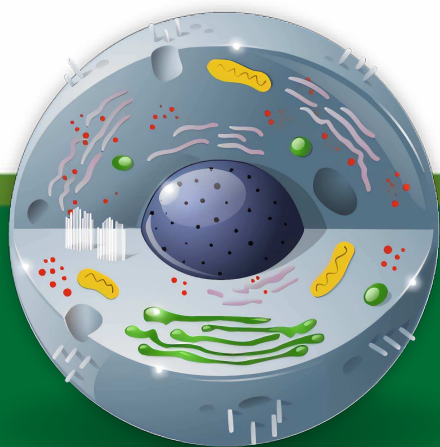




МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ



ТОМ 2

Б. АЛЬБЕРТС, Д. БРЕЙ,
К. ХОПКИН, А. ДЖОНСОН, ДЖ.
ЛЬЮИС, М. РЭФФ,
К. РОБЕРТС, П. УОЛТЕР

Брюс Альбертс
Александр Джонсон
Джулиан Льюис
Мартин Рэфф
Кит Робертс
Питер Уолтер

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

С задачами
Джона Уилсона и Тима Ханта

Том II

Перевод с английского
А. Н. Дьяконовой, П. В. Дюбы и А. А. Светлова

Под редакцией
Е. С. Шиловой, Б. П. Копнина
М. А. Лагарьковой, Д. В. Купраша



Москва ♦ Ижевск
2023

УДК 576.3
ББК 28.050
М75

Научные редакторы

Том I: д. б. н., Миронов А. А., к. х. н. Мочалова Л. В.

Том II: к. х. н. Богачева Е. Н., д. х. н. Шатский И. Н.

Том III: к. х. н. Богачева Е. Н. (гл. 19–21, разд. 22.1–22.7), к. х. н. Теренин И. М. (разд. 22.8–22.9, гл. 23), к. б. н. Захарова Н. И. (гл. 24–25), асп. Шилов Е. С. (гл. 19–25, глоссарий), д. б. н. Копнин Б. П. (гл. 20), д. б. н. Лагарькова М. А. (гл. 21–23, глоссарий), д. б. н. Купраш Д. В. (гл. 19, 24–25, глоссарий), Миронов А. А., Шатский И. Н., Мочалова Л. В. (глоссарий)

Ответственный редактор

Мочалова Л. В.

Переводчики

Светлов А. А. (главы 1–6, 22–25), Карлова О. В. (глава 7),

Дьяконова А. Н. (главы 8–17, глоссарий), Дюба П. В. (главы 18–21)

Молекулярная биология клетки: в 3-х томах. Т. III / Б. Альбертс, А. Джонсон, Д. Льюис и др. — М.—Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», Институт компьютерных исследований, 2023.

Вот уже почти четверть века «Молекулярная биология клетки» остается основным учебником по данному предмету. Авторы рассказывают историю биологии клетки, искусно извлекая самые важные концепции из этой обширной и постоянно развивающейся области знания и выстраивая стройную и логическую систему, которая помогает читателям приблизиться к пониманию сложнейших тем и насладиться их изучением. Появившееся в 2008 году пятое издание книги «*Molecular Biology of the Cell*» представляет собой полностью пересмотренный и обновленный вариант знаменитого учебника. Здесь представлено большое количество нового материала по эпигенетике, стволовым клеткам, сравнительной геномике, последним достижениям в лечении раковых заболеваний.

Книга предназначена для студентов, аспирантов и научных работников биологических и медицинских специальностей.

ISBN 978-0-8153-4111-6 (англ.)

ISBN 978-5-93972-???-?

© Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, 2008, 2002

© Bruce Alberts, Denis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson, 1983, 1989, 1994

© Ижевский институт компьютерных исследований (перевод на рус. яз.), 2023

Перевод англоязычного издания *Molecular Biology of the Cell (MBOC)*, 5th ed. / Dr. Bruce Alberts, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter опубликован с разрешения издательства Garland Science, являющегося подразделением компании Taylor & Francis Group LLC.

Все права защищены. Никакая часть данной книги не может быть перепечатана, воспроизведена, передана или использована в какой бы то ни было форме электронными, механическими или любыми иными средствами, которые известны в настоящее время или будут изобретены впоследствии, включая фотокопирование, запись на магнитный носитель, микросъемку, или при помощи любой другой системы хранения и обработки информации, если на то нет письменного разрешения издательств.

Краткое содержание всех томов

Том I

Предисловие.....	5
Краткое содержание	8
Дополнительный иллюстративный материал	10
Примечания для читателя	28
Часть I. Введение в мир клетки	34
Глава 1. Клетки и геномы	35
Глава 2. Химия клетки и биосинтез.....	101
Глава 3. Белки.....	222
Часть II. Основные генетические механизмы.....	332
Глава 4. ДНК, хромосомы и геномы	333
Глава 5. Репликация, восстановление и рекомбинация ДНК.....	438
Глава 6. Клеточные механизмы считывания генома: от ДНК к белку	540
Глава 7. Управление экспрессией генов.....	672

Том 2

Часть III. Лабораторные методы	892
Глава 8. Манипулирование белками, ДНК и РНК.....	893
Глава 9. Визуализация клеток.....	1010
Часть IV. Внутренняя организация клетки	1070
Глава 10. Структура мембраны.....	1071
Глава 11. Перенос маленьких молекул через мембраны и электрические свойства мембран	1122
Глава 12. Внутриклеточные полости и сортировка белков	1188
Глава 13. Внутриклеточное везикулярное движение	1271
Глава 14. Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты.....	1370
Глава 15. Обмен информацией между клетками	1469
Глава 16. Клеточный скелет.....	1604
Глава 17. Клеточный цикл	1741
Глава 18. Апоптоз	1834

Том 3

Часть V. Клетки в контексте их совокупности.....	1738
Глава 19. Межклеточные переходы, адгезия и внеклеточный матрикс.....	1739
Глава 20. Рак.....	1849
Глава 21. Размножение: мейоз, зародышевые клетки и оплодотворение	1941
Глава 22. Развитие многоклеточных организмов.....	1995
Глава 23. Специализация тканей, стволовые клетки и восстановление тканей...	2168
Глава 24. Патогены, инфекция и врожденный иммунитет	2274
Глава 25. Система приобретенного иммунитета	2361
Словарь терминов.....	2462
Предметный указатель	2574
Благодарности	2731
Приложение	2741

Содержание

Краткое содержание	v
--------------------------	---

Дополнительный иллюстративный материал	xxv
--	-----

ЧАСТЬ III. МЕТОДЫ

Глава 8. Манипуляция белками, ДНК и РНК	775
8.1. Выделение и выращивание клеток в культуре	776
8.1.1. Клетки можно выделить из интактных тканей	776
8.1.2. Клетки можно выращивать в культуре	777
8.1.3. Эукариотические клетки широко используют в качестве источника однородных клеток	780
8.1.4. Эмбриональные стволовые клетки способны совершить переворот в медицине	782
8.1.5. Трансплантация ядер соматических клеток способна привести к соз- данию персональных стволовых клеток	784
8.1.6. Клеточные линии гибридомы как фабрики по производству моно- клональных антител	785
<i>Заключение</i>	787
8.2. Очистка белков	788
8.2.1. Клетки можно разделить на составляющие их фракции	788
8.2.2. Клеточные экстракты представляют собой доступные системы для изучения клеточных функций	792
8.2.3. Белки можно разделить при помощи хроматографии	792
8.2.4. В основе аффинной хроматографии лежит использование специфи- ческих сайтов связывания белков	795
8.2.5. Маркеры, сконструированные методами генетической инженерии, лежат в основе простого способа очистки белков	795
8.2.6. Очищенные бесклеточные системы необходимы для точного опреде- ления функций молекул	797
<i>Заключение</i>	798
8.3. Анализ белков	799
8.3.1. Белки можно разделить при помощи электрофореза в поли- акриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)	799
8.3.2. Специфические белки можно обнаружить путем гибридизации с анти- телами	801
8.3.3. Масс-спектрометрия является высокочувствительным методом иден- тификации неизвестных белков	801
8.3.4. Двумерные методы разделения исключительно эффективны	804
8.3.5. Гидродинамические измерения позволяют установить размер и форму белковых комплексов	806
8.3.6. Группы взаимодействующих белков можно идентифицировать при помощи биохимических методов	807
8.3.7. Белок-белковые взаимодействия также можно идентифицировать методом дрожжевой двугибридной системы	807
8.3.8. Объединение полученных разными методами данных дает надежные карты белковых взаимодействий	809

8.3.9. Оптические методы позволяют наблюдать белковые взаимодействия в реальном времени.....	809
8.3.10. Некоторые методы позволяют следить за отдельными молекулами	811
8.3.11. Функционирование белков можно селективно нарушить при помощи малых молекул.....	813
8.3.12. Структуру белка можно установить при помощи рентгеноструктурного анализа.....	814
8.3.13. Использование ЯМР для расшифровки структуры белка в растворе....	816
8.3.14. Последовательность и структура белка могут указать на его функцию ...	817
<i>Заклучение</i>	820
8.4. Анализ и манипуляции с ДНК.....	820
8.4.1. Рестриктазы разрезают большие молекулы ДНК на фрагменты	822
8.4.2. Гель-электрофорез позволяет разделить молекулы ДНК различных размеров	824
8.4.3. Очищенные молекулы ДНК можно специфически метить при помощи радиоизотопов или химических маркеров <i>in vitro</i>	827
8.4.4. Реакции гибридизации нуклеиновых кислот — чувствительный способ обнаружения специфических последовательностей нуклеотидов	827
8.4.5. Нозерн-блоттинг и Саузерн-блоттинг ускоряют гибридизацию с разделенными электрофорезом молекулами нуклеиновых кислот	828
8.4.6. Гены можно клонировать при помощи библиотек ДНК	831
8.4.7. Два типа библиотек ДНК служат различным целям	836
8.4.8. Клоны кДНК содержат непрерывные кодирующие последовательности ...	838
8.4.9. Гены можно селективно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции	839
8.4.10. Клетки как фабрики по производству специфических белков.....	843
8.4.11. Белки и нуклеиновые кислоты можно синтезировать напрямую в химических реакциях	845
8.4.12. ДНК можно быстро секвенировать	845
8.4.13. Нуклеотидные последовательности используют для предсказания аминокислотных последовательностей белков.....	845
8.4.14. Геномы многих организмов полностью секвенированы.....	849
<i>Заклучение</i>	850
8.5. Изучение экспрессии и функционирования генов	851
8.5.1. Классическая генетика начинается с нарушения клеточного процесса путем случайного мутагенеза.....	854
8.5.2. Генетический скрининг позволяет идентифицировать мутанты со специфическими отклонениями	856
8.5.3. Мутации могут привести к потере или приобретению белком функции ...	858
8.5.4. Тесты на комплементацию показывают, расположены ли две мутации в одном гене или в разных.....	858
8.5.5. Порядок работы генов в метаболическом пути можно определить при помощи эпистаза.....	859
8.5.6. Гены, идентифицированные посредством мутаций, можно клонировать ..	860
8.5.7. Генетика человека обладает особыми задачами и возможностями	861
8.5.8. Гены человека наследуются гаплотипными блоками, что помогает в поиске мутаций, вызывающих болезни	861
8.5.9. На сложные признаки влияет несколько генов	864
8.5.10. Обратная генетика начинает с известного гена и определяет клеточный процесс, в котором необходимо его функционирование	866
8.5.11. Гены можно конструировать несколькими способами	866
8.5.12. Модифицированные гены можно вводить в зародышевые линии многих организмов.....	868

8.5.13. Можно изменять геном животных	870
8.5.14. Трансгенные растения играют важную роль как в клеточной биологии, так и в сельском хозяйстве.....	871
8.5.15. Крупные собрания меченых нокаутов позволяют изучать функции каждого гена организма.....	875
8.5.16. РНК-интерференция — это простой и быстрый способ анализа функции гена	877
8.5.17. Репортерные гены и гибридизация <i>in situ</i> показывают, где и когда экспрессируется ген	878
8.5.18. Экспрессия отдельных генов может быть измерена при помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией	880
8.5.19. ДНК-чипы позволяют одновременно следить за экспрессией тысяч генов	881
8.5.20. Анализ экспрессии генов в одной клетке выявляет биологический «шум».....	885
<i>Заключение</i>	886
<i>Задачи</i>	886
<i>Литература</i>	888
Глава 9. Визуализация клеток	892
9.1. Наблюдая клетки в световой микроскоп	892
9.1.1. Разрешающая способность светового микроскопа для деталей изображения — 0,2 мкм.....	894
9.1.2. Живые клетки хорошо видны в фазово-контрастном или дифференциальном интерференционном контрастном микроскопе.....	897
9.1.3. Изображения можно увеличивать и анализировать цифровыми методами	899
9.1.4. Обычно перед микроскопией интактные ткани фиксируют и изготавливают их срезы	900
9.1.5. Определенные молекулы можно обнаружить в клетках при помощи флуоресцентной микроскопии	901
9.1.6. Антитела можно использовать для обнаружения определенных молекул.....	905
9.1.7. Оптический микроскоп позволяет визуализировать сложные трехмерные объекты.....	907
9.1.8. Конфокальный микроскоп позволяет получить оптические срезы путем исключения расфокусированного света	908
9.1.9. Флуоресцентные белки можно использовать для маркирования отдельных белков в живых клетках и организмах	912
9.1.10. Динамику белков можно наблюдать в живых клетках	915
9.1.11. Испускающие свет индикаторы позволяют измерять быстро изменяющиеся внутриклеточные концентрации ионов	918
9.1.12. Доступно несколько методов введения в клетку веществ, для которых мембрана непроницаема.....	920
9.1.13. Свет можно использовать не только для визуализации микроскопических объектов, но и для манипуляции ими	921
9.1.14. Отдельные молекулы можно визуализировать при помощи флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения	923
9.1.15. Отдельные молекулы можно захватывать и передвигать при помощи атомно-силовой микроскопии	924
9.1.16. Молекулы можно метить радиоизотопами	926
9.1.17. Радиоизотопы используются для слежения за молекулами внутри клеток и организмов.....	927

<i>Заключение</i>	929
9.2. Изучение клеток молекул в электронный микроскоп	929
9.2.1. Электронный микроскоп разрешает тонкую структуру клетки	930
9.2.2. Биологические образцы нужно специально подготавливать для электронной микроскопии	931
9.2.3. Определенные макромолекулы можно локализовать при помощи иммунной электронной микроскопии коллоидного золота	934
9.2.4. Изображения поверхностей можно получить при помощи сканирующей электронной микроскопии	935
9.2.5. Металлическое напыление позволяет исследовать свойства поверхностей при помощи трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения	936
9.2.6. Негативное окрашивание и криоэлектронная микроскопия позволяют видеть макромолекулы с высоким разрешением	939
9.2.7. Для увеличения разрешения можно объединять несколько изображений	941
9.2.8. Различные ракурсы одного объекта можно объединить для получения трехмерной реконструкции	943
<i>Заключение</i>	944
<i>Задачи</i>	946
<i>Литература</i>	949

ЧАСТЬ IV. ВНУТРЕННЯЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТКИ

Глава 10. Структура мембраны	953
10.1. Липидный бислой	954
10.1.1. Основными липидами клеточных мембран являются фосфолипиды, сфинголипиды и стероиды	954
10.1.2. Фосфолипиды самопроизвольно образуют бислои	957
10.1.3. Липидный бислой — это двумерная жидкость	959
10.1.4. Текучесть липидных бислоев зависит от их состава	961
10.1.5. Несмотря на текучесть, липидные бислои способны образовывать домены разного состава	963
10.1.6. Жировые капли окружены монослоем фосфатидилхолина	964
10.1.7. Асимметрия липидного бислоя необходима для его функционирования	965
10.1.8. Гликолипиды расположены на поверхности всех плазматических мембран	967
<i>Заключение</i>	970
10.2. Мембранные белки	970
10.2.1. Мембранные белки могут связываться с липидным бислоем различными способами	971
10.2.2. Липидные якоря контролируют локализацию некоторых сигнальных белков в мембране	972
10.2.3. В большинстве трансмембранных белков полипептидная цепь проходит через липидный бислой в α -спиральной конформации	974
10.2.4. Трансмембранные α -спирали часто взаимодействуют друг с другом	975
10.2.5. Некоторые β -бочонки образуют крупные трансмембранные каналы	977
10.2.6. Многие мембранные белки гликозилированы	980
10.2.7. Мембранные белки можно солюбилизовать и очистить детергентами	982
10.2.8. Бактериородопсин — это светозависимый протонный насос, перекачивающий липидный бислой в форме семи α -спиралей	985

10.2.9. Мембранные белки часто функционируют в составе крупных комплексов.....	988
10.2.10. Многие мембранные белки диффундируют в плоскости мембраны....	989
10.2.11. Белки и липиды могут придерживаться определенных доменов в пределах мембраны	991
10.2.12. Цитоскелет кортикального слоя придает мембранам механическую прочность и ограничивает диффузию мембранных белков	994
<i>Заключение</i>	998
<i>Задачи</i>	998
<i>Литература</i>	1001
Глава 11. Мембранный транспорт малых молекул и электрические свойства мембраны	1004
11.1. Принципы мембранного транспорта.....	1005
11.1.1. Лишенные белков липидные бислои непроницаемы для ионов.....	1005
11.1.2. Существует два основных класса мембранных транспортных белков: транспортеры и каналы	1006
11.1.3. Транспортеры, сопряженные с источником энергии, осуществляют активный транспорт	1008
<i>Заклучение</i>	1009
11.2. Транспортеры и активный мембранный транспорт	1009
11.2.1. Движущей силой активного транспорта могут служить градиенты ионов.....	1011
11.2.2. Транспортеры плазматической мембраны регулируют pH цитоплазмы.....	1013
11.2.3. Асимметричное распределение транспортеров в эпителиальных клетках лежит в основе трансцеллюлярного транспорта растворенных веществ.....	1015
11.2.4. Существует три класса АТФ-зависимых насосов.....	1016
11.2.5. Ca^{2+} -насос является наиболее изученной АТФазой Р-типа	1017
11.2.6. Na^+/K^+ -насос Р-типа плазматической мембраны создает градиент Na^+ через плазматическую мембрану.....	1018
11.2.7. АВС-переносчики составляют самое большое семейство мембранных транспортных белков.....	1023
<i>Заклучение</i>	1027
11.3. Ионные каналы и электрические свойства мембран	1027
11.3.1. Ионные каналы ион-селективны и флуктуируют между открытым и закрытым состояниями	1028
11.3.2. Мембранный потенциал животных клеток зависит в основном от каналов утечки K^+ и градиента K^+ через плазматическую мембрану ..	1030
11.3.3. Потенциал покоя медленно убывает после остановки Na^+/K^+ -насоса..	1031
11.3.4. Трехмерная структура бактериального K^+ -канала показывает, как ионный канал может функционировать	1033
11.3.5. Аквапорины проницаемы для воды, но непроницаемы для ионов	1037
11.3.6. В основе функционирования нейронов лежит их вытянутая форма..	1039
11.3.7. Потенциал-зависимые катионные каналы генерируют потенциал действия в электрически возбудимых клетках	1040
11.3.8. Миелинизация увеличивает скорость и эффективность распространения потенциала действия по нервным клеткам	1042
11.3.9. Пэтч-клэмп указывает на то, что отдельные каналы открываются по принципу «все или ничего».....	1047
11.3.10. Потенциал-зависимые катионные каналы эволюционно и структурно родственны	1049

11.3.11. Медиатор-зависимые ионные каналы в химических синапсах передают химические сигналы в электрические	1049
11.3.12. Химические синапсы могут быть возбуждающими или тормозными	1051
11.3.13. Ацетилхолиновые рецепторы в нервно-мышечных соединениях представляют собой медиатор-зависимые катионные каналы.....	1052
11.3.14. Медиатор-зависимые ионные каналы являются важными мишенями психотропных лекарств	1054
11.3.15. Нервно-мышечная передача сигнала включает в себя последовательную активацию пяти различных наборов ионных каналов	1056
11.3.16. Отдельные нейроны — это сложные вычислительные приборы	1057
11.3.17. Обработка информации нейроном требует по крайней мере трех типов K^+ -каналов	1058
11.3.18. Долговременная потенциация гиппокампа млекопитающих зависит от входа Ca^{2+} через NMDA-рецепторы	1061
<i>Заклучение</i>	1063
<i>Задачи</i>	1064
<i>Литература</i>	1066
Глава 12. Внутриклеточные компартменты и сортировка белков	1069
12.1. Компартментализация клеток	1069
12.1.1. Все эукариотические клетки обладают одинаковым базовым набором мембранных органелл.....	1069
12.1.2. Эволюционное происхождение объясняет топологические взаимоотношения органелл	1072
12.1.3. Белки могут мигрировать между компартментами разными путями..	1076
12.1.4. Сигнальные последовательности направляют белки по правильному клеточному адресу	1079
12.1.5. Большинство органелл невозможно создать de novo: для этого требуется информация, заключенная в самой органелле	1081
<i>Заклучение</i>	1081
12.2. Транспорт молекул между ядром и цитозолем	1082
12.2.1. Ядерные поровые комплексы пересекают ядерную оболочку	1083
12.2.2. Сигналы ядерной локализации направляют ядерные белки в ядро...	1085
12.2.3. Рецепторы ядерного импорта связывают как сигналы ядерной локализации, так и белки NPC	1087
12.2.4. Ядерный экспорт работает так же, как ядерный импорт, но в обратном направлении	1088
12.2.5. GTPаза Ran определяет направление транспорта через NPC	1088
12.2.6. Транспорт через NPC может регулироваться контролирующим доступом к транспортному аппарату.....	1090
12.2.7. Во время митоза ядерная оболочка разбирается	1093
<i>Заклучение</i>	1095
12.3. Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты	1095
12.3.1. Транслокация в митохондрии зависит от сигнальных последовательностей и транслокаторов белков	1096
12.3.2. Митохондриальные белки-предшественники импортируются в форме развернутых полипептидных цепей	1098
12.3.3. Гидролиз АТФ и мембранный потенциал — движущая сила импорта белков в матрикс	1100
12.3.4. Бактерии и митохондрии используют сходные механизмы встраивания поринов в свои внешние мембраны	1101
12.3.5. Транспорт во внутреннюю мембрану и межмембранное пространство митохондрий протекает по нескольким путям.....	1102
12.3.6. Две сигнальные последовательности направляют белки в тилако-	

идную мембрану хлоропластов	1104
<i>Заключение</i>	1105
12.4. Пероксисомы	1105
12.4.1. Пероксисомы используют молекулярный кислород и перекись водорода для проведения окислительных реакций	1107
12.4.2. Короткая сигнальная последовательность направляет импорт белков в пероксисомы	1110
<i>Заключение</i>	1110
12.5. Эндоплазматический ретикулум	1111
12.5.1. ЭР структурно и функционально неоднороден	1112
12.5.2. Сигнальные последовательности впервые обнаружены у белков, импортируемых в шероховатый ЭР	1115
12.5.3. Сигнал-узнающая частица (SRP) направляет сигнальные последовательности к определенному рецептору в мембране шероховатого ЭР ..	1117
12.5.4. Полипептидная цепь проходит через водную пору транслокатора	1119
12.5.5. Транслокация через мембрану ЭР не всегда требует элонгации полипептидной цепи	1124
12.5.6. В односторонних трансмембранных белках единственная внутренняя сигнальная последовательность ЭР остается в липидном бислое в виде пронизывающей мембрану α -спирали	1125
12.5.7. Различные сочетания сигналов начала и остановки переноса определяют топологию многосторонних трансмембранных белков	1127
12.5.8. Транслоцированные полипептидные цепи сворачиваются и собираются в люмене шероховатого ЭР	1130
12.5.9. Большинство синтезированных в шероховатом ЭР белков гликозилируется путем добавления N-связанного олигосахарида	1131
12.5.10. Олигосахариды служат маркерами протекания фолдинга белков ...	1132
12.5.11. Неправильно свернутые белки экспортируются из ЭР и деградируют в цитозоле	1135
12.5.12. Неправильно свернутые белки в ЭР активируют реакцию несвернутых белков	1137
12.5.13. Некоторые мембранные белки приобретают ковалентно связанный гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь	1137
12.5.14. ЭР собирает большинство липидных бислоев	1139
<i>Заключение</i>	1143
<i>Задачи</i>	1144
<i>Литература</i>	1148
Глава 13. Внутриклеточный везикулярный транспорт	1151
13.1. Молекулярные механизмы мембранного транспорта и поддержания различий между компартментами	1154
13.1.1. Существует несколько типов окаймленных пузырьков	1154
13.1.2. Сборка клатриновой оболочки является движущей силой формирования пузырьков	1155
13.1.3. Не все оболочки образуют корзиноподобную структуру	1160
13.1.4. Фосфоинозитиды маркируют органеллы и мембранные домены	1160
13.1.5. Цитоплазматические белки регулируют отшнуровывание и сбрасывание оболочки окаймленных везикул	1162
13.1.6. Мономерные GTPазы регулируют сборку оболочек	1163
13.1.7. Не все транспортные везикулы имеют сферическую форму	1165
13.1.8. Белки Rab направляют везикулы к их мишеням	1167
13.1.9. Белки SNARE опосредуют слияние мембран	1169
13.1.10. Взаимодействующие SNARE должны разойтись, прежде чем они смогут снова функционировать	1173

