стенок (ситовидные пластинки). Сахароза поступает в клетки, образующие верхнюю часть ситовидной трубки и в виде концентрированного раствора (обычно 10-25%) перемещается по трубке вниз, переходя из одной ее клетки в другую. Клетки с толстой стенкой образуют трубку, пригодную для транспорта жидкости под высоким давлением (до 30 атм). Хотя зрелые ситовидные элементы представляют собой живые клетки с функциони-

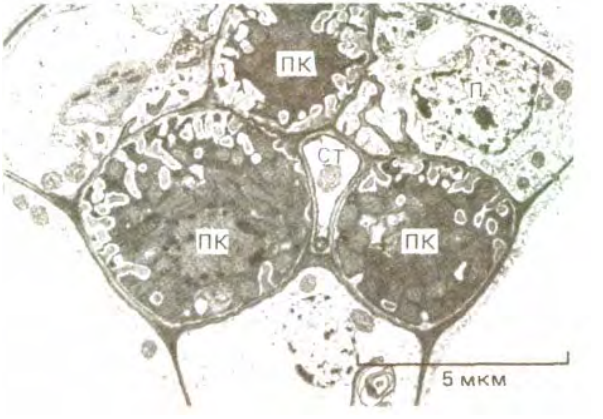


Рис. 20-27. Специализированные **передаточные клетки** в небольшой жилке листа. Элемент ситовидной трубки флоэмы (СТ) окружен тремя передаточными клетками (ПК). Впячивания клеточной стенки, выстланные плазматической мембраной, увеличивают поверхность этих клеток в двадцать раз. Передаточные клетки обнаруживаются в тех областях растения, в которых скорость переноса растворенных веществ через плазматическую мембрану особенно высока, например, там, где неорганические ионы перекачиваются из ксилемы в ткани или, как в данном случае, где сахароза накачивается во флоэму.

рующей плазматической мембраной (и, следовательно, являются частью симпласта), ядра и часть цитоплазмы они потеряли. Их существование обеспечивают связанные с ними *клетки-спутники,* которые переносят растворенные питательные вещества и другие молекулы в обоих направлениях: внутрь ситовидных трубок и из них через собранные в группы плазмодесмы, расположенные на общих боковых стенках (см. схему 20-1).

Транспорт по флоэме - это гораздо более сложный процесс, чем передвижение веществ по ксилеме, поскольку он не ограничивается одним направлением: растворенные органические вещества, главным образом сахароза, переносятся от мест их синтеза к местам потребления и хранения, независимо от того, где эти места расположены. Сахароза активно переносится внутрь ситовидных трубок и из них специализированными *передаточными клетками,* расположенными в источниках и потребителях соответственно) (рис. 20-27). Повышение концентрации сахара в источниках приводит к тому, что во флоэму в этих местах поступает больше жидкости, при этом создается давление, необходимое для сильного тока жидкости через ситовидные трубки к потребителям метаболитов. Здесь сахар в основном задерживается, а вода удаляется осмотическим путем (главным образом в ксилему). Жидкость движется по флоэме со скоростью около 1 м/ч, это значительно превышает скорость диффузии.

Следует заметить, что транспорт жидкости у растений имеет по меньшей мере две характерные особенности, отличающие его от аналогичного процесса у животных. Во-первых, животные имеют только одну транспортную систему - кровеносную, растения же обладают двумя различными системами - флоэмой и ксилемой. Во-вторых, у растений жидкости не циркулируют по замкнутому пути, подобно крови у животных; вместо этого здесь поддерживается постоянный ток воды от корней к листьям по двум «открытым трубопроводам» (см. рис. 20-25).

Заключение

Наличие жесткой относительно непроницаемой клеточной стенки в значительной степени определяет специфику взаимодействия растительных клеток друг с другом, а также с окружающей средой. Все живые клетки растения соединены между собой плазмодесмами - миниатюрными цитоплазматическими каналами, выстланными плазматической мембраной, которые пронизывают клеточные стенки и обеспечивают переход многих растворенных веществ из клетки в клетку. Таким образом, все живые протопласты растительного организма составляют единую систему-

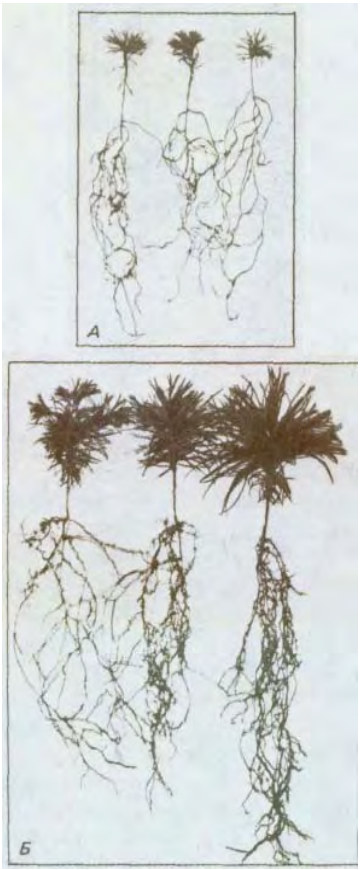


Рис. 20-28. Воздействие микоризы на рост растений. Все проростки сосны первые два месяца выращивали в стерильном растворе питательных веществ (здесь они изображены в возрасте 9 месяцев). Одни проростки *(А)* высаживали сразу в почву, взятую из открытой степи, а другие *(Б)* перед перенесением в степную почву две недели выращивали в почве, взятой из леса. Эти последние *(Б)* растения имели преимущество в росте и развитии благодаря наличию в лесной почве определенных грибов, образующих микоризу. (С любезного разрешения *J.* Iyer, S. Wilde.)

так называемый симпласт. Остальное пространство, занятое клеточными стенками и отмершими «пустыми» клетками, по которым в растении транспортируется большая часть воды, называется апопластом. Фотосинтезирующие клетки растений производят сахара, которые переходят во все остальные органы и ткани растения через живые клетки флоэмы, составляющие часть симпласта. Клетки корней поглощают из почвы воду и растворенные в ней минеральные вещества, транспортируемые затем к листьям по сосудам ксилемы, образованным отмершими клетками, которые входят в состав апопласта. И снова физические силы, в данном случае испарение, обеспечивают непрерывное продвижение столба воды от корня к листьям.

20.3. Взаимодействия между растениями и другими организмами

И корни, и побеги растений взаимодействуют с бесчисленным множеством организмов, среди которых бактерии, грибы, черви и насекомые. Для этого взаимодействия в ходе эволюции выработались специальные механизмы (генетические, химические и анатомические). К ним относятся защитные реакции против патогенов и симбиотические связи с организмами, необходимые для жизни растения. В данном разделе мы рассмотрим четыре примера подобных взаимодействий. Они иллюстрируют всю сложность возникающих при этом сигналов и ответов на них.

20.3.1. Большинство сосудистых растений живет в симбиозе с почвенными грибами [14]

Если проростки лесного дерева, выращенные в стерильных условиях, высадить в луговую почву, то скорее всего они погибнут. Однако если проростки высадить в землю, куда добавлено небольшое количество лесной почвы, то нормальный рост будет обеспечен (рис. 20-28). Необходимый фактор, содержащийся в лесной почве, - это грибы, которые вступают в тесную симбиотическую связь с корнями растения и образуют *микоризу* или «грибной корень», обнаруживаемый более чем у 90% сосудистых растений. Нити грибницы обладают очень большой поверхностью и образуют покрытие корня растения, напоминающее войлок; при этом они проникают между, а в некоторых случаях и внутрь клеток коры корня. Грибы секретируют факторы роста, заставляющие клетки корневой коры увеличиваться в размерах и делиться, что обусловливает ветвление корней. Изменяя pH почвы, грибы также повышают содержание в ней неорганических питательных веществ, в особенности фосфатов, переводя их в форму, которая может усваиваться растением. В свою очередь растение снабжает грибы сахарами и аминокислотами. Каждое растение образует микоризу лишь с ограниченным числом видов грибов, и во многих случаях грибы необходимы для выживания растений. Например, хороший рост орхидей после прорастания семян полностью зависит от присутствия соответствующих грибов. Не исключено, что географическое распространение многих растений определяется присутствием грибов, связанных с ними. Молекулярные механизмы взаимодействия гриба и растения в микоризе еще неясны. Значительно больше известно о симбиозе корней растений с бактериями.

20.3.2. **Бактерии-симбионты помогают некоторым растениям усваивать атмосферный азот** [15]

Исходные материалы, необходимые для роста растений, представлены главным образом неорганическими веществами - O_2, CO_2, H_2O и соля-

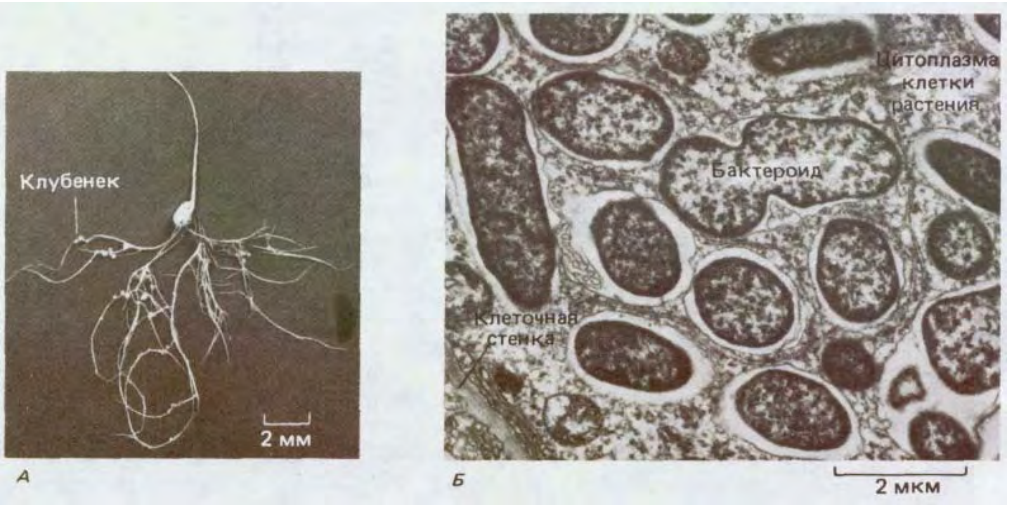


Рис. 20-29. *А.* Молодой проросток гороха в симбиотической ассоциации с азотфиксирующими бактериями *Rhizobium.* Хорошо видны корневые клубеньки, в которых находятся бактерии. *Б.* Электронная микрофотография тонкого среза корневого клубенька гороха, показанного на рис. *А.* Азотфиксирующие бактероиды *Rhizobium,* окруженные мембраной, принадлежащей клетке-хозяину, заполняют цитоплазму этой клетки. *(А - с* любезного разрешения A. Johnston; *Б-* с любезного разрешения B. Huang, Q. S. Ma.)

ми. Большинство солей, потребляемых корнями из почвы, образуются в результате разрушения горных пород. Исключение составляет азот: весь, содержащийся в живых организмах азот происходит в конечном счете из атмосферного азота, который включается в органические вещества в ходе весьма энергоемкого процесса (с этим связана и высокая цена искусственно производимых азотосодержащих удобрений). Единственными организмами, способными фиксировать азот из атмосферы, являются прокариоты (цианобактерии и отдельные виды группы эубактерий). Некоторые из них - свободноживущие почвенные организмы, другие же (например, бактерия *Rhizobium)* вступают в симбиотическую ассоциацию с корнями определенных растений, например бобовых - гороха, бобов и клевера.

Первая стадия в возникновении симбиоза - специфическое узнавание бактерией тонких корневых волосков, отходящих от специализированных эпидермальных клеток растения-хозяина. После связывания с клетками эпидермиса корня растущая бактерия проникает в растение с помощью *инфекционных филаментов* и вызывает деление кортикальных клеток, лежащих под эпидермальными; в результате образуется большой *корневой клубенек* (рис. 20-29, *А).* Бактерии внедряются во все новые кортикальные клетки, заселяя их цитоплазму. Примерно половина массы каждого зрелого клубенька приходится на внутриклеточные бактерии, которые утратили большую часть своей клеточной стенки. Плазматическая мембрана каждой такой бактерии окружена еще одной мембраной, которую продуцирует клетка-хозяин. Именно эти видоизмененные бактерии, именуемые *бактероидами,* и фиксируют азот, который в конечном итоге используется растением (рис. 20-29, *Б).*

Бактериальный фермент, катализирующий связывание азота, носит название *нитрогеназа.* Он представляет собой сложную белковую молекулу, состоящую из трех полипептидных цепей. У симбиотических видов *Rhizobium* этот белковый комплекс катализирует образование аммиака из атмосферного азота. Затем аммиак быстро перемещается в цитоплазму клеток хозяина, где он превращается в глутамин. В конечном счете фиксированный азот включается во все остальные аминокислоты.

Генетический анализ показал, что для возникновения и поддержания подобного симбиоза необходима координированная экспрессия многих генов, принадлежащих и бактерии, и растению. «Диалог» между бактерией и клеткой-хозяином начинается со связывания бактерии с корневыми волосками. В результате этого связывания активируется ряд генов

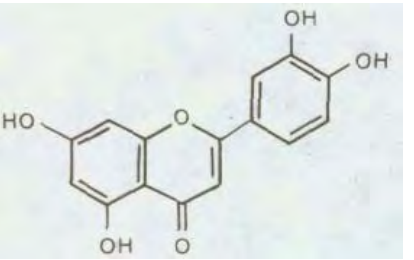


Рис. 20-30. Различные флавоны и родственные им соединения, выделяемые корнем растения-хозяина, связываются со специфическими бактериями, образующими клубеньки, и активируют их. На рисунке представлена структура лютеолина флавона люцерны, который у *Rhizobium meliloti* индуцирует гены *nod.* Эта сигнальная молекула, очевидно, связывается с белком nodD, который в активированной форме включает бактериальные гены азотфиксации. Флавоны тесно связаны с антоциановыми пигментами цветков и плодов. Различные растения продуцируют разные комбинации флавонов, которые избирательно активируют специфичные для этих растений виды *Rhizobium.*

хозяина, кодирующих в растительной клетке белки *(нодулины),* которые необходимы для роста и функционирования клубенька. Флавоноид, вырабатываемый клетками растения, связывается с белком, кодируемым бактериальным геном *nod,* и активирует его (рис. 20-30). Активированный белок *nodD* включает синтез продукта другого бактериального гена, который индуцирует образование нодулинов растения-хозяина. Большая часть бактериальных генов *nod, a* также гены *nif* (они кодируют белки, участвующие в фиксации азота, например нитрогеназу) содержатся в большой плазмиде. Если плазмидные гены азотфиксации, содержащиеся у *Rhizobium,* образующей клубеньки на фасоли, заменить на соответствующие гены, выделенные из клеток штамма, специфичного для гороха, бактерии начинают формировать клубеньки только на горохе.

К нодулинам клетки-хозяина относятся белки, участвующие в делении кортикальных клеток корня, структурные компоненты клубенька, ферменты дающие возможность растению ассимилировать вещества, содержащие связанный азот, и особые белки, необходимые для функционирования бактероида. Наиболее важный из этих белков - *леггемоглобин* - локализован в цитоплазме, связывающей кислород, и аналогичен миоглобину млекопитающих. Нитрогеназный комплекс бактерий необратимо инактивируется свободным кислородом. В связи с этим необходимы специальные механизмы, которые могли бы обеспечивать существование бактероида в корнях. Благодаря им давление кислорода поддерживается на таком уровне, чтобы обеспечить дыхание и вместе с тем не повредить нитрогеназу. Индуцируемый *Rhizobium* синтез больших количеств леггемоглобина, действующего как кислородный буфер, является частью этого механизма. Глобиновая часть молекулы кодируется геном хозяина, а гем (простетическая группа) детерминируется бактериальным партнером - замечательный пример эволюционной адаптации организмов друг к другу.

Процесс азотфиксации обеспечивается солнечной энергией, преобразованной посредством фотосинтеза. Установлено, что для фиксации одной молекулы азота *Rhizobium* необходимо около 25-35 молекул ATP. Эти прокариоты поставляют для растений в естественных экосистемах гораздо больше фиксированного азота (~2 x 10^8 тонн в год), чем можно получить при использовании азотных удобрений.

20.3.3. *Agrobacterium* представляет собой фитопатоген, переносящий гены в геном своего хозяина [16]

Другая почвенная бактерия, близкородственная *Rhizobium,* называется *Agrobacterium tumefaciens.* Эта бактерия у растений вызывает образование корончатых галлов. При контакте с *Agrobacterium* нормальные растительные клетки трансформируются в опухолевые, вследствие переноса генов от бактерии к хозяину (рис. 20-31).

Опухолевые клетки, индуцируемые *Agrobacterium,* обладают рядом замечательных свойств. Во-первых, такие клетки можно выделить и неограниченно долго выращивать в культуре без факторов роста и вне контакта с клетками *Agrobacterium.* Во-вторых, они синтезируют ряд необычных веществ, называемых *опинами.* Эти производные аминокислот могут перерабатываться и усваиваться преимущественно тем штаммом бактерий, которые индуцировали синтез опинов в растительных клетках.

Многие свойства опухолевых клеток стали понятны при анализе молекулярно-генетических данных. Способность *Agrobacterium* индуцировать опухоли связана с большой ДНК-содержащей плазмидой, названной Ti (от англ. tumor inducing - вызывающая опухоли). Часть этой



Рис. 20-31. Опухоли, индуцированные *Agrobacterium tumefaciens* у комнатного растения-суккулента. (С любезного разрешения P. Hooykaas, из Genetic Eng., I, 155, 1979.)

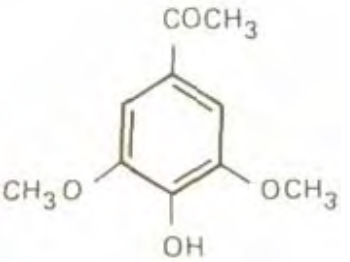


Рис. 20-32. Ацетосирингон сигнальная молекула, обнаруженная в поврежденных, но метаболически активных клетках растений. Ацетосирингон специфически активирует вирулентные гены Ti-плазмиды *Agrobacterium,* которые принимают участие в образовании Т-ДНК, интегрирующейся с геномом клетки-хозяина (см. рис. 20-33).

плазмиды-Т-ДНК (от англ. transferred DNA-передаваемая ДНК) включается в ядерный геном растительной клетки. Бактерия может проникнуть в чувствительное растение только в том месте, где оно повреждено, т. е. там, где растительные клетки секретируют необычные фенольные соединения, в частности *ацетосирингон* (рис. 20-32). При этом у бактерии запускается каскад реакций, в результате которых Т-ДНК вырезается из Ti-плазмиды и переносится в геном клетки-хозяина (рис. 20-33). Включившись в хромосому клетки-хозяина, Т-ДНК транскрибируется и транслируется в ней, образуя три класса белков.

К первому относится фермент, вызывающий у растения синтез специфического опина, а два других - это ферменты, катализирующие синтез регуляторов роста растений - *индолилуксусной кислоты* и *цитокинина* (см. рис. 20-67). Повышение содержания этих двух регуляторов роста в результате активности включившихся в геном растения генов Т-ДНК вызывают неограниченный рост и деление трансформированных растительных клеток, чем и объясняется способность этих клеток продолжать рост в отсутствие обоих регуляторов роста и исходной бактерии.

Способность Т-ДНК *Agrobacterium* стабильно включаться в геном хозяина дает возможность широко использовать полученные на ее основе рекомбинантные молекулы ДНК в качестве вектора для генетической трансформации растительных клеток (см. разд. 20.5.10).

20.3.4. Продукты, возникающие при разрушении клеточной стенки, часто используются в качестве сигналов при взаимодействии растения и патогена [17]

В качестве защитных агентов растения используют большое число крайне специализированных метаболитов. Некоторые вещества, как, например, гликозиды в горчичном масле и самые разнообразные алкалоиды (кофеин, морфин, стрихнин и колхицин) действуют отпугивающе

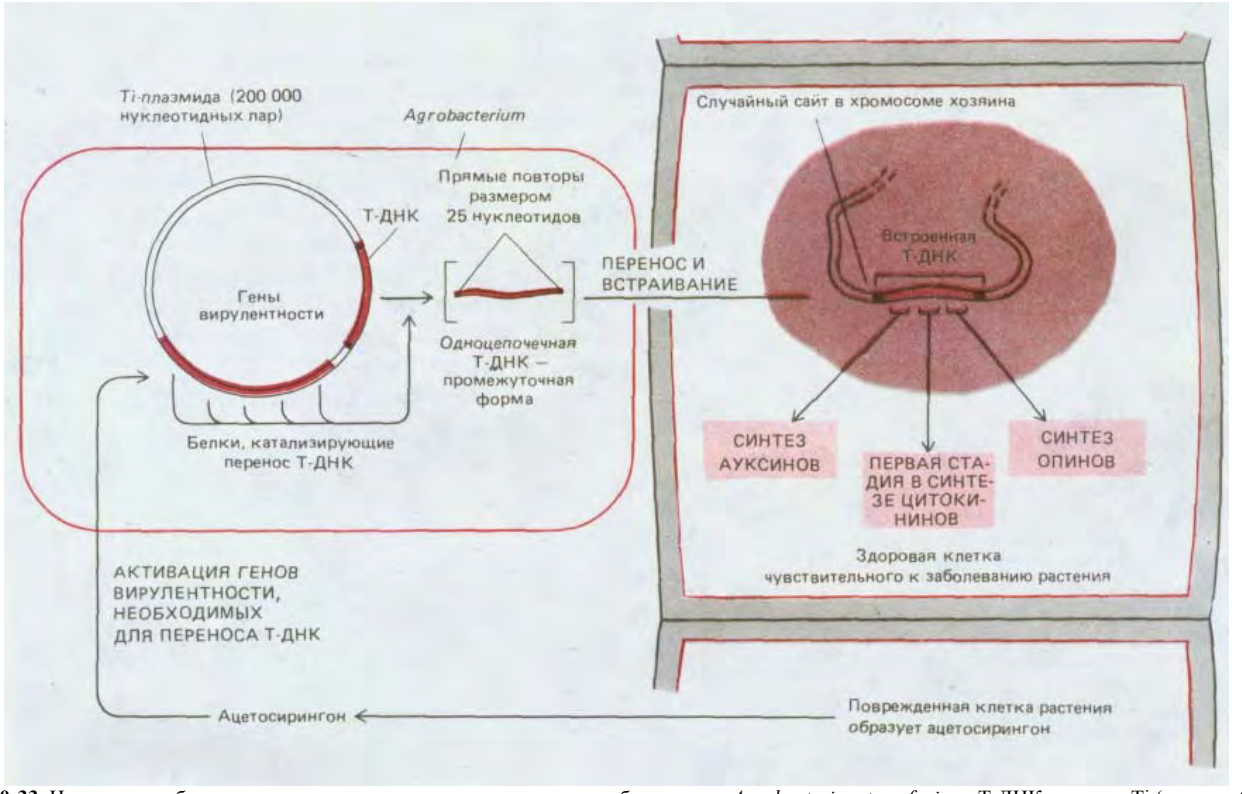


Рис. 20-33. Некоторые события, имеющие место при заражении растения бактериями *Agrobacterium tumefaciens.* Т-ДНК- участок Ti (от англ. tumor inducing -индуцирующей опухоли) - плазмиды бактерии встраивается в случайный сайт хромосомы растительной клетки-хозяина. Среди продуктов экспрессии ее генов присутствуют ферменты, участвующие в синтезе регуляторов роста растений, которые и приводят к возникновению опухоли.

на травоядных животных. Кроме этих конститутивных средств защиты растения выработали более сложные адаптационные механизмы, которые приводятся в действие только при взаимодействии хозяина и патогена.

Многие такие реакции протекают с участием компонентов клеточной стенки растения-хозяина или патогена. Например, в ответ на заражение бактерией или грибом растительные клетки укрепляют свои стенки за счет дополнительного отложения полимеров, входящих в их состав, включая лигнин и гликопротеины, обогащенные гидроксипролином. В свою очередь у патогенов в их войне с растением есть собственное оружие. Рассмотрим, например, что происходит, когда патогенный гриб *(Fmarium solani)* «атакует» растение гороха. Споры гриба секретируют очень небольшие количества фермента кутиназы, которая вызывает частичный гидролиз кутикулы, покрывающей лист. Высвободившиеся мономеры кутина стимулируют усиленное образование кутиназы спорой гриба. В результате кутикула растворяется, и прорастающие гифы гриба могут проникнуть в лист.

Однако продукты распада клеточной стенки, стимулируемые вторгающимся патогеном, могут оказаться полезными в качестве самых первых сигналов об опасности, грозящей клеткам растения-хозяина. Клетки, контактирующие с патогеном, обычно синтезируют низкомолекулярные продукты, которые называются *фитоалексинами* и представляют собой антибиотики, токсичные для определенных патогенных бактерий и грибов. В настоящее время идентифицированы некоторые соединения, ответственные за стимуляцию биосинтеза фитоалексинов растением. Эти вещества, называемые *элиситорами,* представляют собой короткоцепочечные олигосахариды, образующиеся из полисахаридов клеточной стенки и проявляющие активность при очень низких концентрациях (10^{9}- 10^{-10} М). Одним из первых хорошо охарактеризованных элиситоров является гепта-β-глюкозид, выделяющийся из клеточной стенки гриба, поражающего сою (рис. 20-34). Олигосахаридные элиситоры синтеза фитоалексинов могут также продуцироваться клеточной стенкой растений. В этом случае они представляют собой фрагменты пектинового скелета, построенного из остатков галактуроновой кислоты, которые высвобождаются из клеточной стенки растения при действии ферментов, секретируемых либо внедряющимся патогеном, либо в некоторых случаях ферментами растительной клетки, активированными при повреждении.

Простое механическое повреждение растений может вызвать синтез белков, ингибирующих протеазы как насекомых, так и микроорганизмов (ингибиторы протеаз). Полагают, что подобная нормальная защитная реакция может локально индуцироваться небольшими фрагментами полисахаридов, входящих в состав пектина, и высвобождающихся при повреждении. По-видимому, существуют и пока не идентифицированные сигнальные механизмы, действующие на расстоянии, поскольку листья, удаленные от поврежденного листа, также начинают продуцировать ингиторы протеаз.

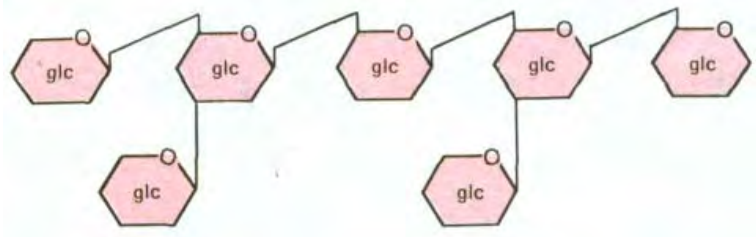


Рис. 20-34. Этот гептаглюкозид (олигосахарид, содержащий семь остатков глюкозы [glc]) выделяется клеточной стенкой *Phytophthora megasperma* - гриба, патогенного для сои. Данный олигосахарид имеет глюкозидный скелет (со связями β1 → 6) и две боковые цепи (со связями β1 → 3). При очень низких концентрациях гептаглюкозид специфически активирует ряд генов сои, включая те, которые принимают участие в биосинтезе фитоалексинов. Изменение связей или расположения любого из остатков глюкозы приводит к потере активности.

20.3.5. В нормальной растительной клетке клеточная стенка может быть важным источником сигналов [18]

Данные ряда экспериментов указывают на то, что сигналы, посылаемые клеткой, зависят от высвобождения олигосахаридов из клеточной стенки растений под действием ферментов. Такие события имеют место и при нормальном росте и развитии растения. Например, удлинение клетки ускоряется регулятором роста растений - ауксином (см. разд. 20.5.8), однако его воздействие может быть устранено даже очень низкими концентрациями сложного фрагмента гемицеллюлозы. Образование таких фрагментов из девяти остатков сахара стимулируется ауксином и, можно полагать, является составной частью регуляторной системы с обратной связью, которая в норме контролирует увеличение размеров клетки (см. разд. 20.4.7). Весьма вероятно, что клеточная стенка представляет собой место связывания и хранения многих сигнальных молекул, которые способны локально высвобождаться и действовать на развитие клетки. Эта гипотеза в настоящее время проверяется во многих лабораториях.

Заключение

В ходе развития растения неизбежно сталкиваются с самыми разнообразными бактериями и грибами. Многие из таких контактов полезны для растений. Так, например, у большинства из них корневые системы сосуществуют со сложными мицелиями грибов, благодаря которым питательные вещества становятся более доступными как для одного, так и для другого организма. Кроме того, почти весь азот, содержащийся в связанном виде в живых организмах, происходит в конечном итоге из азота атмосферы; азот воздуха фиксируется прокариотами, многие из которых (например, Rhizobium) образуют сложные симбиотические ассоциации с корнями растений. Но характер взаимодействия может быть и иным, полезным только для одного из организмов. Фитопатоген Agrobacterium вызывает образование опухолей на растении, вводя свою Т-ДНК в геном клетки-хозяина. Экспрессия вновь индуцированных генов приводит к возникновению дисбаланса молекул-регуляторов роста клеток растений. Специфические низкомолекулярные вещества, выделяемые растением, и у Rhizobium, и у Agrobacterium, активируют гены, необходимые для того, чтобы эти бактерии могли внедриться в растение. Другие небольшие молекулы действуют как своеобразные сигналы, которые запускают ответ хозяина на действие патогенов. В роли таких сигнальных молекул выступают специфические олигосахариды - продукты распада полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки. Аналогичные соединения могут служить сигналами и при нормальном развитии растений.

20.4. Особенности внутренней организации растительной клетки

Клетки высших растений содержат те же внутриклеточные компартменты, которые ранее были описаны для животных клеток, - это цитозоль, аппарат Гольджи, эндоплазматический ретикулум, ядро, митохондрии, пероксисомы и лизосомы. Кроме того, растительные клетки обладают цитоскелетом, состоящим из актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов, сравнимых с теми, которые обнаруживаются в клетках животных. Тем не менее клетки растений легко отличить от клеток животных по присутствию в них двух особых типов компартментов, окруженных мембраной -*вакуолей* и *пластид.* Наличие данных



Рис. 20-35. Электронная микрофотография типичной пропластиды из клетки кончика корня бобового растения. Оболочка пропластиды состоит из двух мембран, внутренняя система мембранных структур слабо развита. (B. Gunning, M. Steer, Ultrastructure and the Biology of Plant Cells. London: Arnold, 1975.)

органелл связано с неподвижным образом жизни растительной клетки. Эти и другие особенности внутреннего строения клеток растений будут рассмотрены в данном разделе.

20.4.1. Хлоропласты представители семейства органелл, называемых пластидами, и свойственных только растительным клеткам [19]

Растения сами производят все органические вещества, в которых они нуждаются, посредством фотосинтеза, происходящего в **хлоропластах.** Продукты фотосинтеза могут непосредственно использоваться клетками для различных процессов биосинтеза, могут запасаться в виде осмотически инертного полисахарида (обычно крахмала) или превращаться в сравнительно низкомолекулярные сахара (как правило, сахарозу), которые транспортируются в другие ткани растения.

Хлоропласты - это лишь один из видов близко родственных органелл, называемых **пластидами.** Пластиды присутствуют во всех живых клетках растения, причем в каждом типе клеток содержится свой набор этих органелл. Всем пластидам свойствен ряд общих черт. Они имеют небольшой геном, одинаковый у всех представителей одного вида, и окружены оболочкой, состоящей из двух концентрических мембран.

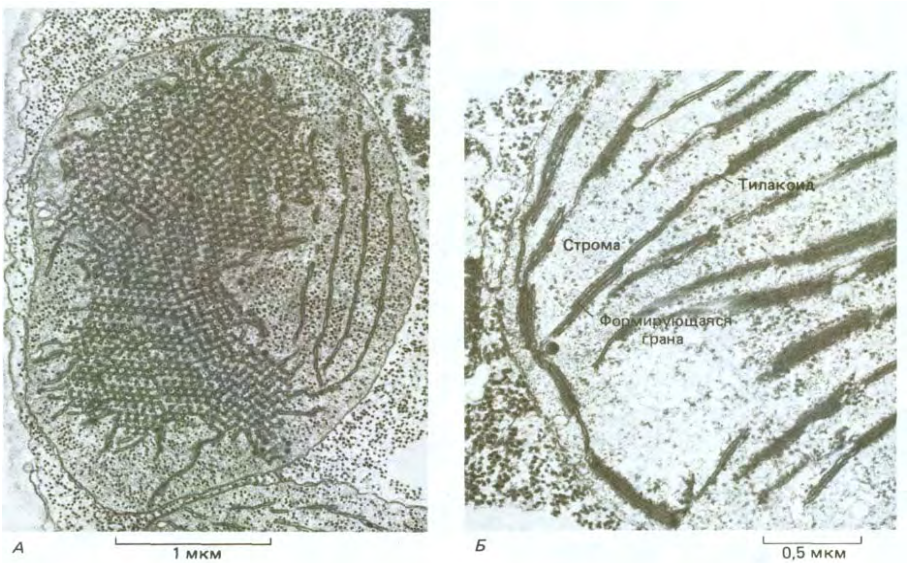


Рис. 20-36. Электронная микрофотография двух форм пластид в проростках овса. *А.* Этиопласт из проростка, выращенного в темноте. Кристаллоподобная структура, образованная внутренними мембранами, содержит протохлорофилл. *Б.* После освещения из этиопласта развивается хлоропласт. Показана часть молодого зеленеющего хлоропласта. Происходит реорганизация мембранной системы этиопласта: в ней уже есть хлорофилл, и начинают образовываться небольшие граны. (С любезного разрешения B. Gunning.)

Поскольку структура и функции хлоропластов были подробно рассмотрены в гл. 7, мы сосредоточим свое внимание на других представителях той же группы растительных органелл.

Все пластиды, включая хлоропласты, развиваются из **пропластид -** относительно мелких органелл, присутствующих в клетках меристемы (рис. 20-35). Судьба пропластид определяется потребностями дифференцированных клеток. Например, если лист растет в темноте, то его пропластиды увеличиваются и превращаются в **этиопласты.** Внутренние мембраны этиопластов образуют кристаллоподобную структуру, содержащую вместо хлорофилла *протохлорофилл* (желтый предшественник хлорофилла) (рис. 20-36, *А).* Под действием света из этиопластов образуются хлоропласты благодаря превращению протохлорофилла в хлорофилл и синтезу новых мембран, пигментов, фотосинтетических ферментов, а также компонентов электронтранспортной цепи (рис. 20-36, *Б).*

Неудивительно, что многие процессы, происходящие в растении, регулируются светом. Фоторецепторы, включая *фитохром* (см. разд. 20.5.7), контролируют транскрипцию многих генов, участвующих в развитии хлоропласта, причем эти гены локализованы не только в самом хлоропласте, но и в ядре. Механизм такого контроля пока неясен. Светом регулируется примерно пятая часть из 120 генов, входящих в состав хлоропластного генома (см. разд. 7.5.4).

Хлоропласты представляют собой другую форму пластид (рис. 20-37, *А).* Они накапливают каротиноидные пигменты, ответственные за желто-оранжевый цвет лепестков (например, у желтых нарциссов) и плодов (например, у помидоров). Еще одна разновидность пластид - **лейкопласты,** которые, кроме своих более крупных размеров, немногим отлича-

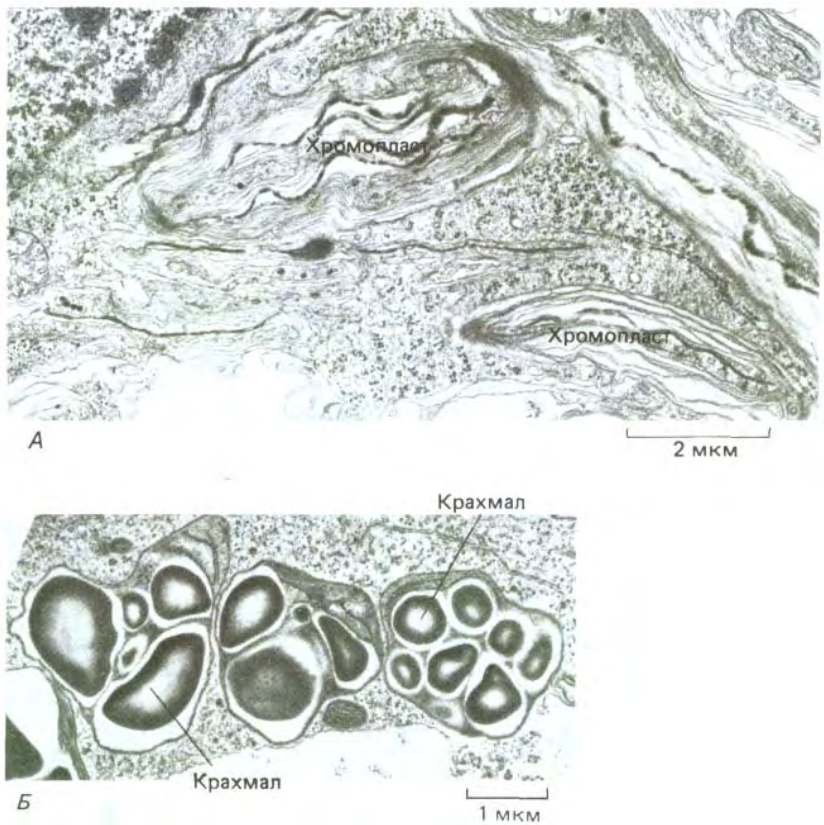


Рис. 20-37. Разнообразные формы пластид. *А.* Хромопласты из клеток оранжево-желтых лепестков нарцисса. Эти пластиды имеют извилистый контур; в их внутренних мембранах, которые расположены весьма хаотично, содержится пигмент (β-каротин, придающий лепесткам характерную окраску. *Б.* Три *амилопласта* (пластиды, накапливающие крахмал) в клетке кончика корня сои. (B. Gunning, M. Steer, Ultrastucture and the Biology of Plant Cells, London: Arnold, 1975.)

ются от пропластид и имеются во многих эпидермальных и внутренних тканях, не приобретающих зеленой окраски и не способных к фотосинтезу. Распространенной формой лейкопластов являются *амилопласты* (рис. 20-37, *Б),* которые служат хранилищами крахмала в запасающих тканях. У некоторых растений, например картофеля, амилопласты, увеличиваясь, могут достигать размера средней клетки животного.

Хотя точно неизвестно, чем определяется превращение пропластиды в ту или иную форму пластид, очевидно, что существенную роль в регуляции этого процесса играет ядерный геном. Ядерные мутации могут переключать развитие с хромопластов на хлоропласты, или же совсем блокировать развитие, в результате чего возникнут либо различные формы лейкопластов, либо незрелые хлоропласты с аномальной пигментацией, которые свойственны многим декоративным растениям.

Пластиды в цитоплазме могут расти и делиться, таким образом происходит их размножение (см. разд. 7.5.1). Единственный тип клеток, утративший пластиды, - это спермии у некоторых высших растений; такие растения (например, кукуруза) получают пластиды только от яйцеклетки, из которой они развились. В этом случае пластиды, подобно митохондриям у животных, наследуются по материнской линии (см. разд. 7.5.10).

Важно усвоить, что пластиды растений - это органеллы, в которых происходит не только фотосинтез. Здесь протекают промежуточные стадии многих метаболических процессов. В пластидах вырабатываются источники химической энергии и восстановители (ATP и NADPH), потребляемые растением в биосинтетических реакциях. Здесь у растений происходит синтез пуринов и пиримидинов, большинства аминокислот и всех жирных кислот, тогда как у животных эти процессы осуществляются в цитозоле.

20.4.2. Вакуоли растительных клеток - это органеллы с удивительно разнообразными функциями [20]

Наиболее заметным компартментом большинства растительных клеток является очень большой пузырек, заполненный жидкостью, который называется вакуолью (рис. 20-38). В одной клетке может присутствовать несколько вакуолей, каждая из которых отделена от цитоплазмы однослойной мембраной, именуемой тонопластом. Вакуоли обычно занимают более 30% всего объема клетки, однако эта величина непостоянна: в зависимости от типа клетки она может составлять от 5 до 90%. Большинство биологов считают, что эта органелла не является частью цитоплазмы, поэтому принято говорить, что растительная клетка содержит ядро, вакуоль и цитоплазму; в цитоплазме же содержатся все остальные органеллы, связанные с мембранами, в том числе пластиды. Вакуоли первоначально образуются в молодых делящихся клетках, вероятно, путем слияния все большего числа пузырьков, отделяющихся от аппарата Гольджи. Как в структурном, так и в функциональном отношении они близки к лизосомам животных клеток, в частности, они тоже содержат множество различных гидролитических ферментов. Вместе с тем функции вакуолей в растительных клетках поразительно многообразны. Они могут использоваться и для запасания питательных веществ, и для хранения отходов, и для увеличения размеров клеток, и для регуляции тургорного давления. В одной и той же клетке часто присутствуют вакуоли с различными функциями (например, действующие как лизосомы и как место хранения). Выше рассматривалась роль вакуолей как компартментов, способствующих заполнению пространства при росте клеток (см. рис. 20-10). В следующем разделе описано участие вакуолей в запасании веществ.

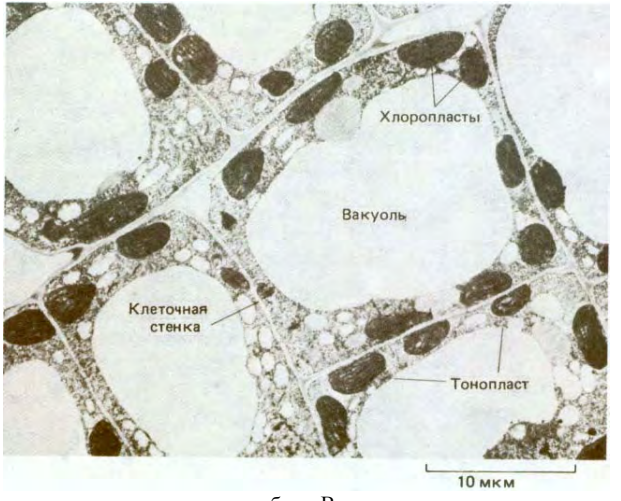


Рис. 20-38. Электронная микрофотография клеток в молодом листе табака. В этих сильно вакуолизированных клетках цитоплазма, в которой много хлоропластов, располагается на периферии в виде тонкого пристеночного слоя. (С любезного разрешения J. Burgess.)

20.4.3. Вакуоли могут служить запасающими органеллами [20]

В вакуолях могут накапливаться и храниться самые различные молекулы, в том числе те необходимые для клетки вещества, которые потенциально опасны, если присутствуют в цитоплазме в больших количествах. Например, у некоторых растений в вакуолях специализированных клеток накапливаются такие хорошо известные продукты, как каучук (у *Hevea brasiliensis) и* опиум (у *Papaver somniferum)*. Даже вездесущие ионы Na^+ могут избирательно накапливаться в этих органеллах, где их осмотическая активность способствует поддержанию тургорного давления. Исследования, проведенные на гигантских клетках водоросли *Nitella,* показали, что натриевые насосы в тонопласте поддерживают относительно низкую концентрацию Na^+ в цитозоле за счет создания 4-5-кратного избытка этих ионов в вакуолях. А поскольку вакуоль занимает в клетке *Nitella* гораздо больший объем, чем цитоплазма, получается, что основной пул клеточного натрия сосредоточен в вакуолях.

Вакуоль играет важную роль в гомеостазе растительных клеток, которые подвержены самым разнообразным воздействиям внешней среды. Если, например, pH среды падает, приток ионов H^+ в цитоплазму компенсируется, по крайней мере, частично, за счет усиления переноса ионов H^+ в вакуоль. Сходным образом многие клетки растений поддерживают тургорное давление на удивительно постоянном уровне несмотря на значительные изменения в окружающей их среде. Это осуществляется благодаря изменению осмотического давления в цитоплазме и в вакуоли в результате контролируемого распада и повторного синтеза в вакуоли таких полимеров, как полифосфаты. Тургорное давление может поддерживаться постоянным и за счет изменения скорости переноса через плазматическую мембрану и тонопласт. Проницаемость этих двух мембран зависит от определенного набора транспортных белков, переносящих специфические сахара, аминокислоты и другие метаболиты через каждый липидный бислой (см. гл. 6).

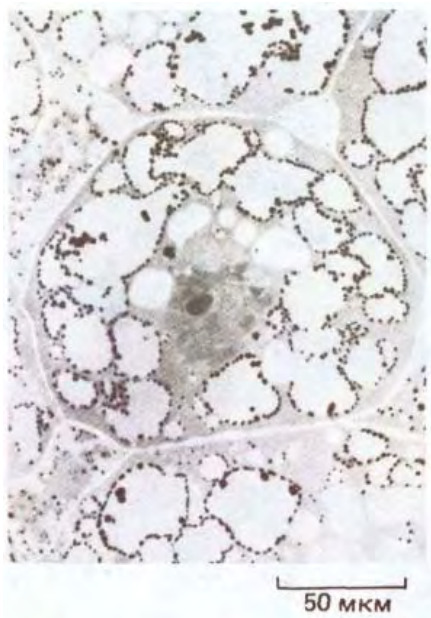


Рис. 20-39. Световая микрофотография клетки из формирующегося семени гороха. По краям развитой системы вакуолей можно увидеть начальные стадии отложения белка. Семена бобовых растений накапливают в клеточных вакуолях большие количества запасного белка, который используется зародышем при прорастании семени. (С любезного разрешения S. Craig.)

Вещества, содержащиеся в вакуоли, как качественно, так и количественно отличаются от веществ, присутствующих в цитоплазме. Однако в связи с тем, что тонопласт не очень прочен механически, гидростатическое давление в вакуоли и цитоплазме должно быть приблизительно одинаковым, и оба эти компартмента для поддержания тургорного давления должны вносить совместный вклад в осмотическое равновесие.

Среди продуктов, запасаемых в вакуолях, важное место занимают различные метаболиты. Например, растения-суккуленты ночью открывают свои устьица, поглощают из воздуха двуокись углерода (в это время суток транспирационные потери уменьшаются) и хранят ее в вакуолях в форме малата, пока на следующий день он не будет с помощью солнечной энергии превращен в сахар при закрытых устьицах. Органические молекулы могут храниться в вакуолях и в течение гораздо более длительного срока, как, например, запасные белки в клетках многих семян, в частности у гороха и фасоли. При набухании семян белки гидролизуются, и аминокислоты используются для питания развивающегося зародыша (рис. 20-39).

Ряд веществ, накапливаемых в вакуолях, участвует во взаимодействии растения с животными или с другими растениями. Например, антоцианины придают окраску лепесткам некоторых цветков, что способствует привлечению насекомых-опылителей. Другие вещества выполняют защитные функции. Растения не могут передвигаться и таким образом избегать уничтожения травоядными животными; вместо этого они синтезируют бесчисленное множество ядовитых веществ, которые высвобождаются из вакуолей при повреждении клеток. Среди них и высокотоксичные алкалоиды, и просто неприятные на вкус вещества, отрицательно влияющие на пищеварение. Ингибиторы трипсина, обычно обнаруживаемые в семенах, а также ингибиторы протеаз, образующиеся в клетках листьев в ответ на ранение, накапливаются в вакуоли и, вероятно, влияют на пищеварение у травоядных. На протяжении всей своей истории растения, так же как и животные, постоянно разнообразили средства ведения химической войны. Равновесие смещалось в ту или иную сторону, когда, например, в растительном мире возникал новый мощный репеллент для растительноядных видов или, наоборот, когда какое-либо насекомое в ходе эволюции научалось нейтрализовать или разрушать токсичный метаболит растения и получало таким образом возможность поедать синтезирующее его растение. Сам токсин в этом случае мог становиться уже не репеллентом, а аттрактантом.

20.4.4. Пузырьки аппарата Гольджи доставляют материал для образования клеточной стенки к определенным участкам цитоплазматической мембраны [21]

Большая часть компонентов матрикса клеточной стенки транспортируется в пузырьках аппарата Гольджи к плазматической мембране, где затем выводится из клетки путем экзоцитоза. Однако в отличие от клеток животных, у которых аппарат Гольджи секретирует гликопротеины, у растений аппарат Гольджи участвует главным образом в продуцировании и секреции широкого круга внеклеточных полисахаридов (рис. 20-40). Детали синтеза этих полисахаридов неизвестны, что не столь уж удивительно, поскольку 1) каждый из полисахаридов, входящих в состав клеточной стенки, образуется из двух или более Сахаров; 2) используется по меньшей мере 12 различных полисахаридов; 3) у большинства этих полисахаридов молекулы разветвленные и 4) полисахариды, после того как они синтезируются, подвергаются многочисленным ковалентным модификациям. Установлено, что в сборке полисахаридных компонентов, необходимых для формирования типичной пер-

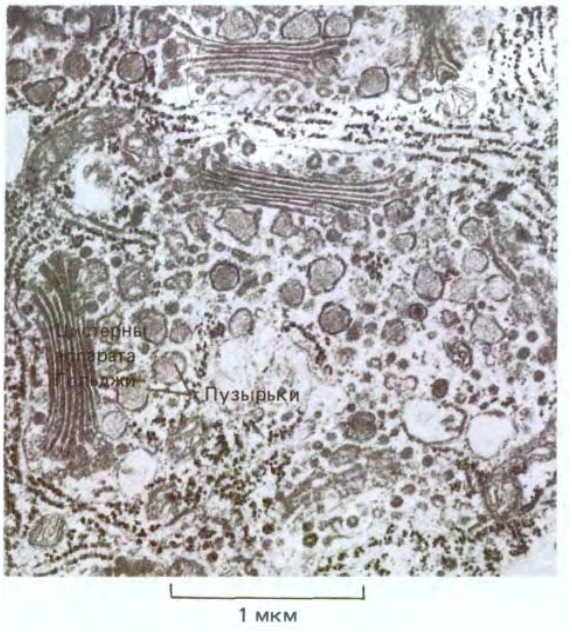


Рис. 20-40. Электронная микрофотография клетки волоска зеленой водоросли *Bulbochaete.* Хорошо видны обособленные друг от друга стопки цистерн Гольджи и связанные с ними транспортные пузырьки, содержащие секретируемые полисахариды. Четко прослеживается полярная организация: от эндоплазматического ретикулума через *цис-, промежуточные* и *транс*-цистерны Гольджи к транспортным пузырькам. В растительных клетках (в отличие от животных) цистерны Гольджи, принадлежащие разным стопкам, не связаны между собой. (С любезного разрешения T. Frazer, по B. Gunning и M. Steer, Ultrastructure and the Biology of Plant Cells. London: Arnold, 1975.)

вичной клеточной стенки, принимает участие несколько сот различных ферментов. Большинство их обнаруживается в эндоплазматическом ретикулуме и аппарате Гольджи, тогда как некоторые из ферментов, связанные с более поздними ковалентными модификациями полисахаридов, присутствуют в самой клеточной стенке, причем часть ферментов ковалентно с ней связана.

Химический состав и структура стенки в разных зонах клеточной поверхности различны, поэтому пузырьки с нужными матрицами должны избирательно направляться к определенным участкам плазматической мембраны. Эту направленность обеспечивают (по крайней мере, частично) элементы цитоскелета; одним из примеров может служить образование de novo первичной клеточной стенки, разделяющей две дочерние клетки после митоза, (рис. 20-41). В конце телофазы между



Рис. 20-41. Серия последовательных световых микрофотографий делящейся клетки тычиночного волоска. Цифрами указано время в минутах, прошедшее с момента начала съемки. Пузырьки, слияние которых приводит к образованию клеточной пластинки, становятся различимыми к 42-й минуте. Пластинка постепенно расширяется и в конце концов сливается со стенкой материнской клетки. (С любезного разрешения P. Herler.)

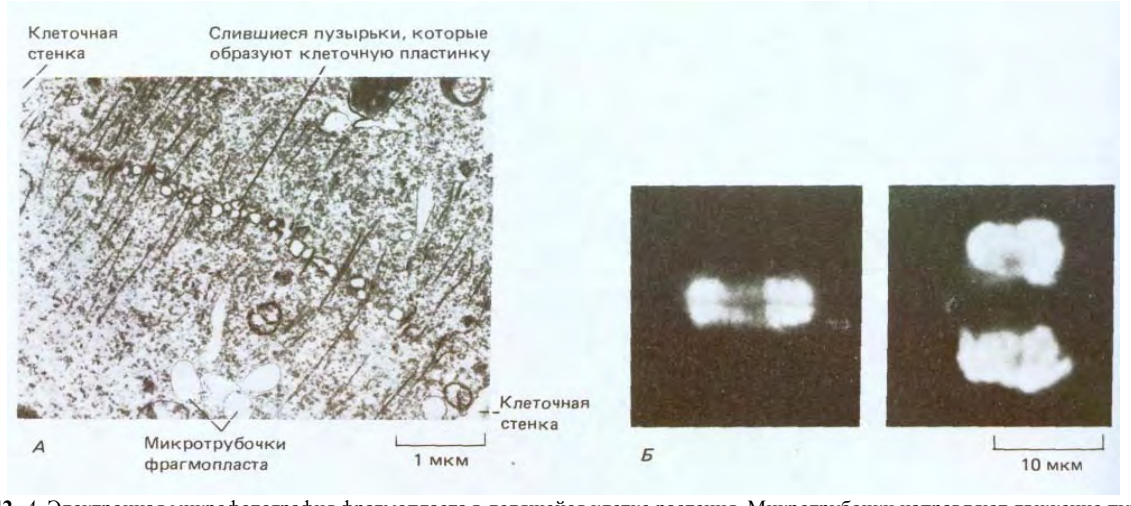


Рис. 20-42. *А.* Электронная микрофотография фрагмопласта в делящейся клетке растения. Микротрубочки направляют движение пузырьков, содержащих предшественники клеточной стенки, к растущей клеточной пластинке. Подробности см. на рис. 13-71. *Б.* Флуоресцентные микрофотографии цитокинеза клеток из кончика корня лука. Окрашивание флуоресцирующими антителами позволяет выявить развивающуюся клеточную пластинку и два набора микротрубочек фрагмопласта, располагающихся по бокам этой пластинки *(слева);* флуоресцентное окрашивание ДНК *(справа)* дает возможность увидеть расположение двух дочерних ядер, которые будут разделены новой клеточной стенкой. *(А* - с любезного разрешения J. Pickett-Heaps.)

двумя дочерними ядрами остается пучок микротрубочек, расположенных параллельно оси веретена. Этот пучок состоит из двух наборов полюсных микротрубочек веретена, обладающих противоположной полярностью; концы микротрубочек, принадлежащих к разным наборам, перекрываются в дискообразной области, называемой **фрагмопластом** и находящейся в плоскости экватора бывшего веретена деления (рис. 20-42). Транспортные пузырьки, содержащие различные предшественники клеточной стенки, в частности пектин, перемещаются вдоль этих ориентированных микротрубочек в сторону экватора и, достигнув цент-



Рис. 20-43. Электронная микрофотография клетки корневого чехлика тимофеевки. В таких клетках аппарат Гольджи занят главным образом выработкой и секрецией слизи, которая, выделяясь на поверхности кончика корня, облегчает его продвижение в почве. Материал, идентичный содержимому цистерн Гольджи, можно видеть также в пузырьках и у наружной поверхности плазматической мембраны. (B. Gunning, M. Steer, Ultrastucture and the Biology of Plant Cells. London: Arnold, 1975.)

рального диска, сливаются друг с другом, образуя **клеточную пластинку.** Клеточная пластинка расширяется за счет все новых и новых пузырьков, направляемых сюда новыми микротрубочками, образующимися на периферии фрагмопласта, по мере того как более центрально расположенные микротрубочки распадаются. В конце концов растущая пластинка сливается с материнской клеточной стенкой, в результате чего образуются две отдельные дочерние клетки (см. рис. 20-41 и 13-71). Неясно, какие компоненты фрагмопласта - микротрубочки или актиновые филаменты (а может быть и те и другие), ответственны за продвижение пузырьков, образующихся в аппарате Гольджи.

Не все полисахариды, образуемые и секретируемые аппаратом Гольджи, предназначены для формирования клеточной стенки. Например, обогащенная фруктозой слизь, секретируемая клетками кончика корня, проходит через клеточную стенку и служит смазкой наружной поверхности корня при его продвижении через почву (рис. 20-43).

20.4.5. В процессе жидкофазного эндоцитоза происходит быстрое рециклирование мембран [22]

Что происходит с большим количеством нового мембранного материала, который добавляется к уже имеющейся плазматической мембране, в ходе все новых слияний с пузырьками? В некоторых, активно секретирующих клетках растений, число транспортных пузырьков аппарата Гольджи, участвующих в экзоцитозе, таково, что поверхность мембраны должна была бы удваиваться каждые 20 мин. Очевидно, однако, что плазматическая мембрана имеет постоянную площадь поверхности и, следовательно, существует какой-то механизм оборота мембранного материала. В плазматической мембране клеток растений существуют многочисленные окаймленные ямки (рис. 20-44, *А).* Полагают, что они участвуют в рециклировании мембраны, как это имеет место в клетках животных (см. разд. 6.5.4). Подобный путь жидкофазного эндоцитоза недавно был обнаружен у растительных клеток при анализе поглощения протопластами электроноплотных маркеров, таких как ферритин или коллоидное золото. Эти маркеры, введенные в протопласты, быстро попадали в сложную сеть мембранных трубочек, которые были названы *частично покрытым (окаймленным) ретикулумом* (рис. 20-44, *Б* и *В).* Полагают, что эта органелла функционально эквивалентна эндосомному компартменту клеток животных (см. разд. 6.5.4). Отсюда маркер попадает в крупные пузырьки и в конечном счете оказывается в вакуоли. Таким образом, основные внутриклеточные пути синтеза метаболитов, их сортировка, упаковка, секреция и эндоцитоз весьма сходны в клетках растений и животных.



Рис. 20-44. Эндоцитоз в протопластах сои, наблюдаемый с помощью электронной микроскопии. *А.* Вид плазматической мембраны со стороны цитоплазмы. Протопласт прикрепляли к сеточке для электронной микроскопии и затем лизировали, промывали и негативно окрашивали. Кроме выстланных мембраной многочисленных ямок, которые участвуют в эндоцитозе, видны микротрубочки, лежащие в кортикальном слое. *Б.* «Частично покрытый ретикулум», видимый на тонких срезах. Он состоит из сложной системы связанных с мембраной трубочек с многочисленными пузырьками, покрытыми клатрином, которые образуются из этой мембраны. Полагают, что это эквивалент эндосомального компартмента клеток животных. *В.* Вещество, захваченное при эндоцитозе, в данном случае электроноплотный маркер ферритин, впервые появляется в частично покрытом ретикулуме. (С любезного разрешения L. Fowke.)

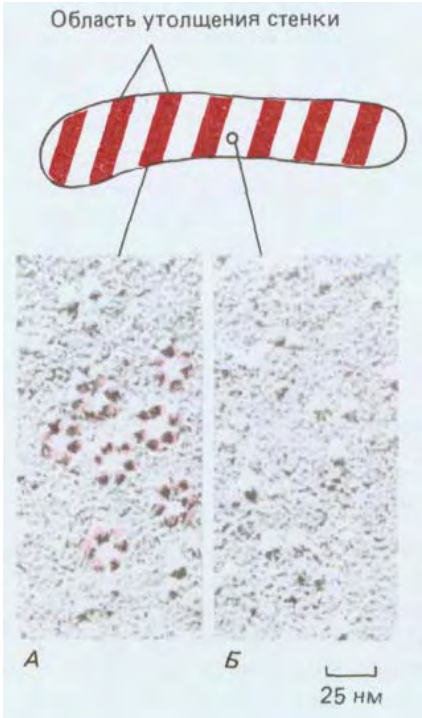


Рис. 20-45. Электронная микрофотография плазматической мембраны развивающегося сосудистого элемента ксилемы в корне перечника (препарат получен методом замораживания-скалывания). Гексагональные группировки белков в мембране («розетки») сконцентрированы в местах, где клеточная стенка утолщается *(А)* и встречаются реже в местах между утолщениями *(Б)*. Предполагают, что «розетки» представляют собой комплексы целлюлозосинтазы. Каждый из этих комплексов, по-видимому, синтезирует от 60 до 70 цепей целлюлозы, входящих в состав каждой микрофибриллы. (С любезного разрешения W. Herth.)

20.4.6. Синтез целлюлозы происходит на поверхности растительных клеток [23]

Полисахариды клеточной стенки обычно образуются в аппарате Гольджи и выводятся путем экзоцитоза. Однако из этого правила есть одно важное исключение: целлюлоза у большинства растений синтезируется на внешней поверхности клеток с помощью мембраносвязанного ферментного комплекса **(целлюлозосинтазы),** субстратом для которого служит соединение сахара с нуклеотидом, вероятно UDP-глюкоза. Новообразованные целлюлозные цепи спонтанно объединяются в микрофибриллы, образующие слой на поверхности плазматической мембраны (ламеллу), в которой все микрофибриллы ориентированы приблизительно одинаково. Поскольку целлюлоза синтезируется на плазматической мембране, каждая новая ламелла образуется под предыдущей. В результате клеточная стенка состоит из концентрически расположенных ламелл, самая старая из которых находится снаружи.

Несмотря на многократные попытки, синтез целлюлозы не удалось воспроизвести in vitro. Вероятно, отчасти это связано с тем, что для реакции необходимо присутствие функционально интактной плазматической мембраны. На электронных микрофотографиях сколов замороженных клеток высших растений видны «розетки», состоящие из внутримембранных частиц, которые расположены на цитоплазматической стороне скола. Эти розетки скорее всего представляют собой целлюлозосинтазные комплексы, поскольку они локализуются в областях, где откладываются новые целлюлозные микрофибриллы, например в мембране, покрывающей упорядоченные утолщения клеточной стенки в молодых клетках сосудов ксилемы (рис. 20-45, см. также разд. 20.1.7).

20.4.7. Форма растущей растительной клетки определяется организацией целлюлозных микрофибрилл [24]

Окончательная форма каждой растущей клетки, а в итоге и форма всего растения, определяется растяжением клетки, которое находится под строгим контролем. Как уже отмечалось выше (см. разд. 20.1.5), растяжение является результатом тургорного давления и пластичности стенки. Однако вопрос о том, каким образом такое ненаправленное давление способно вызвать *направленное* удлинение клетки, пока не затрагивался. В боковых стенках увеличивающейся клетки микрофибриллы, отложенные последними, обычно перпендикулярны оси удлинения. При этом клетка обволакивается ламеллой, в которой микрофибриллы располагаются по спирали. Хотя ориентация отложенных ранее микрофибрилл в наружной ламелле может быть иной, именно от ориентации волокон в этой внутренней ламелле преимущественно зависит направление роста клетки.

Если микрофибриллы целлюлозы во вновь образованной ламелле ориентированы поперечно, они будут ограничивать расширение клетки; однако в связи с тем, что соседние целлюлозные микрофибриллы внутри ламеллы могут отделяться одна от другой под действием тургорного давления, клетка будет растягиваться (рис. 20-46). Чтобы существующая клеточная стенка сохраняла свою прочность и толщину, по мере роста клетки, к уже имеющейся клеточной стенке необходимо добавлять все новые компоненты матрикса и микрофибриллы. Вновь секретируемые компоненты матрикса, вероятно, проникают через толщу стенки, а дополнительные микрофибриллы откладываются в новой ламелле на наружной поверхности плазматической мембраны.

Таким образом, будущая морфология растительных клеток предопределяется ходом образования первичной клеточной стенки. До сих пор

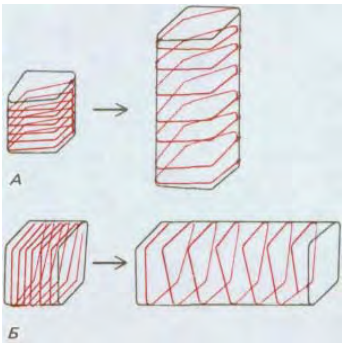


Рис. 20-46. На этой схеме показано, как ориентация целлюлозных микрофибрилл в клеточной стенке влияет на направление, в котором происходит удлинение клетки. Клетки, изображенные на рисунке *А и Б,* изначально имеют одинаковую форму, но разную ориентацию целлюлозных микрофибрилл. В результате ослабления клеточной стенки и тургорного давления каждая клетка растягивается в направлении, перпендикулярном ориентации микрофибрилл. В свою очередь, конечная форма такого органа, как побег, сильно зависит от того, в каком направлении растягиваются клетки, входящие в его состав. Хотя создается впечатление, что фибриллы имеют форму обруча, многочисленные исследования показали, что они намотаны по спирали, как показано на рисунке.

точно неизвестно, каким образом определяется тонкая структура всех компонентов клеточной стенки, однако, по всей вероятности, отложение целлюлозы зависит от расположения кортикальных микротрубочек.

20.4.8. Ориентацию целлюлозных микрофибрилл, откладывающихся на клеточной поверхности, определяют микротрубочки в кортикальном слое [25]

Ориентация целлюлозных микрофибрилл играет решающую роль в определении формы растительных клеток. Но от чего зависит их расположение? Ответ на этот вопрос был подсказан тем фактом, что большинство микротрубочек в кортикальном слое цитоплазмы ориентировано также, как и целлюлозные микрофибриллы, образующиеся в данное время в данном участке клетки.

Кортикальные микротрубочки лежат вблизи внутренней поверхности плазматической мембраны и направлены, как правило, перпендикулярно длинной оси клетки (рис. 20-47). При изучении этой области методом иммунофлуоресцентной микроскопии оказалось, что система перекрывающихся микротрубочек окружает внутренность клетки сплошным упорядоченным слоем (рис. 20-48). Микротрубочки прикреплены к плазматической мембране белками, природа которых еще плохо изучена.

Согласованная ориентация микротрубочек, расположенных у внутренней поверхности плазматической мембраны и целлюлозных микрофибрилл, образующихся на ее наружной стороне, характерна для многих клеток различного типа и разной формы. Это явление наблюдается при формировании как первичной, так и вторичной клеточной стенки (рис. 20-49), в частности при локальном отложении дополнительных слоев, когда, например, образуются утолщения в определенных участках поверхности клеток ксилемы (см. рис. 20-15).

А что произойдет, если деполимеризовать все микротрубочки кортикальной системы, обработав растительную ткань колхицином? Влияние такой обработки на последующее отложение целлюлозы не столь однозначно, как можно было бы ожидать. Колхицин не подавляет образование новых целлюлозных микрофибрилл, и в некоторых случаях клетки могут продолжать откладывать микрофибриллы, ориентированные в прежнем направлении. Однако любые изменения в расположении микрофибрилл в ходе индивидуального развития, которые обычно происходят при откладывании следующих друг за другом ламелл, становятся невозможными. Кроме того, клетка, которая в норме для

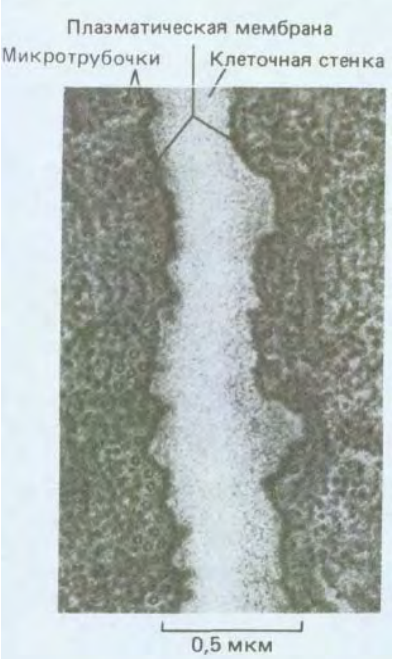


Рис. 20-47. Электронная микрофотография зоны контакта двух соседних клеток кончика корня пшеницы. Видны многочисленные кортикальные микротрубочки, типичные для интерфазных клеток.

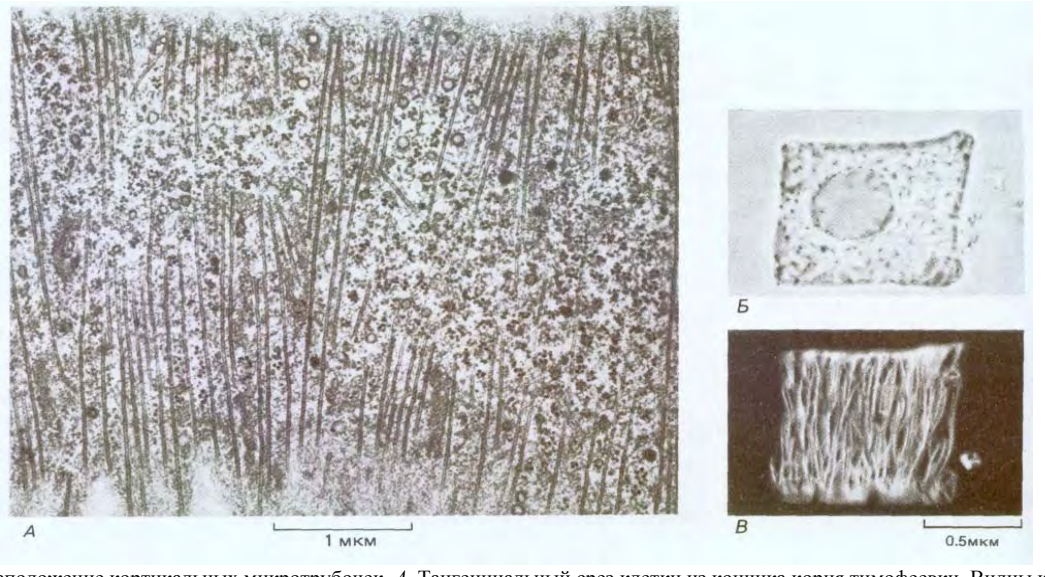


Рис. 20-48. Расположение кортикальных микротрубочек. *А.* Тангенциальный срез клетки из кончика корня тимофеевки. Видны кортикальные микротрубочки, лежащие непосредственно под плазматической мембраной; они расположены под прямым углом к продольной оси клетки. *Б.* Отдельная клетка кончика корня лука. *В.* Та же клетка, окрашенная флуоресцирующими антителами, эта обработка позволяет выявить характер расположения микротрубочек. *(А -с* любезного разрешения B. Gunning; *Б* и *В - с* любезного разрешения K. Goodbody.)

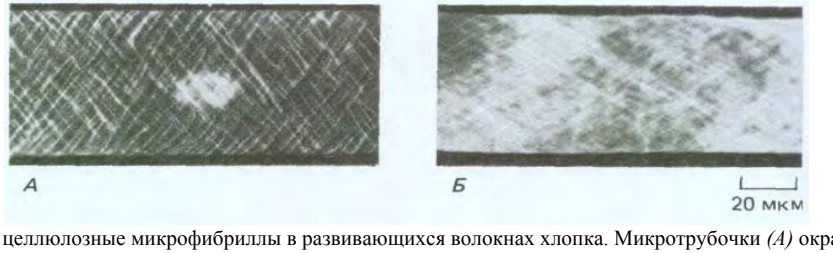


Рис. 20-49. Микротрубочки и целлюлозные микрофибриллы в развивающихся волокнах хлопка. Микротрубочки *(А)* окрашены флуоресцирующими антителами и располагаются по спирали. Клетка «расплющена», благодаря чему видны части спирали как на передней, так и на задней стенке. Вновь отложенные целлюлозные микрофибриллы в такой же клетке *(Б)* окрашены красителем калькофлюором белым, который при связывании с растущими молекулами целлюлозы дает свечение. Микрофибриллы, подобно укрепляющему корду садового шланга, делают стенки хлопкового волокна очень прочными. (С любезного разрешения R. Seagull.)

формирования сосуда ксилемы должна производить упорядоченное утолщение стенки, вместо этого в присутствии вещества, деполимеризующего микротрубочки, начинает откладывать материал стенки совершенно хаотично (рис. 20-50). Таким образом, ранее существовавшая ориентация микрофибрилл может сохраняться и без микротрубочек, но любая стадия клеточного развития, связанная с отложением микрофибрилл, ориентированных по-иному, требует присутствия интактных микротрубочек, определяющих эту новую ориентацию.

Полагают, что комплексы, синтезирующие целлюлозу и находящиеся в плазматической мембране, вращаются вокруг длинных молекул целлюлозы. По мере биосинтеза и самосборки, т. е. процессов, которые протекают одновременно, дистальный конец микрофибриллы, вероятно, образует поперечные сшивки с ранее отложенным слоем стенки. Следовательно, на растущем проксимальном конце синтазные комплексы должны продвигаться вдоль мембраны в направлении синтеза. Можно предположить два механизма воздействия микротрубочек на направление этого движения, а следовательно, и на ориентацию микрофибрилл. Цитоплазматический домен целлюлозосинтазного комплекса может быть прямо или косвенно связан с микротрубочками, лежащими в кортикальном слое. Согласно другой гипотезе, микротрубочки, подобно берегам канала, направляют движение синтазных комплексов парал-

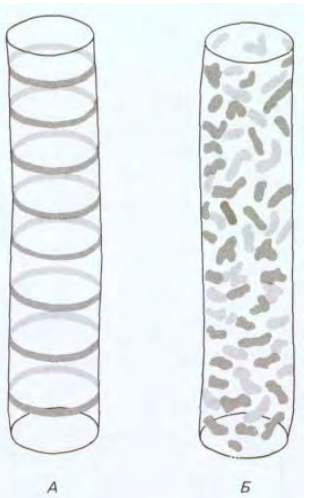


Рис. 20-50. Регулярная картина утолщений клеточной стенки, создающаяся при нормальной дифференцировке клеток ксилемы *(А),* определяется наличием упорядоченных ансамблей кортикальных микротрубочек. В присутствии колхицина кортикальные микротрубочки деполимеризуются, и это ведет к неупорядоченному образованию утолщений *(Б).*

лельно определенной оси (рис. 20-51). В данном случае интенсивность синтеза целлюлозы не зависит от микротрубочек; они лишь определяют те участки мембраны, внутри которых может продвигаться ферментативный комплекс. Остается неизвестным как контролируется расположение микротрубочек в кортикальном слое. Напомним, что цитоскелет животной клетки тоже определяет ориентацию компонентов внеклеточного матрикса, а белки типа коллагена и фибронектина откладываются клетками в тесной взаимосвязи с их плазматической мембраной см. разд. 14.2.18).

20.4.9. В крупных растительных клетках различные материалы перемещаются с ориентированным током цитоплазмы [26]

Клеточный метаболизм требует того, чтобы субстраты, промежуточные продукты, кофакторы, сигнальные молекулы и ферменты могли перемещаться из одной части клетки в другую. В мелких клетках, таких как бактерии или даже большинство животных клеток, диффузия дает возможность низкомолекулярным растворенным веществам в доли секунды преодолевать расстояния, сравнимые с размерами самой клетки. Однако растительные клетки благодаря наличию у них клеточной стенки, вакуолей и тургора могут достигать весьма крупных размеров: обычно их длина превышает 100 мкм, а в отдельных случаях измеряется миллиметрами и даже сантиметрами. Диффузия здесь относительно неэффективна, так как время, необходимое какой-либо молекуле для достижения пункта своего назначения с помощью лишь диффузии, пропорционально квадрату расстояния до этого места (см. разд. 3.1.3). Между тем некоторые клетки взрослого растения могут быть значительно удалены от источника кислорода и питательных веществ. Поэтому неудивительно, что в крупных растительных клетках существуют интенсивные **токи цитоплазмы,** перемешивающие ее компоненты и обеспечивающие их быструю циркуляцию.

Изучение живых растительных клеток показало, что чем крупнее клетка, тем активнее движется ее цитоплазма. Для мелких клеток характерны скачкообразные перемещения органелл - *сальтации* (от лат. saltare - танцевать, прыгать). Как и в животных клетках, цитоплазматические частицы передвигаются здесь так, будто они время от времени получают сильный толчок в определенном направлении. В более круп-

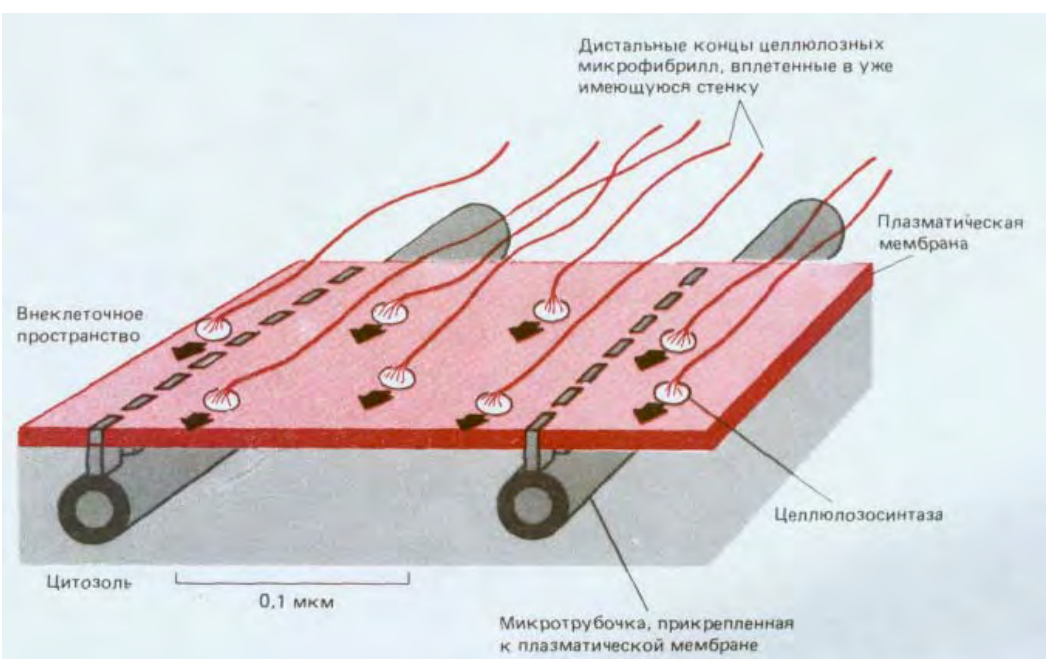


Рис. 20-51. Простая схема, объясняющая каким образом ориентация микротрубочек в кортикальном слое может определять ориентацию новообразованных микрофибрилл. Крупные целлюлозосинтазные комплексы представляют собой составную часть белков мембраны и осуществляют сборку микрофибрилл на наружной поверхности плазматической мембраны. В связи с тем что дистальные концы жестких микрофибрилл входят в состав стенки, их элонгация на проксимальном конце вызывает проталкивание синтазного комплекса вдоль плоскости мембраны. Поскольку микротрубочки прикреплены к плазматической мембране таким образом, что весь комплекс оказывается связанным только с некоторыми каналами мембраны, ориентация микро-трубочек может определять ось, вдоль которой откладываются микрофибриллы.



Рис. 20-52. Тычинки из цветков традесканции покрыты длинными тонкими волосками, каждый из которых состоит из одного ряда крупных клеток. Световые микрофотографии, полученные с интервалом в 5 с, выявляют быстрый ток по цитоплазматическим тяжам, которые пересекают вакуоль. Органеллы по таким тяжам передвигаются со скоростью до 5 мкм/с.



Рис. 20-53. Флуоресцентная микрофотография небольшой части крупной вакуолизированной клетки стебля. Видны пучки актиновых филаментов в тяжах, пересекающих вакуоль. Клетку окрашивали фаллоидином (меченным родамином)-соединением, которое прочно и специфически связывается с актиновыми филаментами. Полагают, что пучки актина, расходящиеся из области ядра (Я), имеют отношение к быстрому току цитоплазмы, который характерен для крупных вакуолизированных клеток высших растений. Вероятно, в этом каким-то образом участвует и миозин.

ных клетках растений такое перемещение уже носит частично направленный характер, а в клетках, где цитоплазма образует лишь тонкий *слой* вокруг гигантской центральной вакуоли, часто можно наблюдать почти непрерывное круговое перемещение цитоплазмы со скоростью несколько микрометров в секунду. В гигантских клетках зеленой водоросли *Nitella* полярность актиновых филаментов кортикального слоя такова, что перемещение вдоль них других - миозиновых - филаментов могло бы создать направленный ток цитоплазмы. Вполне возможно, что он способствует не только внутриклеточному передвижению органелл, но также и межклеточному транспорту растворенных веществ к отверстиям плазмодесм, соединяющих соседние клетки.

Тонкие прозрачные клетки, образующие волоски на поверхности растений, - очень удобный объект для наблюдения движений цитоплазмы. В такой клетке присутствует большая вакуоль, через которую проходят тонкие тяжи цитоплазмы диаметром около 1 мкм (рис. 20-52). Можно наблюдать как через эти тяжи «проплывают» отдельные частицы, например митохондрии. Похоже, что такие тяжи, содержащие пучки актиновых филаментов, но, по-видимому, лишенные микротрубочек, возникают в области, прилежащей к клеточному ядру (рис. 20-53). Можно наблюдать, как эти тяжи постоянно изменяют свою форму и расположение, исчезая, разветвляясь, слипаясь и образуясь заново.

20.4.10. Цитоскелет растительной клетки реагирует на внеклеточные сигналы [27]

Для растительных клеток, ограниченных клеточной стенкой, большое значение имеют едва различимые ответы на изменения окружающей среды, в особенности на свет. Как уже отмечалось выше, изменения в направлении роста растительной клетки часто зависят от цитоскелета, поэтому неудивительно, что и актин, и микротрубочки, входящие в состав цитоскелета, весьма сложным образом реагируют на внешние разражители.

Многие клетки растений способны отвечать на изменения интенсивности и направления света, меняя расположение своих хлоропластов. При слабой освещенности хлоропласты стремятся выстроиться в монослой, перпендикулярно источнику света и таким образом до предела увеличивают поглощение света. Высокие уровни освещенности индуцируют перемещение хлоропластов и их выстраивание вдоль клеточных стенок, параллельных падающим лучам, что уменьшает действие света (рис. 20-54). Молекулярный механизм такого передвижения изучался на примере весьма необычной водоросли. *Mougeotia - это* зеленая водоросль, у которой в каждой клетке цилиндрической формы имеется только один плоский хлоропласт. При изменении условий освещения хлоропласт поворачивается и изменяет свою ориентацию таким образом, чтобы лежать вдоль падающих лучей или перпендикулярно к ним в зависимости от силы света. В качестве фоторецепторов, индуцирующих подобный ответ, выступают *фитохром* (см. разд. 20.5.7) и рецептор синего света, расположенный либо на плазматической мембране, либо непосредственно рядом с ней. Освещение этих рецепторов микропучками света приводит к притоку ионов Ca^{2+} (соответствующий механизм пока не изучен), Ca^{2+} связывается с кальмодулином, который в свою очередь активирует сеть актиновых филаментов, прикрепленных как к наружной мембране оболочки хлоропласта, так и к плазматической мембране, которая принимает участие в повороте пластиды. Если направленным микропучком света осветить лишь малую часть клетки, то изгибаться будет лишь освещенная часть хлоропласта. Следовательно, разные участки активного скелета в одной

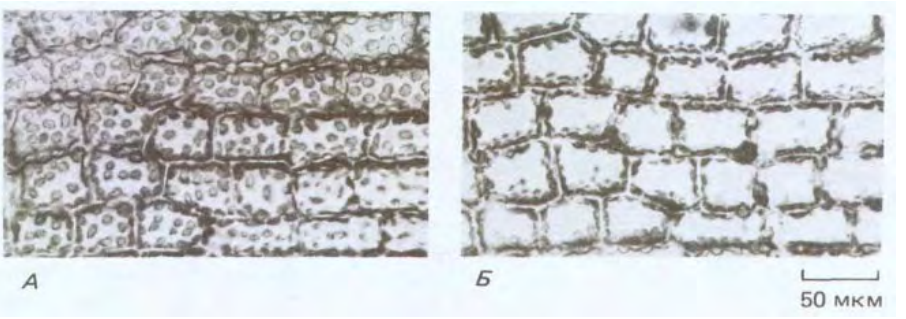


Рис. 20-54. Световая микрофотография клеток листа у мха, на которой видно как происходит перемещение хлоропластов при изменении условий освещения. Световой поток направлен перпендикулярно к плоскости препарата. *А.* При слабом освещении дискообразные хлоропласты располагаются таким образом, чтобы поглощение света было максимальным. *В.* После 30-минутной экспозиции того же участка листа на ярком свету хлоропласты переместились и расположены теперь у клеточных стенок, параллельных падающим лучам.

и той же клетке могут реагировать независимо друг от друга (рис. 20-55).

Расположение микротрубочек в кортикальном слое также быстро меняется в ответ на внешние раздражители. Как уже обсуждалось выше, форма растительной клетки (а значит и форма растения) зависит от упорядоченного отложения ориентированных слоев целлюлозы, причем наиболее важной является ориентация самого нижнего слоя (см. разд. 20.4.7). Наружные слои целлюлозы в клеточной стенке часто имеют ориентацию, отличную от ориентации более поздних, внутренних слоев. Существуют по меньшей мере два механизма, благодаря которым новый и старый слои могут быть ориентированы по-разному. По-видимому, оба они функционируют в растительных клетках: 1) целлюлозные микрофибриллы в более старых слоях стенки могут перестраиваться относительно друг друга по мере их продвижения в наружный ряд, причем происходит разрыв и новое образование связей, которые соединяют полисахариды, входящие в состав стенки и 2) на плазматической мембране в стенку могут откладываться новые слои, которые имеют иную ориентацию, чем наружные.

Поскольку ориентация отложений в новой клеточной стенке связана с расположением микротрубочек в кортикальном слое, любые изменения в одной структуре влекут за собой изменения в другой. Таким образом, для функционирования второго механизма необходимо изменение ориентации микротрубочек. Подобные динамические изменения в спиральном расположении микротрубочек можно наблюдать непосредственно. Например, такие регуляторы роста растений, как этилен и гиббереллловая кислота, обладают противоположным действием на ориентацию микротрубочек (а следовательно, и направление роста клеток) в клетках эпидермиса молодых побегов гороха. Гиббереллловая кислота «заставляет» кортикальные микротрубочки располагаться перпендикулярно продольной оси клетки. При этом целлюлоза откладывается таким образом, что клетки могут только удлиняться, образуя тонкие удлиненные побеги. Однако, если эти побеги обработать этиле-

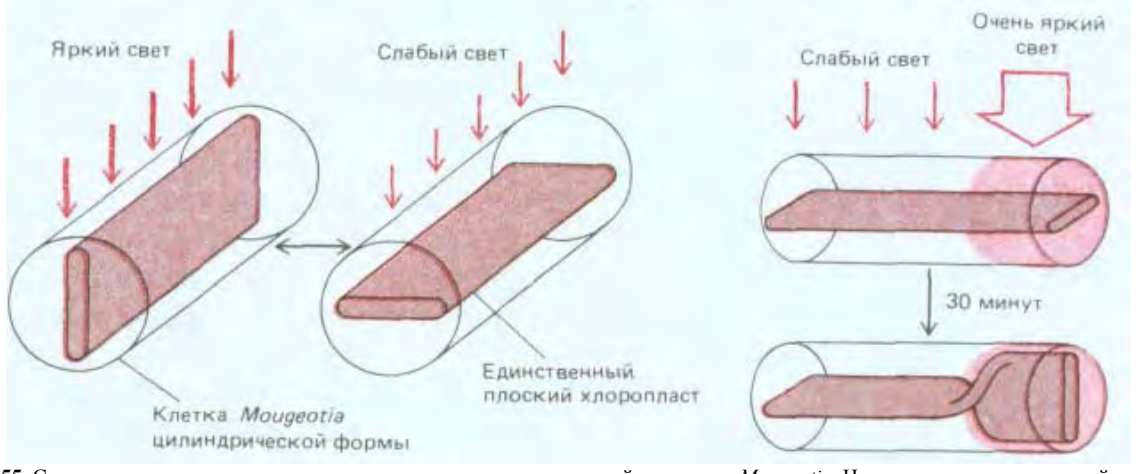


Рис. 20-55. Схема, иллюстрирующая движения хлоропласта в клетке зеленой водоросли *Mougeotia.* Цилиндрические клетки этой водоросли содержат один-единственный хлоропласт плоской формы, который поворачивается в соответствии с условиями освещения, регулируя тем самым количество поглощаемого света *(А).* Часть хлоропласта, на которую падает очень яркий свет, способна изменить свою ориентацию независимо от остальной его части, что указывает на локальный механизм реакции *(Б).*

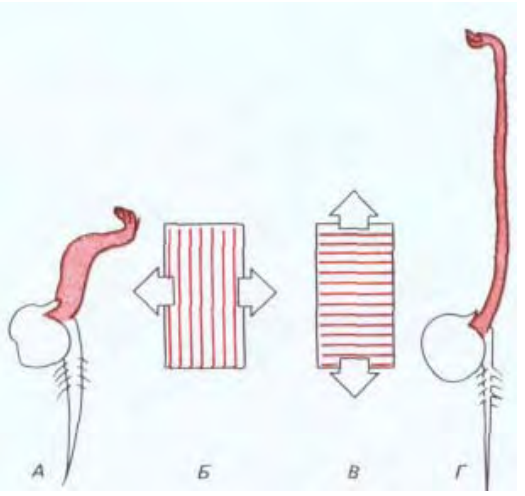


Рис. 20-56. Этилен и гиббереллловая кислота (регуляторы роста растений) оказывают противоположное воздействие на ориентацию кортикальных микротрубочек в клетках молодых побегов гороха. В большинстве клеток, обработанных этиленом *(Б),* обнаруживается исключительно продольная ориентация микротрубочек, тогда как большинство клеток, обработанных гиббереллловой кислотой *(В),* имеет исключительно поперечную ориентацию микротрубочек. Новые микрофибриллы целлюлозы откладываются параллельно микротрубочкам. Так как все это влияет на направление растяжения клетки, гиббереллловая кислота и этилен стимулируют рост в противоположных направлениях: проростки, обработанные этиленом, развивают короткие толстые побеги *(А),* а проростки, обработанные гиббереллловой кислотой, образуют длинные тонкие побеги *(Г).*

ном, микротрубочки за час переориентируются и лягут вдоль продольной оси клетки. Отложение целлюлозы в этом направлении приведет к тому, что клетки начнут растягиваться в ширину, в результате чего образуются толстые укороченные побеги (рис. 20-56). Молекулярные механизмы, определяющие подобные резкие перестройки цитоскелета, все еще неясны.

Заключение

Два типа органелл — пластиды и вакуоли - свойственны только растительным клеткам. К пластидам относятся разнообразные органеллы, обладающие одинаковым геномом. Среди них наиболее известны фотосинтезирующие хлоропласты, присутствующие во всех зеленых тканях. Вакуоль представляет собой крупную внутриклеточную полость, заполненную водным раствором того или иного состава и ограниченную мембраной, называемой тонопластом. Растительные клетки используют вакуоли в самых разных целях, например для экономного заполнения внутриклеточного пространства при росте, для хранения запасов питательных веществ или для накопления вредных продуктов обмена. Хотя сами растительные клетки не обладают способностью двигаться, их цитоплазма, особенно в клетках с большими вакуолями, постоянно перемешивается в результате поддерживаемых в ней направленных потоков. Показано, что в некоторых случаях движение цитоплазмы связано с функцией цитоплазматических актиновых филаментов.

Внутренняя организация растительной клетки и ее цитоскелет играют важную роль в формировании клеточной стенки, что, в свою очередь, определяет направление роста клетки и, следовательно, ее форму. Компоненты матрикса клеточной стенки вырабатываются и экспортируются аппаратом Гольджи, а целлюлозные микрофибриллы синтезируются непосредственно на поверхности клетки. Как места отложения различных компонентов стенки, так и ориентация целлюлозных фибрилл определяются микротрубочками кортикального слоя цитоплазмы. Элементы цитоскелета способны быстро реагировать на различные внешние стимулы, что может, например, приводить к перемещению хлоропластов под влиянием света.

20.5. Клеточные основы развития растений

Несмотря на поразительное разнообразие цветковых растений, некоторые особенности их формы и развития остаются удивительно постоянными. Наличие клеточной стенки заставляет растение выбирать иные, чем у животных, стратегии размножения, роста и развития. В данном разделе будут рассмотрены некоторые общие закономерности и обсуждены их клеточные основы. Особенности размножения растений суммированы на схеме 20-2. Вначале мы рассмотрим оплодотворенную зиготу и некоторые процессы в ее раннем развитии. Растения, подобно животным, при дифференцировке клеток широко используют пространственную регуляцию. Однако вместо миграции и перегруппировки клеток, играющих такую важную роль в развитии эмбрионов животных (см. гл. 16), у растений в морфогенезе решающим остается координированное деление клеток и их жестко регулируемый рост. Эти процессы находятся под контролем внешних факторов, таких как свет, гравитация, наличие питательных веществ, и внутренних, таких как фитогормоны. Благодаря открытию факторов роста появилась возможность выращивать клетки и ткани растений в культуре и использовать эти культуры для разнообразных генетических манипуляций.



Рис. 20-57. *Весьма упрощенная схема расположения главных меристематических зон и участков наиболее быстрого и постоянного деления клеток в высших растениях. Активность апикальных меристем корней и побегов ответственна за рост в длину, тогда как латеральные меристемы (например, камбий) обеспечивают утолщение различных частей растения.*

20.5.1. Эмбриональное развитие начинается с установления оси «корень-побег», а после формирования семени приостанавливается [28]

На самых ранних стадиях развития высших растений зигота делится асимметрично, чем определяется полярность будущего зародыша. Одним из продуктов такого деления является маленькая клетка с густой цитоплазмой, из которой и образуется собственно зародыш. Другая крупная вакуолизированная клетка продолжает делиться и образует так называемый *подвесок или суспензор* - структуру, которая в некотором отношении сравнима с плацентой млекопитающих. Подвесок прикрепляет зародыш к материнской ткани и, кроме того, обеспечивает приток питательных веществ к зародышу из окружающего его *эндосперма* (последний представляет собой триплоидную питательную ткань, которая при оплодотворении образуется отдельно (см. схему 20-2).

На следующей стадии развития диплоидная зародышевая клетка делится, образуя округлое скопление клеток, в котором формируются первые *меристемы* растения. Во время роста клеточное деление происходит почти полностью в специализированных участках, **меристемах,** состоящих из самовозобновляющихся стволовых клеток. Меристемы обычно бывают двух типов: 1) *апикальные меристемы* на верхушках растущих побегов и на кончиках корней, обеспечивающие главным образом рост растения или его частей в длину и 2) *латеральные меристемы* - цилидрические прослойки незрелых клеток, обеспечивающие рост в толщину (рис. 20-57). Латеральной меристемой, очень важной для всех растений, является *камбий,* который представляет собой слой клеток, образующих проводящие ткани.

Шаровидное скопление эмбриональных клеток вскоре разделяется на две группы меристематических клеток. Одна из них располагается на том конце зародыша, где находится подвесок, и образует апикальную меристему корня, а другая, находящаяся на противоположном полюсе, дает начало апикальной меристеме побега. Эти две меристемы определяют основную ось будущего растения в направлении корень - побег. Затем по мере роста зародыша образуется сосудистый камбий, из которого впоследствии возникают проводящие ткани между корнем и побегом. Несколько позже в ходе развития из апикальной меристемы побега формируются зародышевые листья семени или семядоли, одна у однодольных растений и две у двудольных (см. рис. 20-12). На этой стадии дальнейшее развитие обычно приостанавливается и зародыш упаковывается в *семя,* приспособленное для распространения и для выживания в суровых условиях.

Зародыш в семени стабилизирован посредством дегидратации и может оставаться в состоянии покоя в течение очень длительного времени, даже нескольких тысячелетий, что показано для семян злаков, найденных в египетских захоронениях. При соприкосновении с водой семена набухают и развитие зародыша продолжается. Развитие зародыша обеспечивается большими запасами питательных веществ, собранных в триплоидной ткани эндосперма (см. схему 20-2). При развитии семени этот питательный материал может в той или иной степени переходить в семядоли. Так, например, семена однодольных растений (пшеница и кукуруза) и некоторых двудольных содержат большие запасы эндосперма, а семена большинства двудольных (включая горох и бобы) снабжены питательными веществами, запасенными в толстых семядолях.

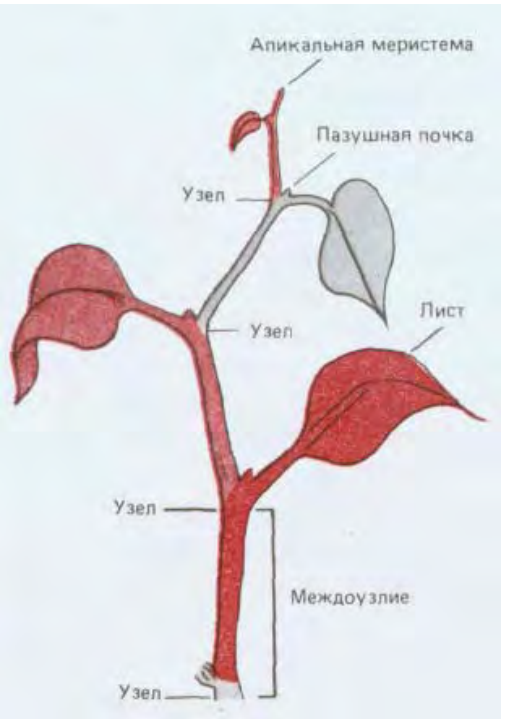


Рис. 20-58. Простой пример модулярного строения растений. Каждый модуль (они окрашены в разные цвета) состоит из стебля, листа и почки, содержащей потенциальную меристему. Модули последовательно возникают друг за другом в результате постоянной активности апикальной меристемы.

20.5.2. Меристемы постоянно образуют новые органы и новые меристемы, в результате чего многократно возникают серии одинаковых модулей [29]

Эмбрион у позвоночных представляет собой уменьшенную копию взрослого организма и обладает большинством характерных для данного животного органов. В противоположность этому зародыш растения, находящийся в семени, совершенно не похож на взрослое растение. Однако каждая из двух его меристем способна полностью воспроизводить в соответствующее время полный набор необходимых органов. При разрыве кожуры семени во время прорастания клетки увеличиваются и появляется корень, чтобы как можно скорее укрепиться в почве. За этим следует активное деление клеток в апикальных меристемах; например, в апикальной меристеме корня кукурузы клетки делятся каждые 12 ч, образуя за день 5 x 10^5 клеток. Быстрорастущие корни повышают свою способность поглощать воду и неорганические вещества из почвы, а у побегов возрастает фотосинтетическая активность (см. схему 20-2).

Апикальная меристема растений образует два типа структур: 1) основную систему корней и побегов, чей рост постоянно поддерживают сами меристемы и 2) цветки и листья, рост которых ограничен. Структуры первого типа, ответственные за постоянное развитие, существуют в течение всей жизни растения, а в случае привоев, например старых сортов яблонь, и значительно дольше. Второй тип структур имеет короткое время жизни, подвергаясь запрограммированному старению. Сопоставьте ежегодную смену листьев с фактическим отсутствием смены соматических клеток в остальных частях растения!

По мере удлинения побега апикальные меристемы образуют упорядоченную последовательность *узлов* и *междоузлий.* Таким образом, постоянная ативность меристем приводит к образованию все увеличивающегося числа одинаковых модулей, каждый из которых состоит из листа, стебля и почки (рис. 20-58). Модули соединены друг с другом основной и проводящей тканью, причем последующий модуль расположен по отношению к предыдущему строго определенным образом, в результате чего возникает упорядоченная структура, характерная для растения (рис. 20-59).

Каждый отдельный модуль обладает определенной степенью автономии, и, таким образом, взрослым растениям можно приписать определенные черты колониальных организмов, например губок или кораллов. В соответствии с этим каждый модуль возникает как вздутие определенного размера на апикальной меристеме, однако конкретные условия окружающей среды, в которых развивается этот модуль, могут изменить его конечную форму. Например, необычно большие темно-зеленые листья, как правило, развиваются в тенистых местах, а короткие и толстые листовые черешки там, где часто дуют ветры. Специально

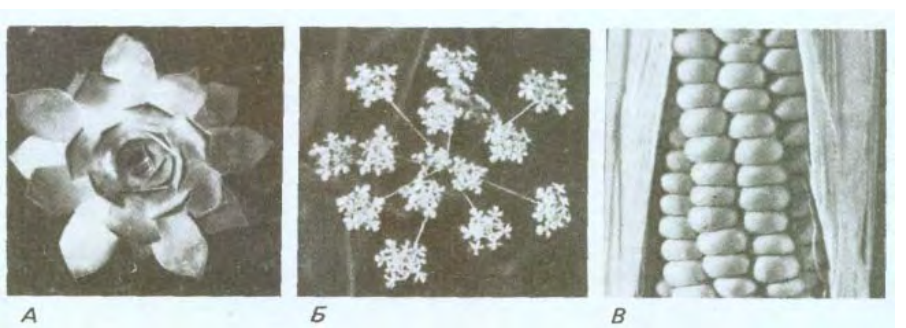


Рис. 20-59. Упорядоченное расположение следующих друг за другом модулей, возникающих из одной апикальной меристемы, приводит к возникновению правильных, хотя и усложненных, фигур в расположении листьев *(А),* цветков *(Б)* и плодов *(В). (С* любезного разрешения А. Davies.)

проведенные эксперименты доказали, что эти локальные приспособления связаны с каждым отдельным модулем, не затрагивая все растение. Более того, в остром углу, образованном стеблем и отходящим листом (пазуха), в каждом модуле возникает почка, содержащая новую апикальную меристему, которая потенциально может дать начало другой ветви. Однако многие из этих новых меристем активируются лишь в том случае, если исходная апикальная меристема повреждается или удаляется (явление, хорошо известное садовникам, которые прищипывают верхушку, чтобы стимулировать рост боковых побегов).

Модульная природа растений особенно хорошо демонстрируется при выращивании меристем в культуре. Используя подходящую питательную среду, можно заставить выделенные из растения апикальные меристемы расти и регенерировать, образуя нормальное растение. Этот метод в настоящее время нашел широкое применение в садоводстве для размножения ценных экземпляров роз, орхидей, а также некоторых сельскохозяйственных культур, как, например, земляника и сахарный тростник.

20.5.3. Внешний вид растения зависит от механизмов, определяющих формообразование в апикальных меристемах [30]

Повторяющийся тип роста побега в междоузлиях свидетельствует о том, что клетки в апикальной меристеме, для того чтобы соответствующим образом дифференцироваться, должны «чувствовать» расстояние от предшествующего узла и ориентацию относительно него. У растений, так же как у животных, существуют механизмы, регулирующие образование зачатков. Они действуют на расстоянии менее 1 мм, и, следовательно, охватывают относительно небольшие группы клеток, (см. разд. 16.4.4). Предшественники каждого нового узла (начальная точка ветвления) выявляются как последовательно возникающие вздутия, которые образуются вблизи самого кончика меристемы, причем в состав каждого из этих вздутий входит около 100 клеток (рис. 20-60). В соответствии с самыми простыми моделями, предложенными для объяснения этого процесса, в каждом новом узле вырабатывается диффундирующее

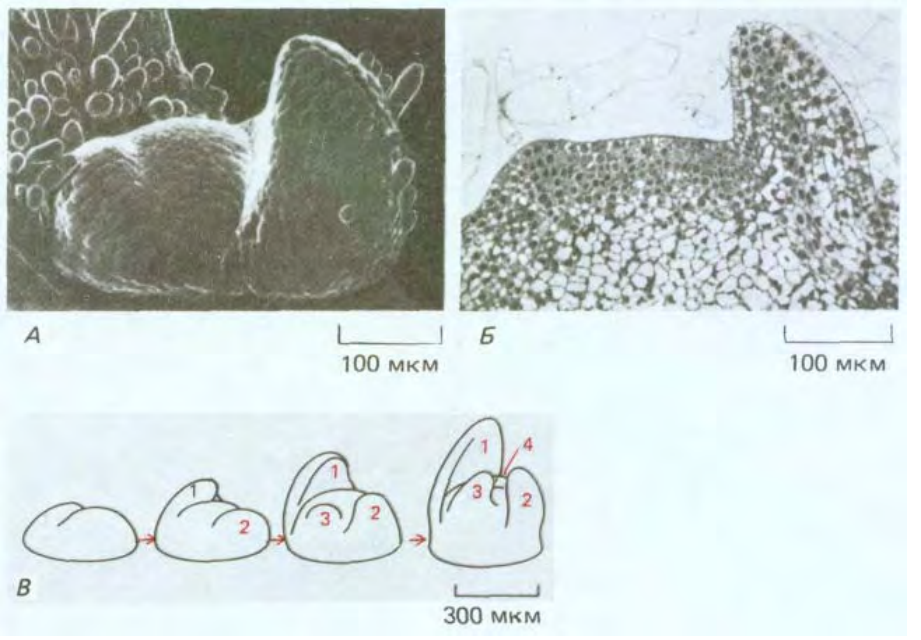


Рис. 20-60. Верхушка побега молодого растения табака. *А.* На фотографии, полученной с помощью сканирующего электронного микроскопа, видна верхушка побега с двумя зачатками листьев. Зачатки листьев выглядят как боковые выросты с каждой стороны апикальной меристемы, имеющей форму купола. *Б.* Тонкий срез такой же верхушки: видно как зачатки молодых листьев возникают из небольшой группы клеток (~100 клеток) в наружных четырех или пятиклеточных слоях. *В.* Очень условная схема, показывающая как зачатки листьев возникают на небольшом расстоянии друг от друга на очень ранних стадиях развития побега. Рост верхушки в конечном итоге приводит к образованию междоузлий, которые по порядку будут разделять листья на стебле (см. рис. 20-58). *(А* и *Б - по* R. S. Poethig, I. M. Sussex, Planta, 165, 158-169, 1985.)