13.1.11. Вирусные белки слияния и белки SNARE могут работать по одинаковым механизмам слияния	1173
<i>Заключение</i>	1175
13.2. Транспорт из ЭР через аппарат Гольджи.....	1176
13.2.1. Белки покидают ЭР в составе окаймленных СОПІI транспортных везикул.....	1176
13.2.2. Только правильно свернутые и собранные белки могут покинуть ЭР ..	1178
13.2.3. Везикулярно-тубулярные кластеры опосредуют транспорт из ЭР в аппарат Гольджи	1179
13.2.4. В возвратном пути в ЭР используются сигналы сортировки	1181
13.2.5. Многие белки селективно удерживаются в компартментах, в которых они функционируют.....	1182
13.2.6. Аппарат Гольджи состоит из упорядоченного набора компартментов ..	1183
13.2.7. Олигосахаридные цепи модифицируются в аппарате Гольджи.....	1186
13.2.8. Протеогликаны собираются в аппарате Гольджи	1189
13.2.9. Зачем нужно гликозилирование?	1191
13.2.10. Транспорт через аппарат Гольджи может протекать посредством везикулярного транспорта или созревания цистерн.....	1193
13.2.11. Белки матрикса Гольджи способствуют организации стопки	1195
<i>Заклучение</i>	1196
13.3. Транспорт из <i>транс</i> -сети Гольджи в лизосомы	1196
13.3.1. Лизосомы — это главный сайт внутриклеточного пищеварения	1196
13.3.2. Лизосомы неоднородны.....	1198
13.3.3. Вакуоли растений и грибов — это удивительно многофункциональные лизосомы	1199
13.3.4. Вещества доставляются в лизосомы различными путями.....	1201
13.3.5. Рецептор маннозо-6-фосфата узнает лизосомальные белки в <i>транс</i> -сети Гольджи.....	1203
13.3.6. Рецептор М6Р движется между определенными мембранами	1204
13.3.7. Сигнальный участок на полипептидной цепи гидролазы указывает, куда присоединять М6Р	1204
13.3.8. Нарушения GlcNAc-фосфотрансферазы вызывают у людей лизосомальные болезни накопления	1206
13.3.9. Некоторые лизосомы претерпевают экзоцитоз	1207
<i>Заклучение</i>	1208
13.4. Транспорт в клетку из плазматической мембраны: эндоцитоз	1208
13.4.1. Специализированные фагоцитирующие клетки способны поглощать крупные частицы	1209
13.4.2. Пиноцитозные пузырьки образуются на плазматической мембране из окаймленных ямок.....	1211
13.4.3. Не все пиноцитозные пузырьки окаймлены клатрином	1212
13.4.4. Для импорта определенных внеклеточных макромолекул клетки используют рецептор-опосредованный эндоцитоз.....	1214
13.4.5. Эндоцитированные вещества, не изъятые из эндосом, оказываются в лизосомах	1216
13.4.6. Определенные белки возвращаются из ранних эндосом в плазматическую мембрану	1217
13.4.7. На пути в поздние эндосомы образуются мультивезикулярные тельца.....	1219
13.4.8. Трансцитоз переносит макромолекулы через пласты эпителиальных клеток	1222
13.4.9. Эпителиальные клетки содержат два различных ранних эндосомальных компартмента, но один общий поздний эндосомальный компартмент....	1225

<i>Заключение</i>	1226
13.5. Транспорт из <i>транс</i> -сети Гольджи во внеклеточное пространство: экзоцитоз ..	1227
13.5.1. Многие белки и липиды автоматически переносятся из аппарата Гольджи на поверхность клетки	1228
13.5.2. Секреторные пузырьки отпочковываются от <i>транс</i> -сети Гольджи....	1229
13.5.3. Часто белки в процессе образования секреторных пузырьков протеолитически модифицируются.....	1232
13.5.4. Секреторные везикулы ждут вблизи плазматической мембраны до тех пор, пока не им поступит сигнал высвободить свое содержимое ..	1233
13.5.5. Регулируемый экзоцитоз может быть локальным ответом плазматической мембраны и расположенной под ней цитоплазмы	1234
13.5.6. Компоненты мембраны секреторных пузырьков быстро удаляются из плазматической мембраны	1235
13.5.7. Некоторые регулируемые события экзоцитоза направлены на увеличение плазматической мембраны	1236
13.5.8. Поляризованные клетки направляют белки из <i>транс</i> -сети Гольджи в соответствующий домен плазматической мембраны	1236
13.5.9. Различные механизмы селективно направляют мембранные белки и липиды в соответствующие домены плазматической мембраны.....	1237
13.5.10. Синаптические пузырьки могут напрямую образовываться из эндоцитозных пузырьков	1239
<i>Заключение</i>	1241
<i>Задачи</i>	1242
<i>Литература</i>	1246
Глава 14. Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты	1250
14.1. Митохондрия	1254
14.1.1. Митохондрия содержит внешнюю мембрану, внутреннюю мембрану и два внутренних компартмента	1255
14.1.2. В цикле лимонной кислоты образуются высокоэнергетические электроны.....	1257
14.1.3. Хемиосмотический процесс преобразует энергию окисления в АТФ ..	1259
14.1.4. NADH переносит свои электроны на кислород через три крупных ферментных комплекса.....	1260
14.1.5. По мере движения электронов по дыхательной цепи энергия запасается в форме электрохимического протонного градиента через внутреннюю мембрану	1261
14.1.6. Протонный градиент служит движущей силой синтеза АТФ	1263
14.1.7. Протонный градиент служит движущей силой сопряженного транспорта через внутреннюю мембрану	1265
14.1.8. За счет протонного градиента образуется большая часть АТФ клетки	1265
14.1.9. Митохондрии поддерживают в клетке высокое соотношение АТФ:АДР	1266
14.1.10. Большая отрицательная величина ΔG гидролиза АТФ делает АТФ полезным клетке.....	1268
14.1.11. АТФ-синтаза может работать в обратном направлении для гидролиза АТФ и накачки H^+	1270
<i>Заключение</i>	1272
14.2. Электрон-транспортные цепи и протонные насосы	1272
14.2.1. Протоны необыкновенно легко транспортировать.....	1273
14.2.2. Окислительно-восстановительный потенциал — это мера сродства к электрону.....	1274
14.2.3. Перенос электрона высвобождает большое количество энергии.....	1275

14.2.4. Методы спектроскопии позволили идентифицировать многие электронные переносчики дыхательной цепи.....	1277
14.2.5. Дыхательная цепь содержит три крупных встроенных во внутреннюю мембрану ферментных комплекса.....	1279
14.2.6. Железо-медный кластер цитохромоксидазы катализирует эффективное восстановление O_2	1281
14.2.7. Перенос электрона во внутренней митохондриальной мембране происходит путем туннелирования при случайных столкновениях.....	1283
14.2.8. Значительное падение редокс-потенциала вдоль каждого из трех дыхательных ферментных комплексов дает энергию для откачки H^+	1283
14.2.9. Перекачка H^+ в трех основных ферментных комплексах происходит по разным механизмам.....	1284
14.2.10. H^+ -ионофоры разобщают электронный транспорт и синтез АТФ.....	1287
14.2.11. Дыхательный контроль обычно ограничивает поток электронов через цепь.....	1287
14.2.12. Природные разобщители превращают митохондрии бурого жира в производящие тепло машины.....	1288
14.2.13. Митохондрии играют множество ключевых ролей в метаболизме клетки.....	1288
14.2.14. Бактерии также используют хемиосмотические механизмы для получения энергии.....	1289
<i>Заключение</i>	1290
14.3. Хлоропласты и фотосинтез.....	1291
14.3.1. Хлоропласт является одним из членов семейства пластид.....	1292
14.3.2. Хлоропласты похожи на митохондрии, но обладают дополнительным компартментом.....	1293
14.3.3. Хлоропласты улавливают энергию света и используют ее для фиксации углерода.....	1294
14.3.4. Фиксация углерода катализируется рибулозобисфосфаткарбоксилазой.....	1296
14.3.5. Фиксация одной молекулы CO_2 требует трех молекул АТФ и двух молекул NADPH.....	1297
14.3.6. В некоторых растениях фиксация углерода компартментализована для усиления роста при низких концентрациях CO_2	1299
14.3.7. Фотосинтез основан на фотохимии молекул хлорофилла.....	1301
14.3.8. Фотохимический реакционный центр и антенный комплекс образуют фотосистему.....	1302
14.3.9. В реакционном центре уловленная хлорофиллом энергия преобразует слабый донор электронов в сильный.....	1303
14.3.10. В результате нециклического фотофосфорилирования образуются NADPH и АТФ.....	1306
14.3.11. Хлоропласты способны синтезировать АТФ посредством циклического фосфорилирования без синтеза NADPH.....	1308
14.3.12. Структуры фотосистем I и II родственны и похожи на структуру бактериальных фотосистем.....	1310
14.3.13. В митохондриях и хлоропластах действует одна и та же протондвижущая сила.....	1310
14.3.14. Белки-переносчики внутренней мембраны хлоропластов контролируют обмен метаболитов с цитозолем.....	1310
14.3.15. В хлоропластах также протекает биосинтез.....	1312
<i>Заключение</i>	1312
14.4. Генетические системы митохондрий и пластид.....	1313
14.4.1. Митохондрии и хлоропласты содержат полные генетические системы.....	1313

14.4.2. Рост и деление органелл определяют число митохондрий и пластид в клетке	1315
14.4.3. Геномы митохондрий и хлоропластов разнообразны.....	1318
14.4.4. По-видимому, митохондрии и хлоропласты эволюционировали из эндосимбиотических бактерий	1319
14.4.5. Митохондриям свойственны свободное использование кодонов и отличающийся генетический код.....	1321
14.4.6. Митохондрии животных содержат самые простые генетические системы из известных.....	1323
14.4.7. Некоторые гены митохондрий и хлоропластов содержат интроны....	1323
14.4.8. Хлоропластный геном высших растений содержит около 120 генов..	1324
14.4.9. Митохондриальные гены наследуются не по менделевскому механизму	1325
14.4.10. Гены органелл во многих организмах наследуются по материнской линии	1327
14.4.11. Карликовые мутанты дрожжей показывают значение клеточного ядра для биогенеза митохондрий	1328
14.4.12. Митохондрии и пластиды содержат тканеспецифичные белки, кодируемые клеточным ядром	1329
14.4.13. Митохондрии импортируют большую часть своих белков; хлоропласты — синтезируют.....	1330
14.4.14. Митохондрии могут вносить вклад в старение клеток и организмов	1330
14.4.15. Почему у митохондрий и хлоропластов есть свои собственные генетические системы?	1331
<i>Заключение</i>	1333
14.5. Эволюция электрон-транспортных цепей.....	1334
14.5.1. Предполагается, что самые ранние клетки для синтеза АТФ использовали брожение.....	1334
14.5.2. Электрон-транспортные цепи позволили анаэробным бактериям использовать несбраживаемые молекулы в качестве основного источника энергии.....	1334
14.5.3. Создав неистощимый источник восстановительной способности, фотосинтетические бактерии преодолели важную эволюционную преграду	1336
14.5.4. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь цианобактерий синтезировала атмосферный кислород и позволила возникнуть новым формам жизни.....	1338
<i>Заключение</i>	1340
<i>Задачи</i>	1343
<i>Литература</i>	1345
Глава 15. Механизмы межклеточной сигнализации	1348
15.1. Общие принципы клеточной коммуникации	1349
15.1.1. Внеклеточные сигнальные молекулы специфически связываются с рецепторами.....	1350
15.1.2. Внеклеточные сигнальные молекулы могут действовать на коротких и дальних расстояниях	1352
15.1.3. Щелевые контакты позволяют соседним клеткам обмениваться сигнальной информацией.....	1355
15.1.4. Каждая клетка запрограммирована отвечать на определенные сочетания внеклеточных сигнальных молекул	1356
15.1.5. Обычно различные типы клеток по-разному отвечают на одну и ту же внеклеточную сигнальную молекулу	1358

15.1.6. Судьба некоторых развивающихся клеток зависит от их положения в градиенте морфогена	1359
15.1.7. Клетка может быстро изменить концентрацию внутриклеточной молекулы, только если время жизни молекулы мало	1360
15.1.8. Сигнал оксида азота основан на прямой регуляции активности специфических белков клетки-мишени	1361
15.1.9. Ядерные рецепторы — это лиганд-зависимые белки-регуляторы генов	1363
15.1.10. Три самых крупных класса поверхностных рецепторов — рецепторы, сопряженные с ионными каналами, с G-белками и с ферментами	1368
15.1.11. Большинство активированных поверхностных рецепторов передают сигнал посредством малых молекул и сети внутриклеточных сигнальных белков	1370
15.1.12. Многие внутриклеточные сигнальные белки выполняют роль молекулярных переключателей, активируемых фосфорилированием или связыванием GTP	1372
15.1.13. Внутриклеточные сигнальные комплексы увеличивают скорость, эффективность и специфичность ответа	1374
15.1.14. Модульные домены опосредуют взаимодействия между внутриклеточными сигнальными белками	1375
15.1.15. Клетки используют различные механизмы для быстрого ответа на постепенно возрастающую концентрацию внеклеточной сигнальной молекулы	1379
15.1.16. Во внутриклеточных сигнальных сетях часто используются обратные связи	1382
15.1.17. Клетки могут регулировать свою чувствительность к сигналу	1385
<i>Заключение</i>	1386
15.2. Сигнализация посредством поверхностныхсопряженных с G-белками рецепторов GPCR и малых внутриклеточных медиаторов	1388
15.2.1. Тримерные G-белки передают сигнал от GPCR	1389
15.2.2. Некоторые G-белки регулируют образование циклического АМР	1390
15.2.3. Действие циклического АМР в основном опосредуется цикло-АМР-зависимой протеинкиназой (РКА)	1392
15.2.4. Некоторые G-белки за счет активации фосфолипазы С активируют инозитолфосфолипидный сигнальный путь	1396
15.2.5. Ca^{2+} функционирует как универсальный внутриклеточный медиатор ..	1400
15.2.6. Частота колебаний Ca^{2+} влияет на ответ клетки	1402
15.2.7. Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CaM-киназы) опосредуют многие ответы животных клеток на сигналы Ca^{2+}	1403
15.2.8. Некоторые G-белки напрямую регулируют ионные каналы	1406
15.2.9. Зрение и обоняние зависят от GPCR, действующих на регулируемые циклическими нуклеотидами ионные каналы	1408
15.2.10. Внутриклеточные медиаторы и ферментные каскады усиливают внеклеточные сигналы	1411
15.2.11. Десенсибилизация GPCR зависит от фосфорилирования рецепторов	1413
<i>Заключение</i>	1414
15.3. Сигнализация посредством сопряженных с ферментами поверхностных рецепторов	1415
15.3.1. Активированные тирозинкиназные рецепторы (RTK) фосфорилируют сами себя	1416
15.3.2. Фосфорилированные тирозины на RTK служат сайтами докинга внутриклеточных сигнальных белков	1417

15.3.3. Белки, несущие SH2-домен, связывают фосфорилированные тирозины	1420
15.3.4. Белок Ras относится к крупному семейству мономерных GTPаз.....	1421
15.3.5. RTK активируют Ras посредством адаптеров и GEF: исследования развития глаза дрозофилы	1424
15.3.6. Ras активирует MAP-киназный сигнальный модуль	1426
15.3.7. Каркасные белки не дают пересекаться параллельным MAP-киназным модулям.....	1429
15.3.8. Семейство GTPаз Rho функционально сопрягает поверхностные рецепторы с цитоскелетом.....	1431
15.3.9. PI3-киназа создает в плазматической мембране липидные сайты докинга.....	1433
15.3.10. Сигнальный путь PI3-киназа-Akt стимулирует выживание и рост животных клеток	1434
15.3.11. Сигнальные пути, активируемые RTK и GPCR, пересекаются.....	1437
15.3.12. Активность связанных с тирозинкиназами рецепторов зависит от цитоплазматических тирозинкиназ.....	1437
15.3.13. Рецепторы цитокинов активируют сигнальный путь JAK-STAT, создавая быстрый путь в ядро.....	1439
15.3.14. Тирозинфосфатазы снимают фосфорилирование по тирозинам.....	1441
15.3.15. Действие сигнальных белков суперсемейства TGF β опосредовано рецепторными серин-треониновыми киназами и белками Smads.....	1442
15.3.16. Структуры серин-треониновых и тирозиновых протеинкиназ похожи	1444
15.3.17. Бактериальный хемотаксис зависит от двухкомпонентного сигнального пути, активируемого связанными с гистидинкиназой рецепторами.....	1445
15.3.18. Адаптация бактериального хемотаксиса происходит за счет метилирования рецепторов	1449
<i>Заключение</i>	1451
15.4. Сигнальные пути, основанные на регулируемом протеолизе латентных белков-регуляторов генов	1452
15.4.1. Рецепторный белок Notch — это латентный белок-регулятор генов ..	1452
15.4.2. Белки Wnt связываются с рецепторами Frizzled и ингибируют деградацию β -катенина	1455
15.4.3. Белки Hedgehog связывают Patched, снимая ингибирование Smoothened.....	1458
15.4.4. Многие стрессовые и воспалительные стимулы опосредованы NF κ B-зависимым сигнальным путем	1461
<i>Заключение</i>	1463
15.5. Сигнализация в растениях.....	1465
15.5.1. Многоклеточность и межклеточная сигнализация в растениях и животных эволюционировали независимо.....	1465
15.5.2. Рецепторные серин-треониновые киназы — самый крупный класс поверхностных рецепторов растений.....	1466
15.5.3. Этилен блокирует в ядре деградацию определенных белков-регуляторов генов	1468
15.5.4. Регулируемое распределение транспортеров ауксина направляет рост растения	1471
15.5.5. Фитохромы улавливают красный свет, а криптохромы — синий	1471
<i>Заключение</i>	1475
<i>Задачи</i>	1475
<i>Литература</i>	1479

Глава 16. Цитоскелет	1483
16.1. Самосборка и динамическая структура филаментов цитоскелета.....	1485
16.1.1. Филаменты цитоскелета динамичны и быстро адаптируются.....	1485
16.1.2. Цитоскелет способен образовывать стабильные структуры.....	1487
16.1.3. Цитоскелетные филаменты состоят из белковых субъединиц.....	1490
16.1.4. Филаменты, образующиеся из множества протофиламентов, обладают преимуществами	1491
16.1.5. Нуклеация — это лимитирующая стадия образования цитоскелетного полимера.....	1492
16.1.6. Для образования полярных филаментов тубулиновые и актиновые субъединицы собираются по принципу «голова к хвосту».....	1494
16.1.7. Противоположные концы микротрубочек и микрофиламентов растут с разной скоростью	1500
16.1.8. Тредмиллинг и динамическая нестабильность филаментов — последствия гидролиза нуклеотидов тубулином и актином.....	1501
16.1.9. Тредмиллинг и динамическая нестабильность способствуют быстрой перестройке цитоскелета	1506
16.1.10. С эволюционной точки зрения эукариотические тубулин и актин высококонсервативны.....	1507
16.1.11. Структура промежуточных филаментов зависит от латерального объединения и скручивания спиралей в суперспираль.....	1508
16.1.12. Промежуточные филаменты придают животным клеткам механическую устойчивость	1511
16.1.13. Токсины могут влиять на полимеризацию филаментов.....	1514
16.1.14. Организация и деление бактериальных клеток зависят от гомологов эукариотического цитоскелета	1515
<i>Заключение</i>	<i>1520</i>
16.2. Как клетки регулируют свои цитоскелетные филаменты	1521
16.2.1. Содержащий γ -тубулин белковый комплекс обеспечивает нуклеацию микротрубочек.....	1522
16.2.2. В животных клетках микротрубочки отходят от centrosомы.....	1522
16.2.3. Нуклеация актиновых филаментов часто происходит в плазматической мембране	1529
16.2.4. Механизм нуклеации влияет на крупномасштабную организацию филаментов	1529
16.2.5. Белки, связывающие свободные субъединицы, влияют на удлинение филаментов	1531
16.2.6. Расщепляющие белки регулируют длину и кинетику актиновых филаментов и микротрубочек	1534
16.2.7. Белки, связывающиеся вдоль филаментов, могут их либо стабилизировать, либо дестабилизировать.....	1535
16.2.8. Белки, взаимодействующие с концами филаментов, способны значительно влиять на их динамику	1538
16.2.9. Различные типы белков изменяют свойства быстрорастущих концов микротрубочек.....	1539
16.2.10. В клетках филаменты объединяются в структуры более высокого порядка	1541
16.2.11. Для образования прочных структур промежуточные филаменты поперечно сшиваются и формируют пучки	1542
16.2.12. Сшивающие белки с особыми свойствами приводят к различной сборке актиновых филаментов.....	1543
16.2.13. Филамин и спектрин образуют сети актиновых филаментов.....	1547
16.2.14. Элементы цитоскелета образуют множество связей с мембраной	1548

<i>Заключение</i>	1550
16.3. Молекулярные моторы	1550
16.3.1. Моторные белки актина образуют суперсемейство миозинов	1551
16.3.2. Существует два типа моторных белков микротрубочек: кинезины и динеины	1554
16.3.3. Структурное сходство между миозином и кинезином указывает на их общее эволюционное происхождение	1558
16.3.4. Моторные белки создают механическую силу за счет сопряжения гидролиза АТФ с конформационными перестройками	1559
16.3.5. Кинетика моторных белков адаптирована к функциям клетки	1564
16.3.6. Моторные белки опосредуют внутриклеточный транспорт мембранных органелл	1566
16.3.7. Цитоскелет локализует специфические молекулы РНК	1568
16.3.8. Клетки регулируют функционирование моторных белков	1570
<i>Заключение</i>	1572
16.4. Цитоскелет и функционирование клетки	1574
16.4.1. Скольжение миозина II и актиновых филаментов приводит к сокращению мышц	1574
16.4.2. Мышечное сокращение инициируется внезапным увеличением концентрации цитоплазматического Ca^{2+}	1578
16.4.3. Сердечная мышца — это точно сконструированная машина	1581
16.4.4. Реснички и жгутики — это подвижные структуры, состоящие из микротрубочек и динеинов	1582
16.4.5. Образование митотического веретена деления требует динамичности микротрубочек и взаимодействия множества моторных белков	1587
16.4.6. Многие клетки способны ползать по твердому субстрату	1589
16.4.7. Полимеризация актина приводит к выпячиванию плазматической мембраны	1590
16.4.8. Адгезия и натяжение клеток позволяют им продвигаться вперед	1594
16.4.9. Представители семейства белков Rho вызывают значительные перестройки актинового цитоскелета	1599
16.4.10. Внеклеточные сигналы могут активировать трех представителей белкового семейства Rho	1603
16.4.11. Внешние сигналы могут определять направление миграции клеток	1605
16.4.12. Взаимодействие между микротрубочковым и актиновым цитоскелетами координирует поляризацию и локомоцию целой клетки	1607
16.4.13. Сложная морфологическая специализация нейронов зависит от цитоскелета	1609
<i>Заключение</i>	1612
<i>Задачи</i>	1613
<i>Литература</i>	1616
Глава 17. Клеточный цикл	1620
17.1. Обзор клеточного цикла	1621
17.1.1. Эукариотический клеточный цикл подразделяется на четыре фазы ...	1622
17.1.2. Контроль клеточного цикла примерно одинаков во всех эукариотах	1623
17.1.3. Контроль клеточного цикла можно генетически препарировать путем анализа дрожжевых мутантов	1624
17.1.4. Контроль клеточного цикла можно биохимически анализировать в зародышах животных	1626
17.1.5. Контроль клеточного цикла можно изучать на клетках млекопитающих в культуре	1628

17.1.6. Прохождение по клеточному циклу можно изучать разными способами	1629
<i>Заключение</i>	1631
17.2. Система контроля клеточного цикла	1631
17.2.1. Система контроля клеточного цикла запускает основные события клеточного цикла	1631
17.2.2. Система контроля клеточного цикла зависит от циклично активируемых циклин-зависимых протеинкиназ (Cdk)	1633
17.2.3. Ингибирующее фосфорилирование и белки-ингибиторы Cdk (CKI) способны подавлять активность Cdk	1636
17.2.4. Система контроля клеточного цикла зависит от циклического протеолиза	1636
17.2.5. Контроль клеточного цикла также зависит от транскрипционной регуляции	1638
17.2.6. Система контроля клеточного цикла функционирует как сеть биохимических переключателей	1638
<i>Заключение</i>	1640
17.3. S-фаза	1641
17.3.1. S-Cdk раз в цикл инициирует репликацию ДНК	1642
17.3.2. Для удвоения хромосом необходима дупликация структуры хроматина	1645
17.3.3. Когезины удерживают сестринские хроматиды вместе	1645
<i>Заключение</i>	1646
17.4. Митоз	1646
17.4.1. M-Cdk управляет входением в митоз	1647
17.4.2. В начале митоза дефосфорилирование активирует M-Cdk	1647
17.4.3. Конденсин помогает подготовить удвоенные хромосомы к разделению	1650
17.4.4. Веретено деления — это состоящая из микротрубочек машина	1652
17.4.5. Связанные с микротрубочками моторные белки управляют сборкой и функционированием веретена деления	1653
17.4.6. В сборке биполярного веретена деления участвуют два механизма	1655
17.4.7. Удвоение centrosом происходит рано в клеточном цикле	1655
17.4.8. M-Cdk инициирует сборку веретена деления в профазе	1656
17.4.9. Для завершения сборки веретена деления в животных клетках необходимо разрушение ядерной оболочки	1657
17.4.10. В митозе значительно усиливается нестабильность микротрубочек	1657
17.4.11. Митотические хромосомы помогают сборке биполярного веретена деления	1659
17.4.12. Кинетохоры прикрепляют сестринские хроматиды к веретену деления	1662
17.4.13. Би-ориентация достигается методом проб и ошибок	1665
17.4.14. На хромосомы на веретене действуют многочисленные силы	1666
17.4.15. APC/C запускает расхождение сестринских хроматид и завершение митоза	1670
17.4.16. Неприкрепленные хромосомы блокируют расхождение сестринских хроматид: контрольная точка сборки веретена деления	1671
17.4.17. Хромосомы расходятся в анафазе А и В	1673
17.4.18. В телофазе разошедшиеся хромосомы упаковываются в дочерние ядра	1674
17.4.19. Мейоз — это особый вид деления ядер, участвующий в половом размножении	1675
<i>Заключение</i>	1677