вещество - *морфоген,* которое подавляет образование следующего узла, до тех пор пока не разбавляется на определенном расстоянии от узла при росте междоузлия. Однако о молекулярных механизмах, принимающих участие в этом основном формообразующем процессе царства растений, практически ничего неизвестно.

20.5.4. Образование новых структур зависит от координированного деления, растяжения и дифференцировки клеток [31]

До сих пор обсуждение развития высших растений велось главным образом на уровне описания тканей и органов. Какие же изменения, происходящие на клеточном уровне, лежат в основе всех этих процессов? Поскольку клетки растений лишены подвижности из-за наличия клеточных стенок, морфогенез растений должен зависеть от регулируемого деления клеток, сопряженного с ростом клеток в строго определенном направлении. Например, большинство клеток, образуемых апикальной меристемой корня, проходит три основные фазы развития: деление, рост (растяжение) и дифференцировку. Эти три стадии, во времени и в пространстве накладывающиеся друг на друга, определяют характерное строение кончика корня. Хотя дифференцировка клетки часто начинается, когда она еще увеличивается в размерах, в кончике корня относительно несложно отличить зону деления клеток, зону их растяжения (в результате чего происходит рост корня в длину) и зону дифференцировки (рис. 20-61). После завершения дифференцировки некоторые из дифференцированных типов клеток остаются живыми (например, клетки флоэмы), а другие погибают (например, клетки ксилемы).

Точное определение плоскости деления клеток является проблемой первостепенной важности для морфогенеза растений и многих процессов развития, таких как образование устьиц или зачатков листа, которые начинаются с изменения плоскости деления клеток. Постоянное деление клеток в меристеме часто приводит к возникновению столбиков дочерних клеток, ориентированных параллельно оси роста (рис. 20-61), а изменения в плоскости деления часто связаны с процессами, происходя-

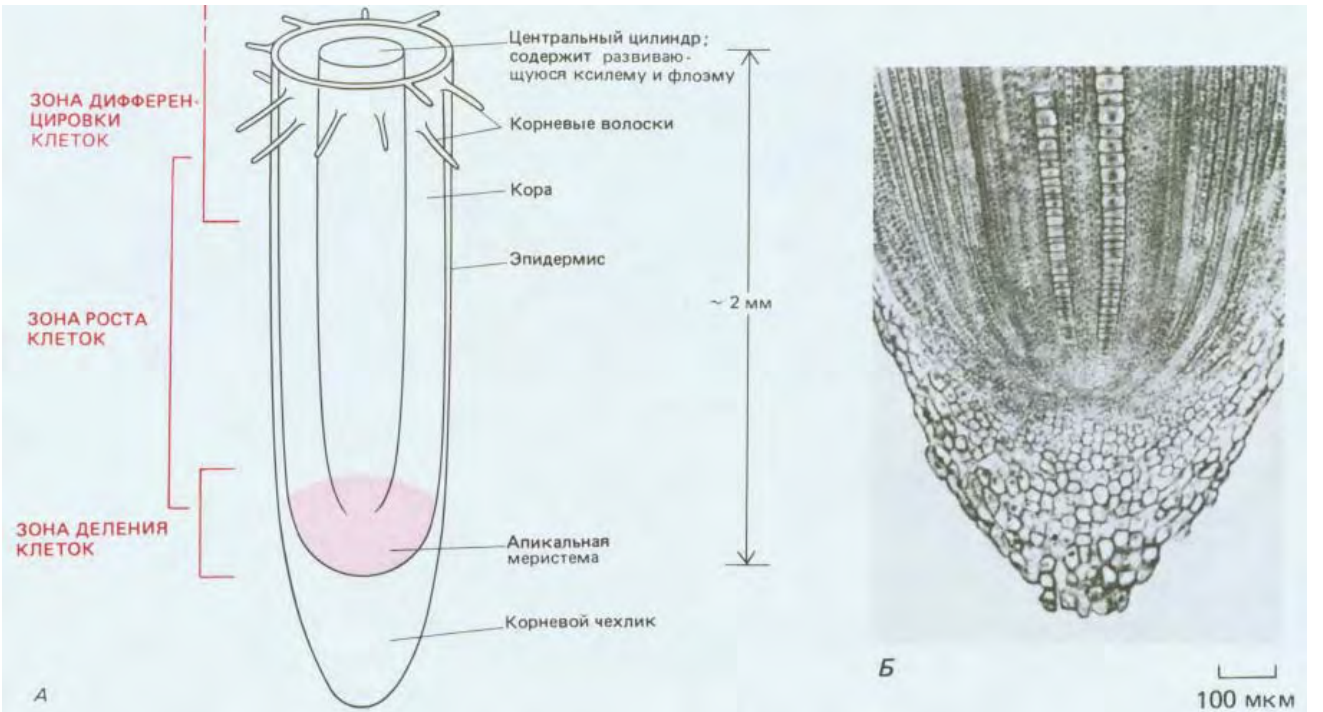


Рис. 20-61. *А.* Структурно-функциональная организация кончика растущего корня (показан участок 2 мм). Весьма приблизительно обозначены границы трех зон, в которых происходит соответственно деление, рост и дифференцировка клеток. *Б.* Апикальная меристема и корневой чехлик корня кукурузы, видны упорядоченные ряды образующихся клеток. *(Б* - по P. H. Raven, R. F. Evert, S. E. Eichhorn, Biology of Plants, 4th ed., New York: Worth, 1986.)

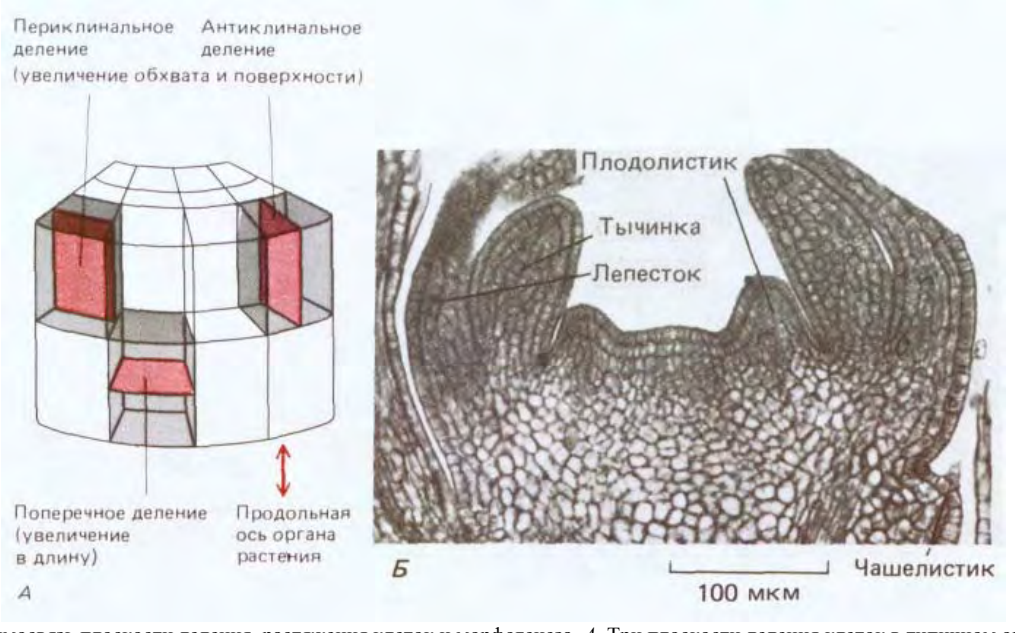


Рис. 20-62. Взаимосвязь плоскости деления, растяжения клеток и морфогенеза. *А.* Три плоскости деления клеток в типичном органе растения. Форма различных морфогенетических структур растения определяется вариациями в относительных соотношениях этих плоскостей, а также в сочетании с растяжением клеток в определенном направлении. *Б.* Продольный срез молодого бутона барвинка. Маленькие купола, образованные клетками, которые впоследствии станут частями цветка, возникают в результате комбинаций вновь возникающих новых плоскостей деления клеток, что определяется укреплением целлюлозных колец в клеточной стенке. (По N. H. Boke, Am.J. Bot, 36, 535-547, 1949.)

щими в ходе морфогенеза. В эпидермисе часто происходят *антиклинальные* деления, в результате которых образуются дополнительные клетки в поверхностном слое. Они могут способствовать утолщению, происходящему в результате *периклинальных* делений (рис. 20-62, *А).* Образование таких органов, как цветки, листья и боковые корни, происходит в результате сочетаний локальных изменений в частоте и ориентации плоскостей клеточных делений (рис. 20-62, Б*).*

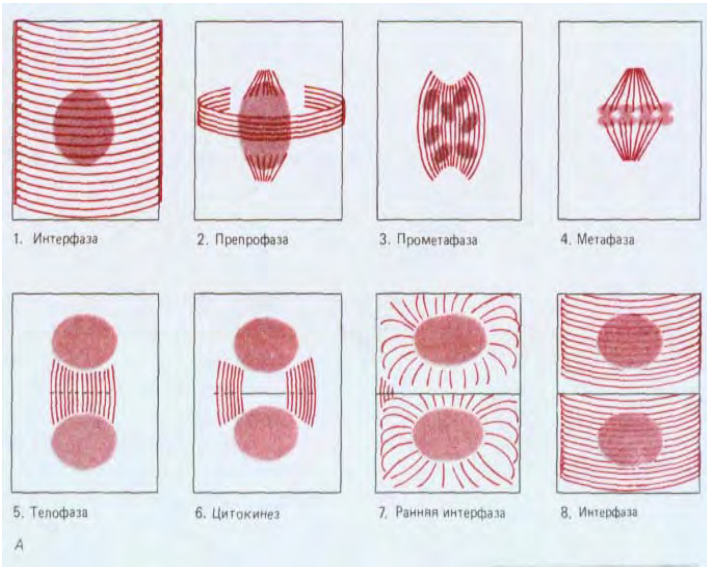
Мы уже видели, что вызываемое тургором растяжение растительной клетки, часто приводящее к увеличению ее объема в пятьдесят и более раз, определяется ориентацией целлюлозных микрофибрилл клеточной стенки, что в свою очередь зависит от ориентации микротрубочек кортикального слоя цитоплазмы. В определении плоскости деления клеток важную роль играет также цитоскелет.

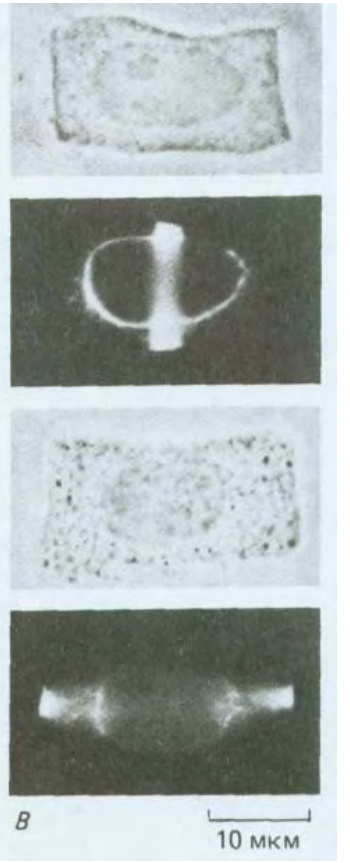
20.5.5. Строение цитоскелета определяет плоскость деления клетки [32]

Для организованного роста растения необходимо, чтобы клетки в специализированных участках делились в определенной плоскости и в определенное время, иными словами, чтобы цепочки клеток были правильно ориентированы. Микротрубочки с самого начала принимают участие в ориентации плоскости деления клеток. Таким образом, первые заметные признаки того, что клетка высшего растения собирается делиться в определенной плоскости, появляются сразу же после интерфазы, когда микротрубочки кортикального слоя исчезают в ходе подготовки к митозу. В это время непосредственно под плазматической мембраной появляется узкая окружающая всю клетку зона микротрубочек (рис. 20-63). Так как микротрубочки, входящие в состав этой зоны, появляются в G_2 перед началом профазы, данная зона называется **препрофазным пучком.** Хотя она исчезает перед метафазой, но граница плоскости деления каким-то образом запоминается: когда позже в процессе цитокинеза образуется новая клеточная пластинка, то она начинает расти наружу, сливаясь с родительской стенкой точно в том месте, которое первоначально было занято препрофазным пучком (рис. 20-64). Даже если содержимое клетки после исчезновения препрофазного пучка сместить посредством центрифугирования, растущая клеточная пла-

стинка будет стремиться вернуться в ту плоскость, которая была определена предыдущим препрофазным пучком.

В настоящее время известно, что препрофазный пучок кроме микротрубочек содержит многочисленные актиновые филаменты. Последние не ограничены кортикальным слоем и формируют также радиальные дисковидные скопления нитей, которые пересекают вакуоль, соединяясь вместе и поддерживая делящееся ядро, расположенное в центре. После того как микротрубочки в препрофазном пучке деполимеризуются, эти радиальные актиновые нити сохраняются, обеспечивая «запоминание», предопределяющее положение плоскости деления. В ходе цитокинеза,





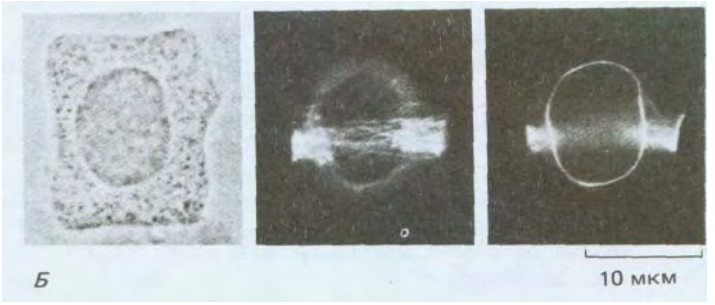


Рис. 20-63. Препрофазный пучок микротрубочек в клетках высших растений. *А*. Упрощенная схема изменения распределения микротрубочек в ходе клеточного цикла в клетках высших растений. Показаны четыре типа ориентации. По мере перехода клеток из интерфазы в профазу микротрубочки (1) в кортикальном слое стягиваются в плотный препрофазный пучок (2) шириной 1-3 мкм, в состав которого часто входит более сотни микротрубочек. Этот препрофазный пучок определяет будущую плоскость деления клетки. Затем образуется митотическое веретено (3), которое формирует и выстраивает хромосомы вдоль метафазной пластинки (4). В конце микротрубочки в ходе цитокинеза образуют фрагмопласт (5), который определяет новую клеточную стенку (6) (см. рис. 13-71). В дочерних клетках микротрубочки, полимеризующиеся из аморфного материала центросомы на поверхности ядра (7), восстанавливают интерфазную ориентацию (8). *Б.* Окрашивание флуоресцирующими антителами микротрубочек в препрофазном пучке клеток кончика корня лука. Слева показана отдельная клетка, а справа две фокальные плоскости помогают установить связь пучка с образованием на ранних стадиях веретена, которое происходит вне ядра. *В.* Несмотря на то, что две клетки, представленные здесь, имеют одинаковую форму, препрофазный пучок определяет, что верхняя клетка будет делиться поперечно, а нижняя - продольно. *(Б* и *В - с* любезного разрешения K. Goodbody, C. Lloyd.)

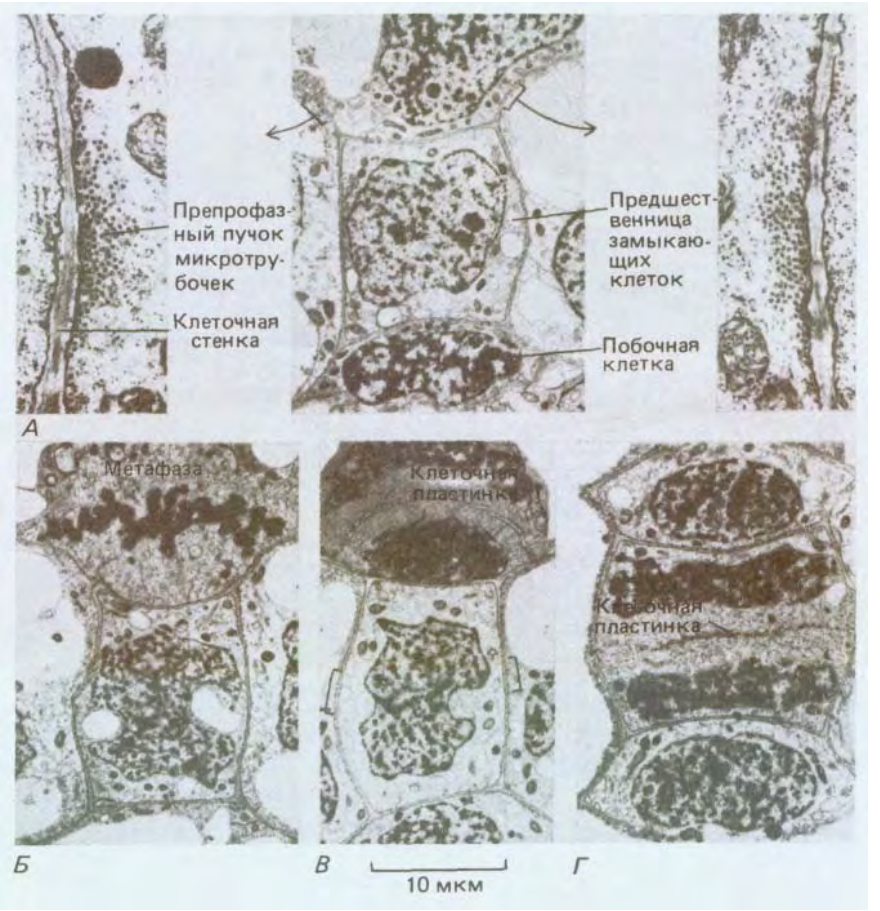


Рис. 20-64. Эта серия электронных микрофотографий эпидермальных клеток листа сахарного тростника демонстрирует строгую последовательность симметричных и асимметричных клеточных делений, происходящих при образовании устьица. Плоскость каждого деления предопределяется препрофазным пучком микротрубочек. *А*. На среднем фото: верхняя клетка готовится к асимметричному митозу, в результате которого отделится побочная клетка (нижняя клетка уже разделилась, образовав другую побочную клетку). Положение препрофазного пучка отмечено скобками, а детали его структуры при большом увеличении показаны на фото слева и справа. *Б*. Верхняя клетка вступает в метафазу, препрофазный пучок исчез. *В*. В верхней клетке образуется клеточная пластинка, ее края загибаются вниз к месту бывшего препрофазного пучка. В то же время крупная центральная клетка - предшественница замыкающих клеток - готовится к симметричному делению, положение препрофазного пучка указано скобками. *Г*. В верхней клетке цитокинез закончен, а в клетке-предшественнице замыкающих клеток близок к завершению. В результате последнего деления образуется пара замыкающих клеток, которые окружают устьичную щель (см. рис. 20-11). (С любезного разрешения C. Busby.)

когда фрагмопласт центробежно разрастается подобно кругам на воде, края растущей клеточной пластинки остаются связанными с местом расположения препрофазного пучка актиновыми филаментами (рис. 13-73).

Вне зависимости от того, симметрично или асимметрично деление клетки, является оно трансверсальным, периклинальным или антиклинальным, препрофазный пучок в растительной клетке всегда определяет место будущего деления клетки еще до того, как начнется митоз (см. рис. 20-63, *Б)*. Подобный пространственный контроль имеет особенно большое значение в случае асимметричного деления клеток, в результате чего образуются две дочерние клетки с разными последующими путями развития; например, клетки устьиц, клетки корневых волосков и генеративные клетки пыльцевых зерен развиваются из меньшей по размеру дочерней клетки. В ходе такого деления ядро переходит в соответствующую область клетки еще до митоза (рис. 20-65). Хотя механизм перемещения ядра пока остается неизвестным, имеются доказательства того, что в этот процесс вовлечены как микрогрубочки, так и актиновые филаменты.

Такой строгий контроль за плоскостями деления клеток возможен лишь в том случае если ткань растения и составляющие ее клетки обладают определенной структурой полярности, которая впоследствии может быть либо закреплена либо видоизменена. Хотя структурная основа подобной полярности у высших растений еще не выявлена, у низших растений можно найти хорошо изученные примеры, позволяющие создать соответствующие модели.

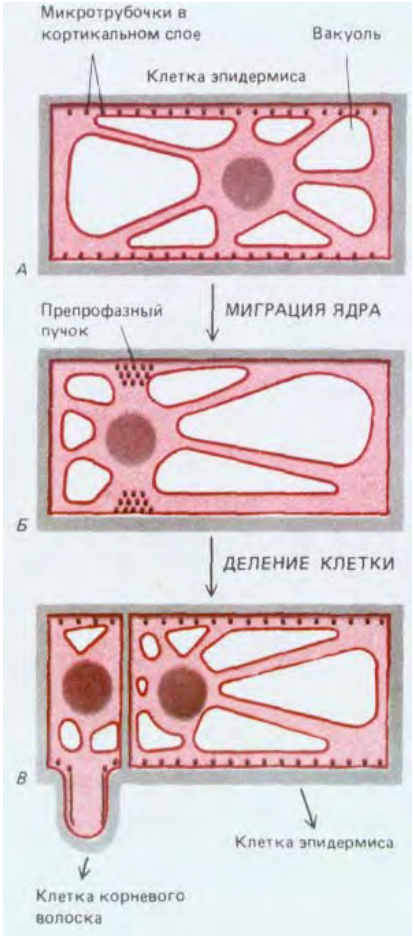


Рис. 20-65. Асимметричное деление в удлиняющейся клетке эпидермиса корня. В интерфазе *(А)* микротрубочки кортикального слоя располагаются вдоль клеточной стенки. Однако в ходе препрофазы (Б) они собираются в дискретный пучок, опоясывающий клетку. Такой препрофазный пучок трубочек точно предсказывает место, где новая клеточная стенка соединится со старой, когда клетка разделится. *В.* Эта клетка эпидермиса делится асимметрично, образуя большую дочернюю клетку, которая остается эпидермальной, и небольшую дочернюю клетку, которая становится клеткой корневого волоска.

20.5.6. Полярность растительных клеток зависит от асимметричного распределения ионных каналов и белков-носителей [33]

Полярность растения и составляющих его клеток отличается поразительным постоянством: маленькие отрезки стебля, даже перевернутые вниз своей верхней частью, всегда регенерируют корни и побеги на месте исходных базальных и апикальных концов соответственно. Еще неясно как подобная полярность клеток создается, поддерживается и передается дочерним клеткам, однако имеются определенные доказательства того, что в этом процессе могут участвовать асимметрично расположенные ионные каналы и белки-носители, присутствующие в плазматической мембране, которые могут генерировать внутриклеточные потоки ионов.

Особенно хорошо изученным в этом отношении объектом является широко распространенная в морях бурая водоросль *Fucus.* Эта крупная водоросль выделяет в окружающую воду тысячи свободно живущих спермиев и яйцеклеток. Округлая оплодотворенная яйцеклетка *Fucus,* имеющая большие размеры, первоначально совершенно гомогенна и лишена полярности. Однако уже через 18 ч зигота поляризуется и подвергается асимметричному делению, в ходе которого возникшая базальная клетка меньшего размера развивается в структуру, которая впоследствии служит для прикрепления водоросли к камню, а апикальная клетка большего размера образует таллом (фотосинтезирующая часть). Ключом к пониманию механизма поляризации зиготы, находящейся на ранней стадии развития, служит небольшой электрический ток, проходящий через эту клетку. Этот ток генерируется и поддерживается отчасти благодаря пассивному переносу ионов Ca^{2+} в базальный полюс и активной утечке Ca^{2+} из другого участка, что, вероятно, отражает асимметричное распределение кальциевых каналов и насосов в плазматической мембране. Такой ток, проходящий через яйцеклетку, способен перемещать путем электрофореза внутриклеточные компоненты, обладающие высоким зарядом; кроме того, имеются данные, что одним из результатов подобной поляризации является накопление секреторных пузырьков у базального полюса, за которым следует локализованное отложение специфических сульфатированных полисахаридов в этом участке клеточной стенки.

Не обладающая какой-либо полярностью зигота *Fucus* становится поляризованной в ответ на внешние стимулы, например, градиент освещения или силы тяжести. Полагают, что эти факторы приводят
к изначальной неравномерности распределения ионов Ca^{2+} в яйцеклетке (рис. 20-66). По-видимому, даже небольшие сдвиги в гомогенном распределении ионов Ca^{2+} вызывают значительные последствия, поскольку быстро усиливаются и распространяются благодаря механизму с обратной связью. Хотя остается непонятным, как осуществляется стабилизация оси зиготы, известно, что для этого процесса требуются как актиновые филаменты, так и клеточная стенка. Вероятно, элементы, цитоскелета участвуют в соединении кальциевых каналов с фибриллами клеточной стенки путем образования на месте будущего базального полюса трансмембранных мостиков. Полагают, что внутриклеточные градиенты Ca^{2+} существуют и во многих других типах растительных клеток, обладающих полярным ростом. Например, показано, что электрические токи, частично вызываемые ионами Ca^{2+} , проходят через растущие верхушки самых разнообразных поляризованных структур, включая корневые волоски, пыльцевые трубки и целые корни, но их нет в тех участках, где рост не происходит. Таким образом, те же механизмы, которые определяют полярность яйцеклеток *Fucus,* могут определять полярность клеток растений и в других случаях.

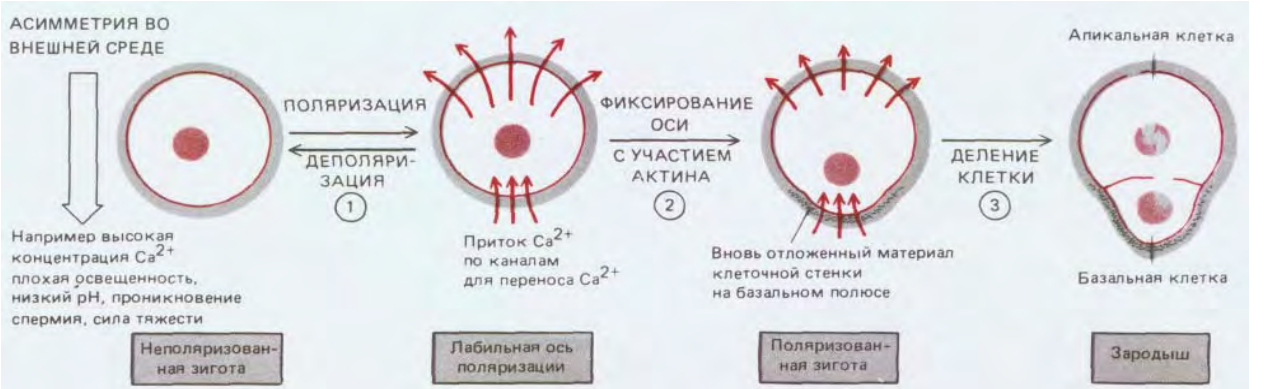


Рис. 20-66. Схема, показывающая, каким образом оплодотворенная яйцеклетка бурой морской водоросли *Fucus* может стать поляризованной (1). В ответ на одно из указанных асимметричных воздействий внешней среды в плазматической мембране возникают (или активизируются) каналы для переноса ионов Ca^{2+} и насосы в плазматической мембране, что определяет поток ионов Ca^{2+} через клетку (2). Такая, вначале лабильная ось, фиксируется с участием актина и на будущем базальном конце откладываются отрицательно заряженные полисахариды клеточной стенки (3). Начальная структурная асимметрия закрепляется при первом делении клетки, в результате которого образуются большая апикальная и маленькая базальная клетки. Полярность клеток высших растений может определяться аналогичным асимметричным распределением ионных каналов и насосов в плазматической мембране.

20.5.7. Рост и развитие растений реагируют на сигналы окружающей среды [34]

Условия окружающей среды часто оказывают гораздо более выраженное воздействие на развитие растений, чем на развитие животных. У растений в ходе эволюции сформировались специальные механизмы для восприятия силы тяжести, температуры, интенсивности и продолжительности освещения. Ответы на эти сигналы часто оказываются весьма сложными и могут быть либо быстрыми и кратковременными (как при движении хлоропластов, индуцированном светом, см. разд. 20.4.10), либо медленными и продолжительными (как в случае длинного светового дня, который необходим для индукции цветения некоторых растений или длительного периода охлаждения, необходимого для прорастания многих семян).

Ответы на воздействие света принадлежат к числу наиболее сложных реакций, которые разделяются на два типа. Ответные реакции на длительное воздействие обычно связаны с изменением экспрессии генов, тогда как реакции на кратковременное воздействие обычно не затрагивают этот уровень. Хотя в растении присутствует несколько типов фоторецепторных молекул, наиболее основательно изучен **фитохром,** белок с большой молекулярной массой (124000 дальтон). Это соединение содержит хромоформ, который реагирует на свет, и может существовать в виде двух форм, способных превращаться одна в другую: *неактивная* форма фитохрома образуется при облучении дальним красным светом (между видимым красным и инфракрасным), а его *активная* форма - при облучении красным светом. Известно, что фитохром участвует во многих реакциях растения, активируемых светом, включая дифференцировку пластид, прорастание семян, удлинение стебля, инициацию роста листьев и цветение.

Некоторые данные о том, как активированный фитохром вызывает ответ в компетентных клетках, получены на папоротнике *Onoclea.* Для прорастания спор этого растения необходим красный свет, а дальний красный свет ингибирует прорастание. Вначале, по-видимому, фитохром инициирует кратковременный приток Ca^{2+} из окружающей клетку среды, в результате чего содержание Ca^{2+} в цитозоле увеличивается. Ионофоры Ca^{2+} ускоряют прорастание и в отсутствие света. Остается неясным, какова роль фитохрома в индуцируемых светом реакциях, в результате которых происходят изменения в транскрипции генов. Вероятно, протеинкиназы, чувствительные к притоку ионов Ca^{2+}, фосфорилируются, активируя при этом факторы транскрипции, специфичные для фоторегулируемых генов.



Рис. 20-67. Структурные формулы регуляторов роста растений. Для каждой из пяти групп регуляторов роста приведено по одному представителю, встречающемуся в природе.

Фитохром может действовать при довольно широком диапазоне уровней освещенности: от единичных фотонов до яркого солнечного света, причем каждый из процессов достигает насыщения при разной интенсивности света. Тем не менее почти во всех таких процессах действие света совмещается с воздействием других факторов окружающей среды, а кроме того, во всем этом принимают участие молекулы одного или более регуляторов роста растений.

20.5.8. Рост и развитие растений регулируются химическими посредниками [35]

Координированные процессы клеточного деления, роста и дифференцировки контролируются многими факторами. Среди них особенно выделяется группа сигнальных молекул, называемых фитогормонами (или регуляторами роста растений), которые специфически действуют на рост растений и играют ключевую роль в их развитии. Известно пять классов таких соединений: **ауксины, гиббереллины, цитокинины, абсцизовая кислота и газ этилен.** Как показано на рис. 20-67, все это небольшие молекулы, способные легко проходить через клеточную стенку. Эти вещества вырабатываются в растительных клетках и либо действуют на месте, либо транспортируются по определенным путям к клеткам-мишеням. Так, например, суммарный поток ауксинов в побегах направлен от верхушки к основанию (скорость его около 1 см/ч). Несмотря на относительно малое число гормонов, растения справляются со своими регуляторными задачами благодаря многообразному использованию каждого гормона: их клетки, как правило, реагируют на определенные комбинации этих веществ. Так, сам по себе ауксин способствует образованию корней, в сочетании с гиббереллином вызывает удлинение стебля, вместе с цитокинином контролирует рост боковых почек, а с этиленом стимулирует рост боковых корней.

Важным общим принципом гормональной регуляции как у растений, так и у животных, является то, что каждая клетка, имея собственную генетическую программу, отвечает на определенные сигналы специфически (см. разд. 12.1.3). Более того, одна и та же клетка на разной стадии развития будет по-разному отвечать на одни и те же сигналы. Так, например, созревание плодов инициируется этиленом (см. разд. 20.1.8), однако чувствительность к этилену клетки приобретают лишь на поздних стадиях развития плода. Аналогичным образом, в семенах ячменя гибберелловая кислота, выделяемая зародышем, приводит к появлению ферментов, индуцирующих мобилизацию резервов крахмала в эндосперме, однако ответственные за реакцию клетки в оболочке семени становятся восприимчивыми к гибберелловой кислоте лишь после процесса дегидратации, необходимого для созревания семени.

До сих пор неизвестно, каким образом регуляторы роста оказывают воздействие на клетки-мишени. Соответствующие белки-рецепторы все еще не выделены и не охарактеризованы. Однако у растений, как и у животных, по-видимому, имеются два класса рецепторов: 1) рецепторы в плазматической мембране, которые активируют ионные каналы (а возможно, и другие еще неизвестные пути), и 2) рецепторы внутри клетки, которые воздействуют на ядро и регулируют экспрессию генов.

Получение очищенных регуляторов роста дало возможность выращивать ткани и клетки растений в культуре, что в значительной мере облегчило изучение различных аспектов роста и развития растений.

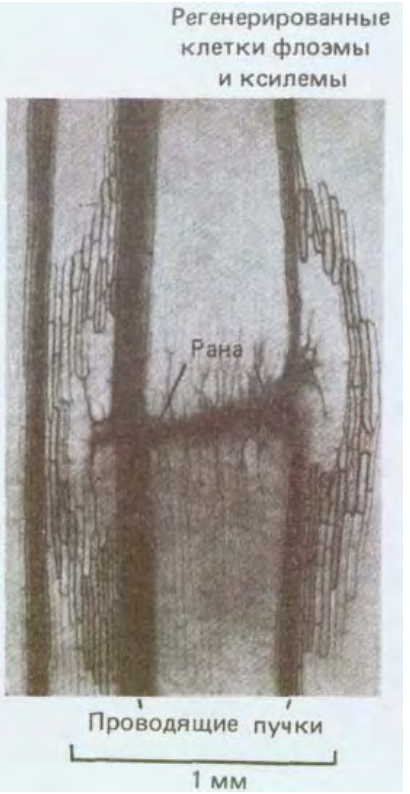


Рис. 20-68. Реакция на повреждение у распространенного комнатного растения *Coleus* (продольный срез стебля, световая микрофотография). Проводящие сосудистые пучки в области раны были перерезаны. Семь дней спустя в результате стимуляции клеточного деления и передифференцировки близлежащих клеток коры возникло много новых клеток ксилемы и флоэмы и была восстановлена непрерывность проводящих структур в области повреждения. Ауксин обычно поступает к основанию растения из верхушки. Полагают, что повреждение тканей вызывает новый направленный поток ауксина, который в свою очередь индуцирует регенерацию сосуда, показанную на этой микрофотографии. (С любезного разрешения N. P. Thompson.)

20.5.9. Культура клеток и тканей - модный инструмент для изучения развития растений [36]

При определенных условиях зрелые растительные клетки сохраняют способность делиться, а в некоторых случаях могут даже вступить на новый путь развития. Такая пластичность дает растению возможность восстанавливаться после повреждения. Например, если надрезать стебель, близлежащие клетки начинают делиться и закрывают рану, при этом другие клетки подвергаются передифференцировке, образуя ксилему и восстанавливая непрерывность проводящей ткани вокруг раны (рис. 20-68).

Такая пластичность свойственна не только целому растению: если культивировать растительную ткань в среде, содержащей необходимые питательные вещества и регуляторы роста, многие клетки начинают делиться. Они способны к неограниченной пролиферации и в конце концов образуют массу относительно недифференцированных клеток, называемую **каллусом.** Если правильно подобрать питательные вещества и регуляторы роста, то внутри каллуса начинают формироваться побеги, а затем корень; у многих видов таким образом удается регенерировать целиком новое растение (рис. 20-69).

Каллус можно механически разделить на отдельные клетки и выращивать их затем в *суспензионной культуре.* В такой культуре клетки очень похожи друг на друга: все они имеют тонкую первичную клеточную стенку и крупные вакуоли, пересеченные тонкими тяжами цитоплазмы (рис. 20-70). В ряде случаев из одиночных клеток, выделенных из суспензии, удавалось вырастить целое взрослое растение. Удачные

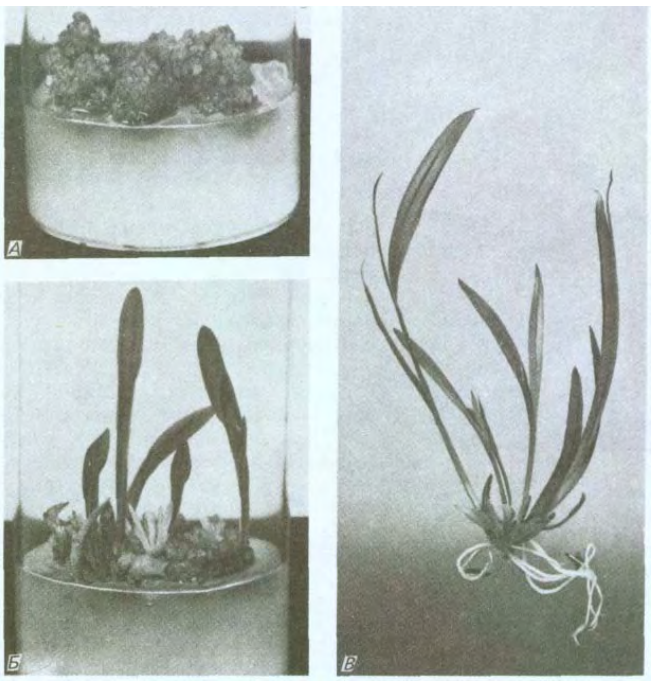


Рис. 20-69. Выращивание целого растения из клеток каллуса. В культуре каллуса *Freesia (А)* индуцировали сначала развитие побегов *(Б),* а затем корней *(В),* меняя соотношение ауксинов и цитокининов в среде. Для формирования побегов и листьев цитокинина в среде должно быть больше, чем ауксина. (С любезного разрешения G. Hussey.)

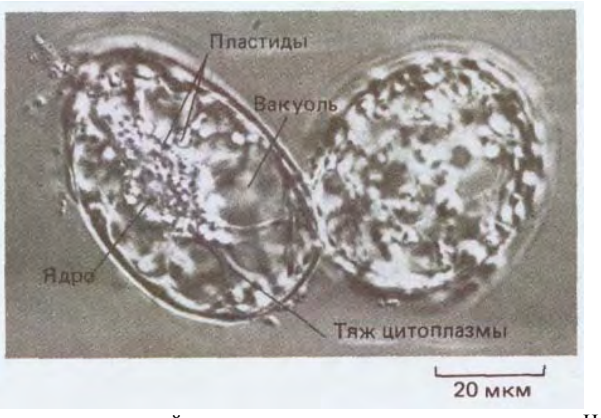


Рис. 20-70. Культуры каллуса можно поддерживать в жидкой среде в виде суспензии одиночных клеток. На микрофотографии показаны две такие клетки из каллуса платана. Они сильно вакуолизированы, и от ядра отходят цитоплазматические тяжи. У этих клеток есть первичная клеточная стенка.

результаты были получены с клетками картофеля, табака, петунии и моркови (рис. 20-69). Такая способность единственной соматической клетки давать начало целому растению хорошо иллюстрирует *тотипотентность* многих растительных клеток.

Растения, выращенные из культивируемых клеток, характеризуются генетической нестабильностью *(сомаклональная вариация).* То же явление имеет место, если интактное растение подвергается стрессу. По-видимому, при стрессах, к которым относят и условия культивирования, в клетках растений происходят разнообразные хромосомные перестройки (см. разд. 10.5.10). Образовавшиеся мутантные растения могут иметь преимущества в изменившихся или неблагоприятных условиях. В настоящее время сомаклональные варианты используются селекционерами как исходный материал для получения улучшенных сортов сельскохозяйственных растений.

20.5.10. Использование методов молекулярной генетики для решения проблем развития растений

Способность соматических клеток растений и регенерации в культуре дает возможность проводить с такими клетками разнообразные генетические манипуляции и получать трансгенные растения. Для того чтобы облегчить попадание чужеродной ДНК в растительные клетки, их лишают жесткой оболочки. Этого можно добиться с помощью обработки клеток ферментами, гидролизующими связи в полисахаридах клеточной стенки. В результате такой обработки клетки превращаются в **протопласты** (рис. 20-71). После введения в них чужеродной ДНК протопласты можно заставить вновь сформировать клеточную стенку, индуцировать деление и даже регенерировать новое растение.

Для введения чужеродной ДНК в интактные клетки растений используется вектор, полученный на основе Т-ДНК *Agrobacterium,* о которой говорилось выше (см. разд. 20.3.3). Для этого гены, ответственные за образование опухоли на растении, удаляются и замещаются желаемыми. После переноса модифицированной Т-ДНК в соответствующую Ti-плазмиду *Agrobacterium* бактерии культивируют вместе с кусочками листа. Эта система позволяет Т-ДНК встроиться к хромосому растения, в результате чего новый ген стабильно включается в растительный геном (рис. 20-72). К сожалению, этот метод успешно используется лишь для некоторых семейств двудольных растений [1)]

[1)] В последнее время круг трансформируемых видов растений значительно расширился, методика стала применима и к некоторым однодольным растениям, например кукурузе и *рису. - Прим. перев.*



Рис. 20-71. Световая микрофотография протопластов, полученных из зеленых клеток листьев табака. Клетки, лишенные стенки, округляются: их можно сохранить только в изотоническом растворе. В каждом протопласте видны многочисленные хлоропласты. (С любезного разрешения F. Burgess.)

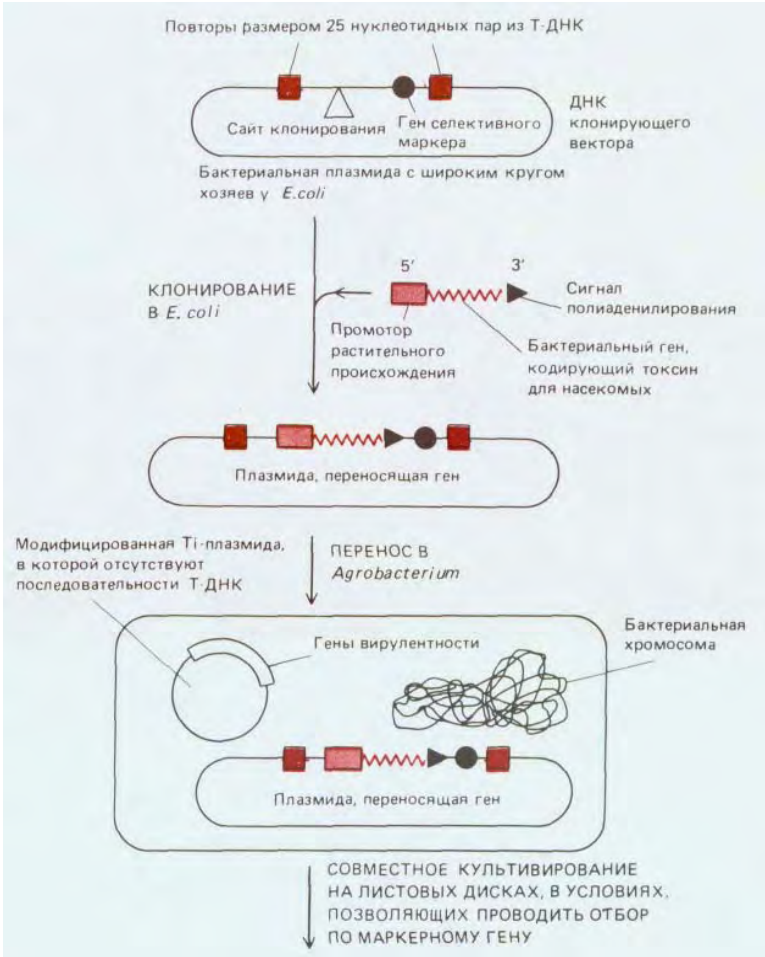


Рис. 20-72. Схема получения трансгенного растения. Интересующий нас ген кодирует бактериальный белок, токсичный для насекомых. Чтобы ген экспрессировался в растительной клетке, его 5'-конец соединяют с растительным промотором, а 3'-конец с сайтом полиаденилирования. Модифицированный ген токсина встраивают в плазмиду, содержащую кроме него и маркерный ген (например, ген устойчивости к канамицину), по которому можно проводить селекцию. Плазмида сконструирована таким образом, чтобы и ген токсина, и маркерный ген были окружены особыми повторами, размером 25 нуклеотидных пар, которые в норме окружают Т-ДНК. Плазмиду из клеток *E. coli* переносят в *Agrobacterium,* где на отдельной плазмиде присутствуют гены вирулентности. Если такую *Agrobacterium* культивировать вместе с листовыми дисками, продукты генов вирулентности узнают повторы в Т-ДНК и перенесут ДНК, содержащую маркер и гены токсина в хромосому растения. Все клетки листового диска затем заставляют делиться, помещая экспланты на соответствующую питательную среду, однако способность делиться и образовывать каллус сохранят лишь те клетки, которые содержат ген селективного маркера. Из каллуса затем получают трансгенные растения, которые экспрессируют бактериальный ген инсектотоксина и, следовательно, обладают необычной устойчивостью к насекомым.

Применение методов генной инженерии к клеткам растений способствовало решению многих задач: удалось выделить в чистом виде регуляторы роста, прояснить пути морфогенеза и механизмы экспрессии генов. Более того, открылись новые горизонты в сельском хозяйстве: появилась теоретическая возможность получать растения с заданными свойствами, например устойчивые к вредителям или способные расти в экстремальных условиях (засоленная или переувлажненная почва).

Хорошо известно, что успехи в изучении механизмов развития у животных были достигнуты благодаря использованию в качестве объекта беспозвоночных, с которыми удобно проводить генетический анализ и эксперименты. Долгие годы модельными организмами служили плодовая мушка *Drosophila* (см. разд. 16.5) и нематода *Caenorhabditis* (см. разд. 16.3). Биология развития растений развивается гораздо медленнее. Это связано с длительностью жизненного цикла у растений и величиной их генома. В последние годы все более широкое применение в качестве объекта молекулярно-генетических исследований находит маленькое травянистое растение *Arabidopsis thaliana.* Во-первых, оно настолько мало (рис. 20-73), что его можно выращивать в пробирках в лабораторных условиях. Во-вторых, время генерации этого растения составляет всего 5 недель и, наконец, *Arabidopsis* обладает самым маленьким геномом из всех геномов растений (7×10^7 нуклеотидных пар),



Рис. 20-73. *Arabidopsis thaliana* - небольшое травянистое растение из семейства крестоцветных, не имеющее никакой хозяйственной ценности, однако необычайно удобное для молекулярно-генетических экспериментов с растительными объектами. Небольшой геном *Arabidopsis* (7 x 10^7 нуклеотидных пар) сопоставим по размеру с геномом дрозофилы (10 x 10^7 нуклеотидных пар). (С любезного разрешения Ch. Sommerville.)

сравнимым с геномами дрожжей (2 x 10^7 нуклеотидных пар), *C.elegans* (8 x 10^7 нуклеотидных пар) и дрозофилы (10 x 10^7 нуклеотидных пар). В настоящее время выявлено большое число интересных мутаций *Arabidopsis thaliana* и получена полная геномная библиотека этого растения (см. разд. 5.6.3). Можно предположить, что в ближайшем будущем *Arabidopsis* будет играть в биологии развития растений такую же роль, как дрозофила в биологии развития животных.

Заключение

На самых ранних стадиях развития у высших растений происходит интенсивное деление клеток зародыша. Однако по мере роста зародыша способность клеток к делению сохраняется только в определенных областях, называемых меристемами. Взрослое растение можно рассматривать как серию повторяющихся модулей, возникших в результате действия в этих меристемах формообразующих механизмов.

Морфогенез растений зависит от координированного деления, растяжения и дифференцировки неподвижных клеток. Контроль за расположением плоскостей деления клеток и за их растяжением в определенном направлении частично осуществляется микротрубочками, связанными с внутренней поверхностью плазматической мембраны. На рост и деление клеток растений оказывают влияние свет, сила тяжести, температура и другие факторы окружающей среды, а также такие специфические низко молекулярные регуляторы роста, как ауксины и цитокинины.

Многие аспекты роста и развития растительных клеток были исследованы на культивируемых клетках - как одиночных, так и в составе каллуса. Соматические клетки растений обладают пластичностью, которой лишены клетки животных. Наиболее ярким примером тотипотентности многих соматических клеток растений является их способность давать начало целому растению.

Протопласты - это растительные клетки, лишенные своей жесткой стенки. Их можно изучать in vitro теми же методами, что и клетки животных, но протопласты имеют еще и дополнительное преимущество, так как из них можно регенерировать целые растения.

Благодаря методам генной инженерии в хромосомы протопластов и интактных клеток можно ввести требуемый новый ген. Во многих случаях из этих клеток удается впоследствии получить трансгенное растение.

Литература

Общая

Cutter E.G. Plant Anatomy, 2nd., Part 1, Cells and Tissues; Part 2 Organs. London, Arnold, 1978.
Esau K. Anatomy of Seed Plants, 2nd ed. New York, Wiley, 1977.
Grierson D., Covey S.N. Plant Molecular Biology, 2nd ed. New York, Methuen, 1988.
Gunning B. E. S., Steer M. W. Ultrastructure and the Biology of Plant Cells. London, Arnold, 1975.
Raven P. H., Evert R. F., Eichhorn S. *E.* Biology of Plants, 4th ed., New York, Worth, 1986.
Roberts K., Johnson A. W.B., Lloyd C. W., Shaw P.J., Woolhouse H. W., eds. The Cell Surface in Plant Growth and Development. J. Cell. Sci., Suppl. 2. Cambridge, U. K., Company of Biologists Ltd, 1985.
Salisbury F.B., Ross C. W. Plant Physiology, 3rd ed. Belmont, CA, Wadsworth, 1985.

Цитированная

1. *Bacic A., Harris P.J., Stone B.A.* Structure and Function of Plant Cell Walls. In Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise (J. Preiss, ed.), Vol. 14, Carbohydrates, pp. 287-371. San Diego, CA, Academic Press, 1988.

Brett C. T., Hillman J. R., eds. Biochemistry of Plant Cell Walls. SEB Seminar Series, 28. New York, Cambridge University Press, 1985.
McNeil M., Darvill A. G., Fry S. C., Albersheim P. Structure and function of the primary cell walls of plants. Annu Rev. Biochem., **53,** 625 663, 1984. *Rees D.A.* Polysaccharide Shapes. London, Chapman and Hall, 1977.
2. *Cassab G. /., Varner J. E.* Cell wall proteins. Annu. Rev. Plant Physiol**., 39,** 321 -353, 1988. *Fry S.* Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. Annu. Rev. Plant Physiol., **37,** 165-186, 1986.
Selvendran R. R. Developments in the chemistry and biochemistry of pectic and hemicellulosic polymers. J. Cell Sci. Suppl., **2**, 51-88, 1985.
3. *Carpita N.. Sabularse D., Montezinos D., Delmer D. P.* Determination of the pore size of cell walls of living plant cells. Science, **205,** 1144 1147, 1979.
Milburn J. A. Water Flow in Planls. London, Longman, 1979.
4. *Street H. E., Öpik H.* The physiology of Flowering Plants, 3rd ed. London, U. K., Edward Arnold, 1984.
5. *Fry S. C.* The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis. New York, Wiley, 1988.
Masuda Y., Yamamoto R. Cell-wall changes during auxin-induced cell extension. Mechanical properties and constituent polysaccharides of the cell wall. In Biochemistry of Plant Cell Walls; (C.T. Brett, J. R. Hillman, eds.), pp. 269 300. SEB Seminar Series 28, New York, Cambridge University Press, 1985.
6. *Baker D. A., Hall J. L.* Ion Transport in Plant Cells and Tissues. Amsterdam, North-Holland, 1975. *Cheeseman J. M.* Mechanisms of salinity tolerance in plants. Plant Physiol., **87,** 547 550, 1988.
Morgan J. M. Osmoregulation and water stress in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., **35**, 299-319, 1984.
Zimmerman U. Cell turgor pressure regulation and turgor pressure-mediated transport processes. Symp. Soc. Exp. Biol**., 31,** 117-154, 1977.
7. *Esau K.* Anatomy of Seed Plants, 2nd ed. New York, Wiley, 1977.
Tanner W., Loewus F .A., eds. Encyclopedia of Plant Physiology, New Series Vol. 13B, Plant Carbohydrates II, Extracellular Carbohydrates. Heidelberg, Springer-Verlag, 1982.
8. *Dugger W. M., Bartnicki-Garcia S.,* eds. Structure, Function, and Biosynthesis of Plant Cell Walls. Proc. 7th Annu. Symp. Botany Rockville, M. D., American Society of Plant Physiologists, 1984. (Several relevant papers appear in this collection.)
Fry S. The Growing Plant Cell Wall: Chemical and Metabolic Analysis. New York, Wiley, 1988.
9. *Gunning B. E. S., Overall R. L.* Plasmodesmata and cell-to-cell transport in plants. Bioscience., **33,** 260-265, 1983.
Gunning B. E. S., Robards A. W., eds. Intercellular Communication in Plants: Studies on Plasmodesmata. New York, Springer-Verlag, 1976.
10. *Baron-Epel 0., Hernandez D., Jiang L.-W., Meiners S., Schindler M.* Dynamic continuity of cytoplasmic and membrane compartments between plant cells. J. Cell Biol.**, 106**, 715 721, 1988.
Gunning B. E. S., Hughes J. E. Quantitative assessment of symplastic transport of pre-nectar into the trichomes of *Abutilon* nectaries. Aust. J. Plant Physiol., **3,** 619-637, 1976.
Terry B. R., Robards A. W. Hydrodynamic radius alone governs the mobility of molecules through plasmodesmata. Planta, **171,** 145-157, 1987.
Zaitlin M., Hull R. Plant virus-host interactions. Annu. Rev. Plant Physiol., **38,** 291-315, 1987.
11. *Aloni R.* Differentiation of vascular tissue. Annu. Rev. Plant Physiol., **38,** 179 204, 1987.
Moorby J. Transport Systems in Plants. New York, Longman, 1981.
12. *Baker D. A.* Transport Phenomena in Plants. London, U.K., Chapman and Hall, 1978.
Clarkson D. T. Factors affecting mineral nutrient acquisition by plants. Annu. Rev. Plant Physiol., **36,** 77-115, 1985.
Milburn J. A. Water Flow in Plants. London, Longman, 1979.
Passioura J. B. Water transport in and to roots. Annu, Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39,** 245-265, 1988.
13. *Cronshaw J.* Phloem structure and function. Annu. Rev. Plant Physiol., **32,** 465-484, 1981.
Cronshaw J., Lucas W. J., Giaquinta R. T., eds. Phloem Transport. New York, Liss, 1986.
Gunning B. E. S. Transfer cells and their roles in transport of solutes in plants. Sci. Prog. (Oxford), **64,** 539-568, 1977.
Ho L. C. Metabolism and compartmentation of imported sugars in sink organs in

relation of sink strength. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39,** 355-378, 1988.

14. *Gianinazzi-Pearson V., Gianinazzi S.,* eds. Physiological and Genetical Aspects of Mycorrhyzae. Paris, INRA, 1986.
Smith S. E., Gianinazzi-Pearson V. Physiological interactions between symbionts in vesicular-arbuscular mycorrhizal plants. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.**, 39,** 221-244, 1988.
15. *Downie J. A., Johnson A. W. B.* Nodulation of legumes by *Rhizobium:* the recognized root? Cell., **47,** 153-154, 1986.
Peters N. K., Frost J. W., Long S. R. A plant flavone, luteolin induces expression of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. Science., **233,** 977-980, 1986.
Rolfe B. G., Gresshoff P. M. Genetic analysis of legume nodule initiation Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39,** 297-319, 1988.
16. *Buchanan-Wollaston V., Passiatore J. E., Cannon F.* The *mob* and *oriT* mobilization functions of a bacterial plasmid promote its transfer to plants. Nature.**, 328,** 172-175, 1987.
Klee H., Horsch R., Rogers S. Agrobacterium-medialed plant transformation and its further applications to plant biology. Annu, Rev. Plant Physiol., **38,** 467-486, 1987.
Stachel S. E., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens.* Nature., **318,** 624-629, 1985.
17. *Ayers A. R., Ebel J., Finelli F., Berger N., Albersheim P.* Host pathogen interactions. Plant Physiol., **57,** 751-759, 1976. (This should be read in conjunction with three related papers that follow its.)
Darvill A. G., Albersheim P. Phytoalexins and their elicitors - a defence against microbial infection in plants. Annu. Rev. Plant Physiol., **35,** 243-275, 1984.
Ralton V. E., Smart M. G., Clarke A. E. Recognition and infection process in plant pathogen interactions. In Plant-Microbe Interactions. (T. Kosuge, E. W. Nestor, eds.), Vol. **2, pp.** 217-252, New York, Macmillan, 1987.
Ryan C. A. Oligosaccharide signalling in plants. Annu. Rev. Cell Biol.**, 3,** 295-317, 1987.
18. *McDougall G. J., Fry S.C.* Inhibition of auxin-stimulated growth of pea stem segments by a specific monosaccharide of xyloglucan. Planta, **175,** 412-416, 1988.
Thanh Van K. T., et al. Manipulation of the morphogenetic pathways of tobacco explants by oligosaccharins. Nature, **314,** 615-617, 1985.
19. *Anderson J. M.* Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. Annu. Rev. Plant Physiol., **37,** 93-136, 1986.
Mullett J. E. Chloroplast development and gene expression. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39,** 475-502, 1988.
Thomson W. W., Watley J. M. Development of nongreen plastids. Annu. Rev. Plant Physiol., **31,** 375-394, 1980.
20. *Boiler T., Kende H.* Hydrolytic enzymes in the central vacuole of plant cells. Plant Physiol., **63,** 1123-1132, 1979.
Boiler T., Wiemken A. Dynamics of vacuolar compartmentation. Annu. Rev. Plant Physiol., **37,** 137-164, 1986.
Marin B., ed. Plant Vacuoles: Their Importance in Solute Compartmentations in Cells and Their Applications in Plant Biotechnology. NATO ASI Series, Vol. 134. New York, Plenum, 1987.
Motile P. Biochemistry and function of vacuoles. Annu. Rev. Plant Physiol., **29,** 193-213, 1978.
21. *Mollenhauer H. H., Morré D. J.* The Golgi apparatus. In The Biochemistry of Plants-A Comprehensive Treatise. (N. E. Tolbert, ed.), Vol. 1, pp. 437-488. New York, Academic Press, 1980.
Moore P. J., Staehelin L. A. Immunogold localization of the cell-wall-matrix polysaccharides rhamnogalacturonan I and xyloglucan during cell expansion and cytokinesis in *Trifolium pratense* L.; implications for secretory pathways. Planta., **174,** 433 445, 1988.
Northcote D. H. Macromolecular aspects of cell wall differentiation. In Encyclopedia of Plant Physiology, New Series. Vol. 14A. Nucleic Acids and Proteins in Plants I (D. Boutler, B. Parthier, eds.), pp. 637-655. Berlin, Springer-Verlag, 1982.
22. *Coleman J., Evans D., Hawes C., Horsley D., Cole L.* Structure and molecular organization of higher plant coated vesicles. J. Cell Sci.**, 88,** 35-45, 1987.
Robinson D. G., Depta H. Coated vesicles. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39,** 53-99, 1988.
Tanchak M. A., Griffing L. R., Mersey B. G., Fowke L. C. Endocytosis of cationized ferritin by coated vesicles of soybean protoplasts. Planta., **162,** 481-486, 1984.
23. *Brown R. M.* Cellulose microfibril assembly and orientation: recent developments. J. Cell Sci., Suppl., **2,** 13-32, 1985.
Delmer D.P. Cellulose biosynthesis. Annu. Rev. Plant Physiol., **38,** 259-290, 1987.
Schneider B., Herth W. Distribution of plasma membrane rosettes and kinetics of

cellulose formation in xyleme development of higher plants. Protoplasma., **131,** 142 152, 1986.
24. Green P. B. Organogenesis-a biophysical view. Annu. Rev. Plant Physiol., **31,** 51 82, 1980.
Herth W. Plant Cell wall formation. In Botanical Microscopy (A. W. Robards, ed.), pp. 285-310. New York. Oxford University Press, 1985.
25. *Lloyd C. W.,* ed. The Cytoskeleton in Plant Growth and Development. New York, Academic Press, 1982. (Chapters 5-8 are particulary relevant.)
26. *Kersey Y. M., Helper P. K.. Palevitz B. A., Wessels N. K.* Polarity of actin filaments in characean algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **73,** 165 167, 1976.
Parthasarathy M. V. F-actin architecture in coleoptile epidermal cells. Eur. J. Cell Biol., **39,** 1-12, 1985.
Sheet: M. P., Spudich J. A. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables in vitro. Nature, **303,** 31-35, 1983.
Williamson R. E. Organelle movements along actin filaments and microtubules. Plant Physiol., **82,** 631 634, 1986.
27. *Haupt W.* Light-mediated movement of chloroplasts. Annu. Rev. Plant Physiol., **33,** 205-233, 1982.
Roberts I. N.. Lloyd C. W., Roberts K. Ethylene-induced microtubule reorientations: mediation by helical arrays. Planta, **164,** 439-447, 1985.
Virgin H. I. Light and chloroplast movements. Symp. Soc. Exp. Biol., **22,** 329 352, 1968.
Wagner G., Klein K. Mechanism of chloroplast movement in *Mougeotia.* Protoplasma, **109,** 169-185, 1981.
28. *Cutter E.G.* Plant Anatomy, 2nd ed., Part 2, Organs. London, Arnold, 1978. *Johri B. M.* Embryology of Angiosperms. Berlin. Springer-Verlag, 1984.
Raven P. H.. Evert R. F., Eichhorn S. E. Biology of Plants, 4th ed. New York. Worth, 1986. (Chapters 19-22 provide a good general outline of plant development.)
29. *Harper J. L.,* ed. Growth and Form of Modular Oganisms. London, Royal Society, 1986. (There are several relevant papers in this collection.)
Walbot V. On the life strategies of plants and animals. Trends Genet., **1,** 165-169, 1985.
30. *Green P. B.* A theory for influorescence development and flower formation based on morphological and biophysical analysis in *Echeveria.* Planta, **175,** 153 169, 1988.
McDaniel C. N.. Poething R. S. Cell lineage patterns in the shoot apical meristem of the germinating corn embryo. Planta, **175**, 13-22, 1988.
Sachs T. Controls of cell patterns in plants. In Pattern Formation (G. M. Malacinski, S. V. Bryant, eds.). New York. Macmillan, 1984.
Sleeves T. A., Sussex I. M. Patterns in Plant Development, 2nd ed. New York, Cambridge University Press, 1988.
31. *Gunning B.E.S.* Microtubules and cytomorphogenesis in a developing organ: the root primordium of *Azolla pinnata.* In Cytomorphogenesis in Plants. (O. Kiermayer, ed.), pp. 301-325, New York, Springer, 1981.
Poethig R. S. Clonal analysis of cell lineage patterns in plant development. Am. J. Bot., **74,** 581-594, 1987.
32. *Gunning B. E. S., Wick S. M.* Preprophase bands, phragmoplasts and spatial control of cytokinesis. J. Cell Sci. Suppl., **2,** 157-179, 1985.
Lloyd C. Actin in plants. J. Cell Sci., **90,** 185-188, 1988. *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.
Wick S. M., Seagull R. W.. Osborn M., Weber K., Gunning B. E. S. Immunofluorescence microscopy of organized microtubule arrays in structurally stabilized meristematic plant cells. J. Cell Biol., **89,** 685-690, 1981.
33. *Hepler P. K., Wayne R. 0.* Calcium and plant development. Annu. Rev. Plant Physiol., **36,** 397-439, 1985.
Kropf D. L., Kloareg B. Quatrano R. S. Cell wall is required for fixation of the embryonic axis in *Fucus* zygotes. Science, **239,** 187-190, 1988.
Quatrano R.S., Griffing L. R., Huber-Walchli V., Doubet R. S. Cytological and biochemical requirements for the establishments of a polar cell. J. Cell Sci., Suppl., **2,** 129-141, 1985.
Schnepf E. Cellular polarity. Annu. Rev. Plant Physiol., **37,** 23-47, 1986.
34. *Jordan B. R., Partis M. D., Thomas B.* The biology and molecular biology of plytochrome. Ox. Sur. Plant. Mol. Cell Biol., **3,** 315-362, 1986.
Kuhlemeier C., Green P. J., Chua N. Regulation of gene expression in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., **38,** 221-257, 1987.
Tobin E. M., Silverthorne J. Light regulation of gene expression in higher plants. Annu. Rev. Plant Physiol., **36,** 569-593, 1985.

Verma D.P.S., Goldberg R. B. Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes. New York, Springer-Verlag, 1988.
von Wettstein D., Chua N.-H., eds. Plant Molecular Biology. NATO AS1 Series A, Vol. 140. New York, Plenum, 1987. (Several relevant papers in this collection.)
35. *Hoad G. V., Lenton J. R., Jackson M. B., Atkin R. K.* Hormone Action in Plant Development: A Critical Appraisal. London, Butterworth, 1987.
Salisbury F. B., Ross C. W. Plant Physiology, 3rd ed. Belmonl, CA, Wadsworth, 1985. (Chapters 16 and 17 are relevant.)
Theologis A. Rapid gene regulation by auxin. Annu. Rev. Plant Physiol., **37,** 407-438, 1986.
Trewavas A. J. Growth substance sensitivity: the limiting factor in plant development. Physiol. Plant., **35,** 60-72, 1982.
36. Application of Plant Cell and Tissue Culture. CIBA Foundation Symposium 137. New York, Wiley, 1988.
Lee M., Phillips R. L. The chromosomal basis of somaclonal variation. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., **39,** 413 437, 1988.
Vasil 1. K., ed. Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture. Int. Rev. Cytol., Suppl. 11A and B, 1980.
37. *Bevan M.* Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. Nucl. Acids Res., **12,** 8711 -8721, 1984.
De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montague M., Schell J., Zambryski P. Expression of foreign genes in regenerated plants and in their progeny. EMBO J., **3,** 1681-1689, 1986.
Finkelstein R., Estelle M., Martinez-Zapater J., Somerville C. Arabidopsis as a tool for the identification of genes involved in plant development. In Temporal and Spatial Regulation of Plant Genes. (D. P. S. Verma, and R. B. Goldberg eds.), pp. 1-25. New York, Springer-Verlag. 1988.
Myerowitz E. M. Arabidopsis thaliana. Annu. Rev. Genet. **21,** 93-111, 1987.
Vaeck M., et al. Transgenic plants protected from insect attack. Nature, **328,** 33 37. 1987.

21. Рак

В развитых странах каждый пятый человек умирает от рака, но вряд ли стоило бы только по этой причине посвящать ему здесь целую главу. Первое место по количеству вызываемых смертей занимают все-таки сердечно-сосудистые заболевания, да и многие другие болезни причиняют людям ничуть не меньше вреда. Очень серьезную проблему для человечества представляют несбалансированное питание и инфекционные болезни. Важность изучения клеточной биологии рака в значительной мере обусловлена тем, что в основе родственных заболеваний, объединенных под этим названием, лежат нарушения наиболее фундаментальных законов поведения клеток в многоклеточном организме. Для того чтобы разобраться в сущности рака и разработать рациональные способы его лечения, необходимо понять как внутренние механизмы жизнедеятельности клеток, так и механизмы взаимодействия их друг с другом в тканях и организме в целом. Именно по этой причине фундаментальные исследования рака столь существенно обогатили наши знания о нормальных клетках. Ведь в ходе этих исследований были созданы эффективные методы, которые во многом определяли нынешнюю революцию в клеточной биологии. Достаточно назвать использование обратной транскриптазы из онкогенных РНК-содержащих вирусов и линий миеломных клеток (потомков раковых В-лимфоцитов) для получения соответственно кДНК (разд. 4.6.3) и моноклональных антител. Можно спорить о том, *в* какой степени огромные средства, брошенные на лабораторные исследования в этой области, способствовали выполнению основной задачи - развитию терапии рака, однако не подлежит сомнению, что стимулированный ими прогресс клеточной биологии значительно углубил наши знания в областях медицины, выходящих за пределы чистой онкологии.

Мы уже касались вопроса о том, каким образом изучение рака положило начало выяснению молекулярных механизмов, лежащих в основе контроля роста и размножения клеток (разд. 13.4). В этой главе, которой завершается наша книга, мы рассмотрим проблему рака как такового. Первый раздел будет посвящен природе рака и его происхождению с клеточной точки зрения, во втором мы сосредоточим внимание на его молекулярных основах.

21.1. Рак как микроэволюционный процесс [1]

Организм животного можно рассматривать как сообщество или экосистему, где в роли особей оказываются клетки, размножающиеся делением и организованные в объединенные совместной деятельностью конгломераты или ткани. Ранее, при обсуждении функционирования тканей мы выступали в роли «экологов»: нас интересовали рождение и смерть клеток, места их обитания, территориальные ограничения, поддержание размеров популяции и т. п. Речь шла лишь об одном важном экологическом понятии - естественном отборе; о мутациях и

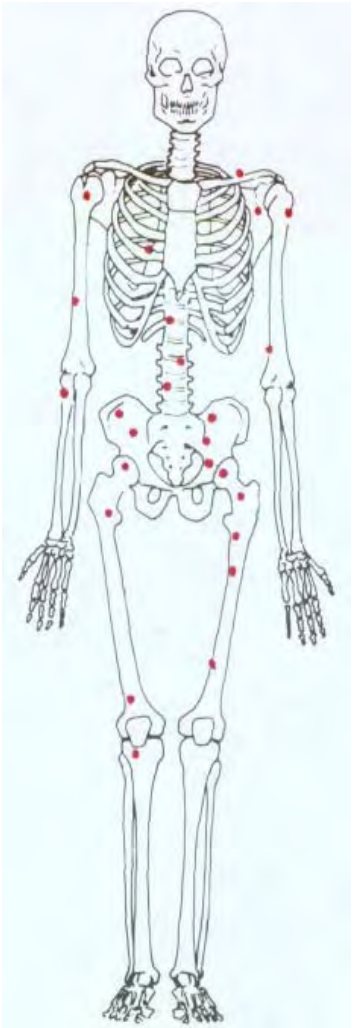


Рис. 21-1. Злокачественные опухоли, как правило, дают начало метастазам (вторичным опухолям), что, собственно, и делает рак столь трудно излечимым. На рисунке изображены те участки костного мозга, где, как правило, обнаруживаются очаги метастазирования при карциноме предстательной железы. (Union International Centre of Cancer, TNM Atlas: Illustrated Guide to the Classification of Malignant Tumors, 2nd ed. Berlin: Springer, 1986.)

конкуренции среди соматических клеток мы умалчивали. Причина здесь заключается в том, что здоровый организм представляет собой весьма специфическое сообщество клеток, в котором преобладание альтруистических тенденций над конкуренцией является правилом для всех типов клеток, кроме одного: любые соматические клетки обречены на умирание без потомства, однако самим своим существованием они обеспечивают сохранение половых клеток - единственных, кто имеет шанс выжить и продолжить себя в потомстве. В этом нет парадокса, поскольку организм является клоном и генотипы соматических и половых клеток идентичны: жертвуя собой ради блага половых клеток, соматические клетки способствуют распространению копий собственных генов.

Итак, в отличие от свободноживущих клеток (например, бактерий), между которыми происходит постоянная конкуренция в борьбе за выживание, клетки многоклеточного организма обречены на сотрудничество. В этой ситуации любая мутация, которая порождает отход от альтруистического поведения у отдельных членов подобного «кооператива», ставит под угрозу само его существование. Поэтому мутации, конкуренция и естественный отбор, начинающие работать *внутри* популяции соматических клеток - признаки патологии. Как раз такой тип патологии и имеет место при раке; последний представляет собой заболевание, при котором отдельные клетки стремятся лишь к собственному процветанию в ущерб соседям, но в конце концов разрушают все клеточное сообщество и погибают вместе с ним.

В этом разделе мы рассмотрим развитие рака как микроэволюционный процесс, протекающий в популяции клеток организма и длящийся месяцы и годы, но подчиняющийся тем же факторам - мутациям и естественному отбору, которые управляют долговременной эволюцией всех живых организмов.

21.1.1. Опухоли различаются в соответствии с типом клеток, из которого они происходят [2]

Раковые клетки характеризуются двумя «врожденными» свойствами, которые сохраняются и у их потомства: во-первых, они размножаются без тех ограничений, которые имеют силу для нормальных клеток, и, во-вторых, они захватывают и заполняют в организме места, предназначенные в норме для других клеток. Именно комбинация этих черт делает рак особенно опасным. Отдельная дефектная клетка, размножающаяся не быстрее, чем ее нормальные соседи, принесет немного вреда, какими бы неприятными особенностями она ни обладала, но если ее пролиферация выходит из-под контроля, она дает начало опухоли, или **неоплазме** - неотвратимо растущей массе аномальных клеток. В том случае, если они остаются компактным скоплением, опухоль считается **доброкачественной,** и хирургическое удаление ее обычно приводит к полному излечению. Раковой же называют опухоль **злокачественную,** клетки которой способны проникать в окружающие ткани. Инвазивность обычно означает способность разрушать барьеры, проникать в кровяное русло и лимфатические сосуды и формировать вторичные опухоли **(метастазы)** в различных частях тела (рис. 21-1). Чем более обширные метастазы дает рак, тем труднее от него избавиться.

Раковые опухоли классифицируют в соответствии с той тканью и типом клеток, откуда они берут начало. Те из них, которые имеют эпидермальное происхождение, называют **карциномами,** соединительнотканное или мышечное - **саркомами.** Типы злокачественных новообразований, не попадающие в эти две обширные категории, включают различные формы лейкозов, возникающие из кроветворных клеток,

Таблица 21-1. Заболеваемость раком и смертность от рака в США, 1986

Вид рака	Число новых случаев за год	Число смертей за год
Всего	930000	472 000
Рак эпителиального происхождения	789000 (85%)	381400 (81%)
(карциномы)		
Ротовая полость и глотка	29 500 (3%)	9400 (2%)
Органы пищеварения (в целом)	217800 (23%)	119700 (25%)
Толстый кишечник, включая прямую кишку	130000 (14%)	60000 (13%)
Поджелудочная железа	25500 (3%)	24000 (5%)
Желудок	24700 (3%)	14300 (3%)
Печень и желчные пути	13600 (1%)	10600 (2%)
Дыхательная система (в целом)	164500 (18%)	135400 (29%)
Легкие	149000 (16%)	130100 (28%)
Молочные железы	123900 (13%)	40200 (9%)
Кожа (в целом)	> 400000[1)]	7500 (2%)
Злокачественная меланома	23 000 (2%)	5600 (1%)
Репродуктивная система (в целом)	169800 (18%)	49400 (10%)
Предстательная железа	90000 (10%)	26 100 (6%)
Яичники	19000 (2%)	11600 (2%)
Шейка матки	14000 (2%)	6800 (1%)
Матка (эндометрий)	36000 (4%)	2900 (1%)
Выделительная система (в целом)	60 500 (7%)	19800 (4%)
Мочевой пузырь	40 500 (4%)	10600 (2%)
Рак кроветворной и иммунной системы: лейкозы и лимфомы	70 100 (8%)	41 100 (9%)
Рак центральной нервной системы и глаза: глиомы, ретинобластома и др.	15600 (2%)	10600 (2%)
Рак соединительной ткани мышц и сосудистой системы: саркомы	7100 (1%)	4200 (1%)
Все прочие случаи рака, включая рак не выясненного происхождения	48200 (5%)	34800 (7%)

[1)] Сюда не включается рак кожи немеланомного происхождения, так как большинство случаев излечивается легко и многие даже не регистрируются.

Наибольший вклад в общемировую статистику дают пять групп раковых заболеваний: легких, желудка, молочной железы, толстого кишечника (включая прямую кишку), шейки матки, а всего ежегодно регистрируются уже свыше 6 млн. новых случаев рака. Обратите внимание на то, что умирает от рака лишь около половины заболевших. (Данные для США: American Cancer Society, Cancer Facts and Figures, 1986.)

и опухоли, ведущие начало от клеток нервной системы. В табл. 21-1 приведены частота заболеваемости и смертности для наиболее обычных в США типов рака. Каждая категория подразделяется на множество групп в соответствии со специфическим типом клеток, локализацией в организме и структурой опухоли; при этом многие названия являются традиционными и не имеют современной рациональной основы. Параллельно с набором названий для злокачественных опухолей существуют родственные термины для обозначения опухолей доброкачественных: примером может служить *аденома* - доброкачественная опухоль железистых органов и слизистых оболочек, выстланных кубическим или призматическим эпителием, которой соответствует злокачественная опухоль - *аденокарцинома* (рис. 21-2). *Хондрома* и *хондросаркома* - соответственно доброкачественная и злокачественная опухоли хрящевой ткани. Около 90% злокачественных опухолей у человека относится к карциномам, что связано, видимо, как с высокой пролиферативной активностью эпителиальных тканей, так и с тем, что последние чаще

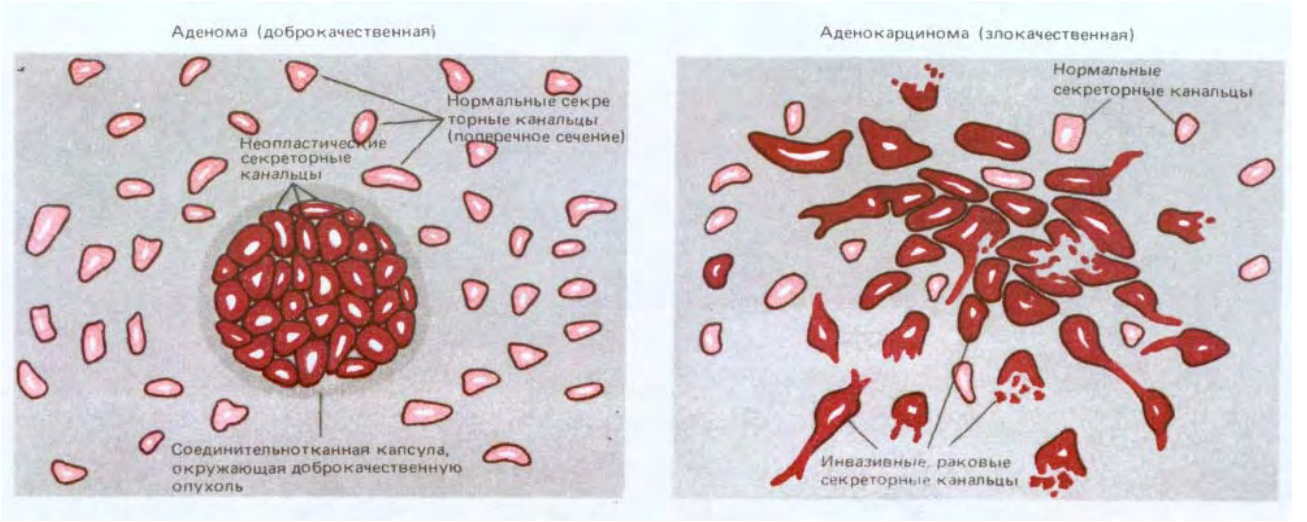


Рис. 21-2. Аденома (доброкачественная опухоль железистой ткани) и аденокарцинома (соответствующая злокачественная опухоль) резко различаются между собой. Существует множество разновидностей этих опухолей; здесь схематически изображены те из них, которые поражают молочную железу.

других подвергаются вредным физическим и химическим влияниям, способствующим возникновению малигнизации.

Каждая раковая опухоль имеет свои характерные черты и особенности, отражающие ее происхождение. Например, клетки эпидермальной *базальноклеточной карциномы,* возникшие из стволовой клетки кератиноцита, обычно продолжают синтезировать цитокератиновые промежуточные филаменты, тогда как возникшие из пигментных клеток кожи клетки *меланомы* часто, хотя и не всегда, образуют пигментные гранулы. Вообще говоря, раковые опухоли различного клеточного происхождения являются совершенно различными болезнями. В рассмотренном примере базальноклеточный рак лишь локально инвазивен и редко образует метастазы, меланома же гораздо более злокачественна и быстро дает начало многочисленным метастазам (такое поведение напоминает склонность к миграции предшественников нормальных пигментных клеток в онотогенезе - см. разд. 16.6.5). Хирургическое удаление базальноклеточного рака обычно не встречает затруднений и ведет к полному излечению, в то время как злокачественную меланому, начавшую давать метастазы, зачастую ликвидировать невозможно, и летальный исход неизбежен.

21.1.2. В большинстве случаев раковая опухоль развивается из отдельной аномальной клетки [3]

В большинстве случаев происхождение рака прослеживается до единичной изолированной первичной опухоли; это наводит на мысль, что они образуются путем делений из единичной клетки с некими наследственными изменениями, позволяющими ее потомкам «перерасти» соседей. Однако к моменту обнаружения типичная опухоль состоит, как правило, не менее чем из миллиарда клеток (рис. 21-3), среди которых немало нормальных - например, фибробластов в поддерживающей соединительной ткани, обычно окружающей раковую опухоль. Доказать, что все раковые клетки данной опухоли являются клоном, берущим начало от единственной аномальной клетки, нелегко, однако в настоящее время имеются данные, которые подтверждают моноклональную природу рака. Так, практически у всех больных *хроническим миелолейкозом* лейкоциты отличаются от нормальных специфическим хромосомным нарушением, так называемой **филадельфийской хромосомой,** которая образуется при транслокации между длинными плечами 22-й и 9-й



Рис. 21-3. Рост типичной опухоли у человека (диаметр опухоли показан в логарифмической шкале). Могут пройти годы, прежде чем опухоль станет заметной.

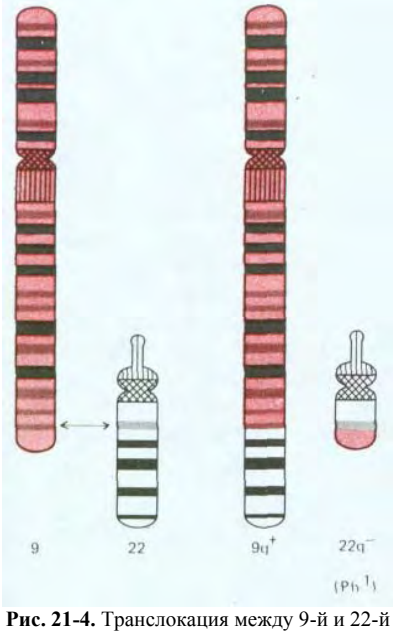


Рис. 21-4. Транслокация между 9-й и 22-й хромосомами ответственна за развитие хронического миелолейкоза у человека. Меньшая из двух дефектных хромосом называется филадельфийской (Ph^1) (впервые эта аномалия была описана в Филадельфии).

хромосом (см. рис. 21-4). Весьма маловероятно, чтобы генетическое событие, ответственное за это нарушение, произошло одновременно в нескольких клетках одного индивидуума; гораздо правдоподобнее выглядит предположение, что все лейкозные клетки являются потомками одной мутантной клетки. Действительно, когда клонировали ДНК в участке транслокации и определяли ее первичную структуру, выяснилось, что точка разрыва и воссоединения транслоцированных фрагментов одна и та же у всех лейкозных клеток данного больного, но у разных больных точки разрывов различны (смещение на несколько сотен или тысяч пар азотистых оснований). Именно такого результата следовало ожидать, если лейкоз всегда является следствием уникального события в единственной клетке.

Другую возможность показать, что рак имеет моноклональное происхождение дает феномен инактивации Х-хромосомы (см. разд. 10.3.9). Нормальный женский организм - это случайная смесь или мозаика двух классов клеток: тех, в которых инактивирована отцовская Х-хромосома, и тех, в которых инактивирована аналогичная материнская хромосома. Такая инактивация происходит в каждой клетке в раннем эмбриогенезе, поэтому у потомства делящейся соматической клетки всегда инактивирована та же Х-хромосома, что и у нее самой. Следовательно, инактивация Х-хромосомы - отцовской или материнской - может служить наследуемым маркером, при помощи которого можно проследить происхождение клеток организма. В подавляющем большинстве исследованных опухолей, доброкачественных и злокачественных, у всех опухолевых клеток была инактивирована одна и та же Х-хромосома; это является сильным аргументом в пользу того, что каждая опухоль - потомство единственной клетки (рис. 21-5).

21.1.3. Большинство раковых опухолей начинается, по-видимому, с изменений в последовательности нуклеотидов клеточной ДНК [4]

Если дефектная клетка дает начало опухоли, она должна передать свою аномальность потомству, т. е. повреждение должно быть наследуемым. Поэтому первая проблема, с которой мы сталкиваемся при попытке понять сущность рака такова: является ли этот наследуемый дефект результатом генетического изменения, т. е. изменения в последовательности нуклеотидов ДНК, или изменения *эпигенетического,* когда меняется картина экспрессии генов, но не первичная структура ДНК. Наследуемые эпигенетические сдвиги, отражающие «память клеток» (см. разд. 10.3 и 16.2.8), - это черта нормального развития, проявляющаяся в стабильности дифференцированного состояния (разд. 17.1.1) и в таких явлениях как инактивация Х-хромосомы (разд. 10.3.9), и нет никаких оснований сразу отвергать участие подобных процессов в возникновении рака. Для одного редкого и необычного вида рака - тератокарциномы (разд. 16.2.6)-действительно, существуют свидетельства в пользу эпигенетического происхождения. Тем не менее имеются серьезные основания думать, что большинство раковых опухолей вызваны именно генетическими изменениями (хотя эпигенетические также могут вносить свой вклад в дальнейшее развитие болезни). Говоря конкретно, это означает, что в последовательности нуклеотидов ДНК клеток данной опухоли имеется скрытая аномалия, которую нередко удается выявить. Мы уже говорили о хроническом миелогенном лейкозе, подобные примеры нам будут встречаться и в дальнейшем. Однако из сказанного вовсе не следует, что генетическое изменение - это *первый* шаг, ведущий к раку. Более правильное утверждение состоит в том, что большинство канцерогенных агентов вызывает генетические изменения, и, наоборот, аген-

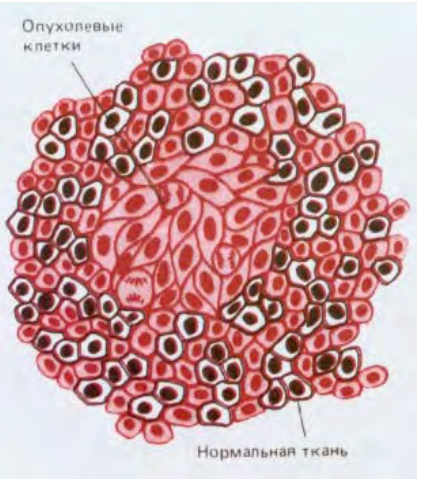


Рис. 21-5. Мозаичность инактивации Х-хромосомы свидетельствует о моноклональном возникновении рака. Вследствие вероятностного характера инактивации Х-хромосомы в раннем эмбриогенезе практически все нормальные ткани женского организма являются смесью клеток с различными инактивированными Х-хромосомами - отцовской или материнской, причем инактивация наследуется всем потомством клетки. Если протестировать клетки опухоли на экспрессию Х-сцепленного гена-маркера, то обычно у всех них оказывается инактивированной одна и та же Х-хромосома. Это сильный довод в пользу того, что все опухолевые клетки - потомки единственной клетки-«родоначальника».

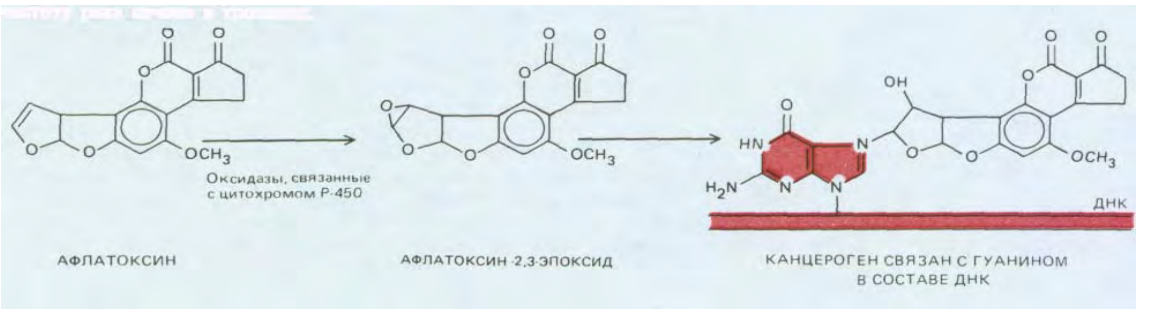


Рис. 21-6. Многие химические канцерогены могут вызывать мутации, взаимодействуя с ДНК, только после того как они активируются, т.е. подвергнутся в организме определенным метаболическим превращениям. Представленное на рисунке соединение - *афлатоксин* B1 продукт жизнедеятельности плесневого гриба *Aspergillus flavus oryzae,* который размножается на зерне и земляных орехах при хранении их во влажных теплых условиях. Это вещество считается одним из факторов, повышающих частоту рака печени в тропиках.

ты, вызывающие генетические изменения, порождают рак. Такая взаимосвязь между **канцерогенезом** и *мутагенезом* ясно прослеживается для трех классов агентов: химических канцерогенов (которые обычно вызывают локальные изменения в последовательности нуклеотидов ДНК); ионизирующих излучений (например, рентгеновского), приводящих обычно к разрывам и транслокациям хромосом; вирусов, которые внедряют в клетку чужеродную ДНК. Роль вирусов в онкологии мы рассмотрим позже, а пока остановимся на химических **канцерогенах.**

Вообще говоря, каждый конкретный случай рака нельзя целиком сводить к какой-то одной причине. Как мы увидим, рак, как правило, есть результат случайного совпадения в одной клетке нескольких независимых событий, последствия которых имеют кумулятивный эффект. На частоту этих событий весьма разнообразными способами влияет внешняя среда клетки, поэтому можно рассматривать рак как исход вероятностного процесса, на который положительно влияют комбинации внешних факторов (см. разд. 21.1.6). Тем не менее бывают такие канцерогенные воздействия, которые увеличивают вероятность критических событий до того, что они становятся практически неизбежными: по крайней мере одна клетка в организме становится раковой. Хрестоматийным примером такого рода стал 2-нафтиламин, который использовался в химической промышленности в начале этого века: на одной английской фабрике у всех рабочих, занятых его перегонкой (и тем самым подвергавшихся длительному воздействию высоких доз), со временем развился рак мочевого пузыря.

Канцерогенными оказываются совершенно различные химические вещества, если их скармливать экспериментальным животным или многократно наносить им на кожу. Некоторые из них действуют на клетки-мишени в своей исходной форме, но многим для этого необходимо превратиться в более активную форму - чаще всего это происходит под действием внутриклеточной системы ферментов, известных как цитохром-Р-450-оксидазы. Эти ферменты в норме превращают попадающие в организм яды и жирорастворимые ксенобиотики в безвредные и легко экскретируемые соединения. Однако окисление этой системой определенных веществ приводит к образованию продуктов, являющихся прямыми канцерогенами (рис. 21-6). Хотя известные на сегодняшний день химические канцерогены весьма разнообразны, большинство из них имеет по крайней мере одно общее свойство - способность вызывать мутации. Мутагенность может быть продемонстрирована различными методами; один из наиболее общепринятых - это *тест Эймса,* при проведении которого канцероген смешивается с экстрактом клеток печени крысы (играющим активирующую роль) и добавляется к культуре, специально подобранных («тестирующих») бактерий. Частота мутаций в такой бактериальной культуре является мерой мутагенности исследуемого вещества (рис. 21-7). Большинство соединений, обнаружи-

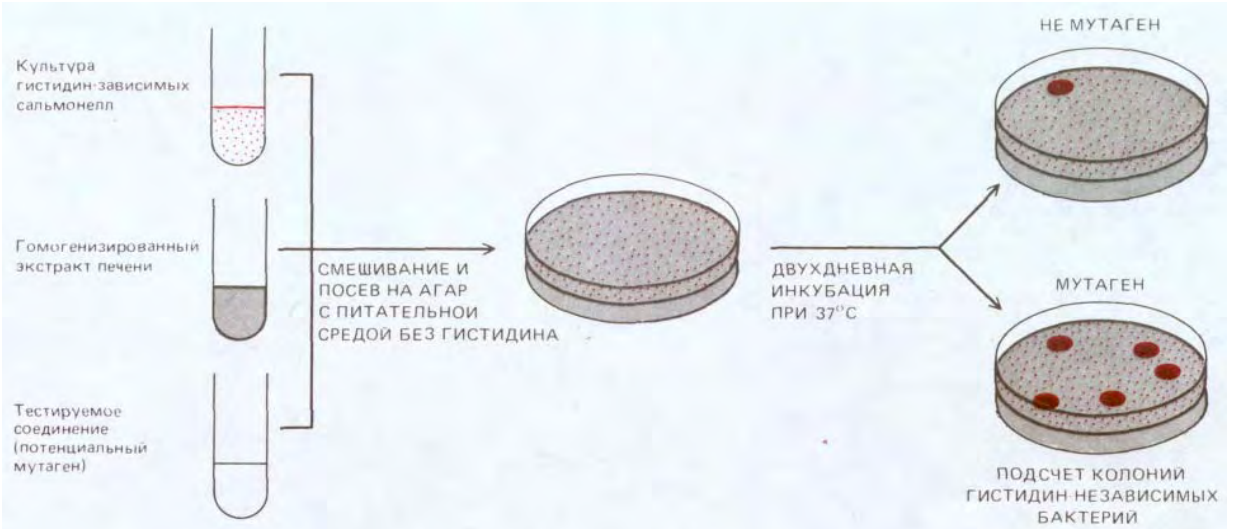


Рис. 21-7. Тест Эймса на мутагенность. В нем используется определенный штамм бактерий рода *Salmonella,* дефектный по синтезу гистидина (his^-), и, следовательно, нуждающийся для роста в этой аминокислоте. Если испытываемое вещество обладает мутагенным эффектом, ген his^- может под действием этого соединения ревертировать к дикому типу. Образовавшиеся при этом бактерии-ревертанты способны расти на среде без гистидина. Для увеличения чувствительности теста в геном тестерного штамма введена мутация по системе репарации, что делает эти бактерии особенно восприимчивыми к действию повреждающих ДНК агентов. Большинство соединений, демонстрирующих мутагенность в этом тесте, являются канцерогенными, и наоборот канцерогенам, как правило, свойственна высокая мутагенность.

вающих мутагенность в этом тесте, способны также вызывать мутации и (или) хромосомные аберрации в клетках млекопитающих, а их химическая структура позволяет предположить, что они вступают в химические реакции с ДНК. Сопоставление данных о мутагенности, полученных различными методами, с данными о канцерогенности, полученными в исследованиях по индукции рака in vivo, обнаружило, что большинство известных канцерогенов являются мутагенами и, наоборот, большинство мутагенов обладает канцерогенным действием.

Существует, тем не менее, важная, хотя и относительно небольшая, группа канцерогенов, которые не являются мутагенами. Ниже мы обсудим (разд. 21.1.7), каким образом немутагенные вещества могут способствовать развитию рака, влияя на поведение уже существующих мутантных клеток. Однако сначала надо рассмотреть вопрос о том, с какой частотой такие мутантные клетки возникают при нормальном развитии организма.

21.1.4. Для возникновения рака недостаточно единичной мутации [1,5]

Число клеточных делений у человека в течение жизни можно оценить величиной порядка 10^{16}, а у мыши, которая состоит из меньшего числа клеток и имеет меньшую продолжительность жизни, соответствующая величина составляет около 10^{12}. Даже если в окружающей среде отсутствуют мутагены, мутации происходят спонтанно, со скоростью примерно 10^{-6} мутаций на ген в течение клеточного цикла (эта величина определяется основными ограничениями, наложенными на процессы репликации и репарации ДНК, см. разд. 5.3.2). Таким образом, на протяжении жизни человека каждый его отдельный ген может претерпеть около 10 млрд. различных мутаций; у мыши это число может достигать одного миллиона. Можно ожидать, что среди возникших мутантных клеток будет немало таких, у которых произошли изменения в генах, регулирующих клеточное деление и которые, следовательно, могут не подчиняться ограничениям, наложенным в норме на пролиферацию клеток. С этой точки зрения проблема рака состоит не в том, почему он вообще возникает, а почему он возникает так редко.

Очевидно, что млекопитающие должны обладать механизмами страховки - двойной или даже более мощной - защищающей нас от опасности быть порабощенными мутантными клонами клеток, имеющими

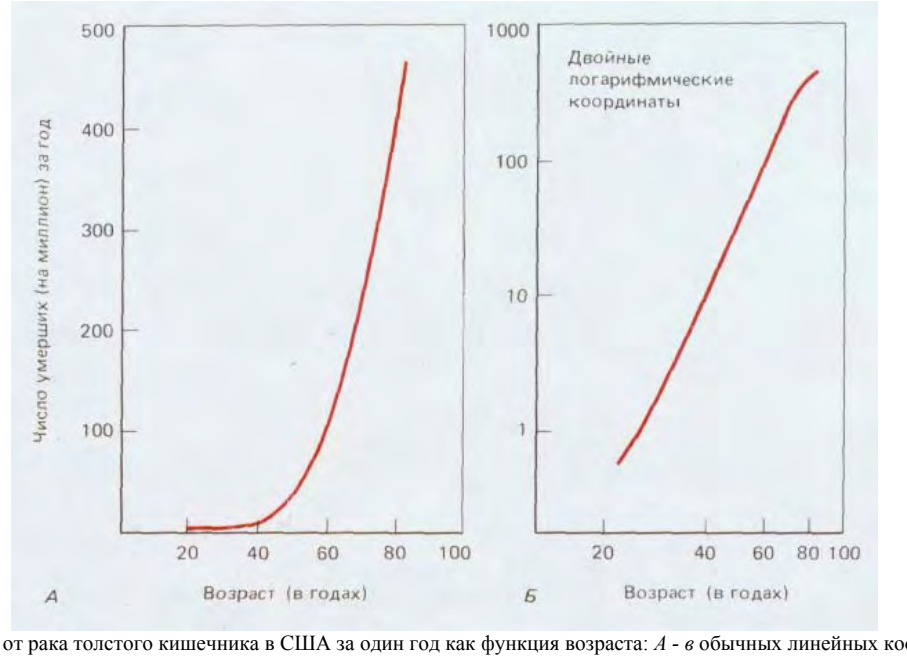


Рис. 21-8. Смертность от рака толстого кишечника в США за один год как функция возраста: *А - в* обычных линейных координатах; *Б - те* же данные в двойных логарифмических координатах. Заболеваемость раком стремительно увеличивается с возрастом (наклон графика на рис. *Б* составляет около 5). По-видимому, для превращения нормальной клетки в раковую в ней должно произойти несколько независимых случайных событий. (U. S. Department of Health, Education and Welfare; Vital Statistics of the United States, Vol. II: Mortality. Washington, D. C.: U. S. Government Printing Office, 1968.)

определенное преимущество над нашими нормальными здоровыми клетками. Действительно, если одной мутации в каком-то гене было бы достаточно, чтобы здоровая клетка стала раковой, мы бы не были жизнеспособными организмами. Существует множество указаний на то, что для возникновения рака необходимо совпадение некоторых событий в одной клетке, происходящих независимо друг от друга и весьма редко. Одно их них получено при эпидемиологических исследованиях частоты раковых заболеваний в зависимости от возраста. Для большинства видов рака заболеваемость резко увеличивается с возрастом и обычно равна третьей, четвертой, а то и пятой степени последнего (рис. 21-8), тогда как если бы для возникновения рака было бы достаточно одной мутации (с постоянной вероятностью), зависимости от возраста не было бы вообще. Эпидемиологическая статистика позволила рассчитать, что в среднем для превращения нормальной клетки в опухолевую требуется от трех до семи независимых случайных событий, каждое из которых имеет низкую вероятность. Число таких событий меньше при лейкозах и больше при солидных раковых опухолях.

Теперь, когда идентифицированы многие конкретные мутации, ответственные за развитие рака, появилась возможность изучать эффекты таких мутантных генов на трансгенных мышах (см. разд. 5.6.10). Как мы увидим ниже (разд. 21.2.6), полученные на этом пути результаты представили дополнительные (и более прямые) доказательства в пользу гипотезы о том, что для возникновения рака единичной мутации недостаточно. Эту гипотезу подтверждают и многочисленные более ранние исследования феномена **опухолевой прогрессии - процесса,** в ходе которого первоначальное малозаметное нарушение клеточного поведения постепенно перерастает в «полноценный» рак. Эти исследования позволили проникнуть в природу множественных изменений, которые необходимы для превращения нормальной клетки в опухолевую, а также обнаружить факторы, вызывающие эти изменения.

21.1.5. Опухоли медленно развиваются из слабо измененных клеток [1, 5, 6]

Если мы рассмотрим связь между внешней причиной (для тех случаев, где внешняя причина очевидна), вызвавшей рак, и началом интенсивного



Рис. 21-9. Продолжительность скрытого периода развития рака мочевого пузыря в группе из 78 мужчин, контактировавших с канцерогеном 2-нафтиламином; подгруппы образованы в соответствии с длительностью контакта. (F. Cairns, Cancer: Science and Society. San Francisco: Freeman, 1978; с изменениями. По M. H. C. Williams, in Cancer, Vol. III (R. W. Raven, ed.), London: Butter-field, 1958.)

развития болезни, то увидим, что почти всегда они разделены длительным латентным периодом: частота возникновения рака легкого резко возрастает лишь после 10-20 лет курения; частота возникновения лейкоза в Хиросиме и Нагасаки оставалась низкой в первые 5 лет после атомной бомбардировки и достигла пика лишь по истечении 8 лет; у промышленных рабочих, некоторое время имевших дело с химическими канцерогенами, редко выявляется рак соответствующей этиологии прежде, чем пройдет 10-20, а то и более лет после контакта, и т.д. (рис. 21-9). В течение этого длительного инкубационного периода будущие опухолевые клетки претерпевают ряд последовательных изменений. Ярким примером может служить все тот же хронический миелогенный лейкоз. Это заболевание начинается с увеличения количества лейкоцитов, которое не является смертельным и тянется несколько лет, пока не превращается в гораздо более быстро прогрессирующую болезнь, обычно за несколько месяцев приводящую к смерти больного. В начальной хронической фазе лейкозные клетки отличаются от нормальных только наличием хромосомной транслокации (см. разд. 21.1.2). В следующей за ней острой фазе болезни система кроветворения переполнена клетками, у которых помимо указанной хромосомной аномалии, обнаруживаются и некоторые другие. Видимо, клетки первоначального клона, претерпевшие дополнительные мутации, заставляющие их размножаться быстрее (или совершать большее число клеточных делений до терминальной дифференцировки), начинают «обгонять» как нормальные кроветворные клетки, так и своих сестер, несущих только первичный дефект. Полагают, что карциномы и другие солидные опухоли развиваются аналогичным образом. Хотя большинство из них у человека не диагнос-



Рис. 21-10. Стадии развития эпителиомы шейки матки. При дисплазии поверхностный слой клеток еще несет определенные черты дифференцированности, однако она неполная, а делящиеся клетки обнаруживаются аномально далеко от базального слоя. В случае *карциномы in situ* клетки всех слоев делятся и фенотипически недифференцированы. Истинная злокачественность проявляется, когда клетки проникают сквозь базальную мембрану и начинают внедряться в подлежащую соединительную ткань. От первых признаков дисплазии до формирования «полноценной» злокачественной опухоли может пройти несколько лет.

тируются вплоть до относительно поздних стадий, в некоторых случаях можно наблюдать и ранние этапы развития болезни. Типичный пример - рак *шейки матки.* Опухоли шейки матки происходят из многослойного эпителия, по организации сходного с кожным эпидермисом (см. разд. 17.4.2). В норме размножаются лишь клетки базального слоя, при этом новые клетки постепенно перемещаются к поверхности эпителия, дифференцируясь в уплощенные, богатые кератином, неделящиеся клетки, которые, достигнув наружного слоя, в конце концов слущиваются (рис. 21-10, *А).* Однако если проанализировать достаточное число образцов такого эпителия, взятых от разных женщин, выяснится, что в них нередки очаги **дисплазии,** в которых делящиеся клетки обнаруживаются за пределами базального слоя и, следовательно, процесс их дифференцировки как-то нарушен (рис. 21-10, *Б).* Клетки слущиваются с поверхности эпителия, находясь на аномально ранних стадиях дифференцировки, и поэтому дисплазию можно обнаружить, сделав соскоб эпителия и исследовав его под микроскопом (рис. 21-11). Обычно такие участки дисплазии не причиняют вреда и даже самопроизвольно регрессируют, но иногда они способны прогрессировать, давая, спустя несколько лет, очаги так называемого рака in situ (рис. 21-10, В). При этой более опасной ситуации обычный характер деления и дифференцировки клеток нарушен гораздо сильнее - уже все слои эпителия состоят из делящихся (пролиферирующих) недифференцированных клеток, часто весьма различных по величине и кариотипу. Тем не менее дефектные клетки пока еще находятся по одну сторону базальной мембраны - на стороне эпителия. На этой стадии заболевания можно достичь полного излечения - достаточно разрушить или удалить хирургически измененную ткань. Без такого лечения патологически измененный участок может оставаться безвредным и даже регрессировать, но в 20-30% случаев происходит его дальнейшее развитие (обычно также в течение нескольких лет), приводящее к формированию истинного рака шейки матки (рис. 21-10, *Г).* Опухолевые клетки при этом нарушают целостность эпителия, проникая сквозь базальную мембрану и внедряются в подлежащую соединительную ткань. С этого момента эффективность хирургического лечения прогрессивно падает по мере распространения инвазивного роста.