17.5. Цитокинез.....	1678
17.5.1. Актин и миозин II сократимого кольца генерируют силы цитокинеза ..	1679
17.5.2. Локальная активация RhoA запускает сборку и сокращение сократимого кольца.....	1679
17.5.3. Микротрубочки веретена деления определяют плоскость деления животных клеток.....	1681
17.5.4. Фрагмопласт направляет цитокинез в высших растениях.....	1684
17.5.5. Во время цитокинеза мембранные органеллы должны быть распределены по дочерним клеткам.....	1685
17.5.6. Некоторые клетки смещают свое веретено деления для асимметричного деления	1687
17.5.7. Митоз может протекать без цитокинеза.....	1687
17.5.8. G ₁ -фаза — это стационарное состояние неактивности Cdk	1688
<i>Закключение</i>	1691
17.6. Регуляция деления и роста клеток.....	1691
17.6.1. Митогены стимулируют деление клеток.....	1692
17.6.2. Клетки могут отложить деление, войдя в специализированное неделящееся состояние	1693
17.6.3. Митогены стимулируют активность G ₁ -Cdk и G ₁ /S-Cdk.....	1694
17.6.4. Повреждение ДНК блокирует клеточное деление: ответ на повреждение ДНК.....	1696
17.6.5. Многие клетки человека обладают встроенным ограничением на число делений	1698
17.6.6. Патологические сигналы пролиферации вызывают в клетках, за исключением раковых, остановку клеточного цикла или апоптоз	1699
17.6.7. Рост организма и органов зависит от роста клеток	1700
17.6.8. Пролиферирующие клетки обычно координируют свой рост и деление.....	1701
17.6.9. Соседние клетки конкурируют за внеклеточные сигнальные белки ..	1703
17.6.10. Животные контролируют общую массу клеток по неизвестному механизму	1704
<i>Закключение</i>	1705
<i>Задачи</i>	1706
<i>Литература</i>	1709
Глава 18. Апоптоз	1713
18.1.1. Клетки, подлежащие элиминации, уничтожаются посредством программируемой клеточной смерти.....	1714
18.1.2. Апоптотные клетки можно распознать биохимически	1716
18.1.3. В апоптозе участвует внутриклеточный протеолитический каскад, опосредованный каспазами	1718
18.1.4. Внешний путь активации апоптоза лежит через рецепторы смерти, находящиеся на поверхности клетки	1720
18.1.5. В запуске апоптоза по внутреннему пути участвуют митохондрии.....	1722
18.1.6. Белки Bcl2 регулируют внутренний путь запуска апоптоза	1723
18.1.7. Белки IAP ингибируют каспазы	1727
18.1.8. Внеклеточные факторы выживания различными способами ингибируют апоптоз	1729
18.1.9. Как избыточный, так и недостаточный уровень апоптоза может приводить к нарушениям.....	1730
<i>Закключение</i>	1732
<i>Задачи</i>	1733
<i>Литература</i>	1734

Дополнительный иллюстративный материал

- Таблица 8.1. Некоторые часто используемые клеточные линии. Стр. 782
- Таблица 8.2. Основные этапы развития рентгеноструктурного анализа и ЯМР спектроскопии и их применения к биологическим молекулам. Стр. 818
- Таблица 8.3. Основные этапы развития метод рекомбинантных ДНК и трансгенных технологий. Стр. 821–822
- Приложение 8.1. Обзор классической генетики. Стр. 852–853
- Таблица 9.1. Некоторые широко применяемые в биологии радиоизотопы. Стр. 926
- Таблица 10.1. Примерный липидный состав различных клеточных мембран. Стр. 963
- Таблица 11.1. Сравнение концентраций ионов внутри и снаружи типичной клетки млекопитающих. Стр. 1005
- Приложение 11.1. Внутриклеточный водный баланс: проблема и ее решение. Стр. 1022
- Приложение 11.2. Следствия уравнения Нернста. Стр. 1032
- Приложение 11.3. Некоторые классические эксперименты на аксоне гигантского кальмара. Стр. 1044
- Таблица 11.2. Некоторые семейства ионных каналов. Стр. 1064
- Таблица 12.1. Относительные объемы, занимаемые основными внутриклеточными компартментами клетки печени (гепатоцита). Стр. 1071
- Таблица 12.2. Относительное содержание разных типов мембран в двух видах эукариотических клеток. Стр. 1072
- Таблица 12.3. Некоторые типичные сигнальные последовательности. Стр. 1079
- Приложение 12.1. Подходы к изучению сигнальных последовательностей. Стр. 1080
- Приложение 13.1. Подходы к изучению молекулярных механизмов везикулярного транспорта. Стр. 1156–1157
- Таблица 13.1. Субклеточная локализация некоторых белков Rab. Стр. 1168
- Таблица 14.1. Выходы продуктов окисления сахаров и жиров. Стр. 1267
- Приложение 14.1. Окислительно-восстановительный потенциал. Стр. 1279
- Таблица 14.2. Относительное содержание митохондриальной и хлоропластной ДНК в некоторых клетках и тканях. Стр. 1316
- Таблица 14.3. Некоторые различия между «универсальным» и митохондриальным генетическими кодами. Стр. 1322
- Таблица 15.1. Некоторые клеточные ответы на гормоны, опосредуемые циклическим АМР. Стр. 1393
- Таблица 15.2. Некоторые ответы клеток, при которых GPCR активирует PLCβ. Стр. 1396
- Таблица 15.3. Четыре основные семейства тримерных G-белков. Стр. 1412

Таблица 15.4. Некоторые сигнальные белки, действующие посредством RTK. Стр. 1418

Таблица 15.5. Суперсемейство Ras мономерных GTPаз. Стр. 1423

Таблица 15.6. Некоторые внеклеточные сигнальные белки, действующие через рецепторы цитокинов и сигнальный путь JAK-STAT. Стр. 1441

Приложение 16.1. Три основных типа образующих цитоскелет белковых филаментов. Стр. 1484

Приложение 16.2. Полимеризация актина и тубулина. Стр. 1496–1497

Таблица 16.1. Основные типы белков промежуточных филаментов (ПФ) клеток позвоночных. Стр. 1511

Таблица 16.2. Токсины, влияющие на актиновые филаменты и микротрубочки. Стр. 1515

Приложение 16.3. Вспомогательные белки, которые контролируют сборку и положение филаментов цитоскелета. Стр. 1524–1525

Таблица 17.1. Основные циклины и Cdk позвоночных и почкующихся дрожжей. Стр. 1635

Таблица 17.2. Обзор основных регуляторных белков клеточного цикла. Стр. 1640

Приложение 17.1. Основные стадии М-фазы. Стр. 1648–1649

Таблица 18.1 Некоторые каспазы человека. Стр. 1718

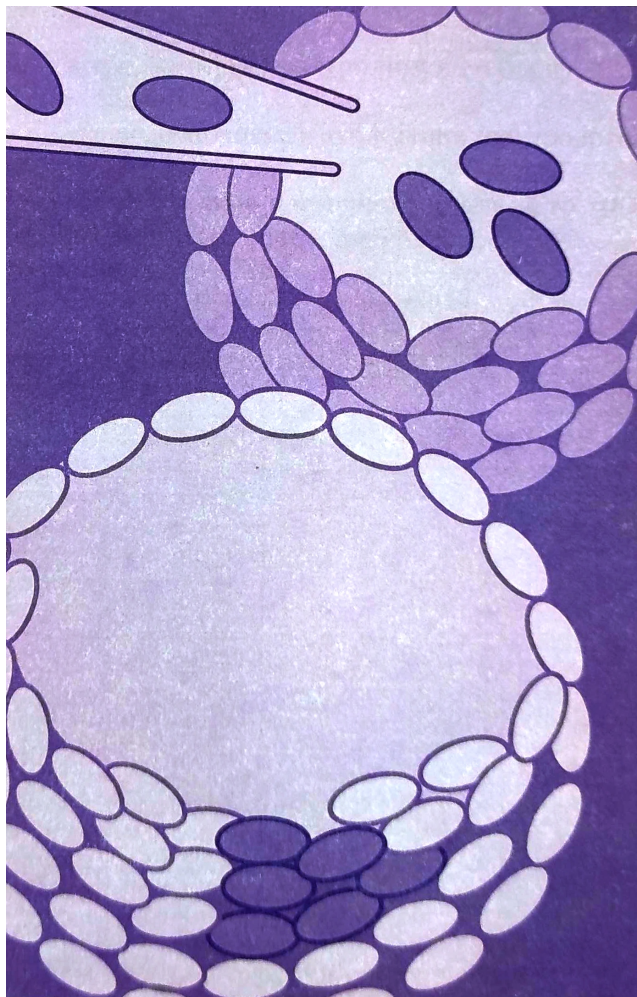
ЧАСТЬ III

ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ

Главы:

8. Манипуляция
белками, ДНК и РНК

9. Визуализация клеток



8

Манипуляция белками, ДНК и РНК

Прогресс науки зачастую тесно связан с развитием технологий. Например, целая область клеточной биологии возникла, когда ремесленники научились шлифовать маленькие линзы настолько высококачественно, что стало возможным наблюдать за клетками и их внутренней структурой. Развитие методов шлифовки линз, а не концептуальные или философские успехи, позволили Гуку и Левенгуку открыть ранее невиданный клеточный мир, где в маленькой капле воды копошатся крошечные создания (рис. 8.1).

XXI век обещает быть особенно успешным для клеточной биологии. Активное применение новых методов анализа белков, ДНК и РНК приводит к информационному взрыву. Сейчас ученые могут исследовать клетки и макромолекулы ранее невообразимыми способами. Нам доступны последовательности миллиардов нуклеотидов, и, как следствие, полные молекулярные схемы сотен организмов — от микробов и арабидопсиса до червей, мух, мышей, собак, шимпанзе и людей. Эффективные новые методы помогают интерпретировать эту информацию, позволяя нам не только составлять огромные подробные каталоги генов и белков, но и начать понимать механизмы слаженной работы этих компонентов, обеспечивающей существование и функционирование клеток и организмов. Долгосрочная цель заключается ни много ни мало в достижении полного понимания того, что происходит в клетке при ее взаимодействии с окружающей средой и соседями. Мы хотим знать, какие работают гены, какие транскрипты мРНК присутствуют в клетке и какие белки

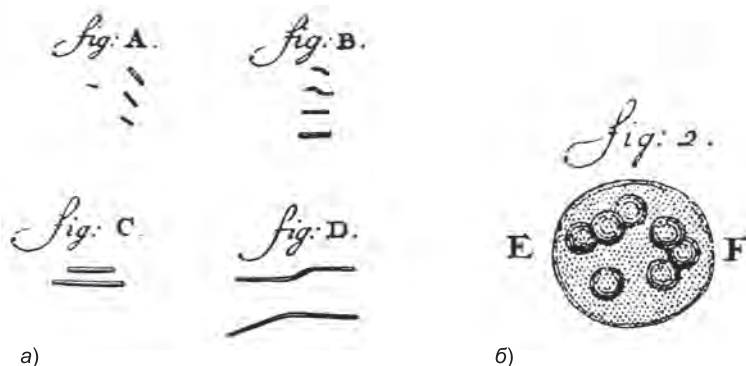


Рис. 8.1. Микроскопическая жизнь. Примеры «разнообразных анималькул», увиденных Левенгуком при помощи его простейшего микроскопа. (а) Бактерия из зубного налета. Изображенные на рис. (В) организмы Левенгук охарактеризовал как «плавающие сначала вперед, а потом назад» (1692). (б) Эукариотическая зеленая водоросль *Volvox* (1700). (С любезного разрешения фонда John Innes.)

активны: где они расположены, с какими другими молекулами они связываются и к каким метаболическим путям или сетям они принадлежат. Мы также хотим знать, как клетка успешно управляется с таким ошеломляюще большим количеством переменных и как она выбирает из практически неограниченного количества возможностей те, которые позволяют ей выполнять разнообразные биологические задачи. Такого рода информация позволит нам сформулировать фундаментальные принципы и со временем предсказывать, как гены и белки функционируют, чтобы заложить основы жизни.

В данной главе мы опишем некоторые принципиальные методы исследования молекулярных компонентов клетки, а именно белков, ДНК и РНК. Мы рассмотрим, как выделять из тканей клетки различных типов, как их выращивать вне организма и как разрушать клетки и получать составляющие их органеллы и макромолекулы в чистом виде. Мы также расскажем о новейших методах изучения структуры, функций и взаимодействий белков и рассмотрим прорывы в ДНК-технологии, продолжающие переворачивать наше понимание клеточных функций.

Описанные в данной главе методы позволили совершить множество открытий, представленных в данной книге, и в настоящее время ими ежедневно пользуются десятки тысяч ученых.

8.1. Выделение и выращивание клеток в культуре

Несмотря на то что органеллы и большие молекулы в клетке можно увидеть при помощи микроскопа, чтобы понять, как они работают, необходим детальный биохимический анализ. Большинство биохимических методов требует физического разрушения большого количества клеток для получения доступа к их компонентам. Если в качестве пробы берется образец ткани, состоящий из различных типов клеток, неоднородные клеточные популяции будут смешаны между собой. Чтобы получить как можно больше информации о клетках ткани, биологи разработали способы выделения клеток из ткани и разделения их по типам. Эти приемы позволяют получить относительно однородные популяции клеток, которые можно уже анализировать либо напрямую, либо после значительного увеличения их количества за счет пролиферации в культуре.

8.1.1. Клетки можно выделить из интактных тканей

Интактные ткани представляют собой наиболее приближенный к реальной живой системе источник материала, так как они дают клетки, на самом деле присутствующие в организме. Первый шаг выделения отдельных клеток — разрушение внеклеточного матрикса и межклеточных контактов, связывающих клетки. Образец ткани обычно обрабатывают протеолитическими ферментами (например, трипсином и коллагеназой), переваривающими белки внеклеточного матрикса, и хелатообразующими агентами (такими как этилендиаминтетрауксусная кислота, или ЭДТА), которые связывают ионы Ca^{2+} , опосредующие межклеточные контакты. Такая ткань затем может быть разрушена при помощи мягкого механического встряхивания.

В некоторых методах биохимического анализа нужный белок можно в достаточном количестве получить без разделения ткани на отдельные типы клеток. Например, это справедливо для приготовления гистонов из тимуса телят, актина мышц кролика или тубулина коровьего мозга. В других случаях получение не-

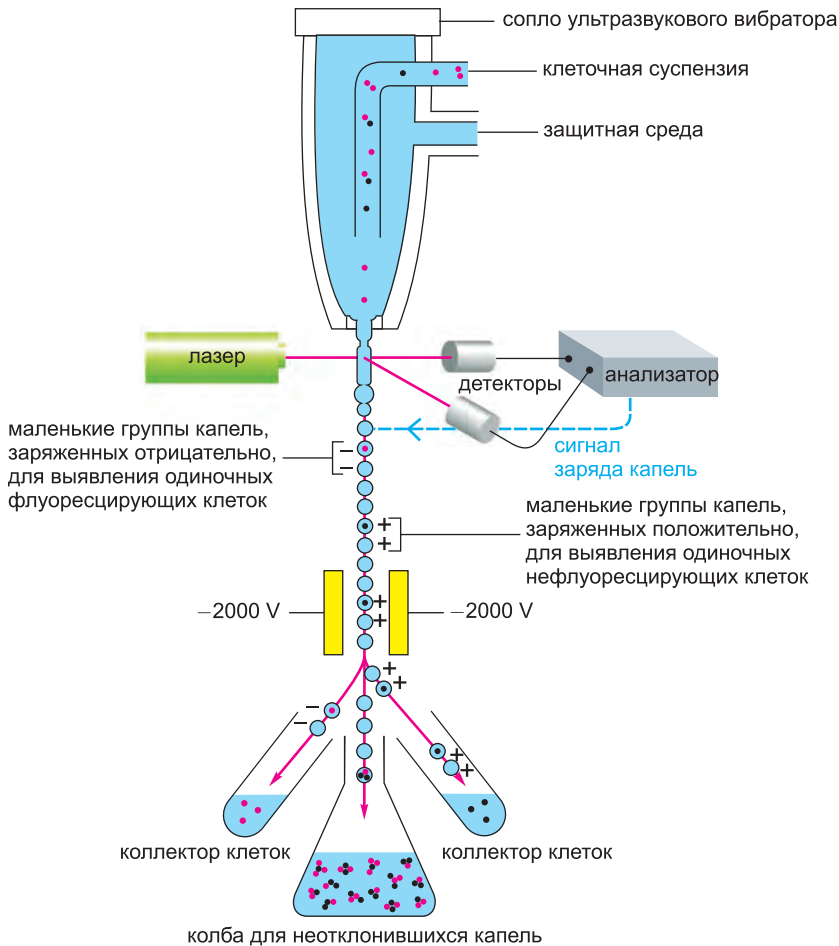


Рис. 8.2. Клеточный сортер с возбуждением флуоресценции. Изменяют флуоресценцию проходящей через лазерный луч клетки. Капельки, содержащие единственную клетку, заряжаются положительно или отрицательно в зависимости от того, обладает ли клетка флуоресценцией. Затем они в соответствии с зарядом направляются за счет электрического поля в пробирку для сбора образцов. Отметим, что необходимо подобрать концентрацию клеток таким образом, чтобы большинство капель не содержало клеток и уходило в контейнер для отходов вместе с любыми клеточными агрегатами.

обходимого белка требует его накопления в клетках определенного типа. Чтобы выделить отдельные типы клеток из смешанной суспензии, применяют несколько подходов. Наиболее распространенный способ разделения основан на мечении специфических клеток при помощи флуоресцентного красителя, связанного с анти-телом. Антитело подбирают таким образом, чтобы оно специфически связывалось только с поверхностью одного типа клеток ткани. Меченые клетки затем можно отделить от немеченых при помощи электронного *клеточного сортера с возбуждением флуоресценции*. В этом удивительном приборе отдельные клетки поодиночке проходят мимо лазерного луча, быстро измеряющего флуоресценцию каждой клетки. Вибрационный распылитель создает крошечные капельки, содержащие единственную клетку или не содержащие клеток вовсе. Содержащие клетку капли

в момент образования автоматически получают положительный или отрицательный заряд в зависимости от того, обладает ли клетка флуоресценцией; затем они за счет сильного электрического поля направляются в соответствующий контейнер. Редкие скопления клеток, которые обнаруживаются за счет повышенного светорассеяния их поверхности, остаются незаряженными и отправляются в контейнер отходов. Такие приборы способны эффективно выделить одну флуоресцирующую клетку из 1000 немеченых и отсортировать несколько тысяч клеток за секунду (рис. 8.2).

Некоторые клетки также можно получить при помощи аккуратного препарирования тонких тканевых срезов, приготовленных для микроскопического исследования (см. глава 9). В одном из подходов на кусочек ткани накладывают тонкую пластиковую пленку и облучают направленным импульсом инфракрасного лазера. Такой импульс расплавляет маленький кружок пленки, связывая расположенные ниже клетки, которые затем можно отделить для дальнейшего анализа. Этот метод, называемый *лазерной захватывающей микродиссекцией*, можно применять для выделения и анализа клеток из различных областей опухоли, что позволяет сравнивать их свойства и молекулярный состав со свойствами соседних нормальных клеток. В подобном методе импульс лазера напрямую вырезает группу клеток и катапультирует их в соответствующий контейнер для дальнейшего анализа (рис. 8.3).

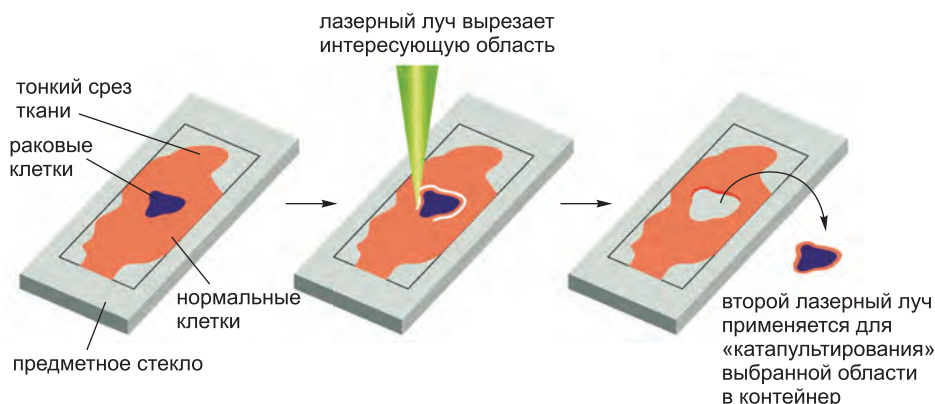


Рис. 8.3. Метод микродиссекции для выделения клеток из тканевых срезов. Лазерный луч использован для вырезания интересующего участка ткани и его выталкивания в контейнер. Этот подход позволяет выделить даже единичные клетки из образца ткани.

Полученная любым из этих или каким-либо другим методом выделения однородная популяция клеток может быть напрямую использована для биохимического анализа. После разрушения клеток при помощи механического воздействия, детергентов или других процедур можно выделить цитоплазму или индивидуальные органеллы, а затем очистить специфические молекулы.

8.1.2. Клетки можно выращивать в культуре

Молекулы можно выделять из целых тканей, но часто это не самый удобный источник материала, требующий, например, поездок на бойню с утра пораньше. Проблема состоит не только в удобстве. На используемом в качестве источника

органов скоте невозможно проводить генетические манипуляции. Более того, сложность интактных тканей и органов является неотъемлемым недостатком при очистке отдельных молекул. Выращенные в культуре клетки представляют собой более однородную популяцию для извлечения материала, к тому же с ними гораздо удобнее работать в лаборатории. В подходящих условиях в чашке Петри большинство растительных и животных клеток может расти, делиться и даже дифференцироваться. Клетки можно непрерывно исследовать под микроскопом или анализировать их биохимическими методами. Кроме того, на них можно систематически изучать влияние добавления или удаления специфических молекул, например гормонов или факторов роста. Более того, при смешивании двух типов клеток возможно исследовать взаимодействие одного типа с другим.

Иногда эксперименты с культурами клеток называют экспериментами *in vitro* (буквально — «в стекле»), в противовес работе с интактными живыми организмами, к которой применяют термин *in vivo* (буквально — «в живом организме»). Эти названия иногда приводят к путанице, потому что зачастую биохимики вкладывают в них совершенно другой смысл. В биохимической лаборатории термин *in vitro* относится к экспериментам, проводимым в пробирке без живых клеток, тогда как *in vivo* относится к любой реакции, протекающей внутри живой клетки, даже если эта клетка растет в культуре.

Культивирование тканей началось в 1907 г. с эксперимента, направленного на разрешение спора между нейробиологами, чтобы проверить гипотезу, носящую название «нейронной доктрины». Ее смысл заключается в том, что каждое нервное волокно представляет собой отросток единственной нервной клетки, а не результат слияния нескольких клеток. Чтобы проверить это утверждение, маленькие кусочки спинного мозга поместили в свернувшуюся тканевую жидкость и поставили в теплую влажную камеру. Через равные интервалы времени препарат наблюдали под микроскопом. Примерно через день отдельные нервные клетки начали выпускать в тромбы длинные тонкие волокна (аксоны). Таким образом, нейронная доктрина получила широкую поддержку и заложила фундамент для революции в молекулярной биологии, произошедшей в результате разработки метода культивирования клеток.

В этих первых экспериментах на нервных волокнах использовали маленькие фрагменты тканей, называемые эксплантатами. Сейчас культуры чаще выращивают из суспензии клеток, выделенных из тканей при помощи описанных выше методов. В отличие от бактерий, большинство клеток ткани не способно жить в толще жидкости, для роста и деления им требуется твердая поверхность. В случае клеточных культур такой подложкой служит поверхность пластиковой культуральной чашки Петри. Однако различным типам клеток нужны различные условия, и многим клеткам для пролиферации или дифференциации необходимо наличие в чашке Петри вещества, к которому они могли бы прикрепиться, например полилизина или компонентов внеклеточного матрикса.

Культуры, приготовленные напрямую из клеток организма, называют *первичными культурами*. На начальном этапе их можно фракционировать, то есть разделить по типам клеток, но так делают не всегда. В большинстве случаев, клетки первичной культуры можно извлекать из культуральной чашки и повторно выращивать, получая так называемые вторичные культуры; таким образом, их можно многократно пересевать (*пассировать*) в течение недель или месяцев. Такие клетки обладают множеством признаков, характерных для их источника

(рис. 8.4): фибробласты продолжают секретировать коллаген; клетки, выделенные из эмбриональных скелетных мышц, сливаются с образованием мышечных волокон, способных к спонтанному сокращению в культуральной чашке; из нервных клеток вырастают аксоны, обладающие электрической возбудимостью и образующие синапсы с другими нервными клетками; эпителиальные клетки формируют плоские слои, свойства которых во многом совпадают со свойствами интактного эпителия. Сохранение такого рода характерных черт в культуре позволяет исследовать клетки методами, которые часто недоступны в случае интактных тканей.

В клеточных культурах выращивают не только животные клетки. Когда фрагмент растительной ткани культивируют в стерильной среде, содержащей минеральные вещества и соответствующие регуляторы роста, многие клетки начинают неограниченно пролифелировать, образуя беспорядочную массу относительно недифференцированных клеток — *каллюс*. При осторожном подборе минеральных веществ и регуляторов роста можно вызвать формирование в каллусе апикальных меристем сначала побегов, а затем корней, и воссоздать целое растение. Как и в случае животных клеток, каллюсные культуры можно механически разделить на отдельные клетки, которые будут расти и делиться в суспензионной культуре (см. рис. 8.4, з).

8.1.3. Эукариотические клетки широко используют в качестве источника одноклеточных культур

С клеточными культурами, полученными путем разрушения тканей, связана одна проблема — со временем клетки умирают. Большинство клеток позвоночных перестают делиться после конечного числа делений в культуре. Этот процесс на-

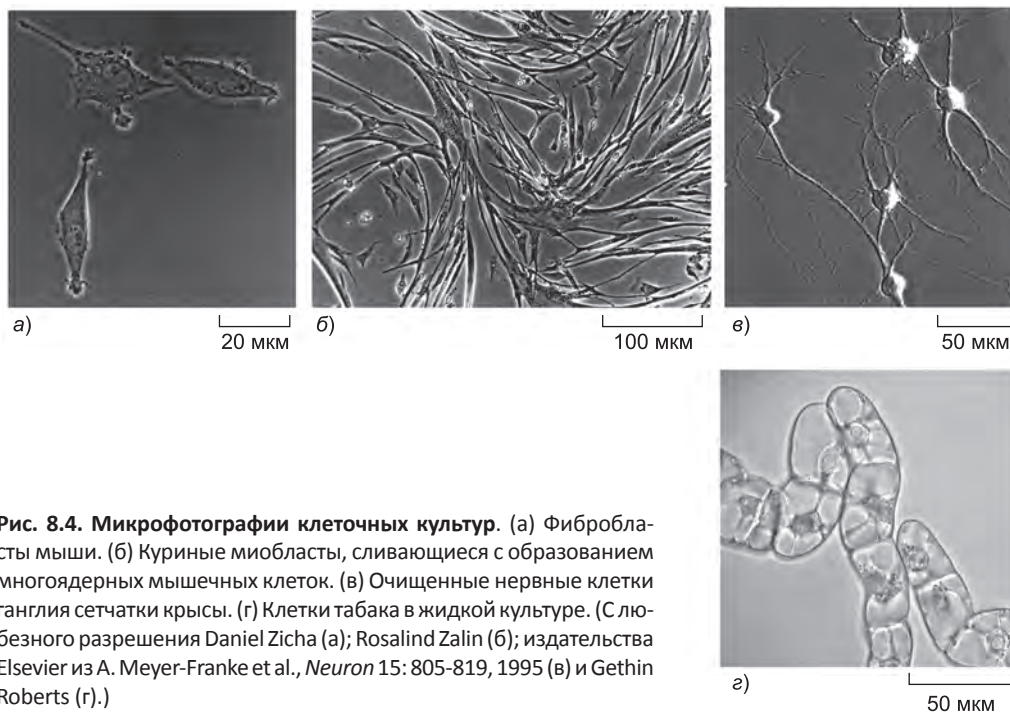


Рис. 8.4. Микрофотографии клеточных культур. (а) Фибробласты мыши. (б) Куриные миобласты, сливающиеся с образованием многоядерных мышечных клеток. (в) Очищенные нервные клетки ганглия сетчатки крысы. (г) Клетки табака в жидкой культуре. (С любезного разрешения Daniel Zicha (а); Rosalind Zalin (б); издательства Elsevier из A. Meyer-Franke et al., *Neuron* 15: 805-819, 1995 (в) и Gethin Roberts (г).)

зывается *репликативным старением клеток* (подробно этот вопрос обсуждается в главе 17). Нормальные фибробласты человека, например, в культуре обычно делятся только 25–40 раз. В таких клетках ограниченная способность к пролиферации отражает постепенное укорочение теломер — расположенных на концах хромосом последовательностей ДНК с большим количеством повторов и специальными белками (см. главу 5). Соматические клетки человека отключили синтез фермента *теломеразы*, за счет которой поддерживается постоянная длина теломер, и поэтому теломеры укорачиваются с каждым делением. Человеческие фибробласты можно уговорить пролиферировать бесконечно, введя в них ген, кодирующий каталитическую субъединицу теломеразы; в этом случае их можно размножать в качестве «бессмертной» клеточной линии.

Однако некоторые клетки человека нельзя обессмертить таким способом. Несмотря на то что их теломеры остаются длинными, они все равно прекращают делиться после ограниченного числа делений, так как условия культивирования в конце концов запускают *механизм контрольных точек* клеточного цикла (см. главу 17), который останавливает клеточный цикл, — этот процесс иногда называют культуральным шоком. Чтобы эти клетки не прекращали делиться, недостаточно одного введения теломеразы. Необходимо также инактивировать механизм контрольных точек. Это можно сделать путем введения определенных стимулирующих раковых онкогенов, выделенных, например, из опухолеродных вирусов (см. главу 20). В отличие от клеток человека, большинство крысиных клеток не отключает синтез теломеразы, и их теломеры не укорачиваются с каждым делением. Таким образом, если удалось избежать культурального шока, некоторые типы клеток крыс будут бесконечно делиться в культуре. Более того, в клетках грызунов часто происходят генетические изменения, инактивирующие механизм контрольных точек, что приводит к спонтанному возникновению бессмертных клеточных линий.

Клеточные линии проще всего получить из раковых клеток, но такие культуры, называемые *трансформированными клеточными линиями*, будут отличаться от культур, приготовленных из нормальных клеток. Например, трансформированные клеточные линии часто растут без прикрепления к поверхности, и они способны пролиферировать в культуральной чашке при значительно большей плотности клеток. Экспериментально можно привить сходные свойства и нормальным клеткам путем трансформации опухолеродным вирусом или химическим соединением. Полученные таким образом клеточные линии после введения в восприимчивое животное способны вызвать рост опухолей (хотя обычно на это способна только небольшая субпопуляция, а именно раковые стволовые клетки — см. главу 20).

Как трансформированные, так и нетрансформированные клеточные линии очень полезны для исследования клеток в качестве источников большого числа однородных по типу и свойствам клеток. Более того, их можно хранить в жидком азоте при -196°C практически неограниченное время, и после разморозки они сохраняют свою жизнеспособность. Однако важно помнить, что клетки в обоих типах клеточных линий почти всегда принципиально отличаются от своих прародителей в тканях, из которых они были выделены.

Некоторые из широко используемых клеточных линий перечислены в **таблице 8.1**. Разные линии обладают разными достоинствами; например, эпителиальные клетки линии PtK, полученные из кенгуровой крысы, в отличие от клеток многих других линий, которые округляются во время митоза, всегда остаются плоскими, что позволяет легко наблюдать митотический аппарат в действии.

Таблица 8.1. Некоторые часто используемые клеточные линии

Клеточная линия*	Тип и происхождение клеток
3T3	Фибробласт (мышь)
BHK21	Фибробласт (сирийский хомячок)
MDCK	Эпителиальная клетка (собака)
HeLa	Эпителиальная клетка (человек)
PtK1	Эпителиальная клетка (кенгуровая крыса)
L6	Миобласт (крыса)
PC12	Хромаффинная клетка (крыса)
SP2	Плазматическая клетка (мышь)
COS	Почка (обезьяна)
293	Почка (человек); трансформирована аденовирусом
CHO	Яичник (китайский хомячок)
DT40	Клетка лимфомы для эффективной направленной рекомбинации (курица)
R1	Эмбриональная стволовая клетка (мышь)
E14.1	Эмбриональная стволовая клетка (мышь)
H1, H9	Эмбриональная стволовая клетка (человек)
S2	Макрофагоподобная клетка (<i>Drosophila</i>)
BY2	Недифференцированная клетка меристемы (табак)

*Многие из этих клеток получены из опухолей. Все они способны к бесконечной репликации в культуре и обладают, по крайней мере, некоторыми из характерных свойств клеток, от которых они произошли.

8.1.4. Эмбриональные стволовые клетки способны совершить переворот в медицине

Среди наиболее перспективных с медицинской точки зрения клеточных линий выделяют эмбриональные стволовые (ЭС) клетки. Эти удивительные клетки, впервые полученные из внутренней клеточной массы находящегося на ранней стадии развития мышиногo эмбриона, могут пролифелировать в культуре бесконечно и при этом сохранять неограниченный потенциал развития. Если клетки из культуральной чашки поместить обратно в среду, соответствующую раннему этапу развития эмбриона, из них могут развиваться клетки всех присутствующих в организме типов, включая половые (рис. 8.5). Их потомки в эмбрионе идеально вживаются в любое место, в котором они оказались, проявляя все свойства нормальных клеток этой ткани.

Клетки со сходными с мышинными ЭС клетками свойствами теперь можно выделить из человеческих эмбрионов, создавая потенциально неисчерпаемый источник клеток для замещения или восстановления поврежденной зрелой ткани человека. Эксперименты на мышах показали, что в будущем ЭС клетки можно использовать для создания специализированных клеток для терапии. Например, для замещения волокон скелетных мышц, дегенерированных у больных мышечной дистрофией, нервных клеток, отмирающих у жертв болезни Паркинсона, инсулин-секретирующих клеток, которые разрушаются при диабете I-го типа, и клеток сердечной мышцы,

погибающих во время сердечного приступа. Может быть однажды путем рекапитуляции эмбрионального развития станет возможным выращивать из ЭС клеток целые органы. Важно помнить, что во взрослые особи нельзя трансплантировать ЭС клетки сами по себе, так как они способны приводить к возникновению опухолей, называемых тератомами.

С использованием ЭС клеток для восстановления тканей связана и другая серьезная проблема. Если трансплантированные клетки генетически отличны от клеток пациента, в которого они вводятся, иммунная система реципиента отторгнет и разрушит эти клетки. Конечно, этой проблемы можно избежать, если применяемые для терапии клетки берутся из организма самого пациента. В главе 23 обсуждается этот вопрос; во многих тканях взрослого организма содержатся стволовые клетки, функцией которых является непрерывное пополнение пула клеток одного или нескольких типов. Значительное количество исследований в области стволовых клеток посвящено именно способам управления поведением этих взрослых стволовых клеток для восстановления тканей.

Технология ЭС клеток, по крайней мере в теории, также предлагает решение проблемы отторжения иммунной системой чужеродных тканей. Этому подходу, известному как «терапевтическое клонирование», посвящен следующий раздел.

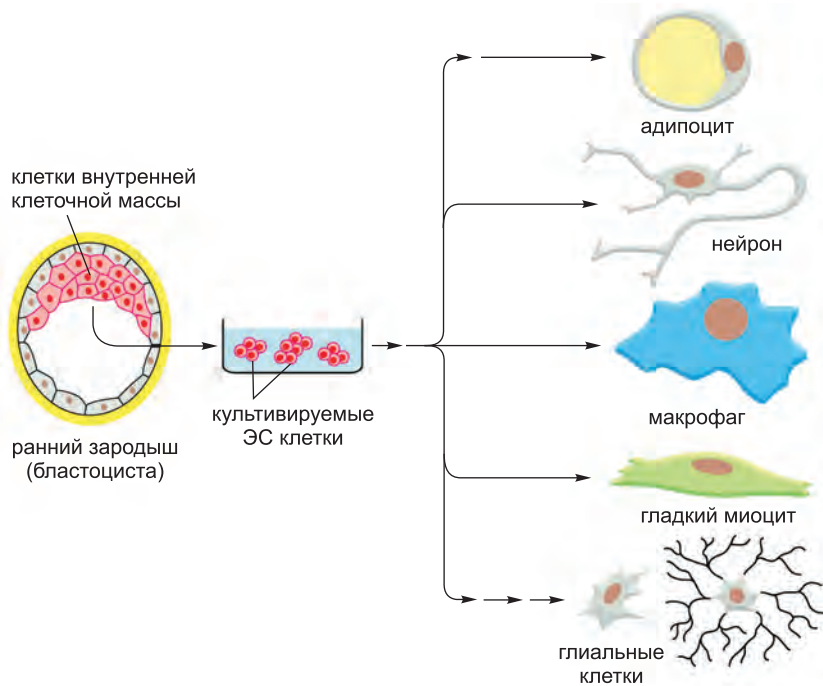


Рис. 8.5. Эмбриональные стволовые (ЭС) клетки, выделенные из зародыша. Из этих культивированных клеток способны развиваться все типы присутствующих в организме клеток. ЭС клетки выделяют из внутренней клеточной массы эмбриона на ранней стадии развития. Их можно бесконечное время поддерживать в культуре в форме стволовых клеток (см. главу 23). Если их поместить обратно в эмбрион, они интегрируются в него и дифференцируются в соответствии со своим окружением. Клетки также можно держать в культуре в качестве бессмертной клеточной линии; затем, чтобы они дифференцировались в определенный тип клеток, их можно обработать различными гормонами или факторами роста. (Согласно E. Fuchs and J. A. Segré, *Cell* 100: 143–155, 2000. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

8.1.5. Трансплантация ядер соматических клеток способна привести к созданию персональных стволовых клеток

Термин «клонирование» используют в качестве короткого обозначения нескольких довольно различных типов процедур. Необходимо понимать эти различия, особенно в связи с общественной дискуссией об этике исследования стволовых клеток.

В биологии *клон* — это всего лишь набор генетически идентичных друг другу особей, произошедших из одного предшественника. Самым простым типом клонирования является клонирование клеток. Таким образом, можно выделить из кожи одну эпидермальную стволовую клетку, позволить ей расти и делиться в культуре и в результате получить большой клон генетически идентичных эпидермальных клеток. Их можно затем использовать, например, для восстановления кожного покрова пациентов с тяжелыми ожогами. Такого рода клонирование является **не чем иным**, как искусственным усилением процессов клеточной пролиферации и заживления, происходящих в человеческом теле в нормальных условиях.

Клонирование целых многоклеточных организмов — *репродуктивное клонирование* — это совершенно другой процесс. Здесь задействованы механизмы, радикально отличающиеся от естественных природных процессов. Обычно у каждого животного есть мать и отец, и оно генетически отличается от них. При репродуктивном клонировании отпадает необходимость наличия двух родителей и сексуального союза для зарождения жизни. В случае млекопитающих выдающиеся результаты достигнуты на овцах и некоторых других домашних животных при помощи *трансплантации ядер соматических клеток*. Процедура начинается с неоплодотворенной яйцеклетки. Из этой гаплоидной клетки высасывают ядро и заменяют его ядром обычной диплоидной соматической клетки. Диплоидную донорскую клетку обычно извлекают из ткани взрослой особи. Гибридная клетка, состоящая из диплоидного донорского ядра и цитоплазмы яйцеклетки-реципиента, некоторое время развивается в культуре. В небольшом количестве случаев происходит формирование эмбриона, который затем помещают в матку суррогатной матери (**рис. 8.6**). Если экспериментатору повезет, развитие зародыша пойдет нормально и в конце концов родится новое животное. Полученная таким образом, при помощи репродуктивного клонирования, особь будет генетически идентична взрослой особи, служившей донором диплоидной клетки (за исключением небольшого количества заключенной в митохондриях генетической информации, которая наследуется исключительно из цитоплазмы яйцеклетки).

Терапевтическое клонирование значительно отличается от репродуктивного. В этом случае метод трансплантации ядер соматических клеток применяют для создания персональных ЭС клеток (см. **рис. 8.6**). Здесь эмбрион на очень ранней стадии развития, состоящий из примерно 200 клеток, не переносится в матку суррогатной матери. Вместо этого его хранят в культуре и используют в качестве источника ЭС клеток с целью их дифференцировки в различные типы клеток, которые можно будет применять для восстановления тканей. Полученные таким путем клетки генетически практически идентичны донору исходного ядра, поэтому их можно трансплантировать обратно в донора без риска иммунологической реакции.

Трансплантация ядер соматических клеток потенциально имеет еще одно достоинство — она может позволить изучать наследственные заболевания человека. ЭС клетки, получившие соматическое ядро от особи с наследственным заболеванием, могут позволить напрямую исследовать развитие заболевания по мере диф-

ференцировки их в различные типы клеток. «Болезнеспецифические» ЭС клетки и их дифференцированных потомков также можно использовать для разработки и тестирования новых лекарств. Эти подходы до сих пор находятся на начальных этапах, и во многих странах определенные аспекты исследований запрещены законом. Остается неясным, возможно ли создавать человеческие ЭС клетки при помощи трансплантации ядер, и способны ли они в полной мере оправдать надежды, возлагаемые на них учеными.

8.1.6. Клеточные линии гибридомы как фабрики по производству моноклональных антител

Антитела — очень полезный инструмент клеточной биологии. Их высокая специфичность позволяет визуализировать расположение нескольких конкретных белков из многих тысяч, синтезируемых клеткой. Антитела часто получают путем прививки животным интересующего белка и последующего выделения из сыворотки крови специфичных к этому белку антител. Однако в результате получается неоднородная смесь антител, распознающих разные антигенные сайты макромолекулы. Более того, одно привитое животное может дать ограниченное число антител, а у разных особей антитела будут отличаться. К тому же специфичные к нужному антигену антитела составляют лишь некоторую часть всех антител в сыворотке крови. Альтернативным подходом, позволяющим получить неограниченное число идентичных друг другу антител и значительно увеличить специфичность и применимость основанных на антителах методов, является синтез антител клеточными линиями гибридомы.

Эта технология, разработанная в 1975 г., совершила переворот в синтезе антител как для нужд клеточной биологии, так и для диагностики и лечения некоторых заболеваний, например, ревматического артрита и рака. Процедура основана на методе получения клеточных гибридов (рис. 8.7) и включает в себя выращивание клеточ-

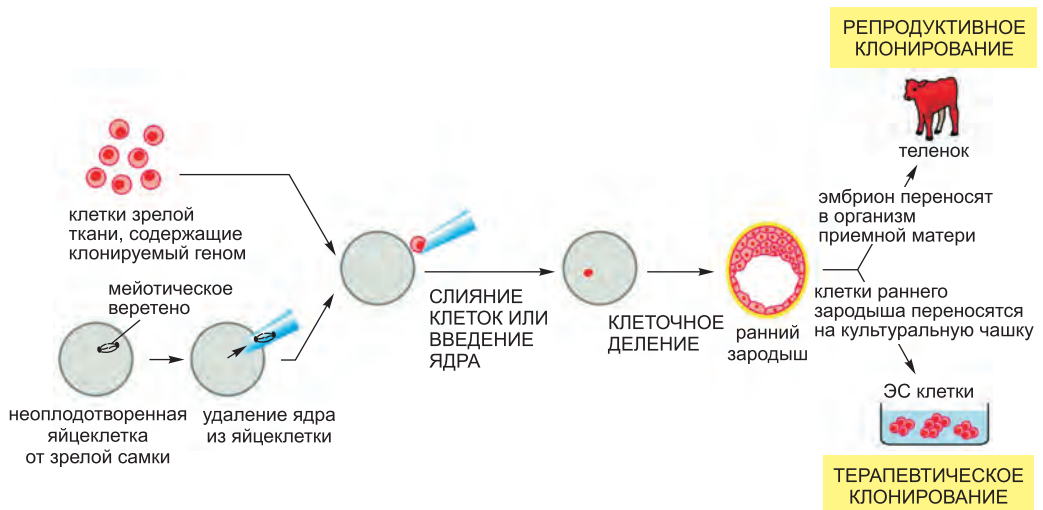


Рис. 8.6. Репродуктивное и терапевтическое клонирование. Клетки взрослого организма можно использовать для репродуктивного клонирования или создания персональных ЭС клеток (так называемого терапевтического клонирования).

ной линии из единственного секретирующего антитела В-лимфоцита для получения большого количества однородных антител. В-лимфоциты в норме живут в культуре ограниченное время, но отдельные синтезирующие антитела В-лимфоцитов из иммунизированных мышей или крыс при слиянии с клетками из трансформированной клеточной линии В-лимфоцитов могут дать гибриды, способные синтезировать определенное антитело и неограниченно размножаться в культуре. Такие **гибридомы** выращивают как отдельные клеточные линии, каждая из которых является постоянным источником единственного типа **моноклональных антител** (рис. 8.8). Каждый их тип распознает единственный тип антигенного сайта, например, конкретный кластер из пяти или шести боковых цепей аминокислотных остатков на поверхности белка. За счет однородной специфичности моноклональные антитела в большинстве случаев гораздо удобнее, чем обычная иммунная сыворотка.

Важное достоинство метода гибридом состоит в том, что можно синтезировать моноклональные антитела против молекул, составляющих лишь малую часть сложной смеси. В обычной иммунной сыворотке, созданной для такой смеси, доля молекул антител, распознающих содержащийся в малом количестве компонент, будет недостаточной для того, чтобы принести хоть какую-нибудь пользу. Но если из В-лимфоцитов, синтезирующих различные компоненты иммунной сыворотки, получить гибридомы, то из большого количества гибридных клонов можно отобрать тот, который будет производить требуемое моноклональное антитело, и выращивать эту линию для синтеза антитела в неограниченных количествах. Таким образом, для любого белка в биологической смеси можно синтезировать моноклональное антитело. Как только антитело готово, его можно использовать для локализации, наблюдения за движением и изучения структуры и функции белка в клетках и тканях.

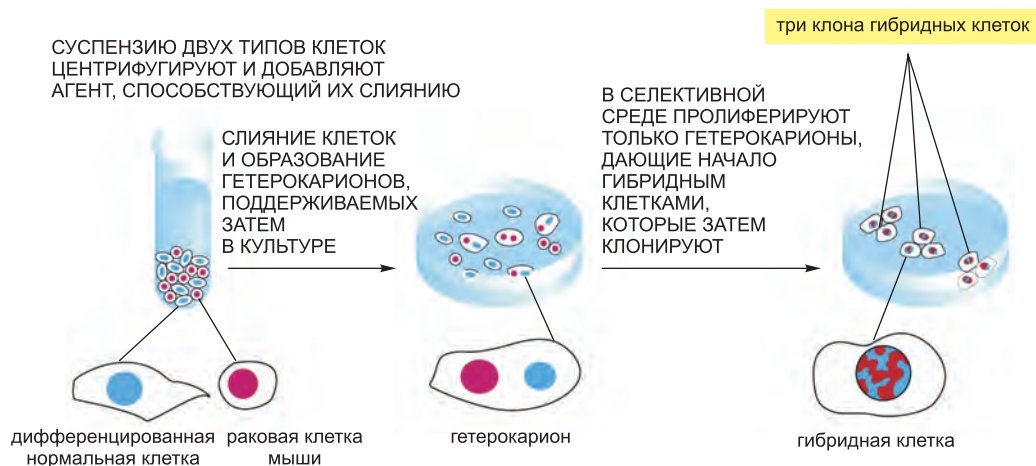


Рис. 8.7. Получение клеточных гибридов. Можно провести слияние двух клеток и получить гетерокарион — одну клетку с двумя ядрами. Обычно суспензию клеток обрабатывают определенными инактивированными вирусами или полиэтиленгликолем, которые способствуют слиянию клеток путем изменения структуры их плазматической мембраны. В конце концов, гетерокарион претерпевает митоз, и получается гибридная клетка, в которой оболочки двух ядер разрушаются, а хромосомы объединяются в одном большом ядре. Такие гибридные клетки дают начало бессмертным гибридным клеточным линиям. Если одна из родительских клеток произошла из опухолевой клеточной линии, то гибридную клетку называют гибридомой.

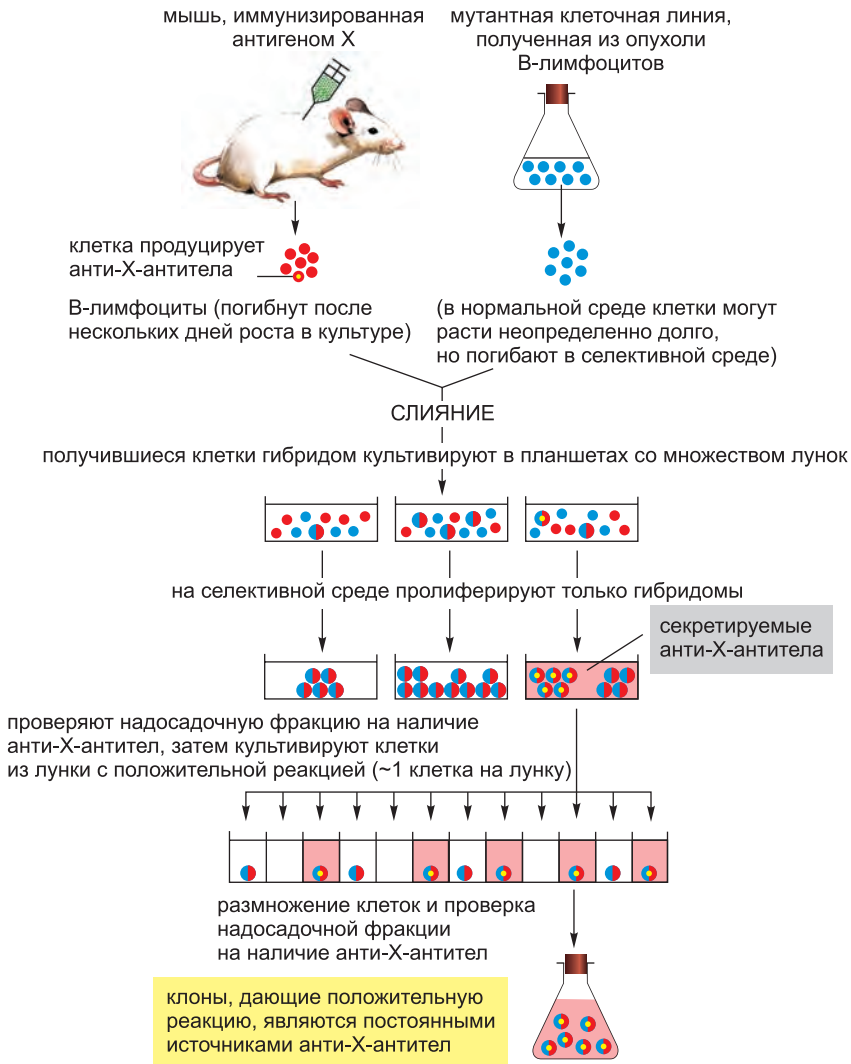


Рис. 8.8. Приготовление гибридом, секретирующих моноклональные антитела против конкретного антигена. Здесь интересующий антиген обозначен как «антиген X». Селективная среда, используемая после этапа слияния клеток, содержит ингибитор (аминоптерин), блокирующий нормальные биосинтетические пути образования нуклеотидов. Таким образом, клеткам приходится использовать альтернативный путь синтеза нуклеиновых кислот. Этот путь у мутантных клеточных линий, выращенных из опухолевых В-лимфоцитов, нарушен, тогда как у нормальных клеток, полученных из иммунизированных мышей, он работает. Поскольку ни один из использованных для исходного слияния клеточных типов не способен выжить и пролифелировать сам по себе, в культуре остаются только клетки гибридомы.