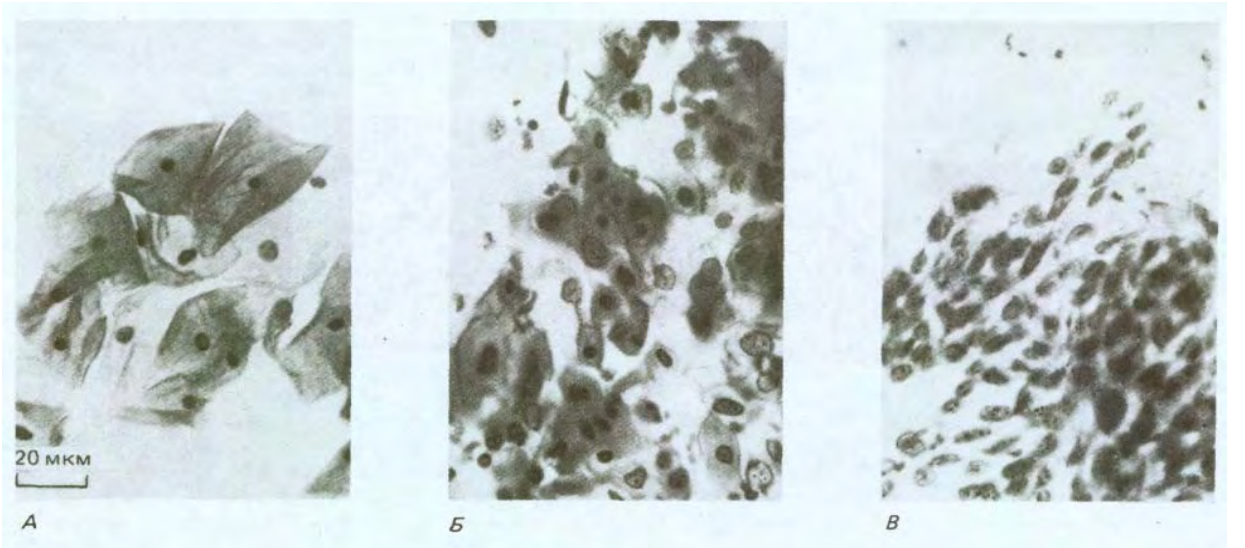


Рис. 21-11. Фотография клеток из соскоба поверхности шейки матки (методика Папаниколау или "Pap smear"). *А.* Норма: клетки крупные и хорошо дифференцированные с сильно уплотненными ядрами. *Б.* Дисплазия: клетки находятся на разных стадиях дифференцировки, попадаются совершенно незрелые. *В.* Инвазивная карцинома; все видимые клетки недифференцированы, с небольшой цитоплазмой и относительно большим ядром; в дебрисе на заднем плане видны клетки крови, разрушившиеся в изъязвленных карциномой местах. (С любезного разрешения E. Miller.)

21.1.6. Развитие опухоли включает последовательные циклы мутаций и естественного отбора [6, 7]

В предыдущем разделе мы рассмотрели два весьма различных примера, которые иллюстрируют данное положение: в общем виде развитие рака можно описать как процесс, в ходе которого первоначальная популяция незначительно измененных клеток, потомков единственной мутантной клетки-предшественницы, движется «от плохого к худшему», проходя через последовательные циклы мутаций и естественного отбора. Элемент случайности в этой эволюции очень велик, поэтому обычно она охватывает многие годы; большинство людей умирает от других заболеваний до того, как у них успевает развиться рак. Для понимания причин его возникновения необходимо выяснить факторы, которые могут ускорить этот процесс.

Вообще говоря, скорость эволюции - имеем ли мы дело с популяцией клеток, «пытающихся вести себя» как раковые в организме, или с популяцией организмов, адаптирующихся к новой среде обитания, должна зависеть от четырех основных показателей: 1) *скорости* мутирования, или *частоты возникновения мутаций* (вероятность того, что каждый член популяции претерпит генетическое изменение); 2) *численности популяции;* 3) *скорости размножения* (среднее число поколений потомства в единицу времени); 4) *селективного преимущества* мутантной особи, которое оценивается как отношение числа выживших плодовитых потомков, произведенных ею за единицу времени, к такому же показателю у немутантной особи. Селективное преимущество зависит как от природы самой мутации, так и от условий внешней среды. Ситуация может усложняться при наличии наследственных эпигенетических изменений.

Справедливость этих эволюционных принципов хорошо иллюстрируется результатами исследований экспериментального рака у животных. При знакомстве с данными, полученными в этих исследованиях, создается впечатление невероятного разнообразия факторов, влияющих на заболеваемость раком человека - от курения (в случае рака легкого) до возраста, в котором женщина впервые рожает (для рака молочной железы). Совершенно ясно, по крайней мере, что скорость мутирования на клетку - не единственная существенная переменная, определяющая развитие рака.

21.1.7. Развитию рака могут способствовать факторы, не изменяющие последовательность нуклеотидов в ДНК клетки [6, 8]

Стадии, через которые проходит поврежденная клетка прежде, чем превратиться в раковую, проще всего наблюдать в коже. У мышей рак кожи можно вызвать экспериментально, смазывая ее химическим канцерогеном бензпиреном (одним из компонентов угольной смолы и табачного дыма) или родственным ему соединением диметилбензоантраценом (ДМБА). Однократный контакт с канцерогеном сам по себе к возникновению опухоли обычно не приводит (как и к какому-нибудь другому очевидному продолжительному нарушению). И все же он вызывает скрытое генетическое повреждение, которое проявляется резким увеличением частоты возникновения опухолей при повторном контакте с тем же канцерогеном или при воздействии других агентов совершенно иной природы. Про канцероген в подобной ситуации говорят, что он действует как **опухолевый инициатор.** Всего лишь простое повреждение кожи, однажды подвергшейся воздействию такого инициатора, может вызвать рак (почти наверняка он будет развиваться из

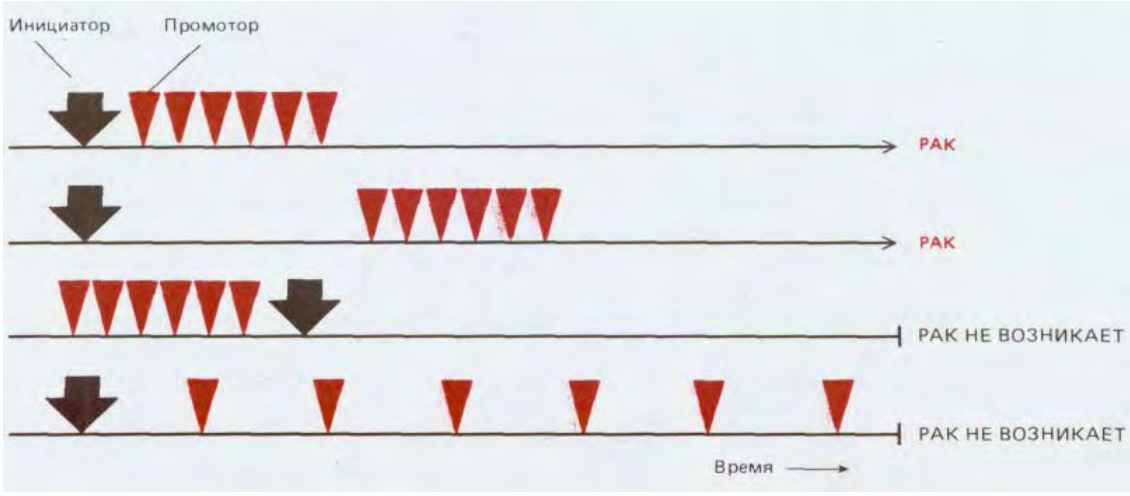


Рис. 21-12. Возникновение опухоли в результате совместного действия опухолевого инициатора (мутагена) и опухолевого промотора (немутагена). Болезнь развивается только в том случае, когда контакт с инициатором предшествует действию промотора, а также если интенсивность воздействия промотора превышает определенный порог. Развитие опухоли имеет место и при многократном воздействии одного инициатора.

клеток, расположенных по краю раны). В то же время многократный контакт в течение месяцев с веществами, именуемыми **опухолевыми промоторами** (которые сами по себе не обладают мутагенным действием), может индуцировать опухолевый рост избирательно в участках кожи, контактировавших с опухолевым инициатором. Из опухолевых промоторов наиболее изучены *форболовые эфиры,* как, например, тетрадеканоил-форбол-ацетат (ТФА), о которых уже шла речь по другому поводу, как об искусственных активаторах протеинкиназы С (и тем самым как об агентах, активирующих часть фосфатидил-инозитольного внутриклеточного сигнального пути (см. разд. 12.3.10). Эти вещества вызывают рак с высокой частотой только *после* предварительного воздействия мутагенного инициатора (рис. 21-12).

Скрытые повреждения, вызываемые опухолевым инициатором, как и генетические повреждения, необратимы, и поэтому могут обнаруживать себя при воздействии опухолевого промотора даже спустя большой промежуток времени. Немедленный первичный эффект промотора, по-видимому, заключается в том, что он стимулирует деление клеток (или задерживает клетки, которые должны были окончательно дифференцироваться, в состоянии продолжающегося деления). В местах воздействия инициатора начинается рост многочисленных мелких доброкачественных бородавкоподобных опухолей, называемых *папилломами.* Чем больше исходная доза инициатора, тем больше образуется папиллом. Считается, что каждая папиллома, по крайней мере при низких дозах опухолевого инициатора, является одним клоном клеток - потомством мутантной клетки, возникшего под действием инициатора. Опухолевый промотор и механическое повреждение могут индуцировать экспрессию некоторых генов «социального контроля», влияющих прямо или опосредованно, на клеточную пролиферацию (см. разд. 13.4). В спокойном эпителии такие гены могут «молчать», и потому любые мутации, возникшие в них в результате действия инициатора, остаются скрытыми; однако индукция их экспрессии опухолевым промотором или факторами, образующимися при повреждении, ведет к проявлению этих мутаций и, как следствие, изменению пролиферации клеток (рис. 21-13).

Типичная папиллома может содержать примерно 10^5 клеток, что более чем в тысячу раз превышает число клеток в нормальной «эпидермальной пролиферативной единице» (см. разд. 17.4.2). Если опухолевый промотор удалить, то практически все папилломы исчезают, и кожа вновь приобретает почти нормальный вид - что соответствует гипотезе, изображенной на рис. 21-13. Однако в некоторых папилломах происхо-



Рис. 21-13. Возможный механизм действия опухолевых промоторов. Согласно другой гипотезе, мутантный ген может экспрессироваться постоянно, но не давать никакого эффекта, пока промотор не активирует дополнительные гены, необходимые для пролиферации клетки.

дят дальнейшие изменения, и они приобретают способность неконтролируемого роста даже после удаления промотора. Эти изменения, судя по всему, возникают в единичных клетках папиллом с частотой, аналогичной таковой для самопроизвольных мутаций. Это путь превращения малой части всех папиллом в раковые опухоли. Таким образом, опухолевый промотор способствует развитию рака (по крайней мере, в рассматриваемой системе), увеличивая популяцию клеток, несущих первичную мутацию: чем больше будет таких клеток, тем больше вероятность, что хотя бы одна из них мутирует еще раз в направлении, приближающем ее к злокачественности. И даже если опухоли «естественного» происхождения не обязательно возникают в точном соответствии с описанной схемой - т. е. проходят через раздельные и последовательные стадии инициации и промоции, их развитие подчиняется аналогичным закономерностям. Они также будут развиваться со скоростью, зависящей как от частоты мутаций, так и от факторов, влияющих на выживаемость, размножение и распространение определенных типов мутантных клеток, если таковые возникнут.

21.1.8. Большинство раковых заболеваний вызвано такими комбинациями внешних воздействий, которых можно избежать [9]

Развитие рака - процесс многостадийный. На течение каждой стадии влияет множество факторов; некоторые из них зависят от генетической конструкции индивидуума, другие - от условий и образа жизни. Поэтому меняя окружающую среду и/или свои привычки, мы, в принципе, сможем значительно уменьшить шанс возникновения практически любой формы рака. Наиболее яркое тому свидетельство - сравнительная заболеваемость раком в разных странах. Практически для любого вида рака, обычного и весьма распространенного в какой-нибудь определенной стране, найдется другое государство, в котором частота этого вида рака будет в несколько раз ниже (табл. 21-2). При этом заболеваемость раком в популяциях иммигрантов имеет тенденцию к сближению с таковой в популяции аборигенов, что говорит о ведущей роли внешних, а не генетических факторов. На основании этих данных было вычислено, что 80-90% случаев заболевания раком может быть предотвращено. К сожалению, различные раковые заболевания имеют различные внешние факторы риска, и страна, которой удалось свести к минимуму какой-нибудь один из них, не имеет преимущества перед другими в отношении всех остальных факторов. По этой причине общая онкологическая статистика (по всем видам онкологических заболеваний) обнаруживает сходную картину заболеваемости лиц одного возраста во всех странах. Вместе с тем есть группы населения, воздержанный образ жизни которых, видимо, привел к снижению смертности от рака. Так, среди ортодоксальных мормонов в штате Юта, она вдвое ниже, чем в целом по США.

Таблица 21-2. Различия между странами в заболеваемости наиболее обычными видами рака

Локализация первичной опухоли	Регион с высокой заболеваемостью	Суммарная заболеваемость в данном районе, %	Регион с низкой заболеваемостью	Отношение высокой заболеваемости к низкой
Кожа	Австралия (Квинсленд)	20	Индия (Бомбей)	>200
Пищевод	Иран	20	Нигерия	300
Легкие	Англия	11	Нигерия	35
Желудок	Япония	11	Уганда	25
Шейка матки	Колумбия	10	Израиль (евреи)	15
Простата	США (черные)	9	Япония	40
Печень	Мозамбик	8	Англия	100
Молочная железа	Канада	7	Израиль (не евреи)	7
Ободочная кишка	США (Коннектикут)	3	Нигерия	10
Матка	США (Калифорния)	3	Япония	30
Ротовая полость	Индия (Бомбей)	2	Дания	25
Прямая кишка	Дания	2	Нигерия	20
Мочевой пузырь	США (Коннектикут)	2	Япония	6
Яичники	Дания	2	Япония	6
Носоглотка	Сингапур (китайцы)	2	Англия	40
Поджелудочная железа	Новая Зеландия(маори)	2	Индия (Бомбей)	8
Гортань	Бразилия (Сан-Паулу)	2	Япония	10
Глотка	Индия (Бомбей)	2	Дания	20
Пенис	Некоторые районы Уганды	1	Израиль (евреи)	300

Данные по раку шейки матки, молочной железы, матки и яичников - для женщин, остальные - для мужчин. Суммарная заболеваемость определяется как процент людей, у которых рак развился до 75-летнего возраста (в отсутствие других причин смерти): отношение заболеваемостей рассчитано для возрастной группы от 35 до 64 лет. (С небольшими изменениями из: R. Doll and R. Peto, The Causes of Cancer. New York: Oxford University Press, 1981.)

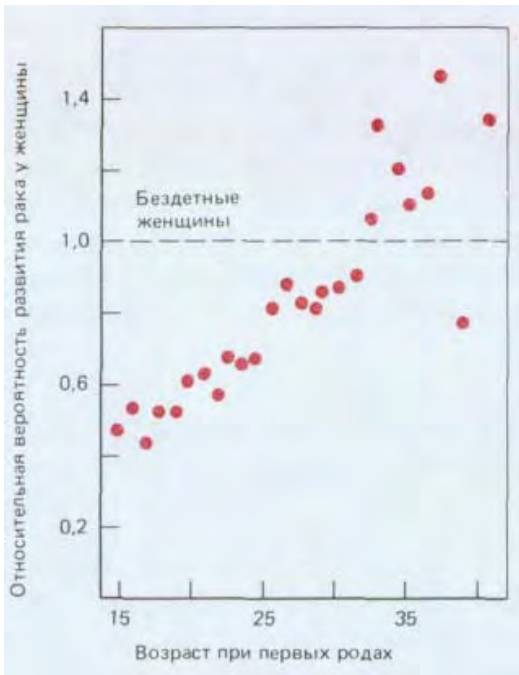


Рис. 21-14. Вероятность возникновения рака молочной железы у женщины в зависимости от возраста ее первых родов. Чем больше возраст, в котором женщина впервые рожает, тем выше вероятность рака молочной железы. По-видимому, определенная комбинация половых гормонов может способствовать развитию опухоли. Согласно данным лабораторных исследований, первая полноценная беременность может приводить к устойчивому эпигенетическому изменению в клетках молочной железы, определяя их последующие ответы на гормоны. Вероятность возникновения рака молочной железы коррелирует и с другими факторами, например, с количеством потребляемых жиров. (F. Cairns, Cancer: Science and Society. San Francisco: Freeman, 1978. По B. MacMahon, P. Cole, F. Brown, F. Natl. Cancer Inst., **50,** 21 42, 1973.)

Хотя эти эпидемиологические наблюдения и свидетельствуют о том, что заболевания раком можно избежать, задача идентификации конкретных факторов риска и механизмов их действия остается трудной. Некоторые из этих факторов - явные мутагенные опухолевые инициаторы, непосредственно вызывающие генетические изменения; другие преимущественно служат опухолевыми промоторами, увеличивая популяцию клеток, способных вызвать рак при дальнейших мутациях. Канцерогены, содержащиеся в табачном дыме, как и афлатоксин (см. рис. 21-6), относятся главным образом к первой категории; ко второй можно отнести, например, женские половые гормоны (рис. 21-14).

Возможно, некоторые факторы действуют посредством других механизмов, отличных от обоих описанных выше, - например, вызывая наследуемые эпигенетические изменения. Разумеется, для того, чтобы идентифицировать некий канцерогенный фактор и избежать его воздействия, совсем не обязательно понимать, как он действует; в этом отношении эпидемиология рака уже достигла больших успехов и являет-

ся многообещающей областью исследований. Только лишь выяснение роли курения в развитии рака легких открыло путь к уменьшению общей смертности от рака в Северной Америке и Европе на 30%. Профилактика рака не только представляется более привлекательной, чем лечение, но и, учитывая нынешний уровень наших знаний, оказывается гораздо эффективнее (и вдобавок обходится значительно дешевле).

21.1.9. Поиск способов лечения рака труден, но не безнадежен [10]

Лечить раковые заболевания столь же трудно, как и избавиться от сорняков в поле. Опухолевые клетки можно удалять хирургически, разрушать с помощью лекарственной и лучевой терапии, но очень трудно уничтожить каждую опухолевую клетку, т. е. ликвидировать их все без исключения. При хирургическом вмешательстве редко удается выявить все имеющиеся метастазы, а химические средства, убивающие раковые клетки, как правило, токсичны и для нормальных. Даже если в организме останется лишь несколько опухолевых клеток, они способны размножиться, и тогда болезнь возродится. Кроме того, раковые клетки могут приобретать устойчивость к тем веществам, которые используются для борьбы с ними, чего нельзя сказать о нормальных клетках. И все же ситуация не является безнадежной. Несмотря на трудности, были разработаны эффективные способы лечения некоторых видов рака (с использованием противоопухолевых препаратов, применяемых самостоятельно или в комбинации с другими средствами), прежде дававших высокий процент смертности (среди них лимфома Ходжкина, рак яичек, хорионкарцинома, а также некоторые виды лейкозов и других злокачественных новообразований, частых в детском возрасте). Современные противоопухолевые препараты, хирургическое вмешательство и местная лучевая терапия позволяют вернуть к нормальной жизни большую часть пациентов в том случае, если болезнь была обнаружена на достаточно ранней стадии. Даже тогда, когда у нас нет возможности вылечить больного, есть способы продлить его жизнь или хотя бы облегчить страдания.

Основная задача клинических исследований рака заключена в проблеме избирательного уничтожения опухолевых клеток. Современные методы лечения опираются, главным образом, на относительно слабые различия в скорости размножения, метаболизме и радиочувствительности нормальных и опухолевых клеток и имеют нежелательные побочные токсические эффекты. Несколько типов раковых клеток особенно уязвимы для избирательных воздействий, так как являются гормонозависимыми или несут на своей поверхности атипичные химические структуры, которые могут распознаваться антителами. Однако в целом решение широко обсуждаемой проблемы избирательной противоопухолевой терапии продвигается медленно, путем предположений, проб и ошибок наряду с рациональным расчетом.

Для поиска оптимальных путей «обуздания» размножения и распространения опухолевых клеток важно более подробно изучить и понять принципы этих процессов (или основные механизмы).

21.1.10. Опухолевый рост часто связан с нарушением клеточной дифференцировки [11]

До сих пор мы делали акцент на утверждении, что деление опухолевых клеток не подчиняется нормальному контролю - это их главная черта. Но многие ткани устроены таким образом, что даже неконтролируемое

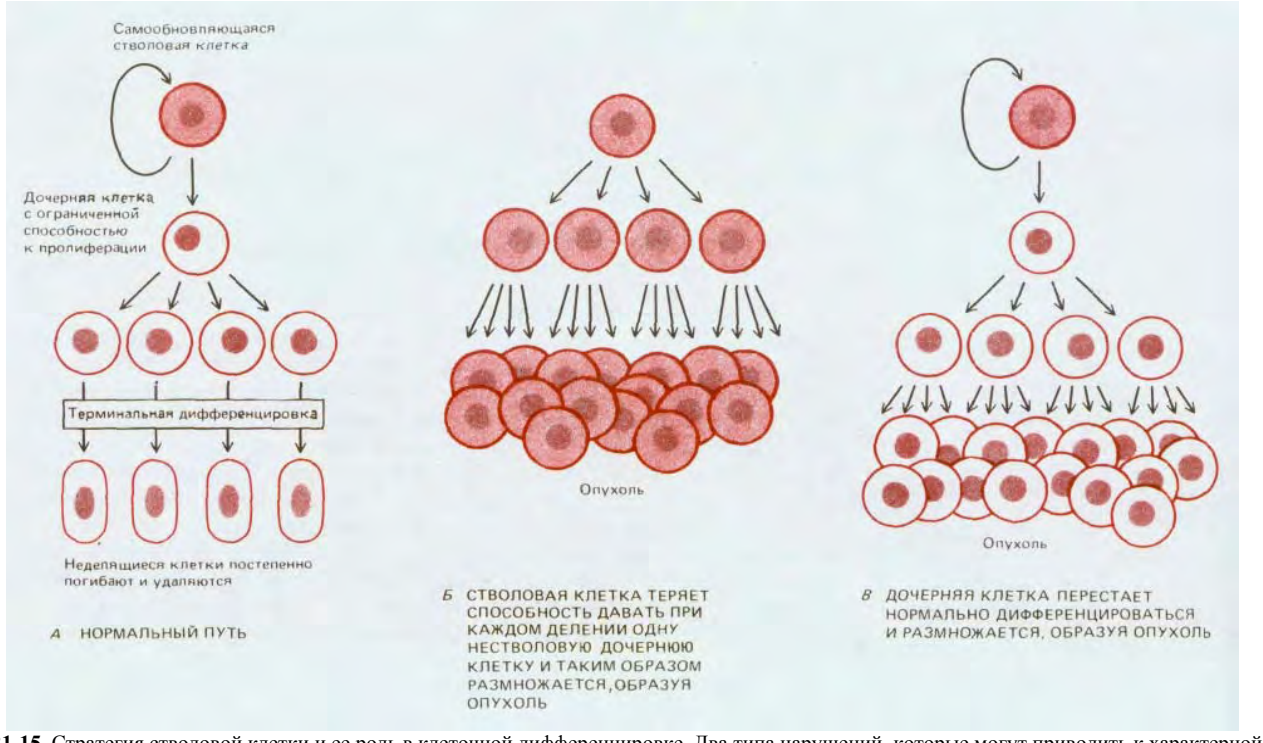


Рис. 21-15. Стратегия стволовой клетки и ее роль в клеточной дифференцировке. Два типа нарушений, которые могут приводить к характерной для рака неудержимой пролиферации. Следует отметить, что повышенная скорость деления стволовой клетки сама по себе не приводит к такому эффекту.

увеличение частоты клеточного деления не приводит само по себе к устойчиво растущей опухоли. Это положение можно проиллюстрировать рассмотренным выше (разд. 21.1.5) примером рака шейки матки. Подобно кожному эпидермису и многим другим видам эпителия, эпителий шейки матки в норме непрерывно самообновляется - дифференцированные клетки слущиваются с его наружной поверхности и все время замещаются за счет деления стволовых клеток базального слоя (см. разд. 17.4.4). В среднем, в результате каждого нормального деления стволовой клетки образуется одна дочерняя стволовая клетка и одна клетка, которой предстоит прекращение деления и терминальная дифференцировка. Если стволовая клетка будет просто быстрее делиться, это лишь увеличит скорость обновления эпителия: дифференцированные клетки будут быстрее образовываться и быстрее слущиваться, т.е. клеточный баланс ткани будет сохранен. Между тем в ситуации, когда трансформированная клетка производит постоянно растущее потомство, должно обнаруживаться нарушение этого баланса: либо стволовыми остаются более половины дочерних клеток, либо процесс дифференцировки изменен так, что дочерние дифференцирующиеся клетки сохраняют способность к неограниченному делению, избегая своей обычной участи в конце «жизненного пути» - слущивания (рис. 21-15).

Есть основания предполагать, что развитие подобных свойств лежит в основе перехода от умеренной дисплазии шейки матки до рака in situ и сформированной истинной злокачественной опухоли (см. рис. 21-10). Сходные предположения применимы к развитию рака и в других тканях, которые обновляются за счет стволовых клеток, таких как кожа, эпителий кишечника и кроветворная система. Например, некоторые формы лейкоза, возникают в результате нарушения нормальной программы дифференцировки, когда промежуточный предшественник какого-либо типа клеток крови продолжает неограниченно делиться вместо

того, чтобы после строго определенного числа клеточных циклов завершить дифференцировку (см. разд. 17.5.5).

В общем, мутации или эпигенетические изменения, блокирующие нормальное созревание клеток и превращение в неделящиеся дифференцированные формы, должны играть важнейшую роль в патогенезе многих злокачественных новообразований. В связи с этим есть надежда, что препараты, стимулирующие клеточную дифференцировку, могут оказаться перспективными в терапии рака как средство выбора или дополнение к цитостатикам - лекарствам, убивающим делящиеся клетки.

21.1.11. Для того чтобы формировать метастазы, опухолевые клетки должны «уметь» проникать через базальную мембрану [12]

Главное свойство опухолей, затрудняющее их лечение хирургическими методами или местной лучевой терапией, - способность давать метастазы. Чтобы распространиться по организму, клетки типичной солидной опухоли должны освободиться от механического контакта с соседними клетками, «выбраться» из ткани, в которой они возникли, «пробраться» сквозь другие ткани до кровеносного или лимфатического сосуда, проникнуть через базальную мембрану и слой эндотелиальных клеток, чтобы выйти в просвет сосуда; затем вновь «пройти» сквозь его стенку,

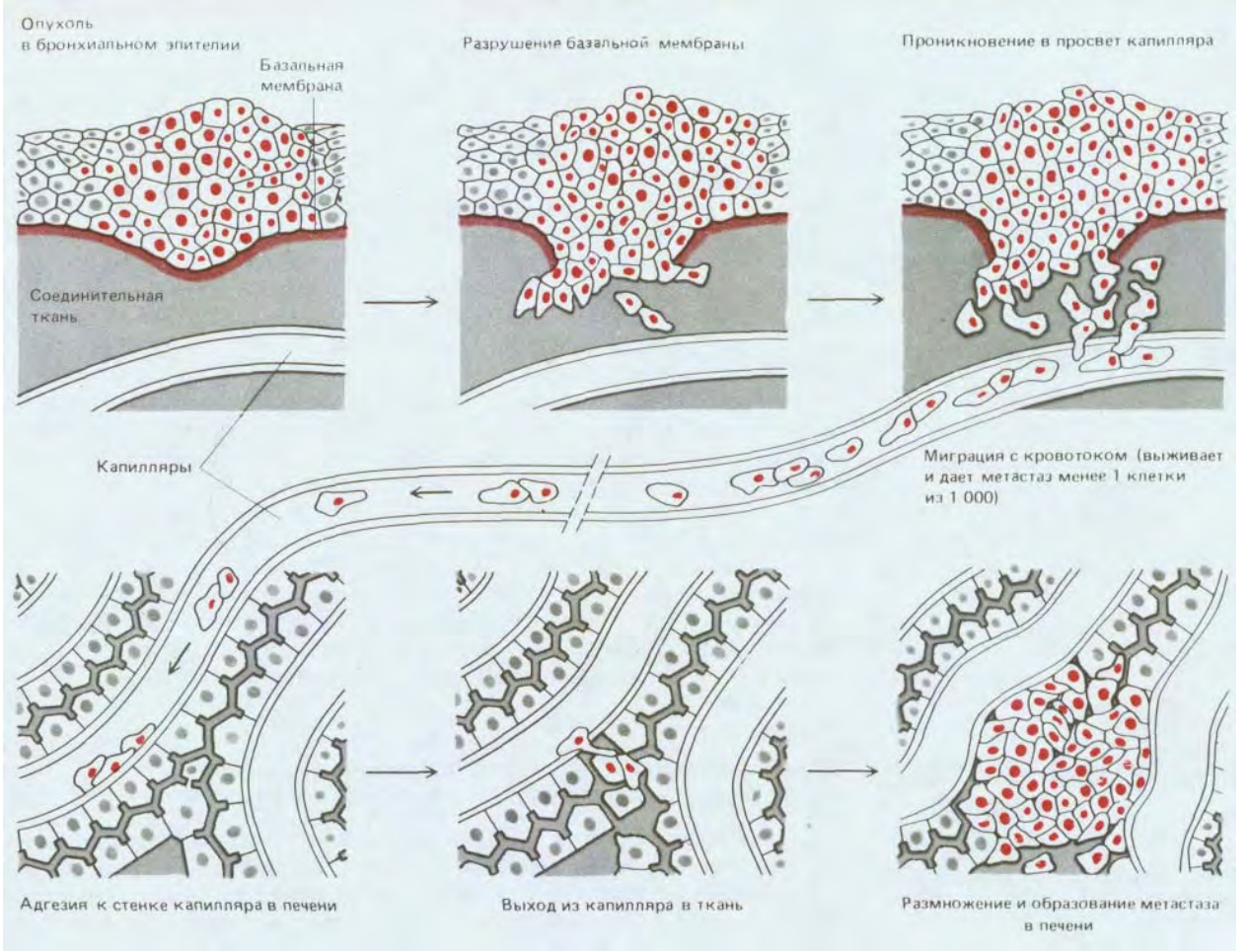


Рис. 21-16. Механизм метастазирования. Данный пример иллюстрирует распространение опухоли из легкого в печень. Опухолевые клетки могут попасть в кровяное русло сквозь стенку кровеносного сосуда, как показано на рисунке, или, что, вероятно, случается чаще, через лимфатическую систему. Лимфатические сосуды выбрасывают свое содержимое (лимфу) в кровяное русло, однако опухолевые клетки часто задерживаются в лимфатических узлах, встречающихся на их пути, давая здесь начало вторичным опухолям. Исследования на животных показали, что из опухолевых клеток, проникших в кровь, способностью образовать опухоль на новом месте обладают лишь немногие. «Успех» метастазирования зависит как от свойств ткани, в которую пытается внедриться клетка опухоли, так и от свойств самой раковой клетки.

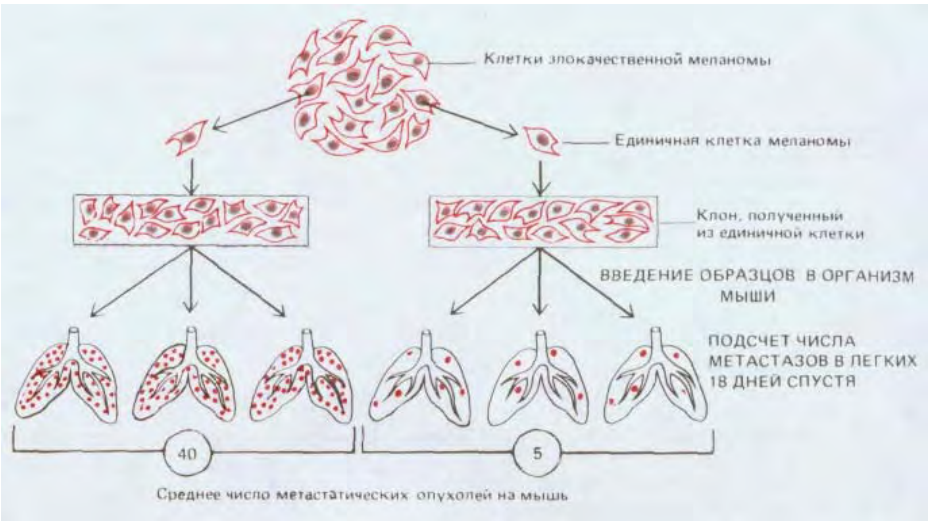


Рис. 21-17. Эксперимент, демонстрирующий наследуемые различия между клетками одной опухоли в отношении способности к метастазированию. Клетки от одной линии субклонируют, и стандартные аликвоты каждого субклона вводят в кровь мышей (тест на способность давать вторичные опухоли). Субклоны значительно отличаются между собой по числу образующихся (на одну мышь) метастазов.

но в обратном направлении и в другой области тела, выжить и размножаться в своем новом окружении (рис. 21-16). Последние этапы, видимо, наиболее трудные; многие опухоли высвобождают в сосудистое русло огромное количество клеток, но лишь ничтожная доля этих клеток оказывается способной образовывать метастазы (метастатические колонии).

Некоторые типы нормальных клеток, а именно лейкоциты, уже изначально обладают многими или даже всеми свойствами, необходимыми для диссеминирования по организму. Но для большинства опухолей появление способности давать метастазы связано, вероятно, с дополнительными мутациями или эпигенетическими изменениями. Скорее всего подобные изменения (как и другие, вовлеченные в канцерогенез) возникают случайным образом еще в исходной опухолевой популяции; и лишь те немногие клетки, которые приобрели свойства, необходимые для метастазирования, и, кроме того, оказавшиеся в подходящем для них микроокружении, способны будут дать начало вторичным опухолям. Таким образом, клетки одной опухоли являются гетерогенными по своей способности к метастазированию (рис. 21-17).

Понимание молекулярных механизмов метастазирования позволило бы разработать подходы к его предотвращению. В этом направлении достигнуты некоторые успехи. Так, было показано, что опухолевые клетки, чтобы проникнуть через базальную мембрану, должны, во-первых, нести на своей поверхности рецепторы к ламинину (см. разд. 14.2.18), при. помощи которых они прикрепляются к базальной мембране, а во-вторых, секретировать коллагеназу IV типа, чтобы разрушить мембрану (рис. 21-18). Было показано, что антитела или другие реагенты, блокирующие прикрепление к ламинину или активность коллагеназы IV типа, могут подавлять метастазирование у экспериментальных животных. Остается выяснить, будет ли такого рода обработка, останавливающая метастазирование, эффективной у больных раком.

21.1.12 Дефекты в процессах репарации, репликации и рекомбинации ДНК способствуют развитию рака [1, 13]

Мы уже отмечали, что возникновение опухолей и скорость опухолевого развития от доброкачественности к злокачественности зависят от частоты мутаций. Скорость мутирования увеличивают как мутагены, находящиеся во внешней среде, так и внутриклеточные дефекты механизмов

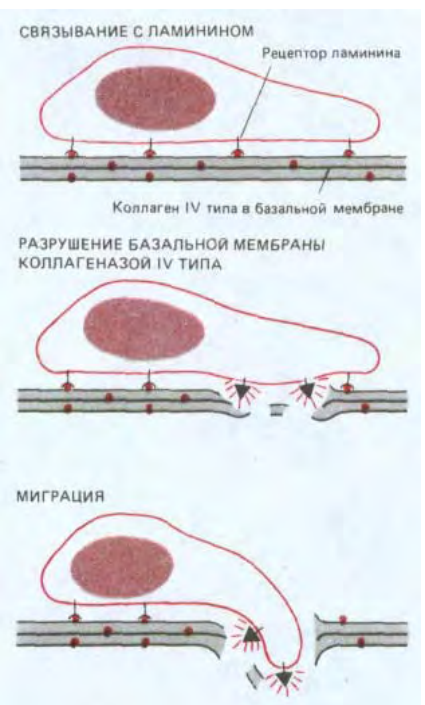


Рис. 21-18. Проникновение опухолевой клетки через базальную мембрану.

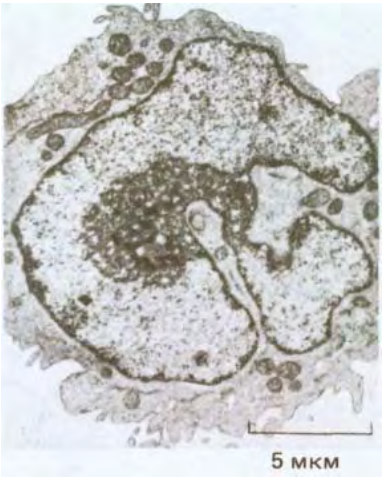


Рис. 21-19. Типичные аномалии в морфологии ядра раковой клетки (в данном случае при эритролейкозе). Ядро такой клетки необычно велико, имеет оболочку с беспорядочно расположенными складками и ядрышко, которое также аномально увеличено и характеризуется сложной структурой. (С любезного разрешения D. Friends.)

репликации, рекомбинации и репарации ДНК. Например, у людей с редким наследственным заболеванием *«пигментная ксеродерма»* обнаружен дефект в системе ферментов, необходимых для репарации повреждений ДНК, вызванных ультрафиолетовым облучением (см. разд. 5.2.8). Это приводит к тому, что даже непродолжительное пребывание на солнце может спровоцировать возникновение рака кожи. Предрасположенность к раку более общего характера наблюдается при *синдроме Блума,* когда имеется дефект фермента ДНК-лигазы, необходимой для репликации и репарации ДНК, и при *анемии Фанкони* и *атаксии-телангиэктазии,* когда существуют нарушения тех же функций, но менее охарактеризованные. При этих редких генетических расстройствах аномалия наследуется через половые клетки и поэтому присутствует во всех клетках организма. Однако сходные генетические дефекты в метаболизме ДНК могут появляться также в результате мутаций в соматических клетках, и есть основания предполагать, что такие аберрации являются общим и важным фактором в развитии многих злокачественных новообразований.

Опухолевые клетки нередко обнаруживают аномальную вариабельность формы и размеров ядер (рис. 21-19), а также числа и структуры хромосом; и на практике изменения в морфологии ядер являются для патологов одним из ключевых признаков в диагностике рака. При культивировании опухолевых клеток их кариотип часто оказывается крайне нестабильным: могут наблюдаться амплификация или делеция генов, потеря, дупликация или транслокация хромосом (или их участков) - все это регистрируется с гораздо большей частотой, чем при культивировании нормальных клеток. С одной стороны, такая вариабельность в числе и структуре хромосом может быть просто следствием ускорения клеточного цикла, возникающего в дифференцированной клетке из-за ее слабой адаптации к быстрой пролиферации. С другой стороны, это может отражать наследуемый дефект в самом механизме или регуляции процессов репарации, репликации или рекомбинации ДНК, возникающий в результате соматической мутации в любом из множества вовлеченных в эти сложные процессы генов. Такая мутация будет увеличивать вероятность всех последующих мутаций в других группах генов. Поэтому можно ожидать, что описанный механизм является общим для клеток, претерпевших множество мутаций, необходимых для превращения их в злокачественные. Предположим, к примеру, что для трансформации нормальной клетки в опухолевую необходимы три мутации в генах, контролирующих поведение клеток, и что вероятность каждой такой мутации за время жизни человека составляет 10^{-4} на клетку. Тогда вероятность того, что одна нормальная клетка успеет (даже за весь указанный промежуток времени) «накопить» эти три мутации, будет $10^{-4} \times 10^{-4} \times 10^{-4} = 10^{-12}$. Но допустим теперь, что скорость мутирования возросла из-за предшествующей мутации в каком-нибудь из ферментов системы репликации или репарации ДНК и достигла 10^{-2}/клетку за время жизни человека. Приняв вероятность этой мутации в системе репарации/репликации стандартной - 10^{-4}, мы увидим, что этот путь, который начинается с мутации, увеличивающей мутабильность, приведет к более частому возникновению раковых клеток: суммарная вероятность превращения клетки в раковую составит в течение жизни $10^{-4} \times 10^{-2} \times 10^{-2} \times 10^{-2} = 10^{-10}$. Это в 100 раз более вероятно, чем в первом случае, хотя и требует не трех, а четырех мутаций.

21.1.13. Высокая мутабильность раковых клеток способствует появлению у них устойчивости к противоопухолевым препаратам [10, 14]

Чем бы ни объяснялась высокая мутабильность раковых клеток, в большинстве опухолей они весьма гетерогенны во многих отношениях, и, кроме того, способны изменяться с пугающей скоростью под влиянием новых факторов отбора; естественно, это лишь усугубляет трудности терапии рака. Длительное лечение препаратами, избирательно токсичными для делящихся клеток, позволяет убить большинство опухолевых клеток у больного, но уничтожить их полностью удается редко - обычно какая-то малая часть их оказывается устойчивой к данному препарату (или классу препаратов). Более того, иногда прием какого-либо препарата обусловливает резистентность не только к нему, но и к другим препаратам, с которыми клетки больного никогда не контактировали.

Этот феномен **множественной лекарственной (мультилекарственной) резистентности** часто коррелирует с любопытным изменением в кариотипе: в клетках обнаруживаются дополнительные пары маленьких хромосом, так называемые *двойные минихромосомы,* или *гомогенно окрашиваемая область,* встроенная в одну из обычных хромосом и нарушающая нормальную картину ее исчерченности. Обе эти аберрации являются результатом огромной амплификации небольшого сегмента генома (см. ниже, рис. 21-26 и 21-31). При клонировании такой амплифицированной ДНК выяснилось, что в ней часто находится специфический ген, известный как ген *множественной лекарственной устойчивости (mdr* 1). Он кодирует одну из транспортных АТРаз плазматической мембраны, которая, как полагают, предотвращает внутриклеточное накопление определенных классов жирорастворимых препаратов, «откачивая» их из клетки. Амплификация других типов генов также может придавать опухолевым клеткам избирательное преимущество - при лечении антагонистом фолиевой кислоты метатрексатом часто происходит амплификация гена дигидрофолатредуктазы (ДГФР); в некоторых опухолях, как мы увидим ниже, аналогичным образом оказываются амплифицированными определенные протоонкогены, участвующие в регуляции клеточного деления (см. разд. 21.2.8).

Дефекты в процессах репликации, рекомбинации или репарации ДНК, делая опухолевые клетки эволюционно более гибкими за счет увеличения мутабильности, одновременно делают их и более уязвимыми к воздействиям определенного характера. Именно этим можно объяснить хорошо известный факт, используемый в терапии, что клетки многих опухолей гораздо легче, чем нормальные, можно убить облучением или обработкой специфическими веществами, вмешивающимися в метаболизм ДНК. Более полное изучение молекулярных механизмов репликации, репарации и рекомбинации ДНК позволит разработать тесты для выявления нарушений этих процессов в каждом конкретном случае рака. Обладая такой информацией, мы смогли бы с большим успехом уничтожать клетки-нарушители, подбирая лекарства, бьющие по их «слабым местам».

Заключение

Раковые клетки, согласно определению, не подчиняются существующему в норме контролю размножения (и потому называются неопластическими), и, кроме того, способны проникать в окружающие ткани и образовывать в них колонии - метастазы (т.е. являются злокачественными). Способность к метастазированию (образованию вторичных опухолей) затрудняет хирургическое лечение опухолей. Раковые клетки обычно

сохраняют многие черты клеток, из которых они произошли («родительских» клеток). Большинство опухолей развивается из единственной клетки, претерпевшей соматическую мутацию; но прежде, чем дать начало раковой опухоли, в потомстве этой клетки должны произойти некоторые изменения (возможно, несколько дополнительных мутаций). Этот феномен - опухолевая прогрессия, растягивающаяся обычно на годы ,- представляет собой эволюцию соматических клеток на основе мутаций и естественного отбора. Процесс может быть ускорен мутагенными агентами (опухолевыми инициаторами) и некоторыми воздействиями немутагенной природы (опухолевыми промоторами), влияющими на экспрессию генов, стимулирующими пролиферацию клеток и изменяющими «экологический баланс» между нормальными и мутантными клетками. Поскольку в развитие каждого конкретного случая рака вносит свой вкад множество факторов и поскольку действие некоторых из них, являющихся элементами внешней среды, можно устранить, оказывается в принципе возможным и предотвращение значительной части онкологических заболеваний.

Множество исследований в онкологии было посвящено поиску методов лечения, которые бы избирательно уничтожали опухолевые клетки, не затрагивая при этом их нормальных соседей. Для рационального решения этой проблемы необходимо понять, какие специфические свойства раковых клеток обеспечивают их развитие, размножение и распространение. Так, пролиферация опухолевых клеток часто сопряжена, по-видимому, с нарушением процесса дифференцировки, когда потомство стволовой клетки продолжает делиться вместо того, чтобы перейти в терминальную (неделящуюся) стадию; в принципе, пролиферацию можно подавить, подтолкнув клетки к дифференцировке. Для превращения в злокачественную опухолевая клетка должна приобрести способность проникать через базальную мембрану. Эту способность раковой клетки можно блокировать с помощью соответствующих антител, тем самым подавляя метастазирование. Мутабильность раковых клеток нередко непомерно велика; это ускоряет появление у них комплекса свойств, необходимых для проявления неопластических и злокачественных характеристик, и способствует формированию устойчивости к противоопухолевым лекарственным препаратам. С другой стороны, нарушения метаболизма ДНК, лежащие в основе такой высокой мутабильности, могут делать раковые клетки весьма чувствительными к соответствующей терапии.

21.2. Молекулярная генетика рака [15]

Поскольку рак - результат серии случайных генетических событий, вряд ли найдутся хотя бы две опухоли даже одного вида, которые были бы генетически идентичны. Несмотря на это, можно ожидать, что при любой форме рака нарушаются нормальные ограничения пролиферации клеток, и для каждого типа клеток существует определенное число возможных способов реализации подобного нарушения. Более того, некоторые элементы механизма, регулирующего клеточное деление, по-видимому, одинаковы во многих или даже во всех типах клеток, и одинаково уязвимы. Фактически основной вклад в нарушение регуляции деления клеток при раке вносит относительно небольшое число генов. Идентификация и характеристика многих из них - одно из крупнейших достижений молекулярной биологии за последнее десятилетие. Пролиферация клеток может регулироваться непосредственно - через механизм, заставляющий клетку начинать очередной цикл деления (см. разд. 13.3.2), или косвенно - например, через регуляцию вступления клетки на путь терминальной дифференцировки (см. разд 17.4.1). В обоих случаях нормальные регуляторные гены можно разделить на две катего-

рии - те, продукты которых способствуют стимуляции пролиферации клеток, и те, чьи продукты участвуют в ее торможении. Соответственно, есть два вида мутаций, ведущих к неконтролируемой пролиферации - основному свойству раковых клеток. Мутации первого типа приводят к гиперактивности «стимулирующего» гена; они доминантны (для проявления достаточно мутации в одной из двух клеточных копий такого гена), а измененный ген называется **онкогеном** (его нормальный аллель - **протоонкогеном).** Мутации второго типа приводят к инактивации «ингибирующего» гена; эти мутации рецессивны - обе клеточные копии гена должны быть инактивированы или удалены, чтобы освободить клетку от ингибирующего контроля; утерянный ген называют иногда геномсупрессором опухолевого роста, или **опухолевым супрессорным геном.** Помимо обычных мутаций существуют генетические изменения другого типа, которые также могут приводить к развитию рака - система контроля клеточного деления может быть разрушена чужеродной ДНК, которая вводится в клетку вирусом. В действительности изучение молекулярной генетики рака началось именно с открытия таких **опухолеродных вирусов,** что подготовило почву для последующего обнаружения онкогенов и протоонкогенов. Успехи в решении другой (и более трудной) задачи - идентификации и клонировании опухолевых супрессорных генов - были достигнуты сравнительно недавно (о них пойдет речь в конце этого раздела).

21.2.1. Опухоли могут вызываться как ДНК-, так и РНК-содержащими вирусами [15, 16]

И ДНК-, и РНК-содержащие вирусы (в частности, ретровирусы) могут участвовать в трансформации нормальной клетки в опухолевую. Это можно экспериментально продемонстрировать как на лабораторных животных (у которых некоторые вирусы способны вызывать рак), так и в культуре клеток, где те же вирусы изменяют поведение инфицированных клеток. Эти клетки приобретают способность к делению в условиях, при которых нормальные клетки делиться не могут (см. разд. 13.4.1, где перечислены свойства неопластически трансформированных клеток в культуре). Два интенсивно изучаемых примера таких вирусов - это *SV40* (ДНК-содержащий вирус, выделенный из клеток обезьяны) и *вирус саркомы Рауса* - куриный ретровирус. Сложнее обстоит дело с ролью вирусов в развитии рака у человека; среди множества причин, приводящих практически ко всем известным видам раковых заболеваний человека, вирусы не фигурируют. Возможно, от многих вирус-индуцированных опухолей нас защищает иммунная система, разрушающая инфицированные вирусами клетки, которые могли бы стать источником опухолей. Тем не менее сейчас имеются веские доказательства того, что причиной возникновения некоторых типов рака человека являются вирусы (табл. 21-3). Они могут оказывать либо непрямое промоторное действие, либо способствовать неопластической трансформации инфицированных клеток.

В устойчиво трансформированной вирусом клетке должно установиться равновесие, вирус не должен убивать клетку, а клетка должна сохранять вирусные гены при размножении (передавать из поколения в поколение). Обычно это осуществляется путем интеграции этих генов в одну или более клеточных хромосом. Но иногда вирусные гены существуют в клетке в виде плазмиды, реплицирующейся одновременно с хромосомами. Так, вирус SV40 и ретровирусы встраиваются в хромосомы клеток, которые они трансформируют; папилломавирусы - класс ДНК-содержащих вирусов, вызывающих у человека образование бородавок (и, вероятно, участвующих в возникновении рака шейки матки),

Таблица 21-3. Вирусы, связанные с раковыми заболеваниями у человека

Вирус	Связанные с ним опухоли	Районы с высокой заболеваемостью	Другие предполагаемые факторы риска
ДНК-содержищие вирусы			
Семейство паповавирусов			
Папилломавирус (разнообразные штаммы)	Бородавки (доброкачественные)	Повсюду	-
	рак шейки матки	Повсюду	Курение
Семейство гепаднавирусов			
Вирус гепатита В	Рак печени (гепатоклеточная карцинома)	Юго-Восточная Азия, тропическая Африка	Афлатоксин (при заражении пищи грибками), алкоголизм, курение, другие вирусы
Семейство герпесвирусов Вирус Эпштейна-Барр	Лимфома Беркитта (рак В-лимфоцитов)	Западная Африка, Папуа - Новая Гвинея Южный	Малярия
	Носоглоточный рак	Китай, Гренландия (инуиты)	Генотип гистосовместимости (?), питание соленой рыбой в детстве (?)
РНК-содержащие вирусы			
Семейство ретровирусов			
Вирус Т-лейкоза человека типа I (HTLV-I)	Т-клеточный лейкоз/лимфома у взрослых	Япония (Кюсю), Вест-Индия	-
Вирус иммунодефицита человека (HIV-1, вирус СПИДа)	Саркома Капоши (рак эпителиальных клеток кровеносных сосудов?)	Центральная Африка	Иммунная недостаточность или супрессия, заражение другим вирусом (?)
Для всех указанных вирусов число инфицированных людей гораздо больше числа заболевших раком: вирусы должны действовать в сочетании с другими факторами. Более того, вклад некоторых вирусов в возникновение рака только косвенный: вирус СПИДа, например, подавляет клеточную иммунную защиту; в результате клетки эндотелия, которые были трансформированы какими-то другими агентами, не уничтожаются иммунной системой, а образуют опухоль.			

при одних условиях существуют в виде плазмид, при других - как интегрированные элементы. В обоих случаях они «наделяют» клетку наследственно измененным геномом. Однако ДНК-содержащие вирусы и ретровирусы отличаются друг от друга по природе генов, вызывающих неопластическую трансформацию, и по тому, какое место в обычном жизненном цикле вируса занимает трансформация клетки.