Заключение

Ткани можно диссоциировать на составляющие их клетки, которые, в свою очередь, можно разделить по типам и очистить для биохимического анализа или создания клеточных культур. Многие животные и растительные клетки выжи-

вают и пролифелируют в чашке Петри при условии наличия в ней подходящей культуральной среды, питательных веществ и соответствующих сигнальных молекул. Несмотря на то что большинство животных клеток перестает делиться после конечного числа клеточных делений, обессмерченные при помощи спонтанных мутаций или генетических манипуляций клетки могут неограниченное время существовать в виде клеточных культур. Эмбриональные стволовые клетки могут неограниченно пролифелировать в культуральной чашке, сохраняя способность дифференцироваться в различные типы клеток организма. Таким образом, они обладают огромным медицинским потенциалом. Клетки гибридомы широко используются для получения неограниченного количества однородных моноклональных антител, применяемых для обнаружения и очистки клеточных белков, а также для диагностики и лечения заболеваний.

8.2. Очистка белков

Задача выделения из тысяч присутствующих в клетке типов белков одного единственного является непростой, но ее необходимо решить, чтобы исследовать функцию белка *in vitro*. Ниже в этой главе мы покажем, как *метод рекомбинантных ДНК* значительно упрощает эту задачу, заставляя клетку синтезировать большие количества нужного белка, облегчая таким образом его выделение и очистку. Независимо от того, является ли источником белка сконструированная методами биоинженерии клетка или интактная ткань, процесс очистки обычно начинается с субклеточного фракционирования для снижения многокомпонентности материала. Затем проводят очистку белка, на каждом шаге увеличивая ее специфичность.

8.2.1. Клетки можно разделить на составляющие ее фракции

Чтобы очистить белок, его нужно извлечь из клетки. Клетки можно разрушить несколькими способами: их можно подвергнуть осмотическому шоку или ультразвуковой вибрации, проташить через маленькое отверстие или измельчить в гомогенизаторе. В результате этих процедур разрушается большинство мембран клетки (включая плазматическую мембрану и эндоплазматический ретикулум), небольшие фрагменты которых тут же заново замыкаются, образуя везикулы. Однако, при осторожном проведении процедур разрушения, такие органеллы, как ядро, митохондрии, аппарат Гольджи, лизосомы и пероксисомы, остаются нетронутыми. Таким образом, суспензия клеток превращается в густую кашу (так называемый *гомогенат* или *экстракт*), содержащую различные замкнутые мембранные органеллы, каждая из которых обладает характерным размером, зарядом и плотностью. При условии правильного подбора среды гомогенизации (путем проб и ошибок для каждой органеллы), различные компоненты, включая везикулы, получившиеся из эндоплазматического ретикулума — микросомы, сохраняют большинство своих естественных биохимических свойств.

Затем необходимо разделить компоненты гомогената. Такого рода фракционирование клеток стало возможным только после коммерческой разработки в начале 1940-х гг. прибора, носящего название «*препаративная ультрацентрифуга*». В ней происходит высокоскоростное вращение экстракта разрушенных клеток (**рис. 8.9**). Это позволяет разделить клеточные компоненты по размеру и плотности: в целом, чем крупнее частица, тем большая центрифужная сила будет на нее действовать, и тем быстрее она будет вращаться. При относительно низких скоростях седимен-

тируют (оседают) крупные компоненты, такие как ядра, с образованием осадка на дне центрифужной пробирки; при больших скоростях и длительном времени центрифугирования можно собрать сначала маленькие замкнутые везикулы, а затем рибосомы (рис. 8.10). Все эти фракции не будут чистыми, но значительное количество загрязнителей можно удалить путем ресуспендирования осадка и повторного проведения центрифугирования.

Центрифугирование почти всегда является первым шагом фракционирования, но с его помощью можно разделить только значительно различающиеся по размеру компоненты. Более высокого уровня разделения можно добиться путем нанесения тонкого слоя гомогената на разбавленный раствор соли, заполняющий центрифужную пробирку. Во время центрифугирования различные компоненты смеси будут двигаться через солевой раствор как отдельные полосы, каждая со своей скоростью. Этот процесс называется *скоростной седиментацией* (рис. 8.11, а). Чтобы этот метод был эффективным, полосы должны быть защищены от конвекционного смешивания, которое обычно происходит, когда более плотный раствор (например, содержащий органеллы) оказывается над менее плотным (раствором соли). В специальном приборе для смешивания раствор в пробирке усиливают слабым градиентом сахарозы. Благодаря получающемуся в результате градиенту плотности более плотный раствор будет на дне пробирки, и каждая область солевого раствора будет иметь большую плотность, чем раствор над ней, и, таким образом, конвекционное смешивание не будет мешать разделению.

При седиментации через такие разбавленные градиенты сахарозы различные клеточные компоненты будут формировать отдельные полосы, которые можно

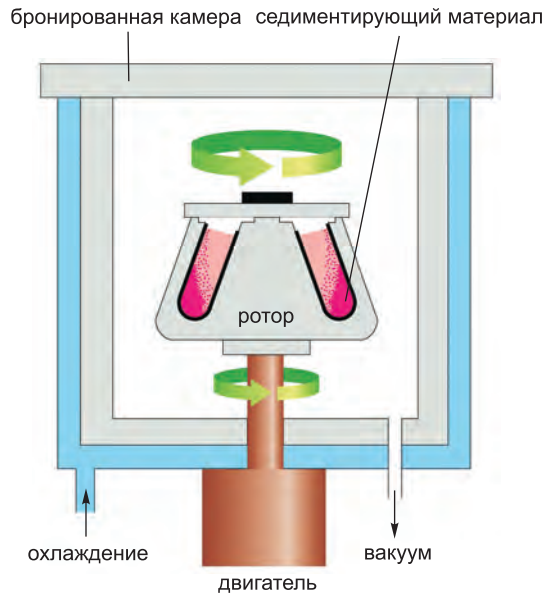


Рис. 8.9. Препаративная ультрацентрифуга. Проба находится в пробирке, которую помещают в цилиндрические отверстия в металлическом роторе. За счет быстрого вращения ротора создается огромная центробежная сила, заставляющая частицы в образце оседать. Вакуум уменьшает трение, препятствуя перегреву ротора и позволяя системе охлаждения поддерживать постоянную температуру образца 4°С.

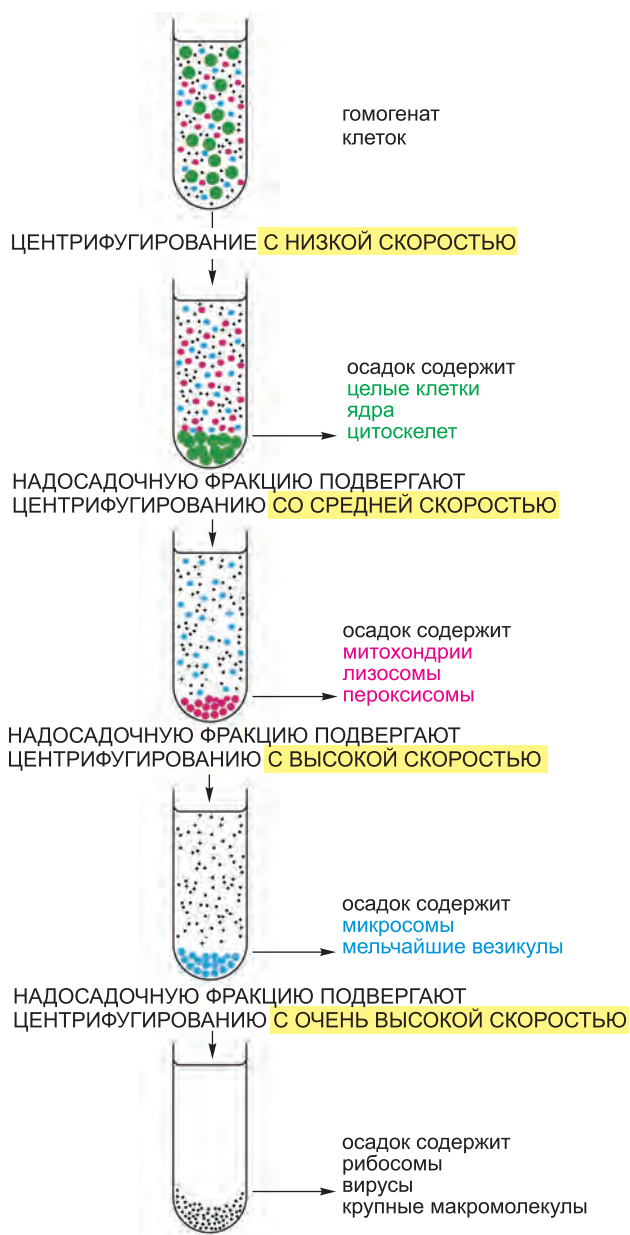


Рис. 8.10. Фракционирование клеток при помощи центрифугирования. Многократное центрифугирование с постоянным увеличением скорости позволяет разделить гомогенаты клеток на компоненты. В целом, чем меньше субклеточный компонент, тем большая центробежная сила необходима для его седиментации. Типичные значения для различных шагов седиментации:

низкая скорость: 1000 g, 10 минут

средняя скорость: 20 000 g, 20 минут

высокая скорость: 80 000 g, 1 час

очень высокая скорость: 150 000 g, 3 часа.

выделить по одной. Относительная скорость седиментации каждого компонента зависит, в первую очередь, от его размера и формы, обычно описываемых в терминах коэффициента седиментации, или величины S . Современные центрифуги вращаются со скоростью до 80 000 оборотов в минуту, а центробежная сила в них может в 500 000 раз превышать силу гравитации. Эти огромные силы заставляют

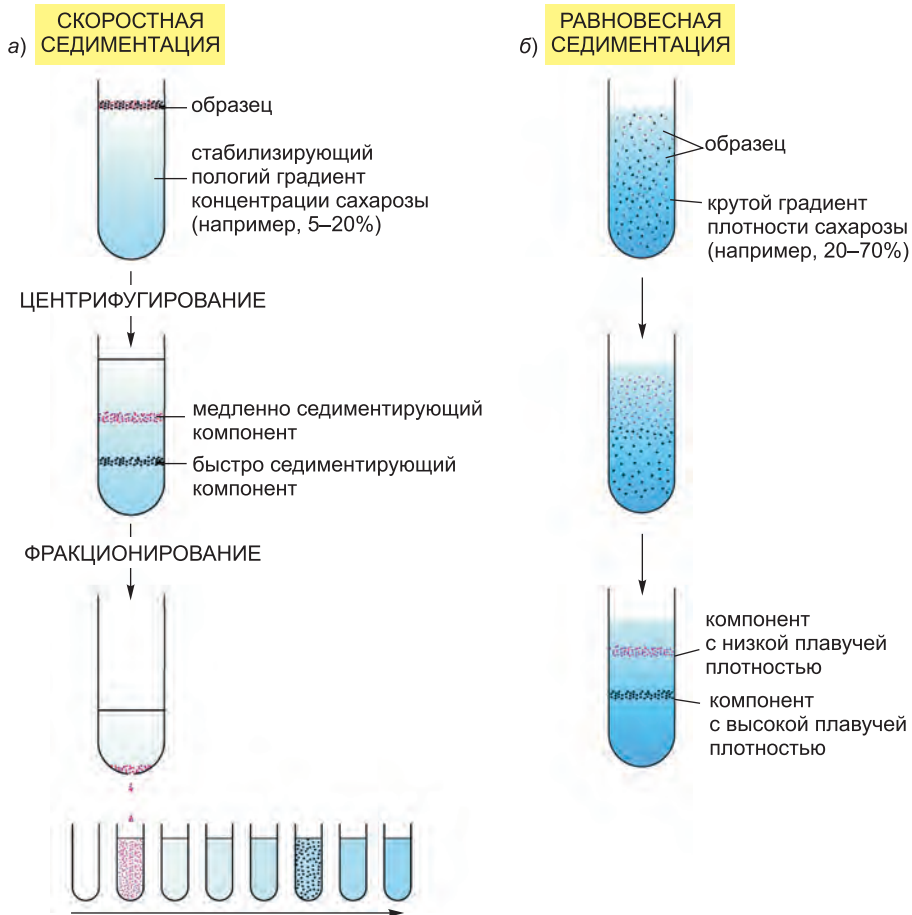


Рис. 8.11. Сравнение методов скоростной седиментации и седиментационного равновесия. (а) При скоростной седиментации субклеточные компоненты, нанесенные на содержащий сахарозу разбавленный раствор, осаждаются с разной скоростью в зависимости от размера и формы. Чтобы избежать конвекционного смешивания различных полос, вызываемого небольшими различиями в температуре или концентрации раствора, в пробирке создают непрерывный слабый градиент сахарозы, концентрация которой возрастает в направлении дна пробирки (обычно от 5 до 20% сахарозы). После центрифугирования разные компоненты можно выделить по одному путем прокалывания дна пластиковой центрифужной пробирки и сбора капель, как показано на рисунке. (б) В методе седиментационного равновесия субклеточные компоненты движутся вверх или вниз при центрифугировании в градиенте до тех пор, пока они не достигнут положения, в котором их плотность будет совпадать с плотностью окружающего раствора. Несмотря на то что здесь показан градиент сахарозы, для разделения белков или нуклеиновых кислот удобнее использовать более плотные градиенты, которые можно создавать при помощи хлорида цезия. Получившиеся в равновесии полосы можно собрать так же, как показано на рис. 8.11, а.

даже маленькие макромолекулы, например молекулы тРНК и простые ферменты, седиментировать с ощутимой скоростью, и, таким образом, их можно отделить друг от друга по размеру.

Ультрацентрифуги также используют для разделения клеточных компонентов в зависимости от их плавучей плотности, вне зависимости от размера и формы. В этом случае образец седиментируют через большой градиент плотности, содержащий высокие концентрации сахарозы или хлорида цезия. Каждый клеточный компонент начинает движение против градиента (см. рис. 8.11, *а*), но в конце концов он достигнет положения, в котором плотность раствора будет равна его собственной плотности. После этого компонент будет плавать на поверхности и не сможет двигаться дальше. Таким образом, в центрифужной пробирке образуется набор отдельных полос, из которых наиболее близкие ко дну будут обладать наибольшей плавучей плотностью (рис. 8.11, *б*). Так называемый *метод седиментационного равновесия* настолько чувствителен, что позволяет отделять макромолекулы, содержащие тяжелые изотопы, например ^{13}C или ^{15}N , от таких же макромолекул, содержащих более легкие, распространенные изотопы (^{12}C или ^{14}N). На самом деле метод с использованием градиента хлорида цезия разработали в 1957 г. для разделения меченой и немеченой ДНК после добавления в среду к растущим популяциям бактерий предшественников нуклеотидов, содержащих ^{15}N ; этот классический эксперимент предоставил прямые доказательства полуконсервативной репликации ДНК (см. рис. 5.5).

8.2.2. Клеточные экстракты представляют собой доступные системы для изучения клеточных функций

Изучение выделенных в центрифуге органелл и других крупных субклеточных компонентов внесло неоценимый вклад в наше понимание функций различных клеточных компонентов. Эксперименты на очищенных при помощи центрифугирования митохондриях и хлоропластах, например, оказали центральную функцию этих органелл — преобразование энергии в формы, доступные для использования клетками. Точно так же замкнутые везикулы, образовавшиеся из фрагментов шероховатого и гладкого эндоплазматического ретикулума (микросомы), были отделены друг от друга и проанализированы в качестве моделей этих компартментов в интактной клетке.

Концентрированные клеточные экстракты, в частности экстракты ооцитов *Xenopus laevis* (африканской шпорцевой лягушки), сыграли главную роль в изучении таких сложных и высокоорганизованных процессов, как цикл клеточного деления, расхождение хромосом при помощи веретена деления и везикулярный транспорт при движении белков из эндоплазматического ретикулума через аппарат Гольджи в плазматическую мембрану.

По сути, клеточные экстракты представляют собой исходный материал для полного разделения всех отдельных макромолекулярных компонентов клетки. Теперь мы рассмотрим, как достигается такое разделение, сосредоточив свое внимание на белках.

8.2.3. Белки можно разделить при помощи хроматографии

Чаще всего белки разделяют при помощи **колоночной хроматографии**, при этом смесь растворенных белков пропускают через колонку, содержащую твердую пори-

стую матрицу (сорбент). Различные белки по-разному взаимодействуют с сорбентом и задерживаются на матрице, их можно будет собрать отдельно по мере выхода из колонки (рис. 8.12). В зависимости от выбора матрицы белки можно разделить по заряду (*ионообменная*), гидрофобности (*гидрофобная*), способности связывать определенный вид малых молекул или макромолекул (*аффинная хроматография*) и размеру (*гель-хроматография* или *гель-фильтрация*).

Многие виды сорбентов доступны коммерчески (рис. 8.13). Ионообменные колонки заполнены маленькими гранулами, несущими либо положительный, либо отрицательный заряд, поэтому белки разделяются на них в зависимости от распределения зарядов на поверхности. Гидрофобные колонки заполнены гранулами, из которых выходят гидрофобные боковые цепи, селективно удерживающие расположенные на поверхности белков гидрофобные области. Колонки для гель-фильтрации, в которых происходит разделение белков в зависимости от размера, содержат мельчайшие пористые гранулы: молекулы, которые достаточно малы для того, чтобы проникать в поры, дольше задерживаются в колонке, тогда как крупные молекулы остаются в растворе, омывающем сорбент, и, таким образом, движутся быстрее и первыми выходят из колонки. Помимо разделения молекул, гель-фильтрация служит удобным способом определения их размера.

Неоднородности сорбентов (например, целлюлоза), приводящие к неравномерному потоку растворителя через колонку, ограничивают разрешение обычных методов колоночной хроматографии. Специальные смолы для хроматографии (обычно, на основе силикагеля), состоящие из мельчайших сфер (3–10 мкм в диа-

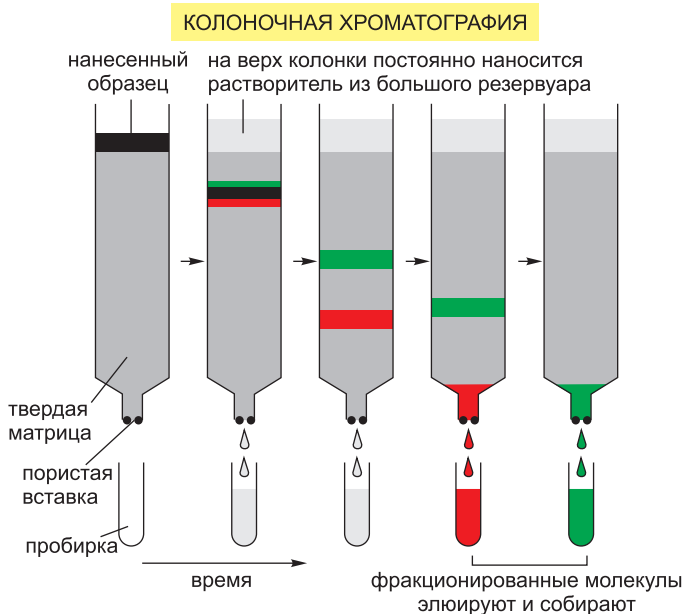


Рис. 8.12. Разделение молекул методом колончатой хроматографии. Образец — раствор, содержащий смесь различных молекул, — наносят на цилиндрическую стеклянную или пластиковую колонку, содержащую проницаемую твердую матрицу, например целлюлозу. Затем через колонку медленно прокачивают большой объем растворителя и собирают его в разные пробирки по мере выхода. Поскольку различные компоненты движутся по колонке с разными скоростями, они будут разделены по разным пробиркам.

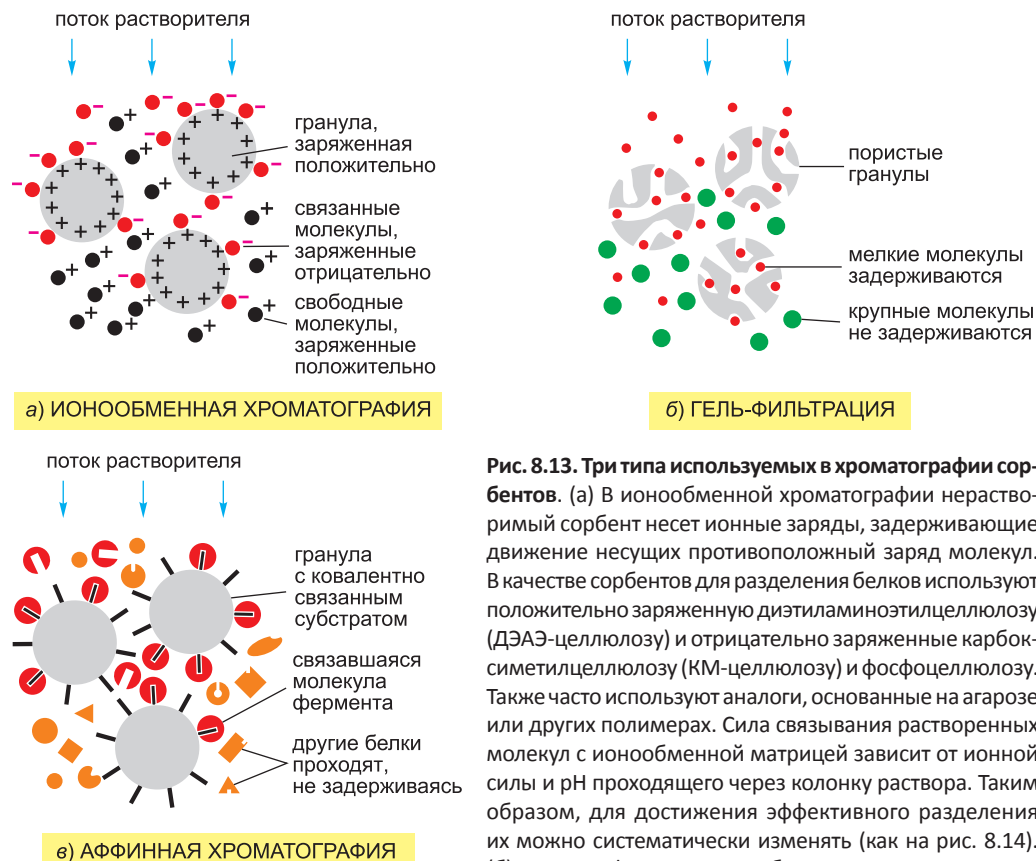


Рис. 8.13. Три типа используемых в хроматографии сорбентов. (а) В ионообменной хроматографии нерастворимый сорбент несет ионные заряды, задерживающие движение несущих противоположный заряд молекул. В качестве сорбентов для разделения белков используют положительно заряженную диэтиламиноэтилцеллюлозу (ДЭАЭ-целлюлозу) и отрицательно заряженные карбоксиметилцеллюлозу (КМ-целлюлозу) и фосфоцеллюлозу. Также часто используют аналоги, основанные на агарозе или других полимерах. Сила связывания растворенных молекул с ионообменной матрицей зависит от ионной силы и pH проходящего через колонку раствора. Таким образом, для достижения эффективного разделения их можно систематически изменять (как на рис. 8.14). (б) При гель-фильтрации сорбент инертен, но содержит поры. Молекулы, которые достаточно малы для того,

чтобы проникать в поры, задерживаются в них и, таким образом, движутся по колонке медленнее, чем крупные молекулы, не способные входить в поры сорбента. Доступен широкий ассортимент гранул поперечно сшитых полисахаридов (декстрана, агарозы или акриламида) с разными размерами пор, что позволяет использовать их для разделения молекул различной молекулярной массы — от менее чем 500 Да до более чем 5×10^6 Да. (в) В аффинной хроматографии применяется нерастворимый сорбент, ковалентно связанный со специфическим лигандом, например молекулой антитела или субстратом фермента, которые будут связывать определенный белок. Молекулы фермента, связавшиеся в таких колонках с неподвижным субстратом, можно элюировать (извлечь из адсорбента) при помощи концентрированного раствора субстрата в свободной форме. Молекулы, связавшиеся с неподвижными антителами, можно элюировать путем диссоциации комплекса антитело-антиген концентрированным раствором соли или раствором с высоким или низким pH. Аффинная хроматография позволяет достичь высокого уровня разделения однократным пропусканием раствора через колонку.

метре), могут быть равномерно упакованы в колонку при помощи специального прибора. Такая **высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)** позволяет достичь высокого уровня разрешения. В ВЭЖХ элюент (растворенное вещество) очень быстро приходит в равновесие с внутренним содержимым гранул сорбента, и, следовательно, молекулы с разным сродством к сорбенту эффективно разделяются даже при высоких скоростях потока. ВЭЖХ служит основным методом очистки многих белков и малых молекул.

8.2.4. В основе аффинной хроматографии лежит использование специфических сайтов связывания белков

Если начинать со сложной смеси белков, описанные выше типы колоночной хроматографии не дадут очень чистых фракций: однократное пропускание раствора через колонку обычно увеличивает долю белка в смеси не больше чем в 20 раз. Поскольку большинство отдельных белков составляют лишь 1/1000 от общего белка клетки, для достижения достаточной степени очистки обычно приходится последовательно использовать несколько различных типов колонок (**рис. 8.14**). Более эффективный метод, известный как **аффинная хроматография**, основан на использовании биологически важных процессов связывания, происходящих на поверхности белков. Если молекула субстрата ковалентно связана с инертной матрицей, например полисахаридными гранулами, фермент, преобразующий данный субстрат, будет специфически удерживаться на сорбенте. Затем его можно элюировать (вымывать) в практически чистом виде. Точно так же можно иммобилизовать короткие олигонуклеотиды ДНК со специально разработанной последовательностью для очистки ДНК-связывающих белков, которые в норме узнают данную последовательность нуклеотидов в хромосоме (см. **рис. 7.28**). В качестве альтернативы можно поместить на матрицу специфические антитела и очистить молекулы белков, узнаваемых этими антителами. В таких колонках, благодаря их высокой специфичности, при однократном пропускании смеси можно достичь увеличения доли белка в растворе в 1000–10000 раз.

8.2.5. Маркеры, сконструированные методами генетической инженерии, лежат в основе простого способа очистки белков

При помощи описанных ниже методов рекомбинантных ДНК можно модифицировать любой ген так, чтобы его белок синтезировался со специальным маркером узнавания. В результате, последующее очищение белка методом аффинной хроматографии будет простым и быстрым. Часто маркер сам по себе является антигенной детерминантой, или *эпитопом*, который может быть узнан высоко специфичным антителом. Антитело затем может быть использовано как для локализации белка в клетке, так и для его очистки (**рис. 8.15**). Другие типы маркеров специально конструируют для очистки белков. Например, аминокислота цистеин связывает определенные ионы металлов, включая никель и медь. Если использовать методы генной инженерии для прикрепления к концу белка короткой цепочки гистидинов, то такой слегка модифицированный белок можно селективно задержать на аффинной колонке, содержащей ионы никеля. Таким образом, аффинную хроматографию с использованием металлов можно применять для очистки модифицированного белка из сложной смеси молекул.

В качестве маркера узнавания также используют целый белок. Клетки можно модифицировать таким образом, чтобы они на одном конце интересующего белка синтезировали маленький фермент глутатион-S-трансферазу (*Glutathione S-Transferase*, GST). Получившийся **химерный белок** может быть очищен от остальных компонентов клетки при помощи аффинной колонки, содержащей глутатион — молекулу субстрата, специфически и прочно связывающую GST. Если проводить очистку в условиях, не мешающих белок-белковым взаимодействиям, то химерный белок может быть изолирован вместе со взаимодействующими с ним в клетке белками (**рис. 8.16**).

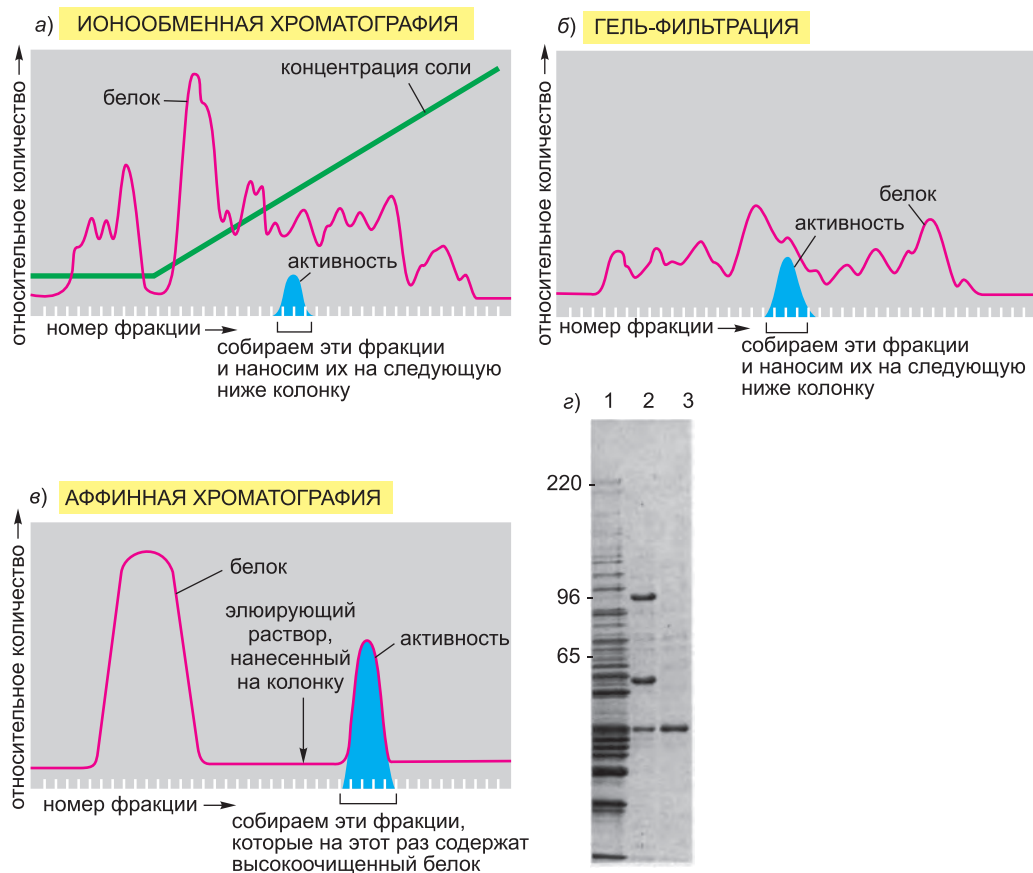


Рис. 8.14. Очистление белков методом хроматографии. Типичные результаты, полученные после последовательного использования трех типов хроматографии для очистки белка. В данном примере гомогенат клеток сначала был фракционирован путем пропускания через ионообменную смолу в колонке (а). Колонку промыли для удаления всех несвязанных загрязнителей, а связанные белки элюировали путем пропускания через колонку раствора, содержащего постепенно увеличивающуюся концентрацию соли. Белки с наименьшим сродством к ионообменной смоле напрямую прошли через колонку и были собраны первыми. Оставшиеся белки были элюированы последовательно в зависимости от их сродства к смоле — для удаления белков с наибольшим сродством потребовалась наибольшая концентрация соли. Интересующий белок был элюирован в несколько фракций и обнаружен по его ферментативной активности. Фракции, в которых наблюдалась активность, были объединены и пропущены через вторую, гель-фильтрационную колонку (б). Наличие в элюате все еще не очищенного белка вновь определили за счет ферментативной активности. Положительные фракции собрали и очистили до гомогенного состояния на аффинной колонке (в), содержащей иммобилизованный субстрат фермента. (г) Анализ аффинной очистки циклин-связывающих белков из *S. cerevisiae* при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, описанного ниже на рисунке 8.18. Дорожка 1 — общий экстракт клетки; дорожка 2 — белки, элюированные из аффинной колонки, содержащей циклин В2; дорожка 3 — один основной белок, элюированный из аффинной колонки, содержащей циклин В3. Белки дорожек 2 и 3 элюированы из аффинной колонки при помощи соли; гель окрашен Кумасси. Шкала слева показывает молекулярный вес белков-маркеров в кДа. (г, из D. Kellog et al., *J. Cell Biol.* 130: 675–685, 1995. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

Рис. 8.15. Маркирование эпитопом для локализации или очистки белков. При помощи стандартных методов генной инженерии к интересующему белку может быть присоединен короткий пептидный маркер. Если маркер сам по себе является антигенной детерминантой, или *эпитопом*, для него легко будет найти коммерчески доступное антитело. Соответствующим образом меченое антитело можно использовать для определения местонахождения белка в клетке или для очистки его аффинной или основанной на иммунной преципитации хроматографией. В случае иммунной преципитации в раствор, содержащий маркированный белок, добавляют направленные против эпитопного маркера антитела; антитела специфически поперечно связывают маркированные молекулы белка и осаждают их в форме комплексов антитело-белок.



Для дальнейшего улучшения методов очистки при помощи маркеров узнавания между нужным белком и маркером можно вставить аминокислотную последовательность, представляющую собой сайт расщепления для высоко специфичного протеолитического фермента. Характерные для сайтов расщепления последовательности аминокислот редко случайно встречаются в белках, поэтому метку будет легко удалить без разрушения очищенного фермента.

Такой тип специфического расщепления используют в очень эффективном методе очистки, известном как *танDEMная аффинная очистка* (Tandem Affinity Purification tagging, *tap-tagging*). При этом один конец белка модифицируют таким образом, чтобы он содержал два маркера узнавания, разделенных сайтом расщепления протеазой. Маркер на самом конце химерного белка должен необратимо связываться с аффинной колонкой, что позволяет полностью отмыть колонку от всех загрязняющих белков. Расщепление протеазой затем освобождает белок, который далее очищают, используя второй маркер. Поскольку такой двухэтапный подход дает особенно высокую степень очистки белка при относительно небольшой затрате усилий, его широко применяют в клеточной биологии. Например, для очистки любого дрожжевого белка этим методом сконструировали набор из приблизительно 6000 штаммов дрожжей, каждый со своим индивидуальным кодирующим маркером геном, пришитым к ДНК.

8.2.6. Очищенные бесклеточные системы необходимы для точного определения функций молекул

Важно изучать биологические процессы независимо от сложных побочных реакций, происходящих в живой клетке с помощью **очищенных бесклеточных систем**. Для этого гомогенаты клеток фракционируют с целью очистки каждой отдельной макромолекулы, необходимой для катализа интересующего биологического процесса. Например, эксперименты по расшифровке механизмов синтеза белка начинали с клеточного гомогената, в котором транслировались РНК. Фракционирование этого гомогената шаг за шагом дало рибосомы, тРНК и различные ферменты, кото-

Рис. 8.16. Очистка белковых комплексов при помощи химерного белка, маркированного GST. Содержащие GST химерные белки, синтезируемые в генетически модифицированных клетках, можно задержать на аффинной колонке, заполненной покрытыми глутатионом гранулами. Не связавшиеся с гранулами белки будут вымыты из колонки. Химерный белок вместе с другими крепко связанными с ним клеточными белками можно элюировать глутатионом. Эти дополнительные белки можно идентифицировать при помощи масс-спектрометрии (смотри рис. 8.21). Аффинные колонки также могут содержать антитела против GST или другие подходящие маленькие белки, или эпитопные маркеры (см. рис. 8.15).

рые все вместе образуют систему синтеза белка. Как только отдельные очищенные компоненты стали доступны, их можно было по отдельности добавлять или удалять. Это позволило точно определить роль каждого компонента от начала до конца процесса.

Реконструкция каждого биологического процесса в очищенной бесклеточной системе — одна из ключевых задач клеточной биологии. Только так можно определить все необходимые для данного процесса компоненты и контролировать их концентрации, что очень важно для понимания механизма их действия. Предстоит еще много работы, но значительная часть того, что мы сегодня знаем о молекулярной биологии, получена благодаря изучению бесклеточных систем. Их использовали, например, для расшифровки деталей репликации и транскрипции ДНК, сплайсинга РНК, трансляции белков, сокращения мышц и транспорта частиц вдоль микротрубочек, а также множества других происходящих в клетке процессов.

Заключение

Биохимический анализ клеточных популяций путем их разрушения и фракционирования их содержимого позволил создавать функциональные бесклеточные системы. Эти системы высокой степени очистки необходимы для определения деталей сложных клеточных процессов на молекулярном уровне. Для этого требуется очистка белков и других участвующих в интересующем процессе компонентов. Белки в растворимом клеточном экстракте можно очистить методами колоночной хроматографии; тип матрицы колонки определяет, по какому признаку будут разделяться биологически активные белки: по молекулярной массе, гидрофобности, распределению заряда или сродству к другим молекулам. Обычно при очистке белок поочередно пропускают через несколько колонок — полученные в одной колонке обогащенные фракции помещают в следующую. Метод рекомбинантных ДНК, который будет описан ниже, позволяет прикреплять к белкам специальные маркеры узнавания, что значительно упрощает очистку.

метод рекомбинантных ДНК используется для слияния белка X и глутатион-S-трансферазы (GST)



8.3. Анализ белков

Белки участвуют в большинстве процессов в клетке: они катализируют метаболические реакции, гидролизуют нуклеотиды для совершения механической работы и служат главным структурным элементом клетки. Огромное разнообразие структуры и функций белков стало причиной разработки множества методов их анализа.

8.3.1. Белки можно разделить при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН)

Обычно белки несут суммарный положительный или отрицательный заряд, определяемый составляющими их заряженными аминокислотными остатками. Наложение электрического поля на содержащий белковую молекулу раствор заставляет белок двигаться со скоростью, зависящей от его суммарного заряда, размера и формы. Это свойство используют, проводя **электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ)**. Обогащенный поперечными сшивками полиакриламидный гель используют в качестве инертной матрицы, через которую движутся белки. Гель приготавливают путем полимеризации мономеров; размер пор можно произвольно выбрать таким образом, чтобы они были достаточно малы для замедления движения определенных молекул. Сами белки помещают не в простой водный раствор, а в раствор, содержащий сильный отрицательно заряженный детергент — додецилсульфат натрия, ДСН (**рис. 8.17**). Этот детергент связывается с гидрофобными областями белков, что приводит к разрыву связей белковых молекул друг с другом или молекулами липидов. В результате каждая молекула белка в растворе детергента находится в свободном растворенном состоянии. Помимо этого, для разрыва S—S связей в белках обычно добавляют восстанавливающий агент, например β-меркаптоэтанол. Это позволяет анализировать отдельные пептиды, входящие в состав мультисубъединичных белков.

Что происходит, когда смесь растворенных в ДСН белков пропускают через слой полиакриламидного геля? Каждая молекула связывает большое количество отрицательно заряженных молекул детергента, что маскирует собственный заряд белка и заставляет его двигаться к положительному электроду при наложении разницы потенциалов. Белки одинакового размера будут двигаться через гель с одинаковой скоростью, так как, во-первых,

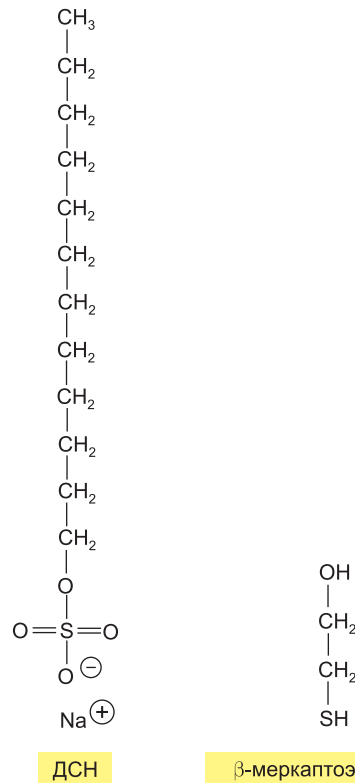


Рис. 8.17. Детергент додецилсульфат натрия (ДСН) и восстанавливающий агент β-меркаптоэтанол. Эти два соединения используют для солиubilизации белков с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. Здесь изображена его ионизированная форма.

они были полностью развернуты при помощи ДСН, и, следовательно, имеют одинаковую форму и, во-вторых, они связали одинаковое количество ДСН и, следовательно, несут одинаковый отрицательный заряд. На более крупные белки с большим зарядом будут действовать большие электрические силы, и они будут сильнее тормозиться. В простом растворе эти два эффекта исключили бы друг друга, но в сетке полиакриламидного геля, действующего как молекулярное сито, большие молекулы будут задерживаться в значительно большей степени, чем малые. В результате сложная смесь белков разделяется на отдельные полосы белков, расположенные в зависимости от молекулярной массы молекулы (рис. 8.18). Содержащиеся в большом количестве белки легко зарегистрировать путем окрашивания их в геле, например, раствором Кумасси (бриллиантовый синий). Даже содержащиеся в малом количестве белки можно увидеть в геле, если добавить серебряный или золотой краситель. Минимальное количество белка, которое можно определить в полосе, составляет 10 нг.

ДСН-ПААГ широко применяют, так как он позволяет разделить любые типы белков, включая те, которые в нормальных условиях в воде нерастворимы, на-

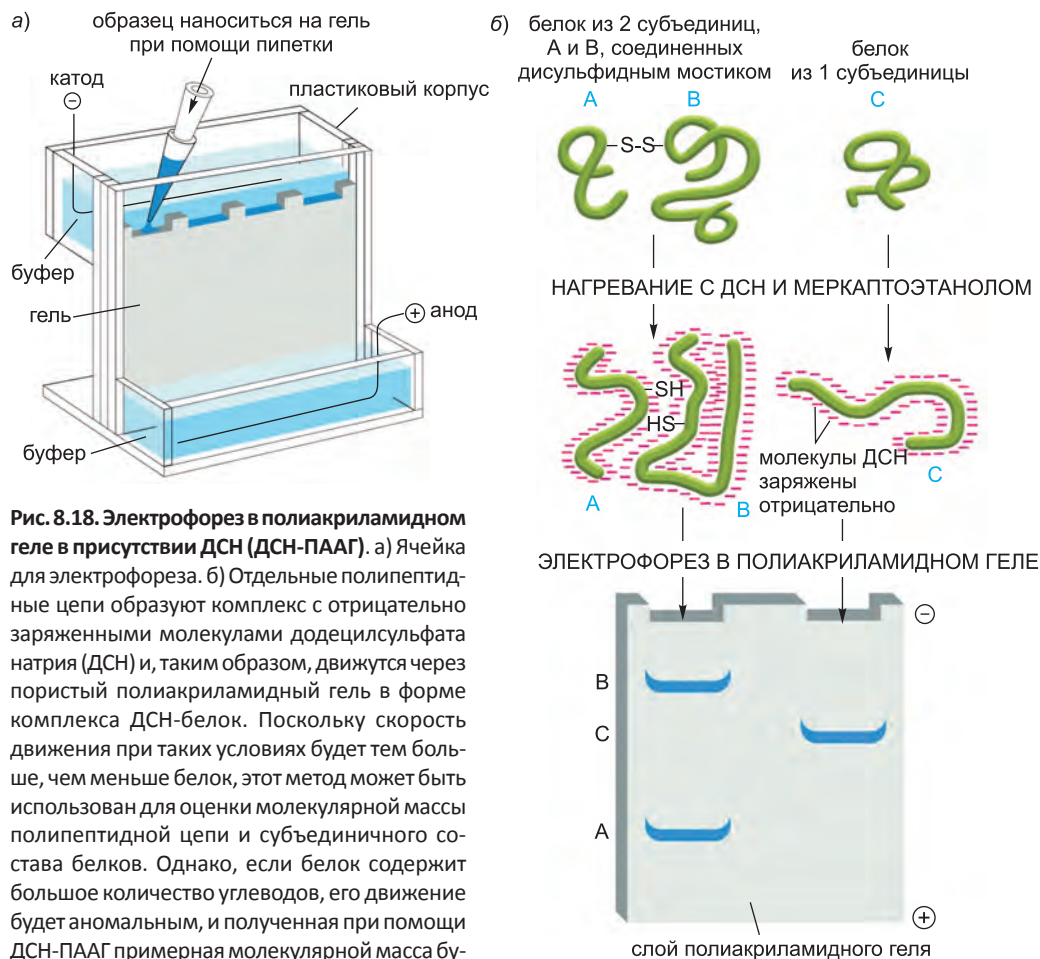


Рис. 8.18. Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ). а) Ячейка для электрофореза. б) Отдельные полипептидные цепи образуют комплекс с отрицательно заряженными молекулами додецилсульфата натрия (ДСН) и, таким образом, движутся через пористый полиакриламидный гель в форме комплекса ДСН-белок. Поскольку скорость движения при таких условиях будет тем больше, чем меньше белок, этот метод может быть использован для оценки молекулярной массы полипептидной цепи и субъединичного состава белков. Однако, если белок содержит большое количество углеводов, его движение будет аномальным, и полученная при помощи ДСН-ПААГ примерная молекулярная масса будет неправильной.

пример мембранные белки. Поскольку полипептиды разделяются по размеру, метод позволяет судить о молекулярной массе и субъединичном составе белков. На **рис. 8.19** представлена фотография геля, использованного для анализа каждого этапа очистки белка.

8.3.2. Специфические белки можно обнаружить путем гибридизации с антителами

Определенный белок можно идентифицировать после фракционирования в ПААГ путем экспонирования всех присутствующих в геле белков к специфическому анти телу, связанному с радиоактивным изотопом, легко регистрируемым ферментом или флуоресцентным красителем. Для удобства все разделенные белки, находящиеся в геле, сначала переносят (путем «промокания», отсюда английский термин «блоттинг») на нитроцеллюлозную бумагу или нейлоновую мембрану. После помещения мембраны на гель налагают сильное электрическое поле, которое заставляет белки выходить из геля и переходить на мембрану. Затем мембрану вымачивают в растворе меченого антитела, что позволяет обнаружить нужный белок. Этот метод обнаружения белков называется **вестерн-блоттинг**, или **иммуноблоттинг** (**рис. 8.20**).

8.3.3. Масс-спектрометрия является высокочувствительным методом идентификации неизвестных белков

Клеточные биологи и биохимики часто сталкиваются с задачей идентификации одного или нескольких белков, полученных одним из ранее описанных методов очистки (см., например, **рис. 8.16**). Поскольку геномы наиболее распространенных экспериментальных организмов расшифрованы, существуют каталоги всех синтезируемых в этих организмах белков. Это упрощает задачу идентификации неизвестного белка (или набора неизвестных белков), так как теперь необходимо лишь сравнить некоторые из содержащихся в образце аминокислотных последовательностей с известными генами. В настоящее время для этого практически повсеместно применяют масс-спектрометрию в сочетании с компьютерным поиском по базам данных.

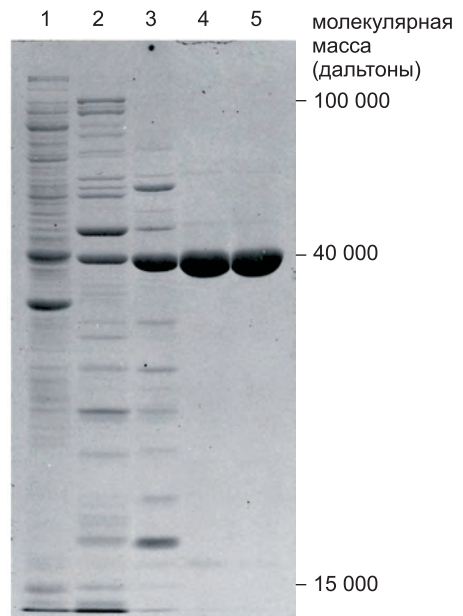


Рис. 8.19. Анализ белковых проб при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН. На фотографии изображен окрашенный Кумасси гель, использованный для обнаружения белков на различных стадиях очистки фермента. Самая левая дорожка (дорожка 1) содержит сложную смесь белков из исходного клеточного экстракта. Каждая следующая дорожка показывает белки, полученные после хроматографического фракционирования белковой пробы, проанализированной на предыдущей дорожке (см. **рис. 8.14**). На старт над каждой дорожкой помещали одинаковое количество белка (10 мкг). Отдельные белки обычно выглядят как четкие окрашенные полосы, однако полоса может уширяться, если она содержит слишком много белка. (Из T. Formosa and B. M. Alberts, *J. Biol. Chem.* 261: 6107–6118, 1986.)

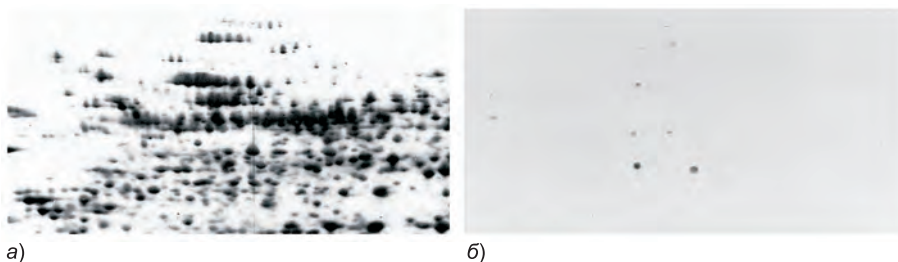


Рис. 8.20. Вестерн-блоттинг. Все белки из делящихся клеток табака в культуре сначала разделяют при помощи двумерного электрофореза в полиакриламидном геле (метод описан на рисунке 8.23). На (а) положение белков определено при помощи чувствительного белкового красителя. На (б) разделенные в одинаковом геле белки перенесены на лист нитроцеллюлозы и экспонированы к антителу, специфичному к белкам, фосфорилированным во время митоза по остаткам треонина. Положение порядка дюжины белков, с которыми связалось данное антитело, определяют при помощи связанного с ферментом второго антитела. Этот метод также иногда называют иммуноблоттингом (или вестерн-блоттингом). (Из J. A. Traas et al., *Plant J.* 2: 723-732, 1992. С любезного разрешения Blackwell Publishing.)

Динамика заряженных частиц под действием электрического и магнитного полей в вакууме подчиняется строгим законам. Этот принцип используют в масс-спектрометрии для разделения ионов в зависимости от отношения их массы к заряду. Это невероятно чувствительный метод. Для него требуется очень малое количество вещества, и он позволяет определять точную массу интактных белков и пептидов, полученных путем ферментативного или химического расщепления. Полученные массы очень точны; часто ошибка меньше чем одна миллионная. Наиболее распространенный вид данного метода — это *матричноактивированная лазерная десорбция/ионизация с времяпролетным масс-анализатором (MALDI-TOF)*. При этом подходе содержащиеся в образце белки сначала расщепляют до коротких пептидов. Эти пептиды затем смешивают с органической кислотой и высушивают на металлической или керамической подложке. Затем образец облучают лазером, и пептиды покидают подложку в виде ионизированного газа, в котором каждая молекула несет один или более положительных зарядов. Ионизированные пептиды ускоряются в электрическом поле и летят в сторону детектора. Их масса и заряд определяют время, за которое они достигнут детектора: большие пептиды движутся медленнее, а частицы с большим зарядом — быстрее. Анализируя такие ионизированные пептиды, несущие единственный заряд, можно определить точную массу содержащихся в исходном образце пептидов. MALDI-TOF также можно использовать для точного определения массы интактных белков массой до 200 тысяч кДа. Полученную информацию затем используют для поиска по геномным базам данных, в которых содержатся массы всех белков и их предполагаемых пептидных фрагментов, полученные из последовательности генома организма (**рис. 8.21, а**). Однозначное совпадение с определенной открытой рамкой считывания можно получить, зная массу лишь нескольких пептидов, входящих в состав данного белка.