21.2.2. Нарушение контроля клеточного деления ДНК-содержащими онкогенными вирусами - часть их стратегии выживания [15, 17]

Как уже сообщалось в гл. *5* (разд. 5.5.3), размножение **опухолеродных ДНК-содержащих вирусов,** таких как SV40, в естественных условиях не сопровождается развитием рака. Проникнув в клетку хозяина, SV40 обычно жестко не встраивается в клеточный геном. Вместо этого кодируемый вирусным геном белок (или группа белков) быстро активирует клеточную систему репликации ДНК, и затем вирус использует ее для репликации собственной ДНК, которая в свою очередь служит матрицей для синтеза других компонентов вируса за счет клетки хозяина. Этот процесс производства вирусных частиц клеткой продолжается до тех пор, пока она не погибнет, высвобождая множество новых вирусов. Значительно реже вирус попадает в *непригодную* для его размножения клетку, где может пребывать сколь угодно долгое время в результате устойчивого внедрения в одну или более клеточных хромосом. В этом случае вирусный ген, ответственный за активацию репликации клеточной ДНК, также может транскрибироваться, подталкивая таким образом, клетку к вступлению в S-фазу клеточного цикла



Рис. 21-20. Предполагаемый механизм, с помощью которого определенные папилломавирусы могут индуцировать рак шейки матки. Данные вирусы имеют кольцевую двухцепочечную ДНК длиной около 8000 пар оснований. В клетках бородавок и других доброкачественных образований вирусные хромосомы стабильно существуют в виде плазмид и реплицируются самостоятельно. В результате редкого случайного события вирусный геном может встроиться в хромосому хозяина. При этом изменится окружение вирусных генов и нарушится контроль их экспрессии. Нерегулируемый синтез белка репликации вируса «подталкивает» клетку к вступлению в S-фазу клеточного цикла, способствуя тем самым возникновению рака.

и заставляя ее снова и снова совершать цикл деления. Вирусный ген начинает работать как онкоген, вызывая опухолевую трансформацию. Однако такой онкоген принципиально отличается от тех классов онкогенов, которые мы рассмотрим ниже, - у него нет гомолога в геноме нормальной клетки.

ДНК-содержащие вирусы - весьма разнообразная группа, но описанные общие принципы, с некоторыми изменениями (вариациями), применимы к большинству из них, вовлеченных в патогенез рака. Примером одного из вариантов являются папилломавирусы, для которых постоянная связь с клеткой организма-хозяина - неотъемлемая часть их жизненного цикла. Вирусы папилломы, как и вирус SV40, относятся к семейству *паповавирусов,* но они, по-видимому, могут переключаться с инфекции «непродуктивного» типа (лизогенизации) к инфекции «продуктивного» (литического) типа, и наоборот. В первом случае вирус реплицируется синхронно с клеткой, не принося ей вреда, во втором случае он быстро размножается и убивает (лизирует) клетку, высвобождая массу новых вирусных частиц, способных инфицировать другие клетки. Подобно SV40, эти вирусы способны «подчинять себе» клеточную систему синтеза ДНК, а осуществляющие эту функцию вирусные гены могут действовать как онкогены. На рис. 21-20 показано, как, вероятнее всего, вирусы папилломы участвуют в канцерогенезе шейки матки у человека.

21.2.3. Ретровирусы способны случайно захватывать онкогены [15, 18]

В отличие от ДНК-содержащих вирусов большинство **ретровирусов** (см. разд. 5.5.8 и 13.4.2) относительно безвредны для клетки-хозяина. Зараженная клетка постоянно выделяет новые вирусные частицы, которые отпочковываются от плазматической мембраны, не вызывая неопластической трансформации клетки. Однако изредка может происходить случайное «овладение», захват ретровирусом регуляторного клеточного гена (или его испорченной копии, или фрагмента этого гена), который не используется в жизненном цикле самого вируса, но может кардинально влиять на судьбу клетки-хозяина. В частности, как мы видели в гл. 13 (разд. 13.4.2), ретровирус, подобный вирусу саркомы Рауса, захватившему клеточный онкоген (рис. 21-21), легко обнаруживается по своему доминантному трансформирующему эффекту на инфицированные клет-

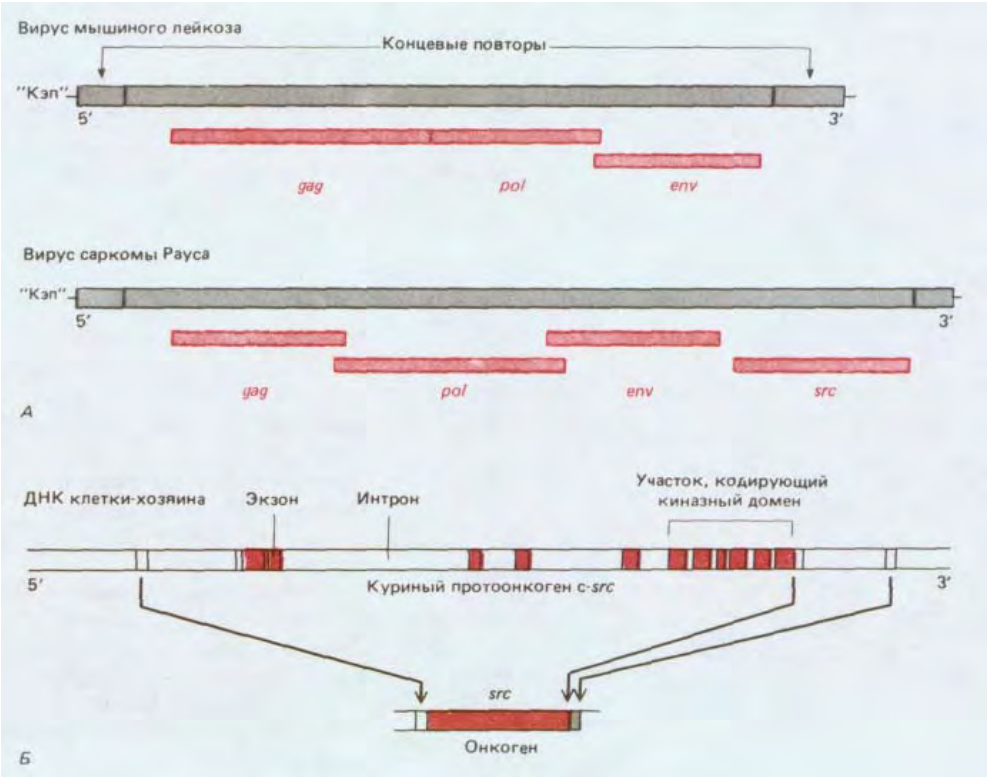


Рис. 21-21. Структура вируса саркомы Рауса. *А.* Особенности организации генома по сравнению с более типичным ретровирусом (вирус мышиного лейкоза). Вирус саркомы Рауса отличается от других онкогенных ретровирусов в том отношении, что сохранил все три гена, необходимые для его жизненного цикла: *gag-кодирующий* полибелок, который при «разрезании» дает белки капсида; *pol*- кодирующий обратную транскриптазу и фермент, участвующий в интеграции хромосомы вируса в геном хозяина; *env*- кодирующий гликопротеин оболочки. В других онкогенных ретровирусах один или больше вирусных генов отсутствуют, поскольку взамен вирус приобрел трансформирующий онкоген (см. рис. 21-22). В результате трансформирующий вирус может образовывать инфекционные частицы только тогда, когда клетка одновременно заражена недефектным, нетрансформирующим *вирусом-хелпером* (помощником), который восполняет утерянные функции. *Б.* Взаимоотношения между онкогеном *v-src* и клеточным протоонкогеном *c-src,* из которого произошел онкоген. Присутствующие в гене *c-src* интроны из гена *v-src* удалены; кроме того,*v-src* несет мутации, изменяющие последовательность аминокислот в белке v-src, что делает его гиперактивной нерегулируемой тирозин-специфической протеинкиназой (см. разд. 13.4.5). Исследователи, работающие над проблемой рака, подвергли вирус саркомы Рауса жесткой селекции в отношении его способности трансформировать клетки. Современные штаммы делают это с необычайной быстротой и эффективностью.

ки хозяина, которые начинают бурно размножаться. Онкоген можно идентифицировать и вычленить методами молекулярной генетики, а на его основе синтезировать ДНК-зонды для выявления гомологичных генов в нормальных клетках. Таким способом было выделено более 20 онкогенов, гомологичных протоонкогенам (табл. 21-4), которые имеются в геноме любой нормальной клетки позвоночных (см. разд. 13.4.2). Эти онкогены относятся к нескольким различным семействам (см. разд. 13.4.4), среди них наиболее крупное - семейство протеинкиназных генов, к которому принадлежит и онкоген вируса саркомы Рауса -*src* (рис. 21-22).

Существуют два механизма превращения протоонкогена в онкоген при включении его в ретровирус: изменение последовательности или фрагментация гена, в результате чего на нем синтезируется белок с аномальной активностью, или попадание его (протоонкогена) под контроль мощных вирусных промоторов и энхансеров, что приводит к избыточному накоплению продукта или созданию неподходящих условий для его функционирования; часто происходит и то, и другое. Сходный онкогенный эффект ретровирусы могут оказывать и другим способом, без захвата клеточных генов и переноса их из клетки в клетку: ДНК-копии вирусной РНК могут просто встраиваться в геном клетки рядом с протоонкогенами или даже внутри их. Этот феномен называется **вставочным (инсерционным) мутагенезом,** а измененный таким образом геном наследуется всеми потомками данной клетки. Вообще, случайное встраивание ДНК-копий вирусной РНК в геном клетки - часть нормального жизненного цикла ретровируса, и если оно происходит в пределах 10 тыс. пар оснований от протоонкогена, то может вызвать аномальную активацию нарушенного встраиванием гена. Вставочный мутагенез дает возможность идентифицировать протоонкогены за счет их близости к встроенному ретровирусу. Выявленные таким способом протоонкогены оказывались теми же, которые обнаруживали и другими методами, но были среди них и новые (табл. 21-5), например, ген *int-l,* активируемый у мышей, зараженных вирусом опухоли молочных желез

Таблица 21-4. Онкогены, первоначально выявленные в составе трансформирующих ретровирусов

Онкоген	Функция протоонкогена (если известна)	Источник вируса	Опухоль, вызванная вирусом
abl	Протеинкиназа (тирозиновая)	Мышь	Лейкоз (предшественников В-лимфоцитов)
		Кошка	Саркома
akt	?	Мышь	Т-клеточная лимфома
crk	Активатор тирозин-специфичной протеинкиназы (протеинкиназ)	Курица	Саркома
erb-A	Рецептор гормона щитовидной железы	Курица	(совместно с *v-erb-B)*
erb-B	Протеинкиназа (тирозиновая)	Курица	Эритролейкоз, фибросаркома
	Рецептор фактора роста эпидермиса (ФРЭ)		
ets	Ядерный белок	Курица	(совместно с v'-*myb)*
fes/fpx	Протеинкиназа (тирозиновая)	Кошка/курица	Саркома
fgr	Протеинкиназа (тирозиновая)	Кошка	Саркома
fms	Протеинкиназа (тирозиновая)	Кошка	Саркома
	Рецептор фактора стимуляции колоний макрофагов		
fos	Ядерный фактор транскрипции	Мышь	Остеосаркома
jun	Ядерный белок	Курица	Фибросаркома
	фактор транскрипции АР-1		
kit	Протеинкиназа (тирозиновая)	Кошка	Саркома
mil/raf	Протеинкиназа (серин/треониновая)	Курица/мышь	Саркома
mos	Протеинкиназа (серин/треониновая)	Мышь	Саркома
myb	Ядерный белок	Курица	Миелобластоз
myc	Ядерный белок	Курица	Саркома миелоцитома карцинома
H-ras	G-белок	Крыса	Саркома эритролейкоз
K-*ras*	G-белок	Крыса	Саркома эритролейкоз
rel	Ядерный белок	Индюк	Ретикулоэндотелиоз
ros sea	Протеинкиназа (тирозиновая)	Курица	Саркома
	Протеинкиназа (тирозиновая)	Курица	Саркома, лейкоз
sis	В-цепь тромбоцитарного фактора роста	Мартышка	Саркома
ski	Ядерный белок	Курица	Карцинома
src	Протеинкиназа (тирозиновая)		Саркома
yes	Протеинкиназа (тирозиновая)	Курица	Саркома

Таблица 21-5. Некоторые онкогены, впервые идентифицированные не по присутствию в трансформирующих ретровирусах

Способ идентификации	Онкогены
Амплификация	*L-myc,* N-*myc*, *Gli*
Трансфекция	*mas, met, neu,* N-*ras*, *trk, onc*-F, "thy"
Транслокация	*bcl*-1, *bcl-2, tcl-1, tcl-2, tcl*-3a, *tcl*-3b
Инсерция	*evi-1, int-1, int-2, int*-3, *int*-4, *Mlvi-2, Mlvi*-3, *Pim-1, Flvi-1, Gin-1, fis-1, Ick, dsi-1, fim-1, ahi-1, mis-1, mis-2, mis-3, mis-4, spi*

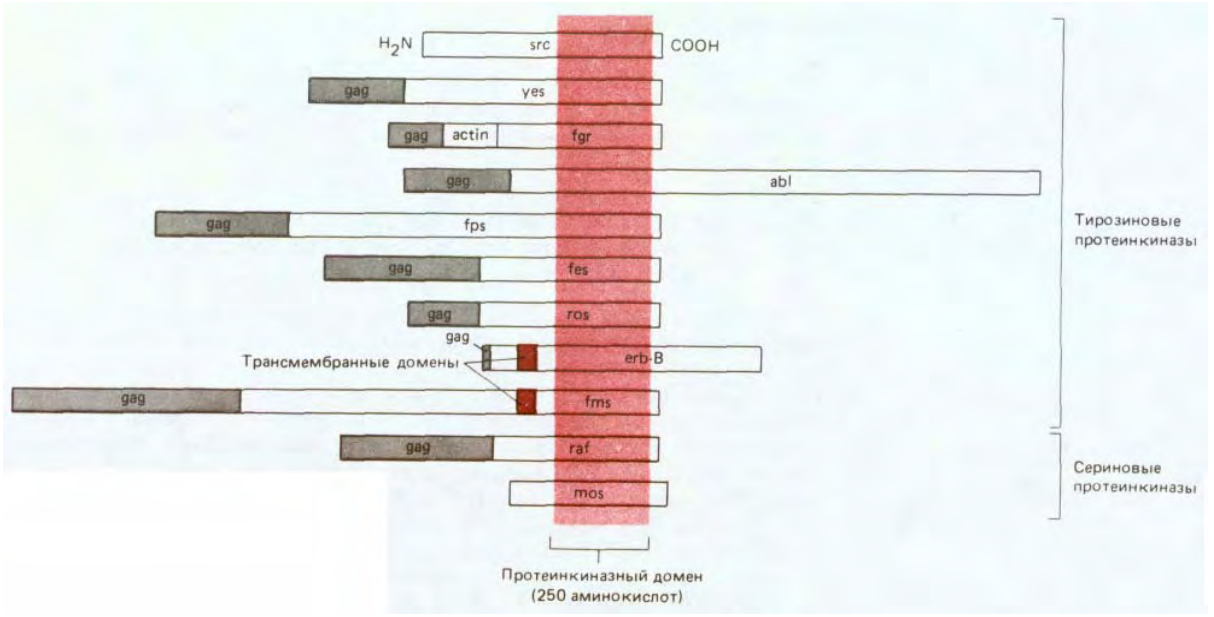


Рис. 21-22. Многие белки, кодируемые онкогенами трансформирующих вирусов, представляют собой протеинкиназы; на рисунке сравниваются (схематично) их первичные структуры. Обратите внимание, что большинство онкогенов несут «осколки» нормальных вирусных генов и продуцируют поэтому «составные» белки, содержащие N-конец вирусного белка gag. (T. Hunter, Sci. Am., **251 (2)**, 70-79, 1984.)

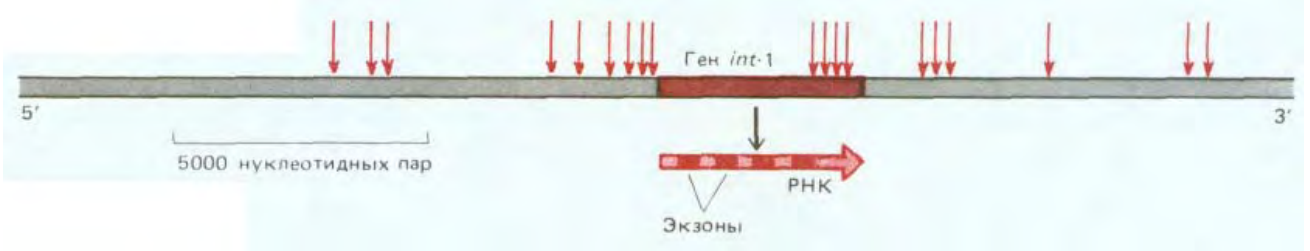


Рис. 21-23. Вставочный мутагенез. В результате вставки активируется ген *int-1* и возникает опухоль молочной железы у мышей, инфицированных вирусом MMTV (от англ. mouse mammary tumor virus). Участки встраивания вируса, выявленные в 19 различных опухолях, обозначены стрелками. Обратите внимание, что вставки могут активировать транскрипцию гена *int-1* на расстоянии более 10 т. п. н. с обеих сторон от гена. Этот эффект обусловлен присутствием мощного энхансера в концевых повторах MMTV.

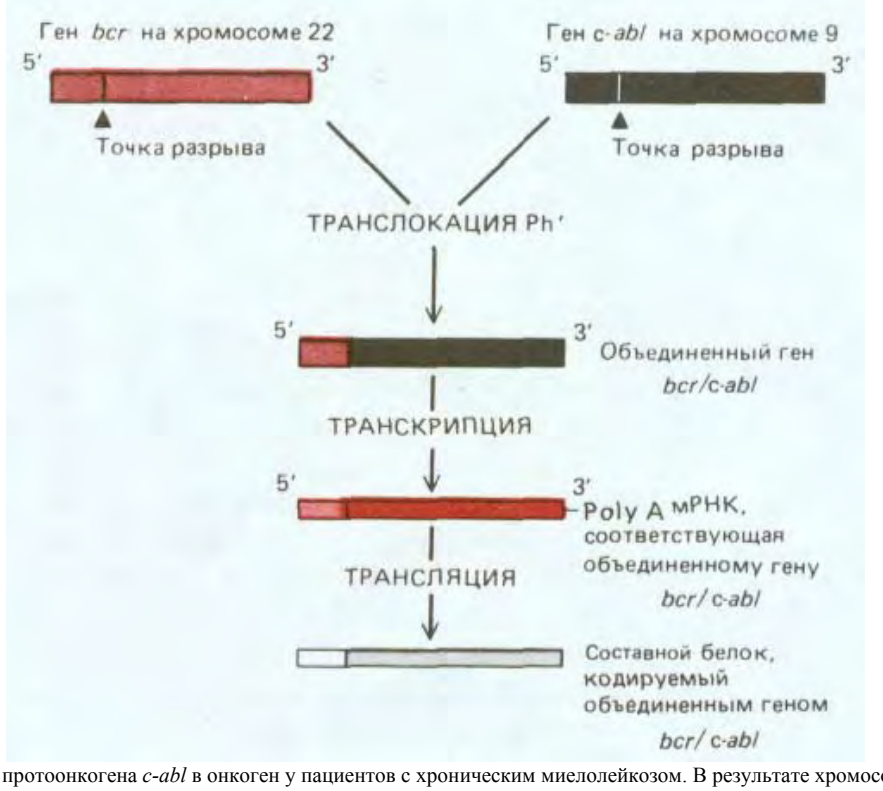


Рис. 21-24. Превращение протоонкогена *c-abl* в онкоген у пациентов с хроническим миелолейкозом. В результате хромосомной транслокации ген *bcr* на хромосоме 22 объединяется с геном *c-abl* из хромосомы 9 (см. рис. 21-4). Образующийся составной белок несет N-концевую последовательность белка bcr и С-концевую последовательность тирозиновой протеинкиназы abl. Abl-киназный домен приобретает аномальную активность, что вызывает избыточную пролиферацию клона гемопоэтических клеток в костном мозге.

(рис. 21-23). Клонирование и секвенирование этого гена выявило его близкое сходство с геном *wingless* дрозофилы (см. разд. 16.5.9), который, возможно, участвует в межклеточных взаимодействиях, регулирующих сегментацию тела мухи.

21.2.4. Исследование генетической природы рака приводит к одной и той же небольшой группе протоонкогенов [15, 19]

В то время как одни исследователи разрабатывали направление, которое можно назвать «от ретровирусов - к онкогенам», другие использовали более прямой подход и занялись поиском определенных последовательностей ДНК в опухолевых клетках человека, которые могли бы вызвать неконтролируемую пролиферацию при введении в нормальные клетки. Суть метода, разработанного для этой цели, заключалась в трансфекции клеток линии NIH 3T3 (одна из неопухолевых линий мышиных клеток 3T3) ДНК, выделенной из клеток опухоли человека (см. разд. 13.4.3) и рис. 13-33). Результат оказался драматический - онкогены были обнаружены во многих линиях раковых клеток человека, и в нескольких случаях эти онкогены оказались мутантными аллелями тех самых протоонкогенов, которые были выявлены при исследованиях с помощью ретровирусов. Так, примерно в каждой четвертой опухоли у человека был найден мутантный представитель генного семейства *ras* (онкогены, вызывающие саркому у крыс). Таким образом, два независимых пути исследований привели к одной и той же группе генов.

Еще один подход, основанный на кариотипировании опухолевых клеток, дал аналогичный результат. Как мы уже упоминали (разд. 21.1.2), почти у всех больных хроническим миелогенным лейкозом в клетках происходит одна и та же хромосомная транслокация (между хромосомами 9 и 22), а в клетках лимфомы Беркитта обычно наблюдается транслокация между хромосомой 8 и одной из трех хромосом, несущих гены иммуноглобулинов. Было обнаружено, что в обоих типах злокачественных новообразований точка транслокационного разрыва (то место, где часть одной хромосомы соединяется с другой) совпадает с расположением протоонкогенов, уже известных по исследованиям ретровирусов -*c-abl* при хроническом миелолейкозе и *c-myc* при лимфоме Беркитта. Аналогичные хромосомные транслокации связаны и с некоторыми другими видами рака. В одних случаях транслокация приводит к превращению протоонкогена в онкоген путем слияния его с другим геном, в результате чего синтезируется измененный белок (рис. 21-24), в других - протоонкоген в результате транслокации попадает в «неестественное» хромосомное окружение, что активирует его транскрипцию и приводит к избыточному синтезу нормального белка.

21.2.5. Существует много способов превращения протоонкогена в онкоген [14, 15, 20]

До настоящего времени выявлено около 60 протоонкогенов (см. табл. 21-4 и 21-5), каждый из которых может быть преобразован в онкоген, играющий решающую роль в возникновении того или иного вида рака. Большинство таких генов обнаруживали неоднократно в самых различных видах опухолей; можно думать поэтому, что большая часть протоонкогенов млекопитающих в настоящее время уже выявлена. За превращение протоонкогена в онкоген могут отвечать разные генетические механизмы (рис. 21-25). Ген может измениться в результате точковой мутации, хромосомной транслокации или вставки мобильного генетического элемента, например ретровируса. Эти изменения могут

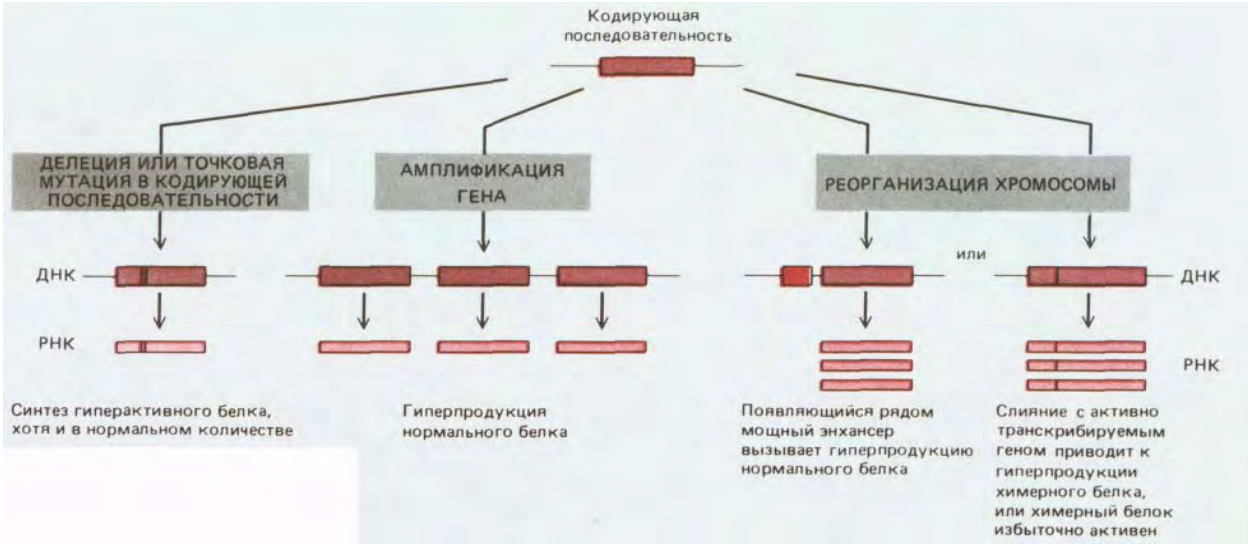


Рис. 21-25. Три пути превращения протоонкогена в онкоген: делеция или точковая мутация *(слева),* амплификация гена *(в центре),* хромосомная перестройка *(справа).* Четвертый механизм (не изображен) включает в себя рекомбинацию между протоонкогеном и ретровирусной ДНК. Конечный эффект подобен тому, который имеет место при реорганизации хромосом: протоонкоген оказывается под контролем вирусного энхансера и/или сливается с активно транскрибируемым вирусным геном.

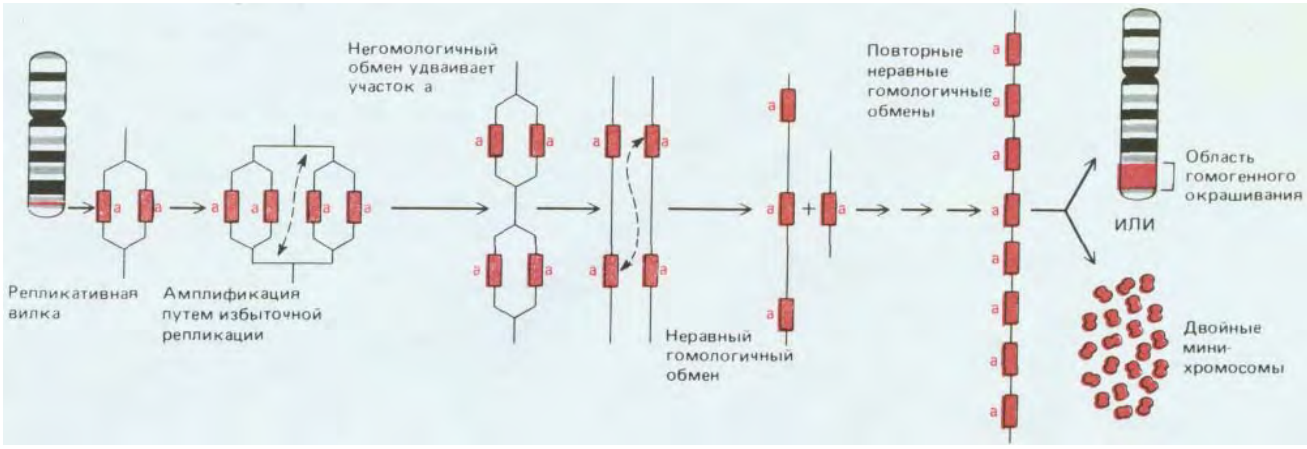


Рис. 21-26. Возможный механизм амплификации гена, приводящей к избыточной продукции белка. Процесс начинается с акта дупликации, в основе которого, по-видимому, лежит незаконная рекомбинация. Изображенная на рисунке схема предполагает, что незаконная рекомбинация может быть следствием дестабилизирующего эффекта избыточной репликации ДНК. Если дупликация гена произошла, неравный обмен сестринских хроматид в результате рекомбинации между одинаковыми копиями генов в ходе репликации ДНК может дополнительно увеличить число копий гена (см. разд. 10.5.2); в результате их количество в хромосоме может достигать десятков и сотен. Многочисленные повторы ДНК делают видимым содержащий их сегмент — он выявляется в хромосоме как *область гомогенного окрашивания.* Амплифицированный участок может быть также вырезан из своего локуса (видимо, опять же с участием какого-то из рекомбинационных механизмов) и дать начало самостоятельным *двойным минихромосомам* (см. разд. 21.1.13). Общая длина амплифицированного по такому механизму сегмента ДНК обычно составляет более 100000 нуклеотидных пар.

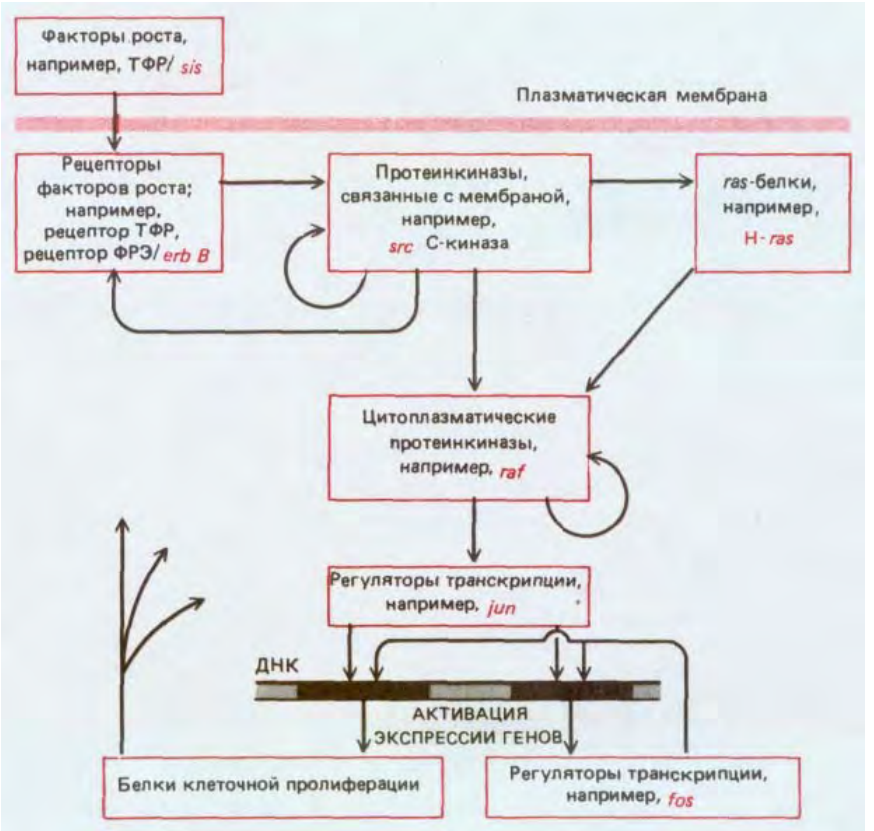


Рис. 21-27. Взаимосвязь между основными классами протоонкогенов во внутриклеточной регуляторной сети, отвечающей за восприятие, передачу и реализацию пролиферативного сигнала. В каждом классе указано по одному характерному представителю. Стрелка от А к Б означает, что в нормальной клетке активация А приводит к активации Б напрямую или опосредованно. В схеме использованы данные, полученные при изучении свойств молекул в бесклеточных системах и, отчасти, при изучении клеток, в которых определенные компоненты были активированы введением онкогена или инактивированы (микроинъекцией соответствующих антител). Существенно, что каждый класс регуляторных молекул представлен многими членами, так что каждая стрелка на схеме «скрывает под собой» множество параллельных стрелок, соединяющих индивидуальные члены одного класса с индивидуальными членами другого. Более того, члены данного класса могут во многих случаях взаимодействовать друг с другом (например, с помощью взаимного фосфорилирования), а также с членами других классов (и предшествующих, и последующих). Наличие множества параллельных путей передачи сигнала, по-видимому, повышает устойчивость клетки к повреждениям, так что единичной онкогенной мутации в норме недостаточно, чтобы сделать клетку опухолевой; однако сложность этой системы и присутствие многочисленных обратных связей делают ее экспериментальное изучение весьма трудной задачей. (Подробности см. в разд. 10.2.8, 12.3.11-12.3.14 и 13.4.4-13.4.6.)

произойти в участках гена, кодирующих белок (следствием чего является гиперактивный продукт), или в прилежащих регуляторных участках (и тогда возможна простая гиперэкспрессия гена). С другой стороны, гиперэкспрессия может быть и следствием амплификации гена (вероятно, прообразом такого процесса является аномальная репликация хромосом) (рис. 21-26). С некоторыми генами нередко происходят изменения вполне определенного типа (это даже может быть их характерным признаком); точно так же некоторые канцерогены вызывают специфические, «узнаваемые» повреждения. Так, например, гены семейства *myc* часто экспрессируются в избытке или амплифицируются, а в 90% случаев рака кожи, вызванного у мышей опухолевым инициатором диметилбенз[а]антраценом, наблюдается замена А на Т в одном и том же участке мутантного гена H-*ras*.

Молекулярные функции протоонкогенов, мутировавших столь разными способами, начинают сейчас проясняться; причем число протоонкогенов, которые прямо вовлечены в какой-либо из путей передачи клеточных сигналов (или имеют к ним отношение, см. гл. 12 и 13, разд. 12.3.10 и 13.4.4), постоянно растет. Продукты многих генов взаимодействуют между собой как компоненты сложной регуляторной сети (рис. 21-27). Одни протоонкогены кодируют факторы роста, другие - их рецепторы, а также некоторые протеинкиназы, третьи - G-белки семейства *ras* или ядерные регуляторные белки. Молекулярные механизмы канцерогенеза обретают, таким образом, «плоть и кровь»: мутации гена c-*sis*, кодирующего тромбоцитарный фактор роста (ТФР), приводят к его избыточной экспрессии, в результате чего клетки приобретают способность постоянно себя стимулировать; мутации гена *c-erbB,* кодирующего рецептор к фактору роста эпидермиса (ФРЭ), изменяют его свойства так, как будто он все время активирован своим фактором роста; мутации, усиливающие экспрессию гена *c-myc* (продукт которого, как полагают,

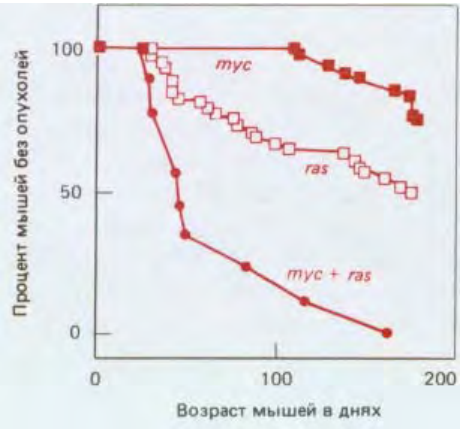


Рис. 21-28.Динамика возникновения опухолей у трансгенных мышей трех типов: несущих онкоген *myc,* несущих онкоген *ras* и несущих оба этих онкогена. В ходе эксперимента были использованы две линии трансгенных мышей: одна несла вставленную копию онкогена, полученного слиянием протонкогена *c-myc* с промотором/энхансером MMTV (этот промотор приводит к избыточной экспрессии находящегося под его контролем гена - в данном случае *c-myc* - в определенных тканях, например, в молочной железе); другая несла вставленную копию онкогена *V-H-ras* под контролем того же промотора/энхансера. Опухоли у мышей обеих линий возникали гораздо чаще, чем у нормальных мышей (обычно в молочных и слюнных железах). Мыши, несущие оба онкогена, были получены скрещиванием мышей этих двух линий. Частота возникновения опухолей у таких гибридов была значительно выше, чем суммарная частота для носителей отдельных онкогенов. Несмотря на это, опухоли начинали появляться лишь спустя некоторое время и только у малой доли клеток той ткани, где эти два гена экспрессировались: видимо, для развития рака кроме присутствия двух онкогенов требовалось, чтобы произошло еще какое-то событие (случайного характера). (По E. Sinn et al., Cell, 40, 465 475, 1987.)

участвует в подготовке ядра к делению), обусловливают способность клетки к неограниченной пролиферации. Тем не менее слишком многое еще остается неясным. Несмотря на богатую информацию о последовательностях ДНК и молекулярной структуре протоонкогенов, онкогенов и их продуктов, мы имеем пока лишь смутное представление о роли большинства из них в физиологии клетки.

21.2.6. Трансгенные мыши - подходящая тест-система для изучения действия онкогенов [21]

Концепция онкогена содержит в себе противоречие: с одной стороны, в первой части этой главы мы привели множество аргументов в пользу того, что для возникновения рака единичной мутации недостаточно; с другой стороны, онкоген - это доминантный ген, обладающий способностью вызывать неопластическую трансформацию клеток в культуре. Это кажущееся противоречие отражает пропасть между упрощенными моделями рака, наиболее широко используемыми в молекулярно-биологических исследованиях, и сложностью реальной болезни у человека. Стандартный метод идентификации онкогенов выявляет их действие не на нормальные человеческие соматические клетки, а на линию мышиных клеток 3Т3; эти клетки уже претерпели мутации в процессе перевода в культуру, что и делает удивительно легкой их трансформацию при единичном дополнительном генетическом изменении. Более того, как указывалось в разд. 21.1.4, мыши в меньшей степени подвержены риску возникновения рака (у них короче продолжительность жизни и меньше общее число клеток), чем человек, и поэтому их клетки могут быть менее надежно защищены от последствий канцерогенных мутаций по сравнению с клетками человека.

Однако даже у мыши единичного онкогена обычно не достаточно для превращения нормальной клетки в раковую. Это отчетливо продемонстрировано на трансгенных мышах. Можно «сшить» онкоген в виде фрагмента ДНК, взятого из вируса или опухолевой клетки, с подходящей промоторной последовательностью ДНК, и ввести полученную молекулу в ядро мышиной яйцеклетки. Такая рекомбинантная молекула ДНК часто встраивается в одну из хромосом, в результате чего получается линия трансгенных мышей, несущих онкоген во всех своих клетках. Этот онкоген может экспрессироваться во многих тканях или же лишь в некоторых «избранных», в соответствии с тканевой специфичностью соединенного с ним промотора. Обычно у мышей, которым ввели таким способом онкогены *myc* или *H-ras,* экспрессирующие их ткани резко увеличиваются в объеме, разрастаясь до чрезмерной величины, а отдельные клетки со временем подвергаются дальнейшим изменениям и дают начало опухоли. И все же подавляющее большинство клеток трансгенной мыши, экспрессирующих *myc*- или H-ras-онкогены, опухолей не образуют, что говорит о недостаточности присутствия одного онкогена для опухолевой трансформации.

Описанный прием был использован для дальнейших исследований. Трансгенных мышей, несущих *myc,* скрестили с трансгенными мышами, несущими *H-ras,* и получили потомство, у которого оба онкогена присутствовали одновременно. Такие потомки давали рак с гораздо большей частотой (и гораздо быстрее), чем каждая из родительских линий (рис. 21-28), но опять же он возникал в виде изолированных опухолей, рассеянных среди нераковых клеток. Таким образом, даже с клеткой, экспрессирующей два онкогена, должны произойти какие-то дальнейшие случайные изменения, чтобы она превратилась в опухолевую.

Хотя такой результат является типичным, были обнаружены и

исключения, когда клетки какой-нибудь одной ткани у трансгенной мыши, несущей один онкоген, одновременно трансформировались в раковые. Однако в этих случаях онкоген был, по-видимому, «дважды активирован» - благодаря мутации в кодирующем участке и (или) соединению с ненормальной регуляторной последовательностью, что приводило к его избыточной или несоответствующей экспрессии в пораженной ткани. Все это означает, что даже если один онкоген и способен в некоторых случаях вызывать превращение нормальной клетки в опухолевую, единичное генетическое нарушение сделать этого, скорее всего, не может.

21.2.7. Наряду с приобретением онкогенов при раке происходит потеря генов-супрессоров опухолевого роста [22]

Из всех имеющихся ныне фактов создается впечатление, что система контроля и регулирования клеточной пролиферации должна иметь «запас прочности» в том смысле, что никакое единичное генетическое изменение не гибельно для ее нормального функционирования: размножение клеток продолжает оставаться в безопасных границах, даже если любой отдельный компонент системы вышел из строя. Как правило, один онкоген в состоянии оказать свой доминирующий трансформирующий эффект на поведение клетки, лишь тогда, когда система контроля уже серьезно повреждена. Удачи при поиске онкогенов во многом определялись выбором подходящей линии клеток для тестирования.

Значительно труднее оказалось идентифицировать и выделить гены-супрессоры опухолей, т.е. гены, тормозящие в норме избыточную пролиферацию клеток. Тем не менее имеется достаточно доказательств, что потеря таких генов играет определенную роль в патогенезе рака. В частности, в разд. 13.4.3 мы рассказали, что при слиянии культивируемых трансформированных клеток с нетрансформированными возникающие гибриды часто имеют нетрансформированный фенотип. Если же гибрид теряет определенную хромосому, принадлежавшую «нормальному» родителю, его поведение вновь приобретает черты опухолевой клетки. Резонно предположить, что в подобных случаях на утерянной хромосоме находилась единственная клеточная копия специфического гена-супрессора опухолевого роста.

В обычной диплоидной клетке до потери контроля роста и пролиферации должна произойти инактивация или потеря обеих копий опухолесупрессорного гена: мутация, которая участвует в развитии рака за счет инактивации или делеции каких-либо генов, должна быть рецессивной. Напротив, мутация, порождающая онкоген, может влиять на поведение клетки даже в присутствии копии соответствующего протоонкогена. Благодаря этим свойствам дефектные гены-супрессоры опухоли можно распознавать и отличать от онкогенов с помощью простых генетических критериев. Хорошей иллюстрацией служит *ретинобластома* - редкий вид раковой опухоли, развивающейся в раннем детстве. Опухоль развивается из предшественников нейрональных клеток в незрелой сетчатке. Известны две формы этой опухоли - наследственная и ненаследственная. При наследственной форме обычно возникают множественные опухоли, при этом поражаются оба глаза, а иногда и кости, при ненаследственной ретинобластоме единственная опухоль поражает один глаз. Кроме того, у некоторых больных наследственной формой ретинобластомы выявляется кариотипическая аномалия - исчезновение специфической полосы на 13-й хромосоме. Делеции этого же локуса зафиксированы в клетках опухоли у больных с ненаследственной формой болезни. Эти факты свидетельствуют о том, что причина опухолевого роста заключена скорее в потере гена-супрессора, чем активации онко-



Рис. 21-29. Генетические механизмы возникновения ретинобластомы. При наследственной форме болезни все клетки тела лишены одной из двух (в норме) функциональных копий гена-супрессора опухолевого роста, и при потере или инактивации оставшейся копии в результате соматической мутации в какой-либо из клеток, та может дать начало опухоли. При ненаследственной форме все клетки исходно содержат обе функциональные копии данного гена, и опухоль образуется лишь в том случае, если обе копии утеряны или инактивированы — для этого необходимо совпадение двух соматических мутаций в одной клетке.

гена. Имеющиеся данные позволяют сделать вывод, что предрасположенность к раку у больных с наследственной формой обусловлена тем, что в их клетках отсутствует одна из двух нормальных копий некоего гена-супрессора опухолевого роста, названного геном ретинобластомы или *RB1*. Поэтому теперь достаточно одной соматической мутации, которая испортит оставшуюся «хорошую» копию этого гена в одной из миллиона или более клеток растущей сетчатки, чтобы вызвать рак. У детей без наследственной предрасположенности возникновение ретинобластомы - большая редкость, т. е. для этого необходимо совпадение в одной клетке сетчатки двух соматических мутаций, которые разрушили бы обе копии гена *RB1* (рис. 21-29). В настоящее время этот ген клонирован; показано, что он кодирует белок, который в норме экспрессируется как в сетчатке, так и во многих других тканях; он содержит так называемые «цинковые пальцы» (структурные участки, похожие на то, что находят во многих ДНК-связывающих белках, см. разд. 9.1.9), а также связывается с белками - продуктами онкогенов некоторых ДНК-содержащих вирусов. С помощью ДНК-зондов, полученных на основе клонированного *RB1,* удалось подтвердить, что в опухолевых клетках, в отличие от их нетрансформированных аналогов-соседей, имеются делеции или инактивирующие повреждения гена *RB1 в* обоих - материнском и отцовском - наборах хромосом; потеря нормального гена может осуществляться различными путями (рис. 21-30). Сходные механизмы, но с участием других генов, ответственны за некоторые другие онкологические заболевания раннего детства (например, опухоль Вильмса). Хотя подобные варианты рака редки и в известном смысле являются исключением, накапливается все больше данных в пользу того, что потеря или инактивация супрессорных генов опухолевого роста играет существенную роль в развитии многих раковых заболеваний у лиц зрелого возраста.

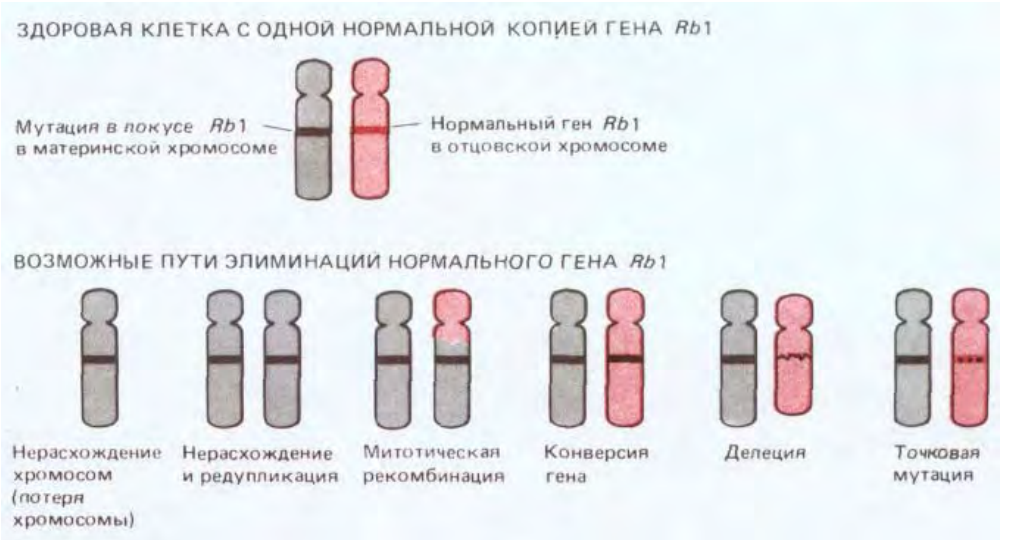


Рис. 21-30. Возможные механизмы, с помощью которых клетка, имеющая дефект в одной из двух копий гена-супрессора опухолевого роста, может лишиться второй, функционально активной копии и сделать тем самым шаг к трансформации. Для анализа опухолевой ДНК и ответа на вопрос, какое именно генетическое событие произошло у данного пациента, весьма эффективны зонды на основе клонированной ДНК в сочетании с исследованием полиморфизма длины рестрикционных фрагментов. Следует отметить, что большинство механизмов приводит к полной потере клеткой функциональной копии (отцовской или материнской) данного гена-супрессора. Оставшийся гомолог изначально дефектен и может оказаться в виде одной или двух генокопий. Подобная *редукция до гомозиготности или гемизиготности* - характерный признак рака, возникающего в результате потери гена-супрессора опухолевого роста. (По W. K. Cavenee et al., Nature **305,** 779-784, 1983.)

21.2.8. Молекулярнобиологический анализ опухолей легких подчеркивает сложность и вариабельность раковых заболеваний у человека [23]

Каждый год в США выявляется около 140 тыс. новых больных раком легкого. До сих пор эффективных методов лечения этой формы рака не существует, и более 90% таких больных умирает в течение года с момента установления диагноза. Для понимания молекулярнобиологических особенностей этого вида злокачественной опухоли были проведены детальные исследования одной из его *форм - мелкоклеточного рака легкого,* на долю которого приходится 20% всех случаев рака этой локализации. Полагают, что мелкоклеточный рак развивается из нейроэндокринных клеток легкого, секретирующих *гастринвысвобождающий пептид (ГВП;* его называют также *бомбезином* из-за сходства с нейропептидом земноводных того же названия) и другие локальные химические медиаторы. Из опухолей различных больных этим видом рака было выделено и проанализировано более сотни культивируемых линий клеток. Эти клетки демонстрируют широкий спектр аномалий, к тому же варьирующих от линии к линии. Выявлены изменения по крайней мере в десяти известных онкогенах и генах-супрессорах опухолевого роста, многочисленные хромосомные делеции и транслокации, а также нарушения в секреции сигнальных молекул, влияющих на клеточную пролиферацию.

Например, многие из этих клеточных линий характеризуются избыточной экспрессией протоонкогена *myc* или родственных ему генов N-myc и *L-myc.* Часто это связано с амплификацией соответствующей области и проявляется в кариотипе как двойные минихромосомы или гомогенно окрашивающиеся хромосомные участки (рис. 21-31, см. также разд. 21.1.13). В этих же клетках гены семейства *ras* нередко претерпевают специфические точковые мутации. Амплификация гена *myc* всегда коррелирует с особенно быстрым ростом опухолевых клеток в культуре и с полным подавлением дифференцировки. Больных, имеющих опухоли с амплификацией этого гена, ждет особенно плохой прогноз.

Наряду с другими хромосомными аномалиями, некоторые опухолевые клеточные линии при мелкоклеточном раке легкого имеют значительные хромосомные дефекты в области гена *RB1:* более чем у половины линий не обнаруживается мРНК этого гена, хотя она синтезируется в нормальных клетках легких и в большинстве раковых клеток другого происхождения. Кроме того, многие опухолевые клеточные линии



Рис. 21-31. Кариотип опухолевой клетки при мелкоклеточном раке легкого. Стрелками указаны двойные минихромосомы, содержащие амплифицированный ген *myc*. (С любезного разрешения F. Whang-Peng и F. D. Minna.)

имеют отчетливые делеции, включающие специфическую полосу 3-й хромосомы, что может указывать на важность потери этого гена для развития рака. С помощью клонированных ДНК-зондов, комплементарных данному участку на 3-й хромосоме, показано, что почти в каждом случае (мелкоклеточного рака и других основных форм рака легкого) одна из двух родительских копий указанного участка на 3-й хромосоме утеряна. В нормальных клетках этих же больных такая делеция не обнаруживается, как и в опухолях других типов у других заболевших. Таким образом, это веский довод в пользу того, что в развитии рака легкого критическим моментом является удаление специфического гена-супрессора опухолевого роста, расположенного в 3-й хромосоме, по одному из механизмов, описанных для ретинобластомы на рис. 21-30. Предполагается, что в типичной раковой легочной клетке одна из двух исходных копий гена-супрессора рака легкого утрачивается за счет делеции сегмента хромосомы, который содержит его, а другая инактивируется вследствие менее заметной (скорее всего, точковой) мутации. По аналогии с ретинобластомой возникает также предположение, что могут быть люди с наследуемым рецессивным дефектом в этом локусе, предрасположенные к раку легкого. Поскольку для возникновения рака легкого, по-видимому, необходимы еще и изменения в других генах (кроме этого для него характерна выраженная зависимость от факторов внешней среды), наследственная предрасположенность в этом случае может быть менее выраженной, чем при ретинобластоме (хотя имеется несколько сообщений о генетической вариабельности чувствительное-

ти/восприимчивости курильщиков к возникновению рака легкого). Недавно были получены сходные данные о потере гена-супрессора опухолевого роста из другого локуса при другом распространенном раковом заболевании - карциноме толстой кишки; показано, что в этом случае есть редкая наследственная форма, хотя ее взаимосвязь на молекулярном уровне с ненаследуемой формой не выяснена. Можно ожидать, что молекулярнобиологические исследования, подобные только что описанным, помогут выявить людей, с повышенным риском заболеть некоторыми определенными видами рака, и в отношении которых соответствующие превентивные меры могут дать наибольший эффект.

Другой клинически важный результат, полученный при молекулярнобиологическом исследовании мелкоклеточного рака легкого, касается бомбезина (ГВП). Этот пептид действует как фактор роста, стимулируя пролиферацию опухолевых клеточных линий. Некоторые линии клеток (но не все) оказались способными не только отвечать на этот фактор, но и секретировать его, создавая аутокринную петлю, посредством которой клетки сами стимулируют себя к делению. В культуре пролиферацию таких клеток удается затормозить с помощью антител, связывающих пептид и блокирующих тем самым стимуляцию. Можно надеяться, что в будущем станет возможным останавливать таким способом опухолевый рост у пациентов с этой разновидностью рака легкого.