MALDI-TOF позволяет получить точную молекулярную массу белков и пептидов. Более того, используя одновременно два масс-спектрометра (такое сочетание носит название MS/MS), можно напрямую определить аминокислотную последовательность отдельных пептидов в сложной смеси. Как описано выше, образец белка сначала расщепляют на пептиды меньшего размера, затем разделяют при помощи

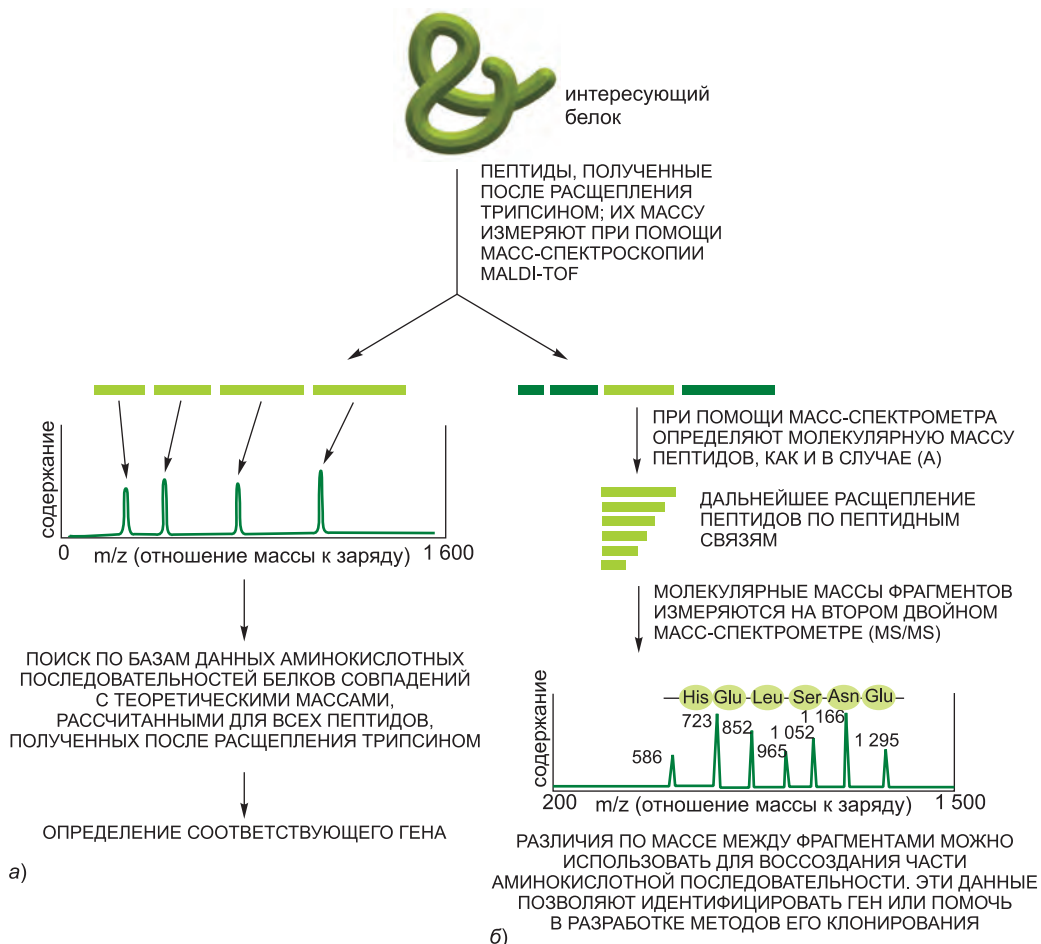


Рис. 8.21. Использование масс-спектрометрии для идентификации белков и секвенирования пептидов.

Выделенный белок расщепляют трипсином, и пептидные фрагменты помещают в масс-спектрометр. Далее для идентификации белка можно использовать два подхода. (а) В первом методе массы пептидов определяют напрямую при помощи масс-спектрометрии MALDI-TOF. Затем поиском по базам данных находят ген, кодирующий белок, чей расчетный профиль расщепления трипсином совпадает с полученными значениями. (б) Масс-спектрометрия также позволяет напрямую определить аминокислотную последовательность пептидных фрагментов. В данном примере триптические пептиды сначала разделяют в масс-спектрометре в зависимости от массы. Затем каждый пептид еще больше фрагментируется, в основном путем расщепления пептидных связей. В результате получается вложенное множество пептидов, различающихся по размеру на одну аминокислоту. Эти фрагменты помещают во второй сопряженный масс-спектрометр и определяют их массу. Разность масс двух близко связанных пептидов можно использовать для определения «лишней» аминокислоты. Посредством последовательного повторения этой процедуры можно определить частичную аминокислотную последовательность исходного белка. Для наглядности показан анализ образца из одного очищенного белка. На самом деле, масс-спектрометрию обычно применяют для смеси белков, полученных, например, для аффинной хроматографии (см. рис. 8.16), это позволяет идентифицировать все присутствующие в смеси молекулы. Более того, масс-спектрометрия способна также определять посттрансляционные модификации белков, как описано в тексте.

масс-спектрометрии. Каждый пептид затем фрагментируется еще больше за счет столкновения с высокоэнергетическими атомами газа. Этот метод фрагментации в основном направлен на разрушение пептидных связей, что приводит к образованию «лестницы» фрагментов, отличающихся на одну аминокислоту. Во втором масс-спектрометре эти фрагменты разделяют и определяют их массу. Анализируя эти различия в массах, можно восстановить аминокислотную последовательность пептида (**рис. 8.21, б**).

МС/МС очень полезна для нахождения и определения точного положения посттрансляционных модификаций белков, например фосфорилирования или ацетилирования. Поскольку эти модификации приводят к характерному увеличению массы аминокислоты, их легко детектировать при помощи масс-спектрометрии. В главе 3 мы говорили, что протеомика — термин, объединяющий множество различных экспериментальных методов, — представляет собой описание всех белков клетки, включая все белок-белковые взаимодействия и посттрансляционные модификации. В сочетании с быстрыми методами очистки, описанными в предыдущем разделе, масс-спектрометрия стала наиболее могущественным методом нахождения посттрансляционных модификаций как данного белка, так и всех белков, связанных с ним в процессе очистки.

8.3.4. Двумерные методы разделения исключительно эффективны

Разные белки могут обладать одинаковым размером, формой, массой и суммарным зарядом, поэтому большинство методов разделения, таких как гель-электрофорез в полиакриламидном геле или ионообменная хроматография, обычно неспособны обнаружить все белки клетки или хотя бы органеллы. В отличие от этих методов, **двумерный гель-электрофорез**, в котором использованы два различных подхода к разделению белков, обладает разрешением в 2000 белков (это общее число различных белков в простой бактерии) на двумерной карте белков.

На первом шаге белки разделяют по их характерному заряду. Образец растворяют в маленьком объеме раствора неионного (незаряженного) детергента, содержащего также β -меркаптоэтанол и денатурирующее химическое соединение — мочевины. В этом растворе все пептидные цепи денатурируют и диссоциируют, но их собственный заряд при этом не меняется. Полипептидные цепи затем разделяют в градиенте рН при помощи метода *изоэлектрического фокусирования*, основанного на изменении суммарного заряда молекулы белка в зависимости от рН окружающего раствора. Каждый белок имеет характерную изоэлектрическую точку, то есть рН, при котором он не несет суммарного заряда и, следовательно, не движется в электрическом поле. При изоэлектрическом фокусировании белки электрофоретически разделяют в узкой трубке полиакриламидного геля, в котором при помощи смеси специальных буферных растворов задают рН. Каждый белок движется в градиенте до места, соответствующего его изоэлектрической точке, и останавливается там (**рис. 8.22**). Это первое пространственное измерение двумерного электрофореза в полиакриламидном геле.

На втором шаге узкий гель, содержащий разделенные белки, вновь подвергают электрофорезу, но в перпендикулярном относительно первого шага направлении. В этот раз добавляют ДСН, и белки разделяют в соответствии с их размером, как в одномерном ДСН-ПААГ; исходный узкий гель вымачивают в ДСН и помещают на край пластины полиакриламидного геля с ДСН, через который будут мигрировать полипептидные цепи. В результате каждый белок будет формировать отдельное пятно. Это второе пространственное измерение двумерного электрофореза в полиакриламидном геле. Не разделяются лишь белки, имеющие как одинаковый заряд,

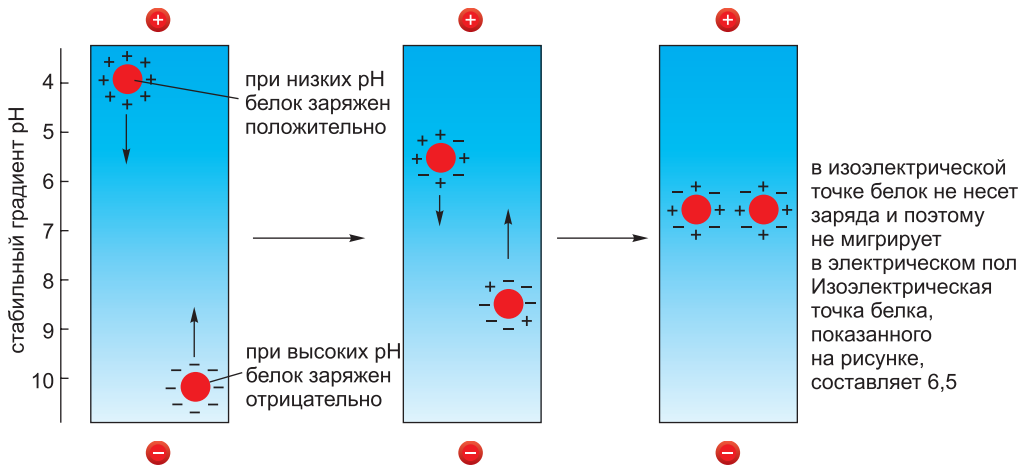


Рис. 8.22. Разделение молекул белков методом изоэлектрического фокусирования. При низком pH (высокой концентрации H^+) карбоксильные кислотные группы белков не заряжены ($-COOH$), а их содержащие азот основные группы заряжены полностью (например, $-NH_3^+$). В результате большинство белков в таких условиях будут нести положительный суммарный заряд. При высоком pH карбоксильные кислотные группы заряжены отрицательно ($-COO^-$), а основные группы не заряжены (например, $-NH_2$), поэтому большинство белков несут отрицательный заряд. При *изоэлектрическом pH* белок не имеет суммарного заряда, поскольку положительные и отрицательные заряды находятся в равновесии. Таким образом, когда трубка, содержащая фиксированный градиент pH, подвергается воздействию сильного электрического поля в подходящем направлении, каждый тип белков в образце будет двигаться до тех пор, пока он не сформирует четкую полосу в своей изоэлектрической точке, как показано на рисунке.

так и одинаковую массу, но это редкий случай. При помощи радиоавтографии, если на белок сначала поместили радиоизотоп, или различных методов окрашивания можно обнаружить даже следовые количества каждой полипептидной цепи (**рис. 8.23**). Метод обладает очень хорошим разрешением, позволяющим отличить белки, различающиеся на одну заряженную аминокислоту.

В настоящее время доступен другой, еще более могущественный «двумерный» метод, направленный на определение всех белков, содержащихся в органелле или другой сложной смеси белков. Поскольку метод основан на масс-спектрометрии, он подходит для белков, выделенных из организмов с полностью расшифрованным геномом. Сначала присутствующие в смеси белки расщепляют трипсином, что дает более короткие пептиды. Затем эти пептиды автоматизированно разделяют несколькими последовательными шагами жидкостной хроматографии. В качестве второго пространственного измерения каждый пептид помещают напрямую в tandemный масс-спектрометр (MS/MS), позволяющий определить его аминокислотную последовательность и любые посттрансляционные модификации. Такой метод, в котором tandemный масс-спектрометр (MS/MS) соединен с выходным отверстием автоматической системы для жидкостной хроматографии (LC), называют LC-MS/MS. Сейчас анализ образца целой органеллы и идентификация сотен белков и их модификаций при помощи LC-MS/MS стали уже рутинной процедурой. Конечно, невозможно идеально изолировать органеллу, и некоторые из обнаруженных белков будут «загрязняющими». Их часто можно исключить путем анализа соседних фракций, полученных при очищении органелл, и «вычитания» их из максимума фракции органеллы.

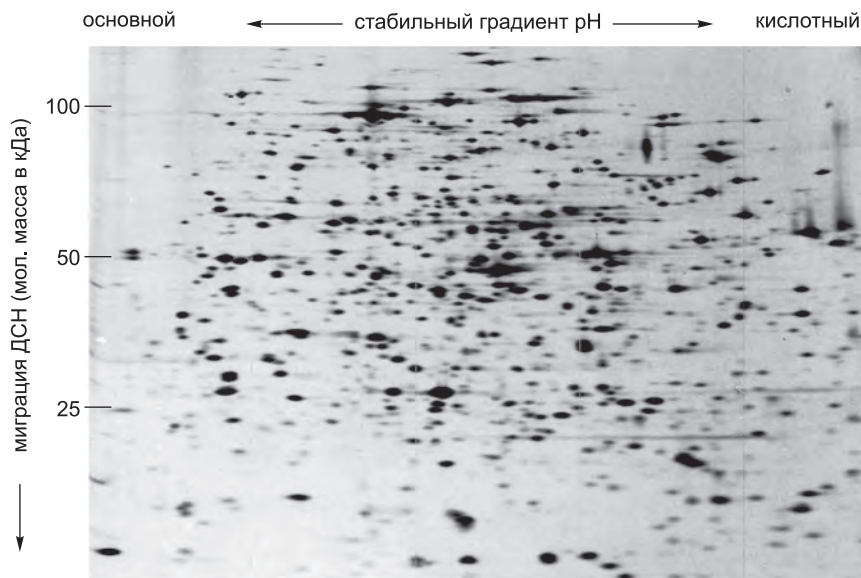


Рис. 8.23. Двумерный электрофорез в полиакриламидном геле. В этом геле разделены все белки бактериальной клетки *E. coli*. Каждое пятно соответствует отдельной полипептидной цепи. Сначала белки разделяли методом изоэлектрического фокусирования в соответствии с их изоэлектрическими точками в направлении слева направо. Дальнейшее фракционирование проводили в соответствии с их молекулярной массой при помощи электрофореза сверху вниз в присутствии ДСН. Заметим, что различные белки присутствовали в различных количествах. Бактерии выращивали в культуре, содержащей меченные радиоизотопами аминокислоты, поэтому все белки были радиоактивны, и их можно было обнаружить при помощи радиоавтографии (см. стр. 602–603). (С любезного разрешения Patrick O’Farrell.)

8.3.5. Гидродинамические измерения позволяют установить размер и форму белковых комплексов

Большинство белков в клетке функционируют в составе комплексов, и знания о размере и форме этих комплексов часто указывает на их функцию. Существует несколько важных способов получения такой информации. Комплекс иногда можно напрямую визуализировать при помощи электронной микроскопии, как описано в главе 9. Дополнительно к этому существует подход, основанный на гидродинамических свойствах комплексов, то есть на их поведении при движении в жидкой среде. Обычно проводят два независимых измерения. Сначала измеряют скорость осаждения комплекса в поле центробежных сил, созданном ультрацентрифугой (см. рис. 8.11, *а*). Полученная в результате константа седиментации (или величина *S*) зависит как от размера, так и от формы комплекса и сама по себе не дает полезной информации. Однако после проведения второго гидродинамического измерения — построения графика движения комплекса через колонку для гель-хроматографии (см. рис. 8.13, *б*) — можно рассчитать приблизительную форму комплекса и его молекулярную массу.

Молекулярную массу также можно оценить проще при помощи аналитической центрифуги, сложного прибора, позволяющего производить измерения поглощения белка, когда образец подвергается действию центробежных сил. При этом подходе образец центрифугируют до тех пор, пока он не достигнет состояния равновесия,

при котором действующая на белковый комплекс центробежная сила точно уравновесит диффузию комплекса. Точка равновесия зависит от молекулярной массы комплекса, но не от его формы, поэтому метод позволяет напрямую рассчитать молекулярную массу для определения стехиометрии каждого белка в белковом комплексе.

8.3.6. Группы взаимодействующих белков можно идентифицировать при помощи биохимических методов

Поскольку большинство белков в клетке функционируют в составе комплексов с другими белками, для характеристики биологической роли неизвестного белка важно сначала идентифицировать все белки, с которыми он специфически связывается.

Коиммунопреципитация является одним из методов идентификации прочно связывающихся друг с другом белков. В данном случае антитело узнает специфический белок-мишень; затем связанные с антителом и прикрепленные к твердой матрице химические соединения вытягивают комплекс из раствора и на дно пробирки. Если во время образования комплекса с антителом исходный белок-мишень достаточно прочно связан с другим белком, то его партнер также будет преципитирован. Этот метод полезен для идентификации входящих в комплексы внутри клетки белков, включая тех, которые взаимодействуют с другими молекулами только временно, например, когда внеклеточные сигнальные молекулы стимулируют клетку (см. обсуждение в главе 15). Другим часто используемым методом идентификации белков-партнеров является аффинная хроматография (см. рис. 8.13, *в*). Модификация этого метода для обнаружения взаимодействующих белков состоит в том, что интересующий белок прикрепляется к полимерным гранулам колонки. Когда белки в клеточном экстракте промываются при прохождении через колонку, те белки, которые взаимодействуют с интересующим белком, задерживаются аффинной матрицей. Затем их можно элюировать и идентифицировать с помощью масс-спектрометрии.

В дополнение к фиксации белковых комплексов на колонках или в пробирках для изучения белковых взаимодействий исследователи разрабатывают высокоплотные белковые чипы. Эти биочипы, содержащие тысячи различных белков или антител, нанесенных на стеклянную подложку или иммобилизованных в очень маленьких лунках, позволяют исследовать биохимическую активность и профили связывания одновременно большого количества белков. Например, если инкубировать флуоресцентно меченый белок с биочипами, содержащими тысячи иммобилизованных белков, пятна, которые сохраняют способность к флуоресценции после отмывания, будут содержать белок, с которым исходный белок специфически связывается.

8.3.7. Белок-белковые взаимодействия также можно идентифицировать методом дрожжевой двугибридной системы

До настоящего момента мы делали упор на биохимические подходы к изучению белок-белковых взаимодействий. Однако один из наиболее эффективных методов — **двугибридные системы** — основан на применении внутренних клеточных механизмов для обнаружения белок-белковых взаимодействий.

Метод использует модульную природу белков-активаторов генов (см. рис. 7.45). Эти белки связываются со специфической последовательностью ДНК и активируют

транскрипцию гена, причем эти функции обычно выполняют различные домены белка. При помощи метода рекомбинантных ДНК два таких белковых домена используют для создания отдельных химерных белков — «наживки» и «добычи». Для конструирования белка-«наживки» последовательность ДНК, кодирующую интересующий белок, сшивают с ДНК, кодирующей ДНК-связывающий домен белка-активатора гена. Когда такую конструкцию вводят в дрожжи, клетки начинают синтезировать химерный белок, состоящий из интересующего белка и ДНК-связывающего домена (рис. 8.24). Этот белок связывается с регуляторным участком репортерного гена, где служит в качестве «наживки» для ловли белков, взаимодействующих с интересующим белком. Для поиска потенциальных белков-партнеров (потенциальной «добычи» на «наживку») возможные кандидаты также должны представлять собой химерные белки: ДНК, кодирующая активирующий домен белка-активатора гена, сшивается с большим количеством различных генов. Отдельные гены из этого набора, кодирующие потенциальную «добычу», поодиночке вводят в клетки дрожжей, содержащие «наживку». Если дрожжевая клетка получает клон ДНК, экспрессирующий белок-«добычу» для белка-«наживки», то две половинки активатора транскрипции соединяются и включают ген-репортер (см. рис. 8.24).

Этот остроумный метод кажется сложным, но двугибридные системы относительно легко применять в лаборатории. Несмотря на то что белок-белковые взаимодействия происходят в ядре дрожжевой клетки, так можно исследовать белки из любой части клетки и любого организма. Созданы двойные гибридные системы, позволяющие создать схему взаимодействий между всеми белками, синтезирующимися в организме. В данном случае для каждого белка конструируются химерные белки «наживки» и «добычи», что позволяет наблюдать любую комбинацию этих белков. При помощи этого метода созданы карты взаимодействий большинства белков дрожжей, круглого червя *C. elegans* и мушки *Drosophila*.

8.3.8. Объединение полученных разными методами данных дает надежные карты белковых взаимодействий

Как показано в главе 3, подробные карты белковых взаимодействий могут быть очень полезны для определения функций белков (см. рис. 3.82). Поэтому метод двойных гибридов и описанный выше биохимический метод, известный как тандемная аффинная очистка (см. стр. 515–516), были автоматизированы для определения тысяч взаимодействующих белков. К сожалению, различные эксперименты приводят к разным результатам, и многие обнаруженные в одной лаборатории взаимодействия не обнаруживают в другой. Таким образом, наиболее надежные карты белковых взаимодействий включают в себя данные многих экспериментов, то есть каждое отмеченное на карте взаимодействие подтверждено более чем одним методом.

8.3.9. Оптические методы позволяют наблюдать белковые взаимодействия в реальном времени

Как только стало известно, что два белка (или белок и малая молекула) связываются, возникла необходимость более подробно охарактеризовать их взаимодействие. Белки могут связываться друг с другом на более-менее продолжительное время (например, как субъединицы РНК-полимеразы или протеосомы) или всего на несколько миллисекунд (как киназа и ее субстрат).

Для понимания механизма функционирования белка в клетке необходимо определить, насколько крепко он связывается с другими белками, как быстро он от них диссоциирует, и как ковалентные модификации, малые молекулы или другие белки влияют на эти взаимодействия. Такого рода исследования динамики белков часто требуют использования оптических методов.

Определенные аминокислоты (например, триптофан) обладают слабой флуоресценцией, которую можно обнаружить при помощи чувствительных флуориметров. Часто интенсивность флуоресценции, или спектр испускания, флуоресцирующих аминокислот, расположенных в области контакта двух белков, изменяется при связывании этих белков. Когда такое изменение может быть зафиксировано при помощи флуориметрии, становится возможным получить точное количественное описание процесса связывания белков.

Особенно полезным методом исследования динамики связывания белков с другими молекулами является **поверхностный плазмонный резонанс (SLR)**. Этот метод позволяет охарактеризовать широкий спектр молекулярных взаимодействий, включая связывание антигена с антителом, лиганда с рецептором, белков с ДНК, углеводами, малыми молекулами и другими белками.

SLR регистрирует связывание молекул путем слежения за отражением луча света от границы раздела между водным раствором потенциально связывающихся молекул и поверхностью биодатчика, несущего иммобилизованный белок-«наживку». Интересующий белок прикреплен к очень тонкому слою металла, нанесенного

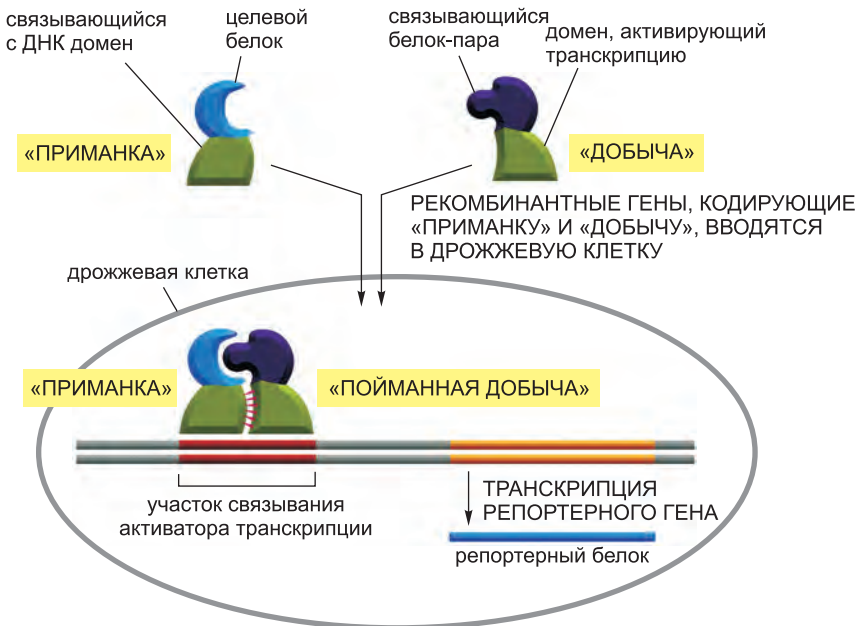


Рис. 8.24. Дрожжевые двойные гибридные системы для обнаружения белок-белковых взаимодействий. Интересующий белок сшивают с ДНК-связывающим доменом, направляющим химерный белок к регуляторной области репортерного гена в качестве «наживки». Когда в ядре клетки этот белок связывается с другим специально сконструированным белком («добычей»), их взаимодействие приводит к объединению двух половинок активатора транскрипции, который затем запускает экспрессию гена-репортера.

на одну сторону стеклянной призмы (рис. 8.25). Луч света пропускают через призму; под определенным углом, называемым *резонансным*, энергия света взаимодействует с электронным облаком металлической пленки, что приводит к возникновению плазмона — колебания электронов перпендикулярно плоскости пленки. Электроны «прыгают» вверх и вниз между верхней и нижней поверхностями пленки, как груз на пружинке. Плазмон, в свою очередь, сверху и снизу металлической поверхности создает электрическое поле, распространяющееся на очень короткое расстояние — порядка длины волны света. Любое изменение состава среды в пределах электрического поля приведет к измеряемому изменению резонансного угла.