21.2.9. Каждый случай рака представляет собой самостоятельный природный эксперимент в клеточной эволюции

Всякий успех в лечении зависит прежде всего от верного диагноза. Если мы не можем точно идентифицировать болезнь, то мы не сумеем ни обнаружить ее причины, ни предсказать ее исход, ни подобрать подходящее для данного больного лечение. Как мы могли убедиться на примере мелкоклеточного рака легкого, традиционная классификация онкологических заболеваний неточна, одна из общепринятых в ней категорий при внимательном рассмотрении превращается в гетерогенную группу болезней, каждая из которых имеет свой характерный набор генетических повреждений. Молекулярная биология начинает создавать инструменты, с помощью которых можно точно узнать, какие гены амплифицированы, какие делетированы и какие подверглись мутациям в опухолевых клетках любого конкретного больного. Информация такого рода столь же важна для лечения и предотвращения рака, как идентификация возбудителя при инфекционных заболеваниях.

Открытие онкогенов и, совсем недавно, генов-супрессоров опухолевого роста ознаменовало конец эры блужданий во тьме в поисках биохимической основы рака. Однако предстоит еще пройти путь от упрощенных лабораторных моделей, сделавших эти триумфальные успехи возможными, к пониманию реальной сложности раковых заболеваний человека. Пока мы далеки от успеха, прогресс до обидного невелик и в отношении разработки эффективного рационального лечения. Мы знаем последовательности ДНК многих онкогенов и протоонкогенов, но в то же время точные физиологические функции нам известны лишь для некоторых из них. Необходимо более глубокое понимание того, как эти и другие молекулы взаимодействуют между собой, управляя поведением отдельной клетки; нужно хорошо разбираться в популяционных механизмах, которые определяют возникновение раковых клеток через мутации и естественный отбор.

Каждый онкологический больной - это жертва неудачного эксперимента в клеточной эволюции, поставленного самой природой. Сложность (и запутанность) самого феномена рака обусловливается сложностью и богатством эволюционных возможностей, и в то же время

именно эволюционные принципы позволяют решать проблему рака. Итак, мы возвращаемся к идее, с которой была начата эта книга: все в биологии имеет смысл лишь в свете эволюции.

Заключение

Размножение нормальных клеток регулируется ингибирующими и стимулирующими молекулами, которые являются соответственно продуктами генов-супрессоров опухолевого роста и протоонкогенов. Проявление раковых свойств у клетки может быть результатом как потери или инактивации обеих клеточных копий гена-супрессора, так и амплификации или гиперактивации одной из двух копий протоонкогена. Наследуемые нарушения пролиферативного контроля могут быть вызваны также внедрением в клетку чужеродного вирусного генетического материала. Ретровирусы могут сами становиться онкогенными, «захватывая» копию клеточного протоонкогена клетки-хозяина и превращая его в онкоген; они могут также создавать онкоген в клетке, действуя как инсерционный мутаген и внедряясь в ее геном рядом с протоонкогеном. Хотя полагают, что большинство онкологических заболеваний у человека вызывается не вирусами, обнаруживаемые в опухолевой ДНК мутации часто затрагивают те же протоонкогены, что и найденные при изучении ретро-вирусов. Способы превращения протоонкогенов в онкогены в опухолях у человека включают точковые мутации, амплификацию генов, а также хромосомные транслокации, которые могут привести к нарушению контроля экспрессии этого протоонкогена или к его соединению с другим геном с последующим синтезом нового белка. Подобно этому, гены-супрессоры опухолевого роста могут быть функционально утеряны в результате мутаций самого разного характера; люди, унаследовавшие от родителей делецию или дефектную копию одного из таких генов, могут проявить выраженную предрасположенность к определенному типу рака, что демонстрирует пример с ретинобластомой. Молекулярнобиологический анализ опухолевых клеток от больных, страдающих одной из наиболее распространенных форм рака, выявил сложный и неоднородный спектр генетических повреждений, включая и активацию онкогенов и потерю генов-супрессоров опухолевого роста. Эти данные являются отражением случайного характера эволюционного процесса, в ходе которого возникает рак, и говорят о том, что каждая злокачественная опухоль, с молекулярной точки зрения уникальна.

Литература

Общая

Cairns J. Cancer: Science and Society. San Francisco, Freeman, 1978.

Cancer Biology: Readings from Scientific American. New York, W. H. Freeman, 1986.

Darnell J.E., Lodish H.F., Baltimore D. Molecular Cell Biology, pp. 1035-1080. New York, W. H. Freeman/Scientific American Books, 1986.

De Vita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., eds. Cancer: Principles and Practice of Oncology, 2nd ed. Philadelphia, Lippincott, 1985.

Farmer P. B., Walker J. M., eds. The Molecular Basis of Cancer. New York. Wiley, 1985.

Franks L. M., Teich N., eds. Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer. Oxford, U.K., Oxford University Press, 1986.

Prescott D.M., Flexer A. S. Cancer: The Misguided Cell, 2nd ed. Sunderland, M. A., Sinauer, 1986.

Watson A. M., Hopkins N. H., Roberts J. W., Steitz J. A., Weiner A. M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed., pp. 962-1096. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1987.

Цитированная

1. *Cairns J.* Mutation selection, and the natural history of cancer. Nature, 255, 197-200, 1975.
   Nowell P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. Science, 194, 23-28, 1976.
2. *Doll R., Peto R.* Epidemiology of cancer. In Oxford Textbook of Medicine (D.J. Weatherall, J.G.G. Ledingham, D.A. Warrell, eds.), 2nd ed., pp. 4.95-4.123. Oxford U.K., Oxford University Press, 1987.
   Parkin D. M., Laara E., Muir C. S. Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers in 1980. Int. J. Cancer, **41,** 184-197, 1988.
   Ritchie A. C. The classification, morphology, and behaviour of tumours. In General Pathology (H. Florey, ed.), 4th ed., pp. 668-719. London, Lloyd-Luke, 1970.
   Robbins S. L., Cotran R. S., Kumar V. Pathologic Basis of Disease, 3rd ed., pp. 214-272. Philadelphia, Saunders, 1984.
3. *Fearon E. R., Hamilton R., Vogelstein B.* Clonal analysis of human colorectal tumors. Science, **238,** 193-197, 1987.
   Fialcow P. J. Clonal origin of human tumors. Biochem. Biophys. Acta, **458,** 283-321, 1976.
   Groffen J.J., et al. Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, *bcr,* on chromosome 22. Cell, **36,** 93-99, 1984.
   Nowell P. C., Hungerforcl D. A. A minute chromosome in human granulocytic leukemia. Science, **132,** 1497, 1960.
4. *Ames B., Durston W.E., Yamasaki E., Lee F.D.* Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **70,** 2281-2285, 1073.
   Ashby J., Tennant R. W. Chemical structure, *Salmonella* mutagenicity and extent of carcinogenecity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the U.S. NCI/NTP. Mutation Res., **204,** 17-115, 1988.
   Case R. M. P. Tumours of the urinary tract as an occupational disease in several industries. Ann. R. Coll. Surg. Engl., **39,** 213-235, 1966.
   Doll R. Strategy for detection of cancer hazards to man. Nature, 265, 589-597, 1977.
   Hay A. How to identify a carcinogen. Nature, **332,** 782-783, 1988.
   Walcer J. M. Testing for carcinogens. In The Molecular Basis of Cancer (P. B. Farmer, J. M. Walcer, eds.), pp. 181-200. New York, Wiley, 1985.
5. *Armitage P., Doll R.* The age distribution of cancer and a multi-stage theory of carcinogenesis. Br. J. Cancer, **8,** 1-12, 1954.
   Peto R. Cancer epidemiology, multistage models and shortterm mutagenicity tests. In Origins of Human Cancer (H. H. Hiatt, J. D. Watson, J. A. Winsten, eds.), pp. 1403-1428. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1977.
6. *Cairns J.* Cancer. Science and Society, pp. 144 156. San Francisco, Freeman, 1978.
   Campion M.J., McCance D.J., Cuzick ., Singer A. Progressive potential of mild cervical atypia: persrective, cytological, colposcopic, and virological study. Lancet, **2,** 237-240, 1986.
   Farber E., Cameron C. The sequential analysis of cancer development. Adv. Cancer Res., **32**, 125-225, 1980.
   Foulds L. The natural history of cancer. J. Chronic. Dis., **8**, 2-37, 1958.
   Mclndoe W.A., McLean M. R., Jones R. W., Millins P.R. The invasive potential of carcinoma in situ of the cervix. Obstet. Gynecol., **64,** 451-464, 1984.
7. *Albanes D., Winick M.* Are cell number and cell proliferation risk factors for cancer? J. Natl. Cancer. Inst., **80,** 772 775, 1988.
   Schinipper L. E. Clinical implications of tumor-cell heterogeneity. N. Engl. J. Med., **314,** 1423-1431, 1986.
8. *Berenblum I.* A speculative review: the probable nature of promoting action and its significance in the understanding of the mechanism of carcinogenesis. Cancer Res., **14,** 471-477, 1954.
   Berenblum I., Shibik P. The role of croton oil applications associated with a single painting of a carcinogen in tumor induction in the mouse's skin. Br. J. Cancer, **1,** 379-383, 1947.
   Dolberg D.S., Holligsworth R., Hertle M., Bissel M.J. Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. Science, **230,** 676 678, 1985.
   Lamph W. W., Wamsley P., Sassone-Corsi P., Verma I. M. Induction of proto-oncogene JUN/AP-1 by serum and TPA. Nature **334,** 629-631, 1988.
   Reddy A.L., Fialcow P.J. Influence of dose of initiator on two-stage skin carcinogenesis in BALB/c mice with cellular mosaicism. Carcinogenesis, **9,** 751-754, 1988.
9. *Cairns J.* The treatment of diseases and the war against cancer. Sci. Am., **253(5),** 51-59, 1985.
   Cohen L.A. Diet and cancer. Sci. Am., **257(5)**, 42-48, 1987. *Doll R., Peto R.* The Causes of Cancer. New York, Oxford University Press, 1981.
   Enstrom J. E. Cancer and mortality among active Mormones. Cancer, **42,** 1943-1951, 1978.

Pike M.C., Ross R.K. Breast cancer. Br. Med. Bull., **40,** 351-354, 1984.

10. *Fentiman I.* The local treatment of cancer. In Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer (L. M. Franks, N. Teich, eds.), pp. 350-362. Oxford, U.K., Oxford University Press, 1986.
Malpas J. Chemotherapy. In Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer (L. M. Franks, N. Teich, ed.), pp. 363-377. Oxford, U. K., Oxford University Press, 1986.
11. *Sachs L.* Growth, Differentiation, and the reversal of malignancy. Sci. Am., **254(1),** 40-47, 1986.
12. *Fidler L, Hart I.* Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. Science**, 217,** 998-1003, 1982.
Liotta L. A. Tumor invasion and metastases - role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. Cancer. Res., **46,** 1-7, 1986.
McCarthy J.B., Skubitz A.P.N., Palm S.L., Furcht L.T. Metastasis inhibition of different tumor types by purified laminin fragments and a heparin-binding fragment of fibronectin. J. Natl. Cancer Inst., **80,** 108-116, 1988.
Nicholson G. Cancer metastasis. Sci. Am., **240(3),** 66-76, 1979.
Schirrmacher V. Cancer metastasis: experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. Adv. Cancer Res., **43,** 173, 1985.
13. *German J., ed.* Chromosome Mutation and Neoplasia. New York, Liss, 1983.
Hanawalt P., Sarasin A. Cancer-prone hereditary diseases with DNA processing abnormalities. Trends Genet., **2,** 124-129, 1986.
Lindahl T. Regulation and deficiencies in DNA repair. Br. J. Cancer, **56,** 91095, 1987.
Nowell P. C. Mechanisms of tumor progression. Cancer Res., **46,** 2203-2207, 1986.
14. *Alt F. W., Kellems R. E., Bertino J. R., Schimke R. T.* Selective multiplication of dihydrofolate reductase genes in methotrexate-resistant variants of cultured murine cells. J. Biol. Chem., **253**, 1357-1370, 1978.
Gerlach J. H., et al. Homology between P-glycoprotein and a bacterial haemolysin transport protein suggests a model for multidrug resistance. Nature, **324,** 485-489, 1986.
Roninson I. B., Abelson H. T., Houseman D. E., Howell N., Varshavsky A. Amplification of specific DNA sequences correlates with multi-drug resistance in Chinese hamster cells. Nature, **309,** 626-628, 1984.
Schimke R. T. Gene amplification in cultured cells. J. Biol. Chem., **263,** 5989-5992, 1988.
15. *Klein G.* The approaching era of the tumor suppressor genes., Science, **238,** 1539-1545, 1987.
Watson J.D., Hopkins N.H., Roberts J. W., Steitz J.A., Weiner A.M. Molecular Biology of the Gene, 4th ed., Chapters 26-27. Menlo Park, CA, Benjamin-Cummings, 1987.
Wyke J. A. Viruses and Cancer. In Introduction to the Cellular and Molecular Biology of Cancer (L. M. Franks, N. Teich, eds.), pp. 176-199. Oxford, U.K., Oxford University Press, 1986.
16. *Kripke M.L.* Immunoregulation of carcinogenesis: past, present and future. J. Natl. Cancer Inst., **80**, 722-727, 1988.
17. *Laso P. A.* Human papillomaviruses in oncogenesis. Bioessays, **9,** 158-162, 1988. *Steinherg B. M., Brandsma J. L., Taichman L. B.* Cancer Cells 5/Papillomaviruses. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1987.
18. *Bishop J.M.* Oncogenes. Sci. Am., **246(3),** 80-92, 1982.
Rijsewijk F., et al. The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. Cell, **50,** 649-657, 1987.
Varmus H. E. The molecular genetics of cellular oncogenes. Annu. Rev. Genet., **18,** 553-612, 1984.
19. *Bishop J.M.* The molecular genetics of cancer. Science, **235,** 305-311, 1987.
Croce C. M., Klein G. Chromosome translocations and human cancer. Sci. Am., **252(3)**, 44-50, 1985. *Weinberg R.A.* A molecular basis of cancer. Sci. Am., **249(5)**, 126-142, 1983.
20. *Bradshaw R. A., Prentis S.* Oncogenes and Growth Factors. Amsterdam, Elsevier, 1987. (Подборка статей из журналов Trends Biochem. Sci., Trends Genet, и Immunol. Today.)
Hunter T. The proteins of oncogenes. Sci. Am., **251(2),** 70-79, 1984.
Kahn P., Graf T., eds. Oncogenes and Growth Control. Berlin, Springer, 1986. (Прекрасная коллекция коротких обзоров.)
Quintanilla M., Brown K., Ramsden M., Balmain A. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. Nature, **322,** 78-80, 1986.
Smith M. R., DeGudicibus S.J., Stacey D. W. Requirement for c-ras proteins during viral oncogene transformation. Nature, **320,** 540 543, 1986. (В статье иллюстрируются возможности использования антител для анализа взаимодействия протоонкогенов в регуляции клеточных функций.)

21. *Hanahan D.* Dissecting multistep tumorigenesis in mice. Annu. Rev. Genet. 22 [в печати], 1988.
Land H., Parada L.F., Weinberg R.A. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature, **304,** 596-602, 1983.
Quaife C.J., Pinkert C.A., Ornitz D.N., Palmiter R.D., Brinster R.L. Pancreatic neoplasia induced by *ras* expression in acinar cells of transgenic mice. Cell, **48,** 1023-1034, 1987.
Sinn E., et al. Coexpression of MMTV/v-Ha-*ras* and MMTV/c-*mvc* genes transgenic mice: synergistic action of oncogenes *in vivo.,* Cell, **49,** 465-475, 1987.
22. *Hansen M. F., Cavenee W. K.* Retinoblastoma and the progression of tumor genetics. Trends Genet., **4,** 125-129, 1988.
Harris H. The genetic analysis of malignancy. J. Cell Sci. (suppl.), **4,** 431-444, 1986.
Knudson A. G. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. Cancer Res**., 45,** 1437-1443, 1985. *Lee E. Y.-H. P., et al.* Inactivation of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancer. Science**, 241,** 218-221, 1988.
Weinberg R.A. Finding the anti-oncogene. Sci. Am., **259(3),** 34 41, 1988.
23. *Bodmer W. F., et al.* Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. Nature, **328,** 614-627, 1987.
Harbour J. W., et al. Abnormalities in structure and expression of the human retinoblastoma gene in SCLC. Science, **241,** 353-357, 1988. (SCLC-мелкоклеточный рак легкого.)
Kok K., et al. Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. Nature, **330,** 561-578, 1987.
Leppert M., et al. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. Science, **258,** 1411-1413, 1987.
Minna J. D., et al. Molecular genetic analysis reveals chromosomal deletion, gene amplification, and autocrine growth factor production in the pathogenesis of human lung cancer. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., **51,** 843-853, 1986.

Предметный указатель

(Если какому-либо предмету посвящен целый раздел, то в указателе дается только его первая страница полужирным шрифтом)

Абсцизовая кислота III: 436
Авидность (антител) III: 236
Агрин III: 365
Адаптация (клеток-мишеней) II: **383**
«Адапторы» I: 133, 258, 260
Адгезионные пластинки II: 281, 480
- соединения II: 478
Адгезия (клеток) II: 431-435, **473;** III: 135-136. *См. также* Молекула адгезивности нервных клеток
Аденилатциклаза II: 356-360
Аденозиндифосфат (ADP) I: 87-89
Аденозинмонофосфат циклический *см.* Циклический AMP
Аденозинтрифосфат (ATP) I: 83-89
- гидролиз и реакции биосинтеза I: **95**
- и мышечное сокращение II: 260-263
- синтез в митохондриях I: 438-440, 442-444
- строение I: 78
Аденозинтрифосфатаза (АТРаза) I: 384-389
Аденозинтрифосфат-синтетаза (ATP-синтетаза) I: **447**
Адреналин III: 327
Адренэргические рецепторы II: 360, 368
Азот, круговорот I: 93
Азотфиксация I: 93; III: 406-408
Акросомальная реакция III: 43, 52
Акросомальный отросток II: 288, 289; III: 43
Аксон III: 288
- кальмара III: 298-299
Аксонема II: 293, 296-299
Аксонный транспорт III: 291-293
Активатор М-фазы II: 399
Активный транспорт I: 382-395
- центр I: 83
Актин I: 151, 152; II: 258, 304
- полимеризация II: 283-284, 286-290
α-Актинин II: 266-267
Актиновые филаменты II: 258-264, 276
- - и движение клеток II: 324-326
Актин-связывающие белки II: 279, 290-291
Аллельное исключение III: 247
Аллостерические белки I: 162-167
Амилопласты III: 414
Аминоацил-тРНК-синтетазы I: **260**
Аминокислоты в белках I: 72
- незаменимые I: 93
- синтез у бактерий I: 107
Амплификация генов (ДНК) II: 237; III: 464, 473, 474, 478
Амфипатические молекулы I: 351
Анаболические реакции I: 83
Анафаза II: 451-455
Анкирин I: 366; II: 279
Антенный комплекс I: 468
Антиген, взаимодействие с антителом III: 235-236
- процессинг III: 271
Т-Антиген II: 27
Антигенные детерминанты III: 222
Антиген-представляющие клетки III: 266, 270-271
Антиген-связывающие участки III: 229, 268-270
Антигены Н-2 III: 263
Антикодон I: 133, 258
Антимитотические агенты II: 303
Антипорт I: 383, 391
Антисмысловые РНК I: 245-246
Антитела *см. также* Иммуноглобулины
- классы III: 231-234
- - переключение III: 249-250
- мембраносвязанная и секретируемая формы III: 248-249
- мечение ими молекул I: **223**
- моноклональные I: 225
- создание разнообразия III: **242**
- структура III: 230-234
- тонкая III**: 237**
- функциональные свойства III: **228**
- Fab- и F(ab')-фрагменты III: 230-231
Аплизия III: 330-333
Апопласт III: 402
Аррестин II: 384
Архебактерии I: 22/23
Асимметрия (в процессах онтогенеза) III: 97-99
Аспартат (как нейромедиатор) III: 316-317
Аспартат-транскарбамоилаза I: 164
Ассоциативное научение III: 334-336
Астроциты III: 94, 294
Атаксия-телеангиэктазия III: 463
Аттенуация транскрипции II: 222
Ауксины III: 436, 437
Аутокринная стимуляция II: 348
Аутофагия, аутофагосомы, аутофаголизосомы II: 68
Афлатоксин III: 450
Аффинная хроматография I: 213
Ацетилаза гистоновая II: 130
N-Ацетилглюкозамин(GlcNac) фосфотрансфераза II: 72-73
Ацетилкофермент А (ацетил-CoA) I: 86-87, 100-101, 437
Ацетилхолин и его рецепторы I: **402;** II: 368; III: 313-315, 317
Ацетилхолинэстераза III: 315
Ацетил-CoA-дегидрогеназа I: 436
Ацетосирингон III: 409
Аэробные процессы I: 27

Базальная мембрана II: 487, 506-509; III: 173
- и рак III: 461-462
Базальное тельце II: 300
Байндин III: 44
Бактерии I: 22, 27
- мембраны II: 8
- регуляция активности генов II: 183-187, 199-200
- транспортные системы I: 393-394
- фотосинтез I: 470-472, 480
- хемиосмотические механизмы I: **458**
- хемотаксис II: 385-390
- эволюция метаболизма I: 478-483
Бактериородопсин I: **370**
Бактериофаг лямбда I: 311; II: 106, 109, ПО, 204-205
Бактериофаги I: 154, 314, 316; II: 106, 108
- лизогенизирующие I: 319
Барра тельца II: 208
Белки, аминокислоты в них I: 72
- ассоциированные с микротрубочками (БАМ) II: 310
- гликозилирование II: 52
- минорные I: 243
- направленное перемещение I: 165-167
- обновление II: 20-22
- последовательность аминокислот I: **129, 137**
- посттрансляционные модификации II: 18-19
- теплового шока II: 23
- транспорт в клетке II: 13-17, **24,** 78-81
- укладка полипептидной цепи I: 137-142
- функции I: **155**
- эволюция I: 146-149
G-Белки II: 354, 357-360, 379; III: 326, 331-333
- активаторы их II: 368
ras-Белки II: 360, 367
Белки-переносчики I: 381, **383**

- фосфолипидов II: 57
Белки-репрессоры II: 184-186
Белковые комплексы, самосборка из субъединиц I: 150-153
Белковый синтез I: 18, **253.** *См. также* Трансляция
- - ингибиторы I: 274
- - эволюция I: 275-276
Белок, структура I: **137**
- - первичная и вторичная I**: 143**
Белок cro II: 104, 105, 204
- гесА I: **305**
Белок-активатор катаболизма (САР) II: 187
Бенс-Джонса белки III: 237
Бесклеточные системы I: 270
Библиотеки ДНК I: 327-331
Биосинтез и катаболизм I. **104**
Биотин I: 101
- сродство к стрептавидину I: 224-225
Блоттинг I: **239**
Бомбезин III: 478
Брожение I: **477**

Вакуоли (у растений) III: 414-416
Вандерваальсовы взаимодействия I: 114, 115
Векторы, вирусные и плазмидные **I: 327**
Веретено (митотическое) II: 438, 439
Взрывообразующие единицы эритроидного ряда (ВОЕ-Э) III: 186
Виментин II: 314, 315
Винкулин II: 282
Виргильные лимфоциты III: 225, 231
Вирус саркомы Рауса I: 320; II: 426; III: 466, 469
- SV40 II: 136; III: 466-469
Вирусные онкогены II: 367, 427-433
Вирусы I: **313,** 424; II: 79-81
- белковые оболочки I: 151-153, 315; II: 79-81
- и рак у человека III: 467
- опухолевые I: 320-321; III: 466-471
- репликация генома I: 317-318
Вителлиновый слой III: 27
Вкусовые почки III: 153
Внеклеточный матрикс II: **486;** III: 195
- - твердый III: **197**
Внутриклеточные посредники II: 354
Вода, химические свойства I: 62-63
Водородные связи I: 114
Волосковые клетки (уха) II: 330; III: 338-341
Восстановление I: 82
Вставочный мутагенез III: 469, 471
Вторичный транскрипт II: 149
Высокоэнергетические связи I: 84
Вытеснение метки I: 222

Галактозилтрансфераза II: 60
Гаметы III: **25**
Гамма-аминомасляная кислота (ГАМК) III: 316-318
Ганглиозиды I: 358-359
Гаптены III: 223
Гаструляция III: 60-66
Гельзолин II: 276
Гель-фильтрация I: 212
Гель-электрофорез I: 216-218, **232**
Гематоэнцефалический барьер III: 294
Гемицеллюлоза III: 384-386
Гемопоэз III: 180-188
«Генеалогия клеток» у нематод III: 85
- - - - роль генов III: 88-94
Генетическая рекомбинация I: **301**; III: 17
- сайт-специфическая I: 310
Генетическая трансформация I: 246
Генетический код I: 132, 263
- митохондрий I: 491
Генная инженерия I: **326**
Геном, репликация II: 400-402
- сохранение постоянства при дифференцировке клеток III: 71-72
Геномная ДНК I: 328
Геномный импринтинг III: 83-84
Гены II: 99
- «домашнего хозяйства» II: 219
- иммуноглобулинов III: 239-240, 243-250
- иммунного ответа (Ir) III: 279
- полярности яйца III: 114
- - сегментов III: 120, 127
- сегментации III: 116
- экспрессия *см.* Экспрессия генов
- эффект положения II: 211
- ядерный геном II**: 236**
Гены-супрессоры опухолевого роста III: 466, 476-480
Гепарансульфат II: 489
Гепарин II: 489
Гепатоциты III: 162
Гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиновые частицы (гяРНП-частицы) II: 153-154
Гетерохроматин II: 131-132, 207-210
Гетерохронные мутации III: 90
Гиалуроновая кислота II: 489-490
Гиббереллины III: 436
Гибридизация нуклеиновых кислот I**: 237, 241, 304**
- субтрактивная I: 331
- in situ I: 242, 331
Гибридомы I. **226**; III: 237
Гибриды клеточные I: **206, 226**
Гидра I: 44-46
Гидрид-ион I: 441
Гиперполяризация III: 297
- мембраны палочек III: 342
Гипоталамус II: 340-341
Гиппокамп III: 335-336
Гистамин I: 410; II: 347
Гистоновый октамер II: 112
Гистоны I: 40; II: 110-115
Гистосовместимость III: 263
Главный комплекс гистосовместимости (МНС) III: 263-271, 278-280
- - - полиморфизм III: 280
Гланцмана болезнь II: 510
Глиальные клетки III: 293-294
- дифференцировка III: 94-96
- - радиальные III: 348-349
Глиальный фибриллярный кислый белок II: 314, 315
Гликоген I: 435, 436; II: 372-375
Гликогенсинтаза I: 436; II: 373
Гликогенфосфорилаза I: 436; II: 379
Гликозаминогликаны II: 487-489, 492
N-Гликозилирование II: 61-63
Гликокаликс I: 378
Гликолиз I: 87-89
Гликолипиды I: **357**
Гликопротеины II: 52
- адгезивные II: 504
Гликосфинголипиды II: 55
Гликофорин I: **367**
Глиоксисомы II: 36-37
Глицеральдегид-3-фосфат I: 88, 464, 465, 476
Глобиновые гены II: 238-239
Глобины II: 238-239
Глутамат (как нейромедиатор) III: 316
- его рецепторы (NMDA-рецепторы) III: 335-336, 374
Глюкоза, строение I: 66
Глюконеогенез I: 107, 108
Гольджи аппарат I: 409, 413; II: 10-14, **58**; III: 416, 419
- положение в клетке II: 312-313
- цистерны II: 65
Гомеобокс III: 130-132
Гомеозисные (гомеотические) мутации и гены II: 182, 220-221; III: 109-110
- селекторные гены III: 110, 121-130
Гормон роста III: 196
Гормоны (таблица) II: 342-344
- стероидные II: **349**
Градиент плотности I: 209
Гуанилатциклаза II: 377
гяРНП-частицы II: 153-154

Движение клетки II: 323-327
- цитоплазмы II: 276-277
Деацетилаза гистоновая II: 130
Дезоксирибонуклеозидтрифосфаты I: 125
Деление клеток II: **394**. *См. также* Клеточный цикл, Митоз, Мейоз
- - гены «социального контроля» II: **425**
- - и прикрепление к субстрату II: 420-421
- - механика *см.* Митоз
- - регуляция у дрожжей II: **407**
- - - у многоклеточных II: 414

- - состояние G_0 II: 422-424
Дендриты III: 288
Деполяризация III 297
Дерма, контроль над производными эпидермиса III: 137
Дерматансульфат II: 489
Десенситизация II: 383-385
Десмин II: 314, 315
Десмосомы, полудесмосомы II: 480-481
Десмотубула III: 399
Дестабилизирующие аминокислоты II: 21
Детергенты I: 362
Детерминация (клеток) III: 81-83
Диацилглицерол II: 356
Диктиосома II: 58
Динеин II: 295, 297
- цитоплазматический II: 311-312
Динитрофенильная группа III: 223
Диплоидность, генетическое преимущество III: 10-14
Дискоидин-1 II: 517
Дисплазия III: 453-454
Дисульфидизомераза II: 51
Дисульфидные связи I: 138/139
Дифракция рентгеновских лучей I: 190-193
Диффузия I: **115,** 374
ДНК I: 20, 123-130; II: 95-100
- клонирование I: **231,** 326
- мегилирование II: 216-219
- мобильные элементы I: 37
- репарация I: 276
- репликация I: 125-129, **287**
- - коррекция I: 289-291, **295**
- A-, B- и Z-формы П: 107, 108
ДНК-геликазы I: 292
ДНК-гираза II: 213
ДНК-гликозилазы I: 283
ДНК-зонд (радиоактивный) I**: 333**
ДНК-лигаза I: 281, 283
ДНК-полимераза I: 281-282
- α и δ II: 136
ДНК-праймаза I: 291
ДНК-репарирующие нуклеазы I: 281
ДНК-связывающие белки II: 101-106
ДНК-топоизомеразы I: **297**
ДНК-футпринтинг I: 235, 237
Додецилсульфат натрия I: 215, 362
Долговременная потенциация III: 335-336
Долихол II: 52-53
Домены I: 143, 148-149
Дородовая диагностика наследственных болезней I: **240**
Дробление III: 59
Дрожжи I: 11
- генетика I: 493-496; II: 201-203
- - мутанты *cdc* II: 409-413
- клеточный цикл II: **407**
Дыхательная цепь I: **447**. *См. также* Электрон-транспортная цепь
Дыхательный контроль I: 457

Емкость (мембраны) III: 296

Жгутики *см.* Реснички
- бактериальные II: 386
Железо-серные белки, железо-серные центры I: 451-453
Жирные кислоты I: **69**
Жировые клетки III: 196

Замораживание быстрое I: 176
Замораживание -скалывание I: 186-187, 368, 369
Замораживание-травление I: 188
Звезда (в митозе) II: 306
Зимогеновые гранулы II: 12
Зимогены II: 11
Злокачественные опухоли *см.* Рак
Зрительная система, развитие (влияние сенсорного опыта) III: 370-374

Идиотопы III: 251-252, 277
Изоэлектрическое фокусирование I: 217
Имагинальные диски III: 123-125
Иммунная система I: **50**; II: **215**
Иммунные ответы, гуморальные и клеточного типа III: 215-216, 218
- - гены III: 279
- - клеточного типа III: **259**
- - первичные и вторичные III: 224-225
Иммуноглобулиновая укладка III: 240
Иммуноглобулиновое суперсемейство III: 281
Иммуноглобулины (Ig). *См. также* Антитела
- гипервариабельные области цепей III: 238
- кодирование в ДНК III: 239-240, 243-250
- L- и H-цепи III: 237-241
Иммунологическая память III: 224-226
- сеть III: 251
- толерантность III: 226-228
Импульсная метка I: 222
Инволюкрин III: 171
Ингибитор трипсина I: 143, 144
Индолилуксусная кислота III: 409, 436
Индукция (в эмбриогенезе) III: 74-75
Индуцируемый путь развития III: 95
Инозитолтрифосфат ($InsP_3$) II: 363-365; III: 49
Инсерционный (вставочный) мутагенез III: 469, 471
Инсулин I: 129, 154; II: 345
Интегральные мембранные белки I: 361
Интегрины II: 480, **509**; III: 136
Интеркалярная регенерация, правило интеркаляции III: 106-108
Интерлейкины III: 186, 271-274, 275 (таблица)
Интерфаза II: 395
Интерференционный микроскоп I: 178
Интерференция света I: 174
Интерферон III: 274
Интроны I: 130, 131, 134-136, 492-493; II: 155-157
Информационная РНК *см.* РНК
Ионные взаимодействия I: 114
- каналы I: 394. *См. также* Лиганд-зависимые ионные каналы *и* Потенциал-зависимые ионные каналы
- - и адаптация Ш: 323-324
- - с регулируемой проницаемостью Ш: 295
Ионный ток III: 296
Ионофоры I: **406**, 456
Ионы, внутриклеточные концентрации I: 196, 380

Кабельные свойства (аксона) III: 297
Кадгерины II: 521-522; III: 135-136
Калиевые каналы III: 322-324
- - быстрые III: 323
- - медленные III: 298, 323
- - проточные I: 396-399
Каллус III: 437-438
Кальвина -Бенсона цикл I: 464
Кальмодулин II: 375
Кальсеквестрин II: 362
Кальциевые ионофоры II: 366
- каналы III: 306
- насосы (Ca^{2+} -насосы) I: 387, 389
Кальций, ионы (Ca^{2+}) П: 361-366
- - и активация яйцеклетки III: 45-46
- - и мышечное сокращение II: 264-266
- - и полярность растительных клеток III: 434-435
- механизм действия П: 375-376
Кальций(Ca^{2+}) запасающие органеллы П: 362
Каналообразующие белки I: 381, 394
Каналы ионные *см.* Ионные каналы, *а также* Калиевые каналы Кальциевые каналы, Натриевые каналы
Канцерогены химические III: 450-451
Капацитация III: 51
Капилляры, образование III: 165-167
Капсид I: 315; II: 79
Кардиолипин I: 432
Каротиноиды I: 468
Картагенера синдром II: 299
Картирование геномов I: **324**
Карцинома (рак) in situ Ш: 453, 454
Катаболизм I: **104**
Катаболические реакции I: 83, 107
Каталаза П: 35-37
Кератансульфат II: 489
Кератины II: 314, 315; III: 172
Киллеры (NK-клетки) III: 262-263
Киназа легких цепей миозина II: 269
- фосфорилазы II: 373, 376
A-Киназа II: 372, 373
C-Киназа II: 366

PI-Киназа II: 369
Ca-Киназы II: 376
Кинезин II: 311-312
Кинетохоры II: 445-448
Кислород (в атмосфере) I**: 481**
Клатрин I: 412; II: 83
Клетки, их основные типы у животных I: 38-39, **49**
- их типы у человека (перечень) III: **204**
- методы разделения I: **201**
- рост II: 394
- слияние I: 206
Клетки-кормилицы III: 30
Клеточная память III: **71,** 101, 128
- пластинка II: 461; III: 419
- стенка (у растений) III: **382**
- - гликопротеины III: 388
- - первичная и вторичная III: 392-395
- - поры III: 388
Клеточное деление *см.* Деление клетки
- дыхание, эффективность I: 446
- старение II: 423-424
Клеточный анализатор, флуоресцентно-активируемый I: 202
- кортекс II: 274, 278, 325-326
- центр II: 301, 306
- цикл, фазы II: **394**
- - - измерение длительности II: 396-399
Клональная делеция III: 277
- селекция III: 220-223
Клонирование ДНК I: **231**, 326
Клонирующий вектор I: 243
Ковалентные связи в биологических молекулах I: 64-65
Кодон (триплет) I: 132
Кожа III: 151
Коклюшный токсин II: 360
Колбовидные клетки III: 63
Колбочки III: 157, 342

Коллаген I: 142-143; II: 494-502
- таблица типов II: 495
- тип IV II: 501-502, 507, 508
Коллагеназы II: 497
Коллагеновые фибриллы, их организация в матриксе II: 499-501
Колониеобразующая единица (КОЕ) III: 182-183
Колониестимулирующие факторы III: 184, 186, 187
Колонки глазодоминантности III: 371
Колхицин II: 303
Компартментализация I: 110; II: 5
Компартменты клеточные II: 5
Комплекс b-c_1 I: 452, 454, 471, 472, 481
- b_6-f I: 472
Комплексы, атакующие мембраны III: 252, 256-257
- H-2 и HLA III: 264
Комплемент III: **252**
Комплементарная ДНК-копия I: 329-331
Кональбумин II: 381
Конверсия генов I: **309**
C3-Конвертаза и C5-конвертаза III: 253-255
Конденсирующие вакуоли II: 12
Коннексоны II: 482-483
Константные и вариабельные области (в цепях антител) III: 237-238
Конститутивная секреция II: 74
Конститутивный путь развития III: 95
Контактное ингибирование движения II: 328
- - деления II: 420
Конусы роста III: 350-357
Конформация I: 137
Конъюгация хромосом III: 18, 24
Кооперативное связывание II: 106, 107
Корневые клубеньки III: 407-408
Кортиев орган III: 339
Кортизол II: 344, 350
Кортикальная реакция (яйца) III: 47-48
Костный мозг III: 180-181
Кость III: **197**
Кофермент QI: 451
Коферменты I: **100,** 157-158
Крахмал I: 465
Кребса цикл *см.* Цикл лимонной кислоты
Криоэлектронная микроскопия I: 189
Кристаллины III: 155
Кристы I: 434

Кроветворение III: 180-188
Кроссинговер III: 17
Ксилема III: 403-404
Культивирование клеток I: 201
- - состав среды Г. 205
- растительных клеток и тканей III: 437-438
Культура тканей, история I: 207
Культуры (клеток) первичные и вторичные I: 204
Кутин, кутикула (у растений) III: 395
Кэпирование II: 149, 309
Кэпирующие белки II: 291
Кэппинг I: 419-420

Лактозный оперон II: 183-187
Ламеллоподии II: 285, 287, 323-326
Ламинин II: 506-508; III: 356
Ламины II: 318
«Ламповые щетки» II: 123-124
Леггемоглобин III: 408
Легкие цепи (L-цепи) антител III: 230, 234
Лейкоцитарной адгезии дефицит II: 511
Лейкоциты III: 177-179
Лектины Г. 377-378
Лецитин *см.* Фосфатидилхолин
Лиганд-зависимые ионные каналы III: 304
Лигнин III: 394
Лидерная последовательность II: 153
Лидерный пептид II: 43
Лизосомные болезни накопления II: 73
Лизосомы II: **66**
Лизоцим I: 158
Лимонная кислота (цитрат) I: 90
Лимфоидные органы III: 217-219
Лимфокины III: 275
Лимфоциты III: 216
- вспомогательные гликопротеины на поверхности Т-клеток (таблица) III: 276
- В и Т III: 218-220
- Т-клеточные рецепторы III: 260-261
- циркуляция III: 223-224
Т- Лимфоциты и клеточный иммунитет III: **259,** 271
- хелперы III: 270-276
Линии клеточные I: 206
Линкерная последовательность II: 112
Линкерный (связующий) трисахарид II: 490
Липидный бислой I: 349, **350, 423**
Липиды I: 350-351
- содержание в мембранах I: 355
«Липкие концы» I: 231, 327
Липокортины II: 348
Липопротеины низкой плотности (ЛНП) I: **414**
Липосомы I: 352
Локальные потенциалы III: 295
- химические медиаторы II: 342, 347
Люлиберин II: 343
Лютеинизирующий гормон II: 343
Лямбда-интеграза I: 311

Макромолекулы I: 113
Макрофаги, активация Т-хелперами III: 274
Малые молекулы I: **59**
- - транспорт I: 379
- ядерные рибонуклеопротеиновые частицы II: 154-155
Маннозо-6-фосфат II: 69, 72
- его рецептор II: 69-71
Матрикс *см.* Внеклеточный матрикс
Матричная РНК *см.* РНК
Межклеточная химическая сигнализация II: **338**
Межклеточное узнавание II: **513**
Межклеточные соединения II: **474**
Мезенхима III: 61, 62
Мезодерма III: 63, 136-137
- индукция ее образования III: 74-75
Мезосома II: 10
Мейоз III: 14
Мелкоклеточный рак легкого III: 478-480
Мембранные белки I: 360
- - диффузия I: **372**
- - транспортные I: 381
- углеводы I: **377**
Мембранный потенциал I: **396**

- - действия I: **399.** *См. также* Потенциал действия
- - покоя I: 398
Мембраносвязанные антитела III: 248
Мембраны. *См. также* Плазматическая мембрана
- внутриклеточные I: **33;** II: 7
- ёмкость III: 296
- липидный состав I: 355
- рециклирование (у растений) III: 419
- слияние I: **423**
Меристемы III: 427-429
Метаболизм, регуляция I: **104**
Метаболическая кооперация, метаболическое сопряжение (клеток) II: 481-482
Метаболические пути I: 23-24
Метилазы, поддерживающая и утверждающая II: 216, 217
Метилирование ДНК II: 216-218; III: 83
5-Метилцитозин II: 216
Миастения III: 227
Миграция клеток II: 324-327; III: 139-141, 348-349
Миелин, состав I: 355
Миелиновая оболочка III: 300, 302-303
Микориза III: 406
Микроворсинки I: 393; II: 279-281
Микроглия III: 293
β_2-Микроглобулин III: 265, 269
Микроинъекции I: 199
Микроскопия I: **172**
Микросомы II: 41-42
Микротельца *см.* Пероксисомы
Микротрубочки И: 294-295
- интерфазное скопление II: 439
- скольжение И: 297-298
- центр организации II: 306, 439
- цитоплазматические II: **302**
Микрошипики II: 285, 287; III: 351
Микроэлектроды I: 196-197
Миксамебы (слизевиков) II: 514-517
Миниатюрные синаптические потенциалы III: 309, 312
Миобласты II: 182; III: 190-192
Миозин II: 259-263
Миомезин II: 266, 267
Миофибриллы II: 255-256
Миоэпителиальные клетки II: 268
Митоз, механика II: **438**
- М-стимулирующий фактор (MPF) II: 402-407
- стадии II: 439-443
- эволюция II: 465-467
Митотическая рекомбинация III: 125-127
Митохондрии I: **30, 431**
- геномы I: **485, 490**
- деление I: 486
- мембраны I: 431-434
- перенос белков в них II: 29-33
- роль ядерных генов I: 495-497
Михаэлиса константа I: 159
Многоклеточные организмы, возникновение I: 41
«Многопроходные» белки II: 48
Мобильные генетические элементы I: 314
Молекула адгезивности нервных клеток (N-CAM) и молекула адгезивности нейрон-глия (Ng-CAM) II: 520-522
Молекулярная генетика и развитие растений III: 438-440
Молекулярное узнавание I: **113**
- - ошибочное I: 122
Молекулярные насосы I: 166-167
Молочная железа III: 174-176
Моноаминовые медиаторы III: 327-328
Моноклональные антитела I: 226
Моносахариды I: 61
Морфин II: 384, 385
Морфоген III: 99-100, 104-106
Морфогенез, его генетика у дрозофилы III: 109-134
Морфогенетические взаимодействия при образовании пространственных структур III: **97,** 135
- - у растений III: 429-436
- движения III: 57, 135
Мультиферментные комплексы I: **160**
Мускариновые рецепторы II: 368
Мутагенность и канцерогенность III: 450
Мутанты I: 244-246
Мутации I: **128,** 277-281
- гетерохронные III: 90
- термочувствительные II: 84
Мышечное сокращение II: **255**
Мышцы II: 267-268; III: **189**
- влияние активности на иннервацию III: 356-369

Насекомые, развитие III: 110-116
Натриевая проводимость III: 296
Натриево-калиевый насос (N^+K^+-насос) I: 384-387
Натриевые каналы I: **400**
- - и потенциал действия III: 298
- - в фоторецепторах III: 343-344
Небулин II: 266
Негативное контрастирование I: 188-189
Незаменимые аминокислоты I: 93
Нейриты II: 324; III: 351
- адгезия (молекулы N-CAM и Ng-CAM) III: 355
Нейромедиаторы II: 342 (таблица); III: 304
- высвобождение «квантами» III: 309
- структура III: 316
Нейроны *см.* Нервные клетки
Нейропептиды III: 328-330
Нейрофиламенты II: 314, 315, 319
Нековалентные связи I: 114-118
Нексин: II: 298
Нематоды, развитие III: **85**
- - роль генов III: 88-94
Нерасхождение хромосом III: 16
Нервная система III: **287**
- - развитие III: 67-68, **346**
- - - теория нейронной специфичности III: 356-357
- трубка III: 67-68, 346-348
Нервно-мышечная передача I: **405**
Нервно-мышечное соединение III: 305-309
Нервные клетки I: 51-56; III: **287**
- - беспозвоночных III: 324-325
- - выживание и гибель III: 358-361
- - рост отростков III: 350-357
- - сенсорные III: 337-338
- связи, конкуренция между синапсами в процессе их образования III: 367-374
Нервный гребень III: 67, 139
Нернста уравнение I: 397-398; III: 296
Нециклическое фосфорилирование I: **472**
Никотинамидадениндиуклеотид (NAD^+, NADH) I: 88-92, 437 440
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NADP, NADPH) I: 89, 101-103
- в фотосинтезе I: 462-465, 470-475
Нитрогеназа III: 407
Нодулины III: 408
Нозерн-блоттинг I: 239
Норадреналин III: 327
Нуклеиновые кислоты I: 78, **123.** *См. также* ДНК, РНК
- - - гибридизация I: **237**
Нуклеокапсид II: 79
Нуклеолин II: 164
Нуклеоплазма II: 25
Нуклеоплазмин II: 26
Нуклеосомы II: 111-117
Нуклеотиды I: 75
- комплементарное спаривание I: **123**

Облегченная диффузия I: 382
«Обратная генетика» I: 245
Обратная транскриптаза I: 320, 329
Обратные связи I: **106,** 162
Овальбумин II: 381
Окаймленные пузырьки и ямки I: 411-413, 419; II: 59, 83
Окисление I: 82
Окислительно-восстановительный потенциал (редокс-потенциал) I: **454**
Окислительное фосфорилирование I: 90-92, 438
Окислительный катаболизм I: **89**
Окрашивание (клеток) I: **176**
Оксалоацетат I: 90, 92, 437
Оксидаза D-аминокислот II: 35
2-Оксоглутарат I: 92
Олигодендропиты III: 94, 293
Олигосахариды I: 66
- модификация (процессинг) II: 59-61
Омматидии I: 54

Онкогены I: 321, 367, 370; III: 466, 468-476
ras-Онкогены II: 367, 470, 475
Оогенез III: 28-30
Ооциты, созревание III: 32-34
Опины III: 408
Оплодотворение III: 42
- ход событий у морского ежа III: 50
Опоясывающие десмосомы (адгезионные пояса) II: 282, 329, 478-479
Опсин III: 343
Опухолевая прогрессия III: 452-457
Опухолевые промоторы III: 456-457
Опухолевый инициатор III: 455
Опухоли злокачественные *см.* Рак
Органеллы I: 27
- перенос в них белков и липидов I: 498-499
- симбиотическая гипотеза I: **31, 499**
Органогенез III: 134
Остеобласты, остеокласты III: 199-201
Отторжение трансплантата III: 263

Палочки III: 157-159, 342
Папилломавирусы III: 468
Паповавирусы III: 468
Паракринная сигнализация II: 339, 347
Паратгормон II: 343
Пассивный транспорт I: 382
Пектины III: 385-387
Пемфигус II: 481
Пептидилтрансфераза I: 266
Пептидная карта I: 219
- связь I: 72
Первичный транскрипт I: 131
Перенос химических групп Г. **100**
Переносчик-обменник $Na^+ + H^+$ I: 391-392
Переходные элементы (эндоплазматического ретикулума) II: 12, 59
Перинуклеарное пространство II: 24
Периплазматнческие субстрат-связывающие белки I: 394
Периферические мембранные белки Г. 361
Перманентные клетки III: **154**
Пероксидаза хрена (ПХ) III: 293
Пероксисомы II: 35
Перфорины III: 263
Печеночные клетки (гепатоциты) II: 7, 8, 162
Печень III: 160-163
Пигментная ксеродерма III: 463
Пиноцитоз, пиноцитозные пузырьки I: 410, 411
Пиримидиновые основания I: 75
Пируват I: 86
Пируватдегидрогеназа I: ПО
Пируватдегидрогеназный комплекс I: 435, 437
Пищеварительный тракт, эпителий III: 160
Плавучая плотность I: 209
Плазматическая мембрана I: 19-20, **349**
Плазматические клетки III: 219, 220
Плазмиды I: 324**, 327**
Плазмин II: 432
Плазминоген и его активатор II: 432
Плазмодесмы III: 399-400, 402
Пластиды III: 412-414
Плотные контакты (соединения) I: 375, 376; II: 475-477
Плюрипотентные стволовые клетки и кроветворение III: 176
Повторяющиеся последовательности II: 242
Позиционная информация III: 97, 101-104
-- имагинальных дисков III: 123-125
-- мезодермы III: 136-137
Позиционные сигналы II: 436-437
Полиаденилирование (РНК) II: 225-226
Полимеразная цепная реакция I: **341**
Полимеры биологические, синтез I: **103**
Полинуклеотиды I: **13**
- матричное копирование I: 14-15
Полипептиды I: **17**
Полипротеины II: 64; III: 329
Полирибосомы I: 134, 271
Полисахариды I: 66
Полиспермия, блокада III: 46-48
Политенные хромосомы II: 125-128, 132; III: 31
Половое размножение I: 48-49
- - преимущества III: 7
Половые клетки III: 7
«Полоса 3» (белок, транспортирующий анионы) I: **369**
Полуконсервативная репликация I: 125, 129
Полярное тельце III: 28
Полярные гранулы III: 26
Поперечные трубочки (Т-трубочки) II: 264
Поровые комплексы II: 24-25
Поры (белковые каналы) I: **394, 396**
Постсинаптический потенциал (ПСП) III: 312, 320-322
Посттранскрипционный контроль II: **221**
Посттрансляционные модификации белков II: 18
Потенциал действия III: **295**
Потенциал-зависимые ионные каналы I: 399-402; III: **295**
- - - совместное действие III: 322-324
Праймосома I: 293
Пребиотические условия I: 13
Пре-В-клетка III: 231
Препрофазный пучок III: 431-433
Пресинаптическое торможение и облегчение III: 325, 332-333
Привыкание (у аплизии) III: 330-332
Прикрепительные контакты II: **477**
Провирусы I: 319
«Прогулка по хромосоме» I: **333**
Прокариоты I: **22**
Проколлаген II: 497
Промежуточные филаменты II: **313**
Промотор I: 255-257; II: 191-192
Пропластиды III: 412-414
Простагландины II: 342, 348
Простейшие I: **35**
Пространственная суммация ПСП III: 320
Пространственные структуры, развитие III: **97, 134**
Протеинкиназа А (А-киназа) II: 372, 373
- С (С-киназа) II: 366
Протеинкиназы I: ПО; И: 369-371, 374
- Ca^{2+}/кальмодулин-зависимые (Са-киназы) II: 376
- кодируемые онкогенами III: 471
- тирозин-специфические II: 368-370
Протеогликаны I: 377; II: 63-64, 490-494
Протонный градиент I: 440-443
Протонодвижущая сила I: 442
Протоонкогены II: 367, 428-433; III: 466
Профилин II: 288
Психотропные препараты (воздействие на синапсы) III: 318
Псориаз III: 174
Пульс-электрофорез I: 233
Пуриновые основания I: 75
Пуфы II: 126-128, 351
Пэтчинг I: 373, 420
Пэтч-регистрация I: 197-198

Рабль-ориентация II: 167-168
Равновесие химическое I: 120-121, 159
Радиальные глиальные клетки III: 348-349
Радиоавтография I: **223**
Радиоизотопы I: 223
- мечение ДНК I: 233
Разобщающие агенты I: 456
Рак III: **445**
- виды опухолей III: 446-448
- и клеточная дифференцировка III: 459-461
- метастазирование III: 446, 461-462
- молекулярная генетика III: **465**
- моноклональное происхождение III: 448-449
- эпидемиологические данные III: 447, 457-458
Раковые клетки II: **425.** *См. также* Рак
Рамки считывания I: 132
Рамногалактуронан III: 387
Ранвье перехваты III: 303
Растения, клеточные основы развития III: **426**
- раннее развитие III: 401, 427
- типы клеток и тканей III: 396-397
- эволюция III: 392
Растительные клетки III: **382**
- - рост III: 389-390
- - цитоскелет III: 424-426
«Раффлинг» II: 287
Реагрегация диссоциированных клеток И: 519
Регенерация конечностей у позвоночных III: 103-104
--у тараканов Ш: 107-108
Резонансная передача энергии I: 467
Рекомбинантные ДНК I: **228, 342**

Рекомбинационные узелки III: 19
Рекомбинация сайт-специфическая I: 310
Рентгеноструктурный анализ *см.* Дифракция рентгеновских лучей
Репарация ДНК I: **276**
- - и рак III: 462-463
Репликационная вилка I: **287**, 292-294, 296
Репликационный глазок I: 296; II: 134
Реснички (и жгутики) II: **292**
Рестрикционные карты I: 230-231
- фрагменты I: 230, 327
Рестрикция MHC III: 266, 278
Рестрицирующие нуклеазы I: 230, **236**
Ретиналь III: 343
Ретинобластома III: 476-477
Ретиноевая кислота III: 104-106
Ретровирусы I: 320-322; III: 467-471
Ретротранспозоны I: 322
Рецепторный потенциал III: 337-338
Рецепторы, не связанные с каналами III: **326**
Рибосомные РНК II: 162-167
Рибосомы I: **133,** 264-269
- и ЭР II: 39-40
- связывающие участки I: 265-266
Рибулозо-1,5-бисфосфат I: 463-465
Рибулозобисфосфат-карбоксилаза I, 463
РНК I: 130-136; II: 152
- антисмысловые I: 245-246
- выход из ядра II: 28, 227
- добавление polyA II: 149-150
- информационные (матричные, мРНК) I: 131-134; II: 149
- - редактирование II: 233-234
- каталитические функции I: **16, 134**; II: 234-235
- рибосомные (рРНК) I: 131, 133, 265; II: 162-167
- синтез I: 253; II: 143. *См. также* Транскрипция
- - ингибиторы I: 274
- стабильность II: 231-233
- транспортные (тРНК) I: 131, 133-134, 258-262
РНК-затравки (праймеры) I: 291
РНК-полимераза I: **254, 256**; II: 116-117
- белки-активаторы II: 186
- субъединицы II: 144
РНК-полимеразы I, II и Ш-см. II: 145-148
Родопсин III: 343
Рост клетки II**: 394**
Ростовые факторы *см.* Факторы роста

Сайленсер И: 203
Сакситоксин I: 401
Самосборка белковых структур I: 150-154
Самосплайсинг II: 160
Саркомеры II: 255, 257, 263
Сателлитная ДНК II: 208, 242
Саузерн-блоттинг I: 240
Сахара I: 61
Сахароза I: 465
Свечение I: 51
Свободная энергия I**: 94,** 444-445
Сдвиг рамки II: 230-231
Седиментации коэффициент I: 209
Секвенирование белков автоматическое I: 219-220
- ДНК I: **234**
Секреторные пузырьки I: 409; 11: 74-76
Секреторный компонент III: 233
Секреция, конститутивная и регулируемая II: 74
Сенситизация III: 331-333
Серин I: 106
Сериновые протеиназы I: 146, 156, 159
Сетчатка III: 156-159
Сиаловая (N-ацетилнейраминовая) кислота I: 358
Сигма-факторы II: 189-190
Сигналы ядерного импорта II: 27
Сигнальная пептидаза II: 46
Сигнальные пептиды II: 15, 29-30, 32, 43
- участки II: 15
Симбионты растений III: 406-408
Симбиотическая теория (об органеллах) Г**. 31, 499**; II: 9
Симпласт III: 402
Симпорт I: 383
Синапсин I (белок) III: 309
Синапсы III: 290
- образование и уничтожение III: **362**
Синаптическая базальная мембрана III: 364
Синаптические пузырьки III: 308
Синаптонемальный комплекс III: 18
Синезеленые водоросли *см.* Цианобактерии
Системная красная волчанка II: 155
Ситовидные трубки III: 394, 397, 404-405
Сканирующий электронный микроскоп I: 185-186
Скелет эукариотических клеток I: **34**
Скелетные мышцы III: 189
β-Складчатый слой I: 140, 141
Склеродерма П: 446
«Скользящих нитей» модель II: 257
Слияние клеток I: **206**
- мембран I: **423**
Соединительнотканные клетки III: **197**
Сократимое кольцо II: 438, 460
Соматическое гипермутирование III: 246
Соматостатин II: 343, 373
Сомиты III: 68-70
Сопряженные реакции I: 80, 84, **95**, 160
Сортер *см.* Клеточный анализатор
SOS-ответ I: 284
Спейсер II: 162
Спектрин I: **365;** II: **279**
Спермий III: 36-41
СПИД III: 270
α-Спираль I: 140, 141
Спиральные структуры I: 115, 119
Сплайсинг I: 131; II: 153-161
- альтернативный II: 158, 223-226, 273, 505; III: 130
- - при выработке антител III: 250
Сплайсосомы II: 154, 156, 160
Сродство, константа I: 121
Старт-кодон I: 269
Стволовые клетки III: **168, 176**
Стереоцилии II: 330-332; III: 338-341
Стероидные гормоны II: **349**
Стоп-кодоны I: 269
Стрептавидин I: 224-225
Стыкующий белок (рецептор SRP) II: 44-45
Субмитохондриальные частицы I: 417
Т-Супрессоры III: 275-277
Сфингомиелин II: 55

Таксол II: 303
Талассемия II: 159
Талин II: 282, 480; III: 262
Тандемные повторы II: 237
ТАТА-фактор, ТАТА-бокс II: 147, 191
Тектин II: 295
Теломера II: 96, 138
Темнопольный микроскоп I: 180
Тератокарцинома III: 78-80
Терминальная сеть II: 280
Термодинамика I: 79-80
Тестикулярная феминизация II: 352
Тестостерон II: 344, 352
Тетродотоксин (TTX) I: 401
Тиаминпирофосфат I: 157-158
Тилакоиды I: 462; II: 33-34
Тимус III: 218-219, 277-279
Тиреоидный гормон II: 344, 346
Титин II: 266, 267
Ткани, поддержание организации и обновление III: **150**
Токи цитоплазмы (у растений) II: 277; III: 423-424
Точка рестрикции (R) II: 416
Трансгенные организмы I: 245, **338;** III: 247, 475
Трансдукция I: 325
Трансдуцин II: 377; III: 344
Транскрипция I: **130, 254, 256**
- аттенуация II: 222
- белки-регуляторы II: 179-183, 194-197, 205-207
- влияние транспозонов II: **183**
- контроль инициации II: 183
Транслокаторы фосфолипидов I: 353
Трансляция I: 132
- контроль II: 228-229
Трансмембранные белки I: **360; II**: 45-50
Транспозиция I: 321
Транспозоны I: 313, 321-324; II: 243-248
- у человека И: 247

Транспозазы I: 321
Транспортные пузырьки I: 409; II: 12, 14
Трансферрин I: 417
Трансформирующий фактор β2 III: 75
Трансцитоз I: 418; III: 234
Тредмиллинг II: 284
Трейлерная последовательность II: 153
Триацилглицеролы I: 72
Триглицериды *см.* Триацилглицеролы
Триплеты I: 132-133
Трискелион I: 412
Тромбоцитарный фактор роста (ТФР, PDGF) II: 417-419, 430, 432-433; III: 95
Тропоколлаген II: 497
Тропомиозин II: 265-266
Тропонин II: 265-266, 375
Тубулин II: 294, 302-304, 309. *См. также* Микротрубочки
Тургор III: 389-392
Тучные клетки I: 410; III: 233-234
Тяжелые цепи (Н-цепи) антител III: 230-234
Убихинон I- 451 454
Углерод, соединения I: **59** - фиксация I: 464
Узнавание межклеточное II: **513**
Ультрацентрифугирование I**: 208**
Унипорт I: 383
Упорядоченность биологических систем I: **79, 94**
Уратоксидаза II: 35
Устьица III- 391
Фабрициева сумка III: 219
Фагосомы, фаголизосомы I: 410, **420**
Фагоцитоз I: 410, 420-423
Фагоциты I: 420-422
Фазово-контрастный микроскоп I: **178**
Фактор инициации М-фазы (ФИМ) III: 33-34
- роста нервов (ФРН) III: 358-361
- - фибробластов (ФРФ) III: 75, 167
-- эпидермиса (ФРЭ) I: 418
- транскрипции III А II: 104
- элонгации I: 273; II: 144
Факторы инициации I: **267,** 272; II: 144
- роста I: **204**; II: 417-420
- - (таблица) II: 419
- транскрипции II: 146
Фаллоидин II: 290
Фанкони анемия III: 463
Фасцин II: 279
Ферментативный катализ I: 158-161
Ферментные каскады II: 378
Ферменты I: 83 - и регуляция метаболизма I: 106-110, 162-163
Ферритин II: 232
Фибриноген II: 510
Фибринопептиды I: 277
Фибробласты II: 182; III: 193
Фиброин I: 131
Фибронектин II: 48, 504-506 - его рецептор II: 510
Фиксация (тканей) I: 175
- напряжения III: 298-300
Филадельфийская хромосома III: 449
Филамин II: 375
Филоподии II: 285; III: 61, 62, 351
Фимбрин II: 279
Фитоалексины III: 410
Фитохром III: 435
Флавинадениндинуклеотид (FAD, FAD-H_2) I: 91-92, 437-438, 455
Флагеллин II: 386
Флип-флоп I: 353, 373; II: 55
Флоэма III: 403-405
Флуоресцентный микроскоп I: 177
Флуоресценция, восстановление I: 374
Фокальные контакты II: 271, 281-282
Фолликулы (яйцевые) III: 35
Форболовые эфиры II: 367; III: 456
Фосфатидилхолин I: 351; II: 53, 55, 56
Фосфокреатинкиназа II: 261
Фосфолипаза С фосфоинозитид-специфическая II: 364
Фосфолипиды I: 72, 351
- их белки-переносчики II: 57
Фосфопротеин-фосфатаза I: 110
Фосфофруктокиназа I: 109
Фотодыхание I: 465
Фоторецепторы III: 156-159, 341-344
Фотосинтез I: **80, 460**
- реакционный центр I: 371-372, 468-469
- у C_{14}-растений I: 465-467
- Z -схема I: 473
Фотосистемы I: 468
- (I и II) I: 472
Фрагмопласт II: 461; III: 418
Фракционирование клеточного содержимого I: **208**
Фруктозобисфосфатаза I: 109
Фузоген I: 426
Хемиосмотический процесс I: **438, 458**
Хемиосмотическое сопряжение I: 439
Хемотаксис И: 385-390, 515-516
Химеры III: 78
Химическая сигнализация (межклеточная) II: **338**
Химические синапсы I: 402, 403
Химотрипсин I: 147
Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (ХАТ) I: 337
Хлоропласты I: 460; III: 412, 413
- геномы I: 485, 489
- симбиотическая теория I: 31
- структура I: 461-462
Хлорофилл I: 467
Холерный токсин I: 359; II: 359
Холестерол I: 354, 414
Холлидея структура I: 307
Хоминг-рецепторы III: 224
Хондроитинсульфат II: 489
Хроматин активный II: 130-131
Хроматография I: **211,** 218
Х-Хромосома II: 208-209
Хромосомы I: 40
- белки и ДНК II: **95**
- репликация II: **133**
- структура II: **118**
-- петельная II: 118-119
Хромоцентры II: 208
Хрусталик III: 154-155
Хрящ III: 197-198
Целлюлоза III: 383-386
- организация микрофибрилл III: 420-423
Целлюлозосинтаза III: 420
Центриоли II: 299-302; III: 51
Центромера II: 96, 445
Центросома II: 301, 306, 307, 441
Центры связывания (у белков) I: 155
Церамид I: 357
Цианобактерии I: 26, 472, **481**
Цикл лимонной кислоты I**: 90**, 437
Циклин II: 405-407
Циклический AMP (cAMP) II: 355-356, 372-376; III: 32, 334 --у миксамеб II: 516 -
Циклическое фосфорилирование I: **474** Цинга И: 497
«Цинковые пальцы» II: 104 Цирроз III: 163
Цитозоль II**: 17**, 322
Цитокинез II: 458-464
Цитокинины III: 409, 436
Цитокины III: 275
Цитоплазматическая память III: 82
Цитплазматическое наследование генов органелл I: 493-496
Цитоплазматический осциллятор II: 405
Цитоскелет II: **254**
- организация II: **320**
Цитотоксические Т-клетки III: 218, 261-263, 266-268
Цитохалазины II: 289
Цитохром a_3 I: 453
-b_{562} I: 145
- c I: 158, 453
Цитохромоксидазный комплекс I: 452

Цитохромы 1: 450-451, 453
Цитрат *см.* Лимонная кислота

Частица, распознающая сигнал (SRP) II: 44-46

Щелевые контакты II: 481-486

Эволюция клетки I: 12
Эйкозаноиды II: 348
Эймса тест III: 450-451
Экворин I: 198, 199
Экдизон II: 127, 351
Экзоны I: 131; II: 239-241
Экзоцитоз I: **407;** II: 10
Экспрессирующие векторы I: **335**
Экспрессия генов II: **176**
- - стратегии контроля II: **176**
Эластаза I: 147
Эластин I: 142-143; II: 502-504
Электронная микроскопия I: 181-190
- история I: 182
Электрон-транспортная цепь I: 92, 430. *См. также* Дыхательная цепь
- - эволюция I: **447**
Электрофорез в полиакриламидном геле I: 215
Электрохимический градиент 1: 382
- протонный градиент I: 440-443
Элементы химические I: 59-60
Элиситоры III: 410
Эмбриональное развитие III: 57
-- дрозофилы III: 112-117
- - млекопитающих III: 76-78
Эндолизосомы I: 417
Эндоплазматический ретикулум (ЭР) II: 10-14**, 38**
-- положение в клетке II: 312-313
Эндорфины II: 384; III: 329
Эндосомы Г. 416-417
Эндотелий III: 163-166
Эндоцитоз I: **407**
- у растений III: 419
Эндоцитозный цикл II: 327
Энкефалины II: 384
Энтактин II: 508
Энхансер II: 192-193, 197-198
- трансляции II: 229
Эпендимные клетки III: 294
Эпидермис III: 168
- производные III: 137
Эпитопы III: 222
Эритропоэтин III: 190
Эритроциты, мембранные белки I: 363
Эстрадиол II: 346
Этилен III: 395, 436
Этиопласты III: 413
Эубактерии I: 22
Эукариоты I: 22
Эухроматин II: 208

Ядерная ламина II: 10, 93, 318
- мембрана II: 24-28
- оболочка II: 93, 94
- - и митоз II: 456-457
- память (геномный импринтинг) III: 83
Ядерные ламины (белки) II: 315, 318
- поры II: 10, 24-28
Ядерный геном, организация и эволюция II: **236**
- магнитный резонанс (ЯРМ) I: 194-196
Ядро (клеточное) II: 94
Ядрышко II: 164-167
Ядрышковый организатор II: 164
Яйцевая оболочка III: 27
Яйцеклетка III: 26-32
- - активация III: 45-46, 48-50
Яйцо, полярность у дрозофилы III: 114-115
- - у земноводных III: 58-59
Якорная клетка (у *Caenorhabditis)* III: 92

Указатель латинских названий

Acanthamoeba II: 278
Agrobacterium III: 408-409, 438-439
Amanita II: 290
Aplysia HI: 330
Arabidopsis III: 439-440
Aspergillus I: 487, 493; II: 241; III: 450
Azolla III: 404
Bulbochaete III: 417

Caenorhabditis I: 333; II: 460, 464; III: 86-93

Chara II: 277
Chironomus II: 127
Chlamydomonas I: 43, 487, 488, 492, 498; II: 58, 298, 299, 301
Chondromyces I: 42
Coleus III: 437
Crithidia II: 109
Crypthecodinium II: 465

Cyanophora I: 31
Dictyostelium II: 326, 385, 514-517

Didinium 1: 35, 36
Drosophila I: 54, 150, 178, 199, 242-244, 339, 343; II: 23, 206; III: 334
Echinarachnius II: 459

Escherichia I: 18, 230, 256, 303, 316, 355, 482, 488; II: 144, 145, 386
Freesia III: 437
Fucus III: 434-435
Fusarium III: 410
Gonium I: 43

Gonyaulax I:5
Haemophilus I: 230
Halobacterium I: 370, 376, 377; II: 9
Halocynthia III: 86
Hevea III: 415
Hydra III: 98
Klebsormidium I: 487
Mougeotia III: 424, 425
Neurospora I: 487, 493
Nitella II: 277; III: 415

Oncopeltus II: 120

Papaver III: 415
Paramecium I: 35, 36, 487
Pelomyxa I: 31
Phytophthora III: 410
Rhizobium III: 407-408
Rhodopseudomonas I: 371, 372
Saccharomyces I: 487, 492, 493, 496; II: 64, 96, 112, 135, 201, 203, 408, 446
Salmonella II: 204, 385, 386; HI: 451
Schizosaccharomyces I: 487; II: 408

Spiroplasma I: 21
Sryela III: 73

Tetrahymena I: 134-136; II: 131, 138, 160

Trypanosoma I: 487
Vibrio alginolyticus I: 459
Volvox I: 43

Xenopus II: 147, 162, 403-407, 457, 484, 524; III: 57-60, 64-66, 72-75

Оглавление

III От клеток к многоклеточным организмам 5

15. Половые клетки и оплодотворение 7

15.1 Преимущества полового процесса 7

15.1.1. У многоклеточных животных диплоидная фаза бывает сложной и продолжительной, а гаплоидная - простой и кратковременной 8

15.1.2. Половое размножение делает организмы конку рентоспособными в условиях изменчивости окружающей среды 9

15.1.3. Новые гены появляются в результате дупликаций и дивергенции 10

15.1.4. Половое размножение сохраняет диплоидность у диплоидных видов 10

15.1.5. Диплоидный вид обладает лишней копией каждого гена, способной мутировать и выполнять после этого новую функцию 11

15.1.6. Диплоидный вид может быстро обогащать свой геном, приобретая новые гены 12

Заключение 14

15.2 Мейоз 14

15.2.1. При мейозе происходит не одно, а два деления ядра 15

15.2.2. Пересортировка генов усиливается благодаря кроссинговеру между гомологичными несестринскими хроматидами 17

15.2.3. В конъюгации хромосом участвует синаптонемальный комплекс 18

15.2.4. Как полагают, обмены между хроматидами происходят при участии рекомбинационных узелков 19

15.2.5. Хиазмы играют важную роль в расхождении хромосом во время мейоза 21

15.2.6. Расхождение половых хромосом тоже обеспечивается их конъюгацией 24

15.2.7. Второе деление мейоза напоминает обычный митоз 24

Заключение 25

15.3. Гаметы 25

15.3.1. У высших животных яйцеклетка - это единственная клетка, из которой может развиться новая особь 26

15.3.2. Яйцеклетки представляют собой высокоспециализированные клетки, способные к независимому развитию и обладающие большими запасами питательных веществ и совершенной оболочкой 27

15.3.3. Яйцеклетка проходит в своем развитии несколько стадий 28

15.3.4 Яйцеклетка достигает крупных размеров благодаря специальным механизмам 30

15.3.5. Созревание ооцитов у позвоночных инициируется уменьшением внутриклеточной концентрации циклического AMP 32

15.3.6. Созревание ооцитов связано с активацией фактора инициации М-фазы 33

15.3.7. Большая часть ооцитов, не созревая, погибает в яичнике человека 34

15.3.8. Спермии отлично приспособлены для внесения своей ДНК в яйцеклетку 36

15.3.9. У многих млекопитающих спермии образуются постоянно 38

15.3.10. Ядра спермиев гаплоидны, однако процессом дифференцировки этих клеток управляет диплоидный - геном 40

Заключение 42

15.4. Оплодотворение 42

15.4.1. Контакт со студенистой оболочкой яйца инициирует у спермия морского ежа акросомальную реакцию 43

15.4.2. Связывание спермия с яйцеклеткой осуществляется при помощи видоспецифических макромолекул 44

15.4.3. Активация яйцеклетки опосредуется изменениями внутриклеточных концентраций ионов 45

15.4.4. Деполяризация плазматической мембраны яйца обеспечивает быструю блокаду полиспермии 46

15.4.5. За позднюю блокаду полиспермии ответственна кортикальная реакция 47

15.4.6. Активация яйцеклетки осуществляется с помощью инозитолфосфолипидного механизма клеточной сигнализации 48

15.4.7. У некоторых организмов поздние биосинтетические процессы, связанные с активацией яйцеклетки индуцируются повышением внутриклеточного pH 49

15.4.8. В слиянии пронуклеусов спермиев и яиц морского ежа участвуют центриоли, вносимые спермием 51

15.4.9. Яйцеклетки млекопитающих могут быть оплодотворены in vitro 51

Заключение 53

Литература 53

16. Клеточные механизмы развития 57

16.1. Морфогенетические движения и формирование общей пространственной организации тела 57

16.1.1. Полярность эмбриона земноводных определяется полярностью яйца 58

16.1.2. В результате дробления из одной клетки образуется множество клеток 59

16.1.3. Бластула представляет собой полый шар, стенка которого образована одним слоем клеток 60

16.1.4. После гаструляции полый клеточный шар превращается в трехслойную структуру с первичной кишкой 60

16.1.5. Гаструляционные движения основаны на четко скоординированных простых движениях клеток 63

16.1.6. Гаструляционные движения организованы вокруг бластопора 65

16.1.7. Из энтодермы образуется кишка и такие ее производные, как легкие и печень 66

16.1.8. Из мезодермы образуются соединительные ткани и мышцы, а также сердечно-сосудистая и мочеполовая системы 66

16.1.9. Из эктодермы образуется эпидермис и нервная система 67

16.1.10. Нервная трубка образуется в результате координированных изменений формы клеток 67

16.1.11. Скопление клеток мезодермы делится, образуя сомиты по обе стороны от продольной оси тела 68

16.1.12. План строения тела позвоночного животного складывается в миниатюре на ранней стадии и сохраняется в период роста эмбриона 70

Заключение 70

16.2. Клеточная память и возникновение разнообразия клеток 71

16.2.1. В ходе развития геном сохраняет постоянство, но меняется экспрессия генов 71

16.2.2. Различия между бластомерами часто являются следствием асимметрии, присущей яйцеклетке (за исключением млекопитающих) 73

16.2.3. Химические взаимодействия между бластомерами приводят к возникновению новых типов клеток, расположение которых более детализировано: ин дукция мезодермы у *Xenopus* 74

16.2.4. Эмбрионы млекопитающих развиваются в матке, обеспечивающей их защиту 76

16.2.5. Дифференцировка клеток раннего эмбриона млекопитающих зависит от межклеточных взаимодействий 78

16.2.6. Поведение клеток тератокарциномы демонстрирует значение сигналов окружающей среды 78

16.2.7. Поведение клеток многоклеточных животных определяется не только геномом и окружающей средой, но и их предысторией 80

16.2.8. Будущая специализация клеток определяется задолго до появления внешних признаков дифференцировки 81

16.2.9. Время детерминации клеток можно определять в экспериментах с пересадками 82

16.2.10. Состояние детерминации может определяться цитоплазмой или хромосомами 82

16.2.11. Наборы хромосом, происходящие из спермия и яйца, несут отпечаток своей истории 83

Заключение

16.3. Программы развития индивидуальных клеток: анализ генеалогии клеток на примере нематод 85

16.3.1. В анатомическом и генетическом отношениях нематода *Caenorhabditis elegans* устроена очень просто 86

16.3.2. Для развития нематод характерно удивительное постоянство 87

16.3.3. Гены, контролирующие развитие, детализируют программу, управляющую клеточной генеалогией нематод 88

16.3.4. Программа дифференцировки согласована с программой клеточных делений 91

16.3.5. Автономное поведение клеток и межклеточные взаимодействия взаимосвязаны и определяют характер развития 91

16.3.6. Эксперименты позволяют уточнить роль генов, контролирующих развитие 93

16.3.7. Программу развития индивидуальных клеток млекопитающих можно анализировать в клеточной культуре: дифференцировка глиальных элементов зрительного нерва крысы 94

Заключение 96

16.4. Принципы образования пространственных структур 97

16.4.1. Асимметрия, определяемая пространственной организацией среды, может нарастать за счет положительной обратной связи 97

16.4.2. Локализованный участок, испускающий сигнал, может часто создавать градиент морфогена 99

16.4.3. Порог реакции клетки обусловливает строго определенный характер ее детерминации, несмотря на плавный градиент морфогена 100

16.4.4. Эмбриональные поля очень малы, поэтому основные черты строения взрослого животного должны детерминироваться достаточно рано с участием клеточной памяти 101

16.4.5. В процессе развития конечности позиционная информация постепенно уточняется 101

16.4.6. После приобретения позиционных значений сходные клетки становятся неэквивалентными 103

16.4.7. Клетки различных областей обеспечиваются одинаковой позиционной информацией, но интерпретируют ее по-разному 103

16.4.8. Ретиноевая кислота - вероятный морфоген в зачатке конечности позвоночных 104

16.4.9. Процесс роста контролируется характером позиционных значений, которые могут изменяться приинтеркаляции 106

Заключение 108

16.5. Дрозофила и молекулярная генетика формирования пространственной организации 109
16.5.1. Тело насекомого формируется путем видоизменения основного плана строения, предусматривающего наличие повторяющихся сегментов 110
16.5.2. Развитие дрозофилы начинается с образования синцития 112
16.5.3. План строения эмбриона контролируется в двух прямоугольных системах координат 113
16.5.4. Переднезадняя полярность эмбриона контролируется сигналами с обоих концов яйца дрозофилы 114
16.5.5. Действие трех классов генов сегментации приводит к подразделению эмбриона на сегменты 116
16.5.6. Локализованная экспрессия генов сегментации регулируется иерархической системой позиционных сигналов 117
16.5.7. Продукты одного гена сегментации контролируют экспрессию другого 118
16.5.8. Гены полярности яйца, *gap-гены* и *pair-rule-гены* создают временную пространственную организацию; гены полярности сегментов и гомеозисные селекторные гены обеспечивают постоянную запись 120
16.5.9. Гены полярности сегментов контролируют основные подразделения каждого из парасегментов 120
16.5.10. Гомеозисные селекторные гены комплекса bithorax и комплекса Antennapedia обусловливают возникновение различий между парасегментами 121
16.5.11. Гомеозисные селекторные гены кодируют систему молекулярных адресов 122
16.5.12. Продукты гомеозисных селекторных генов участвуют в регуляции экспрессии этих генов 122
16.5.13. Взрослая муха развивается из набора имагинальных дисков, которые запомнили позиционную информацию 123
16.5.14. Гомеозисные селекторные гены играют важную роль в запоминании позиционной информации клетками имагинальных дисков 125
16.5.15 Гомеозисные селекторные гены и гены полярности сегментов определяют компартменты тела 127
16.5.16. Саморегуляция гомеозисных селекторных генов вносит вклад в механизмы клеточной памяти 128
16.5.17. Экспрессия гомеозисных селекторных генов регулируется по принципу дифференциального сплайсинга, а также за счет контроля транскрипции 130
16.5.18. Многие гены, контролирующие становление пространственной организации, содержат консервативные последовательности гомеобокса, кодирующего часть ДНК-связывающего белка 130
16.5.19 В эволюции гомеобокс обладает высокой степенью консерватизма 131
16.5.20. Механизмы региональной клеточной детерминации у позвоночных и насекомых могут быть сходными 132
Заключение 133
16.6. Органогенез: координированная сборка сложных тканей 134
16.6.1. Избирательное слипание стабилизирует клеточные структуры, образованные по-разному детерминированными клетками 135
16.6.2. Пространственные структуры, образуемые молекулами клеточной адгезии, регулируют характер морфогенетических движений 135
16.6.3. У позвоночных первичным носителем позиционной информации является мезодерма 136
16.6.4. Характер и распределение производных эпидермиса контролируется дермой 137
16.6.5. Соединительную ткань конечности позвоночных заселяют многие типы мигрирующих клеток 139
16.6.6. Пространственная организация соединительной ткани конечности не зависит от заселяющих эту ткань клеток 139
16.6.7. Соединительная ткань определяет пути перемещения и конечный адрес мигрирующих клеток 140
16.6.8. При исследовании развития нервой системы возникает ряд особых проблем 141
Заключение 142
Литература 143
17. Поддержание нормальной организации тканей 150
17.1. Поддержание дифференцированного состояния 150
17.1.1. Большинство дифференцированных клеток обычно сохраняет свои специфические признаки даже в новом окружении 152
17.1.2. Дифференцированное состояние может видоизменяться под влиянием клеточного окружения 152
17.1.3. Некоторые структуры поддерживаются благодаря постоянному взаимодействию их частей. Пример: вкусовые почки и их нервы 153
Заключение 154
17.2. Ткани с перманентными клетками 154
17.2.1. Клетки, расположенные у взрослого в центре хрусталика, образовались еще в эмбриональном периоде 154
17.2.2. Большинство перманентных клеток обновляет свои составные части. Пример: фоторецепторные клетки сетчатки 156
Заключение 159
7.3. Обновление путем простого удвоения 159
17.3.1. Печень - промежуточное звено между пищеварительным трактом и кровью 160
17.3.2. Утрата печеночных клеток стимулирует их пролиферацию 162
17.3.3. Для регенерации необходим координированный рост компонентов ткани 163
17.3.4. Все кровеносные сосуды выстланы эндотелиальными клетками 163
17.3.5. Новые эндотелиальные клетки образуются путем

простого деления существующих эндотелиальных клеток 165
17.3.6. Новые каппиляры образуются как ответвления существующих сосудов 165
17.3.7. Рост каппилярной сети регулируют факторы, выделяемые окружающими тканями 166
Заключение 168

17.4. Обновление за счет стволовых клеток. Пример: эпидермис 168

17.4.1. Стволовые клетки обладают способностью неограниченно делиться и давать дифференцированное потомство 168
17.4.2. Эпидермис подразделен на пролиферативные единицы 170
17.4.3. В дифференцирующихся эпидермальных клетках по мере их созревания последовательно синтезируются различные кератины 172
17.4.4. Возможно, что «бессмертие» стволовой клетки сохраняется благодаря контакту с базальной мембраной 173
17.4.5. Пролиферация базальных клеток регулируется в соответствии с толщиной эпидермиса 174
17.4.6. Секреторные клетки кожи обособлены в железах, и их популяциям свойственна иная динамика 174
Заключение 176

17.5. Обновление с помощью плюрипотентных стволовых клеток. Пример: образование клеток крови 176

17.5.1. Существуют три категории лейкоцитов: гранулоциты, моноциты и лимфоциты 177
17.5.2. Образование каждого типа клеток в костном мозге регулируется отдельно 179
17.5.3. Костный мозг содержит кроветворные стволовые клетки 180
17.5.4. Плюрипотентная стволовая клетка дает начало всем классам клеток крови 182
17.5.5. Число различных клеток крови увеличивается в результате деления коммитированных клеток-предшественниц 184
17.5.6. Факторы, регулирующие гемопоэз, можно исследовать на культурах клеток 184
17.5.7 Эритропоэз зависит от гормона эритропоэтина 185
17.5.8 На образование нейтрофилов и макрофагов влияет несколько колониестимулирующих факторов (КСФ) 186
17.5.9. Поведение кроветворной клетки частично зависит от случая 187
Заключение 188

17.6. Происхождение, видоизменение и регенерация ткани скелетных мышц 189

17.6.1. Новые клетки скелетных мышц образуются путем слияния миобластов 190
17.6.2. Мышечные клетки могут видоизменять свои свойства в результате смены изоформ специфических белков 191
17.6.3. Некоторые миобласты сохраняются во взрослом организме как покоящиеся стволовые клетки 192
Заключение 193

17.7. Фибробласты и их превращения: семейство соединительнотканных клеток 193

17.7.1. Фибробласты изменяют свои свойства в ответ на сигналы от межклеточного матрикса 194
17.7.2. Внеклеточный матрикс может влиять на дифференцировку соединительнотканных клеток, изменяя их форму и способность к прикреплению 195
17.7.3. Различные сигнальные молекулы, действуя последовательно, регулируют образование жировых клеток 196
Заключение 197

17.8. Мягкие клетки и твердый матрикс: рост, обновление и репарация кости 197

17.8.1 Хрящ способен к интерстициальному росту 197
17.8.2. Остеобласты секретируют костный матрикс, а остеокласты разрушают его 199
17.8.3. В развивающемся организме остеокласты разрушают хрящ, чтобы проложить путь для роста кости 201
17.8.4. Структура тела стабилизируется его соединительнотканным каркасом, а также избирательным сцеплением клеток 201
Заключение 203

Приложение. Перечень клеток взрослого человеческого организма 204
Литература 210

18. Иммунная система 215

18.1. Клеточная основа иммунитета 216

18.1.1. Иммунная система человека состоит из триллионов лимфоцитов 216
18.1.2. В- лимфоциты реализуют гуморальные иммунные ответы, а Т-лимфоциты -иммунные ответы клеточного типа 218
18.1.3. Лимфоциты развиваются в первичных лимфоидных органах, а с чужеродными антигенами реагируют во вторичных органах 218
18.1.4. Маркеры клеточной поверхности позволяют различать и разделять Т- и В-клетки 219
18.1.5. Работа иммунной системы основана на принципе клональной селекции 220
18.1.6. В большинстве случаев один антиген стимулирует много различных клонов лимфоцитов 222
18.1.7. Большая часть лимфоцитов находится в непрерывной циркуляции 223
18.1.8. Иммунологическая память обусловлена ростом клонов и созреванием лимфоцитов 224
18.1.9. Отсутствие иммунного ответа на собственные антигены организма обусловлено приобретенной иммунологической толерантностью 226
18.1.10. Иммунологическую толерантность к чужеродным антигенам можно индуцировать и у взрослых животных 227
Заключение 228

18.2. Функциональные свойства антител 228

18.2.1. Антиген-специфические рецепторы на В-клетках- это молекулы антител 228

18.2.2. Можно стимулировать выработку антител В-клетками в культуральной чашке 229

18.2.3. Антитела имеют два идентичных антиген-связывающих участка 229

18.2.4. Молекула антитела состоит из двух идентичных легких цепей и двух идентичных тяжелых цепей 230

18.2.5. Существуют пять классов Н-цепей, каждый со своими особыми биологическими свойствами 231

18.2.6. Антитела могут иметь или ϰ, или λ-цепи, но не те и другие 234

18.2.7. Сила взаимодействия антигена с антителом зависит как от сродства, так и от числа связывающих участков 235

Заключение 236

18.3. Тонкая структура антител 237

18.3.1. L- и Н-цепи состоят из константной и вариабельной областей 237

18.3.2. Каждая L- и Н-цепь содержит по три гипервариабельные области, которые совместно формируют антиген-связывающий участок 238

18.3.3. L- и Н-цепи свернуты в ряд повторяющихся гомологичных доменов 239

18.3.4. Рентгеноструктурные исследования выявили трехмерное строение доменов и антигенсвязывающих участков иммуноглобулинов 240

Заключение 241

18.4. Как создается разнообразие антител 242

18.4.1. В процессе развития В-клеток происходит сборка генов антител из отдельных генных сегментов 243

18.4.2. Каждая V-область кодируется более чем одним генным сегментом 243

18.4.3 Неточное соединение генных сегментов увеличивает разнообразие V-областей 245

18.4.4. Направляемое антигеном соматическое гипермутирование осуществляет тонкую подстройку образования антител 246

18.4.5. Соединение генных сегментов для антител регулируется таким образом, что обеспечивает моноспецифичность В-клеток 247

18.4.6. Переключение синтеза с мембраносвязанной на секретируемую форму одного и того же антителапроисходит путем изменения РНК-транскриптов для Н-цепи 248

18.4.7. В-клетки могут переключаться с выработки одного класса антител на выработку другого 249

18.4.8. Идиотопы молекул антител служат основой иммунологической сети 251

Заключение 252

18.5. Система комплемента 252

18.5.1. Активация комплемента представляет собой усилительный механизм в форме протеолитических реакций; центральную роль играет расщепление белка 253

18.5.2 Классический путь активируется комплексами антиген-антитело 254

18.5.3 Альтернативный путь может прямо активироваться микроорганизмами 255

18.5.4. Активация комплемента способствует фагоцитозу и воспалению 256

18.5.5. В результате сборки поздних компонентов комплемента образуется гигантский комплекс, атакующий мембраны 256

18.5.6 Каскад комплемента точно регулируется 257

Заключение 259

18.6. Т-лимфоциты и клеточный иммунитет 259

18.6.1 Т-клеточные рецепторы представляют собой антителоподобные гетеродимеры 260

18.6.2. Различные ответы Т- лимфоцитов опосредуются разными классами этих клеток 261

18.6.3. Цитотоксические Т-лимфоциты убивают клетки, инфицированные вирусами 261

18.6.4. Как цитотоксические Т-клетки убивают свои мишени? 262

18.6.5. Молекулы МНС определяют отторжение трансплантата 263

18.6.6. Существуют два основных класса молекул МНС 264

18.6.7. Цитотоксические Т-клетки узнают чужеродные антигены, ассоциированные с молекулами МНС класса I 266

18.6.8 Цитотоксические Т-клетки узнают фрагменты вирусных белков на поверхности клеток, инфицированных вирусами 266

18.6.9. Рентгеноструктурный анализ позволяет выявить антиген-связывающий участок гликопротеина МНС класса I268

18.6.10. Т-хелперы узнают фрагменты чужеродных антигенов в ассоциации с гликопротеинами МНС класса II на поверхности антиген-представляющих клеток 270

18.6.11. Т-хелперы стимулируют пролиферацию Т- лимфоцитов путем секреции интерлейкина-2 271

18.6.12. Т-хелперы необходимы большинству В- лимфоцитов для ответа на антиген 272

18.6.13. Т-хелперы помогают активировать В-клетки путем секреции интерлейкинов 273

18.6.14. Некоторые Т-хелперы активируют макрофаги путем секреции интерферона 274

18.6.15. Белки межклеточной адгезии стабилизируют взаимодействия между Т-клетками и их мишенями 274

18.6.16. Т-супрессоры главным образом подавляют функцию Т-хелперов 275

18.6.17. Развивающиеся Т-клетки, которые сильно реагируют с собственными молекулами МНС, элиминируются в тимусе 277

18.6.18. Некоторые аллельные формы молекул МНС неэффективны в представлении специфических антигенов Т-клетками, это зависит от генов иммунного ответа (Ir) 279

18.6.19. Гипотеза совместного узнавания МНС позволяет

объяснить трансплантационные реакции и полиморфизм MHC 280
18.6.20. , Молекулы, участвующие в иммунном узнавании, принадлежат к древнему «суперсемейству» 281
Заключение 282
Литература 282

19. Нервная система 287

19.1. Клетки нервной системы: строение и функция 287

19.1.1. Функция нервной клетки определяется длиной ее отростков 288
19.1.2. Нервные клетки передают электрические сигналы 289
19.1.3. Связь между нейронами осуществляется в синапсах с помощью химических сигналов 290
19.1.4. Вновь синтезируемые материалы переносятся из тела нервной клетки в аксоны и дендриты с помощью механизмов медленного и быстрого транспорта 291
19.1.5. Благодаря ретроградному транспорту поддерживается обратная химическая связь между окончаниями и телом нервной клетки 292
19.1.6. Нейроны окружены глиальными клетками различного типа 293
Заключение 294

19.2. Потенциал-зависимые ионные каналы и потенциал действия 295

19.2.1. Изменение потенциала может распространяться в нервной клетке пассивно 295
19.2.2. Потенциал-зависимые натриевые каналы генерируют потенциал действия; потенциал-зависимые калиевые каналы ограничивают его продолжительность 298
19.2.3. Потенциалы действия обеспечивают быструю передачу сигналов на дальние расстояния 300
19.2.4. Миелинизация повышает скорость и эффективность проведения нервных импульсов у позвоночных 303
Заключение 304

19.3. Лиганд-зависимые ионные каналы и быстрая синаптическая передача 304

19.3.1. Нервно-мышечное соединение -наиболее изученный синапс 305
19.3.2. За сопряжение потенциалов действия с высвобождением медиатора ответственны потенциалзависимые кальциевые каналы 306
19.3.3. Нейромедиатор быстро высвобождается путем экзоцитоза 308
19.3.4. Нейромедиатор высвобождается «квантами» случайным образом 309
19.3.5. Лиганд-зависимые каналы снова преобразуют химический сигнал в электрический 311
19.3.6. Рецептор ацетилхолина представляет собой лигандзависимый катионный канал 313
19.3.7. Ацетилхолин удаляется из синаптической щели в результате диффузии и гидролиза 315
19.3.8. Быстрая синаптическая передача осуществляется с помощью небольшого числа нейромедиаторов 315
19.3.9. Ацетилхолин и глутамат опосредуют быстрое возбуждение, а ГАМК и глицин - быстрое торможение 316
19.3.10 . Для одного вида нейромедиаторов часто имеется несколько типов рецепторов 317
19.3.11 . Синапсы служат важными мишенями для воздействия лекарственных веществ 318
Заключение 318

19.4. Роль ионных каналов в совместной переработке информации нейронами 319

19.4.1. Сдвиг мембранного потенциала в теле постсинаптической клетки - это результат пространственной и временной суммации множества постсинаптических потенциалов 320
19.4.2. Для передачи информации на большие расстояния суммарный ПСП снова преобразуется в частоту нервных импульсов 321
19.4.3. Кодирование требует совместного действия различных ионных каналов 322
19.4.4. Адаптация уменьшает реакцию на постоянный стимул 323
19.4.5. Сигналы могут передаваться не только по аксонам 324
Заключение 325

19.5. Рецепторы, не связанные с каналами, и синаптическая модуляция 326

19.5.1. Рецепторы, не связанные с каналами, опосредуют медленные и рассеянные эффекты 327
19.5.2. Самую большую группу нейромедиаторов образуют нейропептиды 328
19.5.3. Стойкие изменения в поведении связаны с изменениями в специфических синапсах 329
19.5.4. За сенситизацию у аплизии ответственны рецепторы, связанные с G-белком 331
19.5.5. Ca^{2+} и циклический AMP - важные внутриклеточные посредники, участвующие в ассоциативном научении у позвоночных 334
19.5.6. У млекопитающих при обучении происходят изменения в гиппокампе, вызванном притоком Ca^{2+} через двояко регулируемые каналы 335
Заключение 336

19.6. Прием сенсорной информации 337

19.6.1. Силу стимула отражает величина рецепторного потенциала 337
19.6.2. Волосковые клетки внутреннего уха реагируют на отклонение стереоцилий 338
19.6.3. При наклоне пучков" стереоцилий открываются механически регулируемые катионные каналы в их кончиках 340
19.6.4. Фоторецепторы обладают высокой чувствительностью и способны к адаптации, но реагируют относительно медленно 341
19.6.5. Рецепторный потенциал, возникающий в палочке,- результат закрытия натриевых каналов 342
19.6.6. Фотоны изменяют конформацию молекул родопсина 343
19.6.7. К закрытию натриевых каналов плазматической

мембраны приводит снижение уровня циклического GMP в цитоплазме фоторецепторных клеток, вызванное светом 343

19.6.8. Фоторецептор адаптируется к яркости света 344

19.6.9. Нейроны обрабатывают исходную информацию, доставляемую сенсорными рецепторными клетками 345

Заключение 345

19.7. Рождение, рост и гибель нейронов 346

19.7.1. Нейроны образуются в соответствии с определенными программами клеточного деления 346

19.7.2. Радиальные глиальные клетки образуют временный «каркас», направляющий миграцию незрелых нейронов 348

19.7.3. Тип нейрона и его будущие связи определяются временем его «рождения» 349

19.7.4. Аксоны и дендриты удлиняются благодаря конусу

19.7.5. роста на их кончиках 350 В конусе роста скапливаются и используются материалы, необходимые для роста 352

19.7.6. Движение конуса роста in vitro может направляться избирательной адгезией, хемотаксисом и электрическими полями 353

19.7.7. In vivo конус роста направляет движение нейрита по строго определенному пути ("pathway guidance") 354

19.7.8. Конусы роста используют специфические адгезионные молекулы для сцепления с поверхностью клеток и внеклеточным матриксом 355

19.7.9. Организация нервных связей определяется различиями в свойствах нейронов: теория нейронной специфичности 356

19.7.10 Ткани-мишени выделяют нейротропные факторы, регулирующие рост и выживание нервных клеток 358

19.7.11 В результате гибели клеток число выживших нейронов регулируется в соответствии с количеством ткани-мишени 359

19.7.12. Нервные связи создаются и разрушаются на протяжении всей жизни 361

Заключение 362

19.8. Образование и уничтожение синапсов 362

19.8.1. Синаптический контакт приводит к специализации данных участков растущего аксона и клетки-мишени для функции передачи сигналов 363

19.8.2. Рецепторы ацетихолина диффундируют в мембране мышечной клетки и собираются в месте формирования синапса 364

19.8.3. Место нервно-мышечного контакта отличается устойчивой специализацией базальной мембраны 364

19.8.4. Восприимчивость мышечной клетки к образованию синапсов регулируется ее электрической активностью 366

19.8.5. Электрическая активность мышцы влияет на выживание эмбриональных мотонейронов 367

19.8.6. Электрическая активность регулирует конкурентную элиминацию синапсов в соответствии с «правилом возбуждения» 367

19.8.7. Синхронно активные окончания аксонов образуют поддерживающие друг друга синапсы 369

19.8.8. Число сохраняющихся синапсов зависит от числа дендритов у постсинаптического нейрона 369

19.8.9. У детенышей млекопитающих связи в зрительной системе подвержены влиянию сенсорного опыта 370

19.8.10. В зрительной системе млекопитающих активные синапсы стремятся занять место неактивных 371

19.8.11. Для образования конвергирующих связей от обоих глаз необходима синхронная бинокулярная стимуляция 373

19.8.12. Роль «правил возбуждения» в организации нервных связей с учетом индивидуального опыта 374

Заключение 374
Литература 375

20. Особенности растительных клеток 382

20.1. Центральная роль клеточной стенки 382

20.1.1. Клеточная стенка образована волокнами целлюлозы, погруженными в полисахаридно-белковый матрикс 383

20.1.2. Микрофибриллы целлюлозы соединены поперечными сшивками с молекулами гемицеллюлозы, пектина и гликопротеина, в результате чего образуется сложная сеть 385

20.1.3. Малые размеры пор в стенке растительной клетки ограничивают обмен макромолекулами между клеткой и окружающей средой 388

20.1.4. Высокая прочность клеточной стенки позволяет клеткам поддерживать избыточное внутреннее гидростатическое давление, называемое тургором 389

20.1.5. Рост растительной клетки определяется как тургорным давлением, так и контролируемым образованием клеточной стенки 389

20.1.6. Тургор регулируется по принципу обратной связи путем изменения концентраций внутриклеточных растворенных веществ 390

20.1.7. При образовании специализированных клеток происходит модификация клеточной стенки 392

20.1.8. Даже зрелая клеточная стенка представляет собой динамичную структуру 395

Заключение 398

20.2. Перенос веществ между клетками 398

20.2.1. Растительные клетки соединены между собой специальными цитоплазматическими мостиками, так называемыми плазмодесмами 399

20.2.2. Плазмодесмы позволяют молекулам непосредственно переходить из одной клетки в другую 400

20.2.3. У высших растений биологические жидкости разделены на два больших компартмента - внутриклеточный и внеклеточный 402

20.2.4. Фотосинтезирующие и поглощающие клетки связаны друг с другом сосудистыми тканями, в состав которых входит ксилема и флоэма 402

20.2.5. Вода и растворенные в ней соли передвигаются по ксилеме 403

20.2.6. Сахара переносятся под действием давления, возникающего во флоэме 404

Заключение 405

20.3. Взаимодействия между растениями и другими организмами 406

20.3.1. Большинство сосудистых растений живет в симбиозе с почвенными грибами 406

20.3.2. Бактерии-симбионты помогают некоторым растениям усваивать атмосферный азот 406

20.3.3. *Agrobacterium* представляет собой фитопатоген, переносящий гены в геном своего хозяина 408

20.3.4. Продукты, возникающие при разрушении клеточной стенки, часто используются в качестве сигналов при взаимодействии растения и патогена 409

20.3.5. В нормальной растительной клетке клеточная стенка может быть важным источником сигналов 411

Заключение 411

20.4. Особенности внутренней организации растительной клетки 411

20.4.1. Хлоропласты - представители семейства органелл, называемых пластидами, и свойственных только растительным клеткам 412

20.4.2. Вакуоли растительных клеток - это органеллы с удивительно разнообразными функциями 414

20.4.3 Вакуоли могут служить запасающими органеллами 415

20.4.4. Пузырьки аппарата Гольджи доставляют материал для образования клеточной стенки к определенным участкам цитоплазматической мембраны 416

20.4.5 В процессе жидкофазного эндоцитоза происходит быстрое рециклирование мембран 419

20.4.6 Синтез целлюлозы происходит на поверхности растительных клеток 420

20.4.7 Форма растущей растительности клетки определяется организацией целлюлозных микрофибрилл 420

20.4.8 Ориентацию целлюлозных микрофибрилл, откладывающихся на клеточной поверхности, определяют микротрубочки в кортикальном слое 421

20.4.9. В крупных растительных клетках различные материалы перемещаются с ориентированным током цитоплазмы 423

20.4.10. Цитоскелет растительной клетки реагирует на внеклеточные сигналы 424

Заключение 426

20.5. Клеточные основы развития растений 426

20.5.1. Эмбриональное развитие начинается с установления оси «корень-побег», а после формирования семени приостанавливается 427

20.5.2. Меристемы постоянно образуют новые органы и новые меристемы, в результате чего многократно возникают серии одинаковых модулей 428

20.5.3. Внешний вид растения зависит от механизмов, определяющих формообразование в апикальных меристемах 429

20.5.4. Образование новых структур зависит от координированного деления, растяжения и дифференцировки клеток 430

20.5.5. Строение цитоскелета определяет плоскость деления клетки 431

20.5.6. Полярность растительных клеток зависит от асимметричного распределения ионных каналов и белков-носителей 434

20.5.7. Рост и развитие растений реагируют на сигналы окружающей среды 435

20.5.8. Рост и развитие растений регулируются химическими посредниками 436

20.5.9. Культура клеток и тканей - удобный инструмент для изучения развития растений 437

20.5.10. Использование методов молекулярной генетики для решения проблем развития растений 438

Заключение 440

Литература 440

21. Рак 445

21.1. Рак как микроэволюционный процесс 445

21.1.1. Опухоли различаются в соответствии с типом клеток, из которого они происходят 446

21.1.2 В большинстве случаев раковая опухоль развивается из отдельной аномальной клетки 448

21.1.3. Большинство раковых опухолей начинается, повидимому, с изменений в последовательности нуклеотидов клеточной ДНК 449

21.1.4. Для возникновения рака недостаточно единичной мутации 451

21.1.5. Опухоли медленно развиваются из слабо измененных клеток 452

21.1.6. Развитие опухоли включает последовательные циклы мутаций и естественного отбора 455

21.1.7. Развитию рака могут способствовать факторы, не изменяющие последовательность нуклеотидов в ДНК клетки 455

21.1.8. Большинство раковых заболеваний вызвано такими комбинациями внешних воздействий, которых можно избежать 457

21.1.9. Поиск способов лечения рака труден, но не безнадежен 459

21.1.10. Опухолевый рост часто связан с нарушением клеточной дифференцировки 459

21.1.11 Для того чтобы формировать метастазы, опухолевые клетки должны «уметь» проникать через базальную мембрану 461

21.1.12. Дефекты в процессах репарации, репликации и рекомбинации ДНК способствуют развитию рака 462

21.1.13. Высокая мутабильность раковых клеток способствует появлению у них устойчивости к противоопухолевым препаратам 464

Заключение 464

21.2. Молекулярная генетика рака 465
21.2.1. Опухоли могут вызваться как ДНК -, так и РНК-содержащими вирусами 466
21.2.2. Нарушение контроля клеточного деления ДНК-содержащими онкогенными вирусами - часть их стратегии выживания 467
21.2.3. Ретровирусы способны случайно захватывать онкогены 468
21.2.4. Исследование генетической природы рака приводит к одной и той же небольшой группе протоонкогенов 472
21.2.5. Существует много способов превращения протоонкогена в онкоген 472
21.2.6. Трансгенные мыши - подходящая тест-система для изучения действия онкогенов 475
21.2.7. Наряду с приобретением онкогенов при раке происходит потеря генов-супрессоров опухолевого роста 476
21.2.8. Молекулярнобиологический анализ опухолей легких подчеркивает сложность и вариабельность раковых заболеваний у человека 478
21.2.9. Каждый случай рака представляет собой самостоятельный природный эксперимент в клеточной эволюции 480
Заключение 481
Литература 481