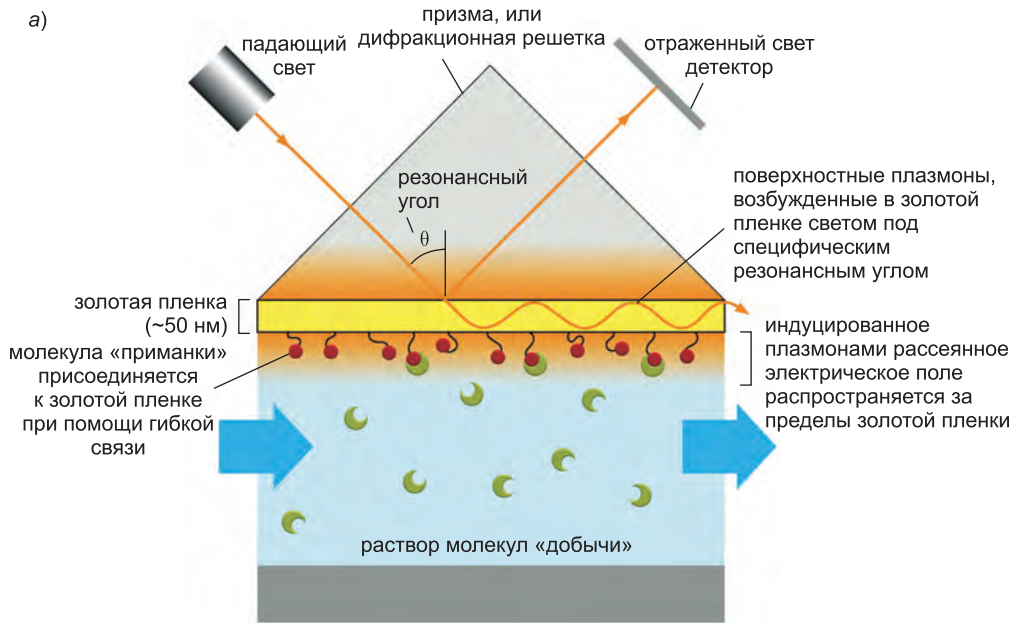
Для исследования связывания растворов белков (или других молекул), которые потенциально взаимодействуют с иммобилизованным белком-«наживкой», пропускают мимо поверхности биодатчика. Белки, связывающиеся с наживкой, изменяют состав молекулярных комплексов на металлической поверхности, что приводит к изменению резонансного угла (см. рис. 8.25). Изменение резонансного угла происходит в реальном времени и отражает кинетику связывания/диссоциации молекул с интересующим белком. Константу связывания k_{on} измеряют по мере взаимодействия молекул, а константу распада комплексов k_{off} определяют по мере того, как буфер отмывает связанные молекулы с поверхности датчика. Константа равновесия рассчитывается путем деления k_{off} на k_{on} . Помимо измерения кинетики, LPR можно использовать для определения числа молекул в комплексе: интенсивность сигнала изменяется пропорционально массе иммобилизованного комплекса.

Метод LPR особенно эффективен, поскольку он требует малых количеств белка, нет необходимости метить белок и взаимодействие белка с другими молекулами можно наблюдать в реальном времени.

В третьем оптическом методе исследования белковых взаимодействий используется *зеленый флуоресцентный белок* GFP (см. ниже) и его производные различной окраски. В этом подходе два интересующих белка метят различными флуорохромами таким образом, чтобы спектр испускания одного флуорохрома перекрывался со спектром поглощения другого. Если два белка и прикрепленные к ним метки сближаются на очень короткое расстояние (в пределах 1–10 нм), то энергия поглощенного света передается от одного флуорохрома другому. Передачу энергии, носящую название **резонансного переноса энергии флуоресценции** (Fluorescence Resonance Energy Transfer, **FRET**), регистрируют путем освещения первого флуорохрома и измерения испускания второго (рис. 8.26). Этот метод особенно эффективен в сочетании с флуоресцентной микроскопией, поскольку он позволяет характеризовать белок-белковые взаимодействия в определенных областях живой клетки.

8.3.10. Некоторые методы позволяют следить за одиночными молекулами

Вышеописанные биохимические методы применяют для изучения больших популяций молекул. Это ограничение отражает малые размеры биологических молекул по отношению к чувствительности методов их обнаружения. Однако последние разработки высокочувствительных и точных измерительных методов привели к возникновению новой ветви биофизики — исследованию одиночных молекул. Изучение отдельных молекул особенно важно для клеточной биологии, потому что в основе многих процессов лежит функционирование нескольких критических молекул в клетке.



- б) Связывание молекул «добычи» с молекулами «приманки» повышает показатель преломления поверхностного слоя, что влияет на резонансный угол возбуждения плазмонов, изменения которого можно измерить детектором.

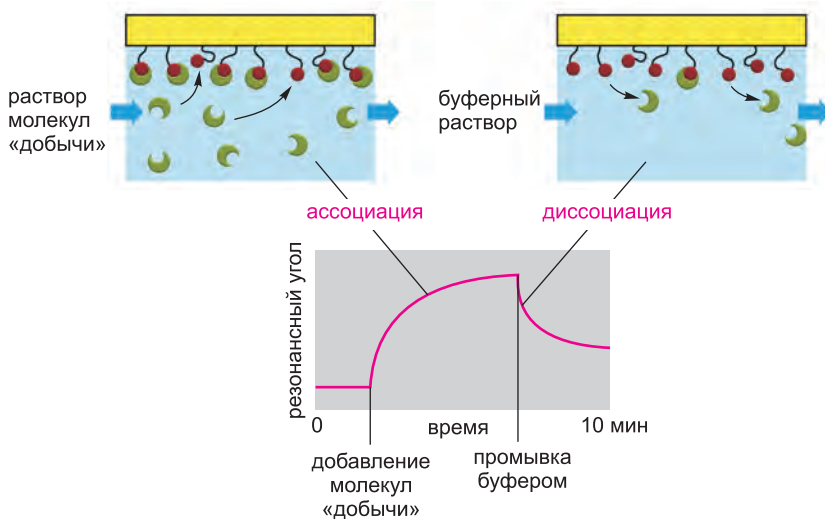


Рис. 8.25. Поверхностный плазмонный резонанс. (а) Метод обнаруживает взаимодействия, контролируя отражение луча света от границы раздела между водным раствором потенциально связывающихся молекул (показаны зеленым) и поверхностью биодатчика, на которую нанесен иммобилизованный белок-«наживка» (показан красным). (б) Раствору белков-«добычи» разрешено обтекание иммобилизованного белка-«наживки». Связывание молекул-«добычи» с белками-«наживкой», а также распад комплекса при их отмывании буферным раствором, приводит к регистрируемому изменению резонансного угла. Эти изменения, наблюдаемые в реальном времени, отражают образование и распад молекулярных комплексов.

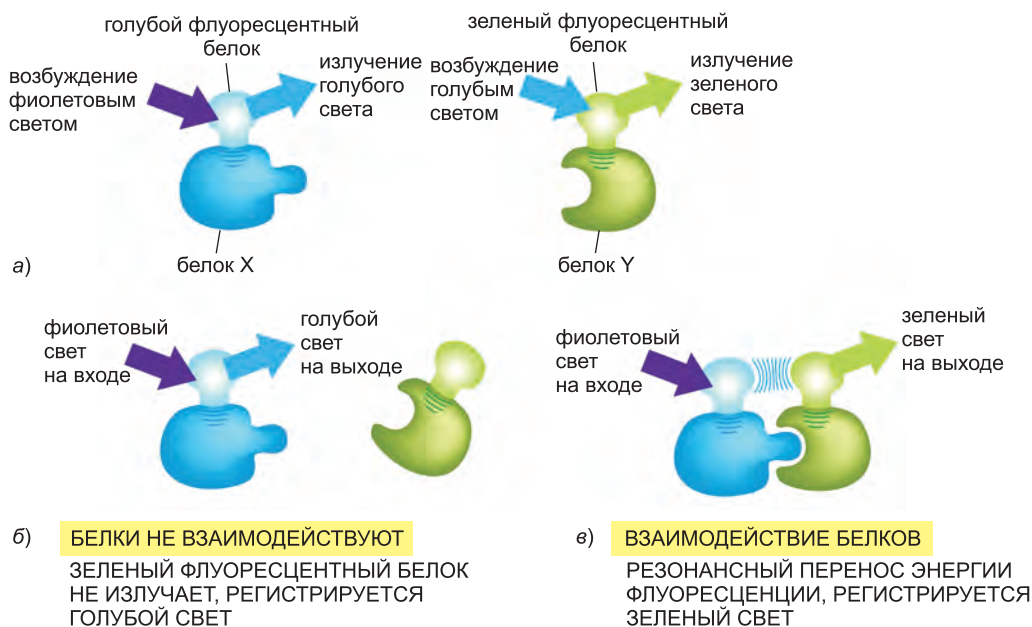


Рис. 8.26. Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET). Чтобы определить взаимодействие двух белков в живой клетке, их сначала синтезируют в виде химер совместно с зеленым флуоресцентным белком (GFP) или его производными другого цвета. (а) В данном примере белок X сшит с голубым флуоресцентным белком (tagCFP), который возбуждается фиолетовым светом (370–440 нм) и испускает синий свет (440–480 нм); белок Y сшит с зеленым флуоресцентным белком, который возбуждается синим светом и испускает зеленый (510 нм). (б) Если белки X и Y не взаимодействуют, при освещении образца фиолетовым светом будет наблюдаться флуоресценция только голубого флуоресцентного белка. (в) При взаимодействии белков X и Y может произойти резонансный перенос энергии флуоресценции. Освещение образца фиолетовым светом возбуждает синий флуоресцентный белок, его испускание, в свою очередь, возбуждает зеленый флуоресцентный белок, что приводит к испусканию зеленого света. Флуорохромы должны быть близко расположены (на расстоянии около 1–10 нм), чтобы произошел перенос энергии. Поскольку не все молекулы белков X и Y связаны постоянно, можно наблюдать некое голубое свечение. Но как только белки начинают взаимодействовать, испускание донора GFP падает, а испускание акцептора GFP растет.

Первый пример исследования функции одиночной молекулы белка — использование контактного прижимного электрода для измерения прохождения электрического тока через единственный ионный канал (см. рис. 11.33). Другой подход состоит в прикреплении белка к более крупной структуре, например грануле полистирола, которую затем можно наблюдать при помощи обычной микроскопии. Этот подход дал особенно полезные результаты при измерении движения моторных белков. К грануле, например, можно прикрепить молекулы двигательного белка кинезина (см. главу 16). В результате, наблюдая движение связанной с кинезином гранулы вдоль микротрубочки, можно измерить величину шага мотора (то есть расстояние, пройденное за счет гидролиза одной молекулы АТФ). Как мы увидим в главе 9, оптические микроскопы обладают ограниченным разрешением за счет дифракции света, но для определения положения гранулы с гораздо большей точностью, чем позволяет разрешение микроскопа, можно сочетать вычислительные и оптические методы. При помощи такого подхода можно легко обнаруживать и количественно описывать очень малые движения — порядка нанометров.

Еще одно достоинство прикрепления молекул к более крупным гранулам — эти гранулы могут служить «рычагами», с помощью которых становится возможным манипулировать молекулами. Это позволяет прилагать к молекулам силы и наблюдать их ответ. Например, скорость или величину шага мотора можно измерить как функцию силы, против которой он работает. В следующей главе описано как можно использовать сфокусированный лазерный луч в качестве «оптического пинцета» для приложения к грануле механической силы и исследования белков под действием внешних сил (см. рис. 9.35). На гранулы также можно воздействовать магнитными силами; этот метод носит название «магнитного пинцета». Если в магнитном поле находится множество гранул, на них всех будет действовать одинаковая сила, что позволяет параллельно, в течение одного эксперимента управлять большим количеством гранул.

Гранулы можно использовать в качестве маркеров для слежения за движением белков, но, очевидно, предпочтительнее визуализировать белки сами по себе. В следующей главе мы увидим, что недавние достижения микроскопии сделали это возможным.

8.3.11. Функционирование белков можно селективно нарушить при помощи малых молекул

Химические ингибиторы внесли значительный вклад в развитие клеточной биологии. Например, для анализа того, какие микротрубочки участвуют в данном биологическом процессе, часто используют ингибитор микротрубочек колхицин; несколько десятилетий назад эта молекула способствовала первому выделению и очистке тубулина. В прошлом такого рода небольшие молекулы обычно имели природное происхождение, то есть они синтезировались живыми организмами. Несмотря на то что, в целом, природные вещества были невероятно полезны для науки и медицины (см., например, таблицу 6.4, **стр. 385**), они влияли на ограниченное число биологических процессов. Однако недавнее развитие методов синтеза сотен тысяч малых молекул и автоматического широкомасштабного скрининга обещает идентификацию ингибиторов практически всех биологических процессов. В такого рода подходах большие наборы малых химических соединений анализируются одновременно как в живой клетке, так и в бесклеточных системах. Как только ингибитор обнаруживается, его можно использовать в качестве зонда для идентификации белка, с которым он связывается. Для этого используют аффинную хроматографию (см. рисунок 8.13, *в*) и другие сходные методы. Такой подход, часто называемый **химической биологией**, позволил обнаружить ингибиторы многих ключевых белков, принимающих участие в процессах клеточной биологии. При помощи этого метода, например, идентифицирован белок кинезин, участвующий в митозе (**рис. 8.27**). Химические ингибиторы дают клеточным биологам возможность контролировать время ингибирования, поскольку лекарства можно быстро добавлять или удалять из клеток, обеспечивая быстрое включение и выключение функции белка.

8.3.12. Структуру белка можно установить при помощи рентгено-структурного анализа

Основной метод расшифровки трехмерной структуры молекул, включая белки, в атомном разрешении — **рентгеновская кристаллография**. Рентгеновские лучи, как и свет, представляют собой вид электромагнитного излучения, но они обладают

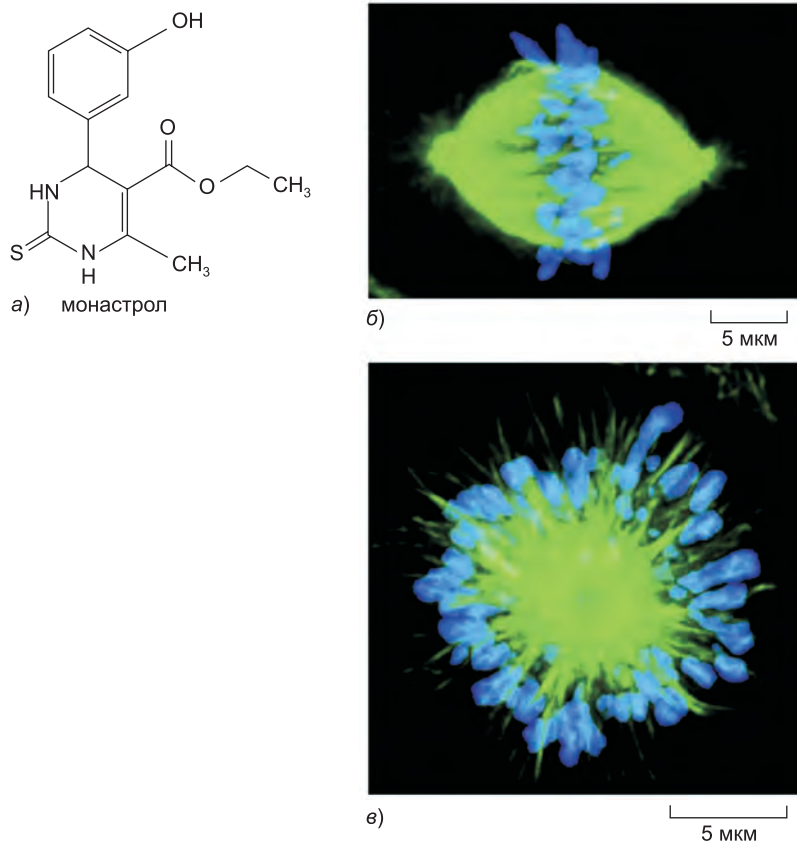


Рис. 8.27. Малые молекулы-ингибиторы для манипуляции живыми клетками. (а) Химическая структура монастрола — ингибитора кинезина, обнаруженного путем широкомасштабного скрининга малых молекул, нарушающих митоз. (б) Нормальное митотическое веретено деления, наблюдаемое в intactных клетках. Микротрубочки окрашены зеленым, хромосомы — синим. (в) Однополюсное веретено деления, образующееся в клетках, обработанных монастролом. (б и в из T. U. Mayer et al., *Science* 286: 971–974, 1999. С любезного разрешения издательства AAAS.).

меньшей длиной волны, обычно около 0,1 нм (диаметр атома водорода). Если узкий параллельный пучок рентгеновских лучей направить на образец чистого белка, большинство лучей пройдут прямо насквозь. Однако маленькая их часть будет рассеиваться за счет взаимодействия с атомами в образце. Если проба представляет собой высокоупорядоченный кристалл, рассеянные лучи в определенных точках будут усиливать друг друга, и в специальном детекторе они будут отображаться как дифракционные пятна (рис. 8.28).

Положение и интенсивность каждого пятна на изображении рентгеновской дифракции дают информацию о положении атомов, вызвавших рассеяние лучей, в кристалле. Расшифровка трехмерной структуры большой молекулы — это сложная задача. Она не была разрешена вплоть до 1960 г. Но в последние годы рентгеноструктурный анализ стал автоматизированным, и сейчас самым медленным шагом обычно бывает получение подходящих кристаллов белка. Для этого необходимы

большие количества очень чистого белка, и часто на нахождение правильных условий кристаллизации уходят годы проб и ошибок. Скорость значительно увеличилась после начала использования метода рекомбинантных ДНК для получения чистого белка и роботизированных методов анализа большого числа условий кристаллизации.

Анализ получившейся дифракционной картины дает сложную трехмерную карту электронной плотности. Интерпретация этой карты — перевод ее контуров в трехмерную структуру — представляет собой сложный процесс, требующий знания аминокислотной последовательности белка. Обычно методом проб и ошибок последовательность и карта электронной плотности соотносятся друг с другом на компьютере с получением наилучшего совпадения. Надежность получившейся атомной модели зависит от разрешения исходных кристаллографических данных: разрешение 0,5 нм может дать слабое разрешение полипептидной цепи, тогда как при 0,15 нм можно надежно предсказать положение всех не водородных атомов.

Полная атомная модель часто слишком сложна, для того чтобы рассматривать ее напрямую, поэтому ее обычно представляют в качестве упрощенной версии, демонстрирующей основные структурные свойства белка (см. приложение 3.2, стр. 132–133). На данный момент методами рентгеновской кристаллографии и ЯМР-спектроскопии (см. ниже) расшифрованы трехмерные структуры около 20 тысяч различных белков. Этого оказалось достаточно для обнаружения семейств часто встречаемых структур. Эти структуры или способы сворачивания белков часто в течение эволюции остаются неизменными, в отличие от образующих их аминокислотных последовательностей (см. рис. 3.13).

Методы рентгеновской кристаллографии также можно применять для изучения макромолекулярных комплексов. Последнее великое достижение — это расшифровка структуры рибосомы, большой и сложной машины, состоящей из нескольких молекул РНК и более 50-ти белков (см. рис. 6.64). Расшифровка потребовала использования синхротрона — источника рентгеновских лучей, интенсивность которого достаточно велика для анализа кристаллов такого крупного макромолекулярного комплекса.

8.3.13. Использование ЯМР для расшифровки структуры белка в растворе

Ядерную магнитно-резонансную (ЯМР) спектроскопию много лет широко используют для анализа структуры малых молекул. Этот метод сейчас все чаще применяют для изучения небольших белков или белковых доменов. В отличие от рентгеноструктурного анализа, для ЯМР не нужен кристаллический образец. Все, что необходимо, — это небольшой объем концентрированного раствора белка, помещаемый в сильное магнитное поле. ЯМР является основным методом получения подробной информации о трехмерной структуре молекул в растворе.

Определенные ядра атомов, в особенности водородные ядра, обладают магнитным моментом или спином, то есть они обладают внутренней намагниченностью, как стрелочка магнита. Спин ориентируется вдоль направления сильного магнитного поля, но его можно перевести в хаотическое возбужденное состояние под воздействием радиочастотных импульсов электромагнитного излучения. Когда возбужденные ядра водорода возвращаются в исходную ориентацию, они испускают радиочастотное излучение, которое можно измерить и выразить в виде спектра. Природа испускаемого излучения зависит от окружения каждого атома водорода,

и если одно ядро возбуждено, то оно будет влиять на поглощение и испускание других близлежащих ядер. Затем при помощи искусственного применения базового метода ЯМР, известного как двумерный ЯМР, можно различить сигналы водородов различных аминокислотных остатков и измерить малые смещения в этих сигналах, происходящие, если эти ядра водородов лежат достаточно близко для взаимодействия. Поскольку величина этих смещений указывает на расстояние между взаимодействующими парами водородных ядер, метод ЯМР способен давать информацию о расстояниях между частями белковой молекулы. Совмещение этих данных с аминокислотной последовательностью позволяет рассчитать трехмерную структуру белка (рис. 8.29).

В связи с техническими ограничениями ЯМР-спектроскопия позволяет хорошо определять только структуру маленьких белков с молекулярной массой до 20 кДа. Разрешение падает с увеличением размера макромолекулы. Но последние технические разработки увеличили предел до 100 кДа, что сделало ЯМР-спектроскопию доступной для структурного анализа большинства белков.

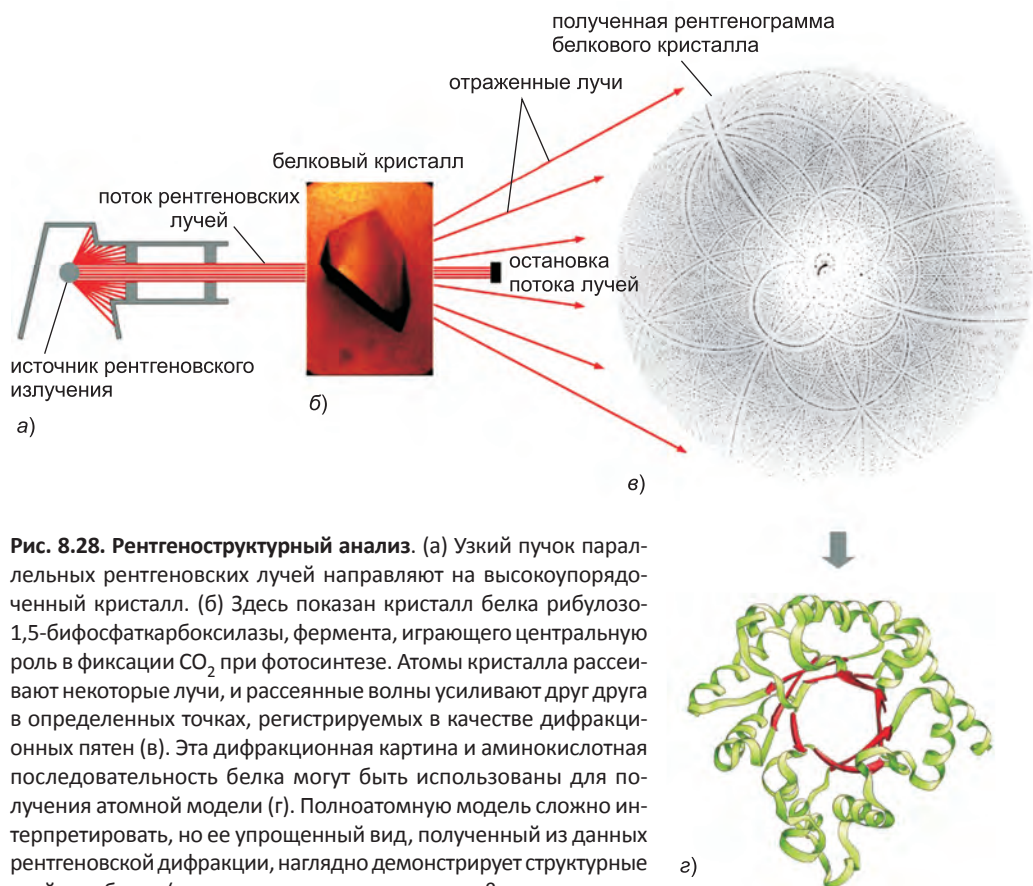


Рис. 8.28. Рентгеноструктурный анализ. (а) Узкий пучок параллельных рентгеновских лучей направляют на высокоупорядоченный кристалл. (б) Здесь показан кристалл белка рибулозо-1,5-бифосфаткарбоксилазы, фермента, играющего центральную роль в фиксации CO_2 при фотосинтезе. Атомы кристалла рассеивают некоторые лучи, и рассеянные волны усиливают друг друга в определенных точках, регистрируемых в качестве дифракционных пятен (в). Эта дифракционная картина и аминокислотная последовательность белка могут быть использованы для получения атомной модели (г). Полноатомную модель сложно интерпретировать, но ее упрощенный вид, полученный из данных рентгеновской дифракции, наглядно демонстрирует структурные свойства белка (α -спирали показаны зеленым, β -листы — красным). Компоненты на рисунках а–г показаны не в масштабе. (с любезного разрешения С. Branden (б); J. Hajdu и I. Andersson (в); адаптировано из оригинала, предоставленного В. Furugren (г).)

Поскольку ЯМР требует использования растворов веществ, данный метод также подходит, например, для наблюдения за изменением структуры белков при фолдинге или связывании белком другой молекулы. ЯМР также широко применяют для исследования отличных от белков молекул, он очень полезен, например, в качестве метода определения трехмерной структуры молекул РНК и сложных углеводных боковых цепей гликопротеинов.

Некоторые основные этапы развития рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии перечислены в [таблице 8.2](#).

8.3.14. Последовательность и структура белка могут указать на его функцию

Обсудив методы очистки и анализа белков, обратимся к обычной ситуации в клеточной и молекулярной биологии — исследователь идентифицировал важный для биологического процесса ген, но не знает биохимических свойств его белкового продукта.

Благодаря стремительному увеличению количества последовательностей белков и нуклеиновых кислот в геномных базах данных, функция гена — и кодируемого им белка — часто может быть предсказана путем простого сравнения его последовательности с уже охарактеризованными (см. рис. 3.14). Поскольку аминокислотная последовательность определяет структуру белка, а структура определяет биохимическую функцию, белки со сходными аминокислотными последовательностями часто обладают сходной структурой и, следовательно, выполняют одинаковые биохимические функции. Это справедливо даже для белков из неродственных организмов. В современной клеточной биологии изучение недавно открытого белка обычно начинается с поиска ранее охарактеризованных белков, обладающих сходными аминокислотными последовательностями.

Поиск гомологичных генов или белков среди известных последовательностей обычно производится во всемирной паутине. Необходимо просто выбрать базу данных и ввести нужную последовательность. Программа совмещения последовательностей — наиболее популярны BLAST и FASTA — ищет в базе данных сходную последовательность путем перемещения предложенной пользователем последовательности вдоль содержащихся в базе до тех пор, пока не найдет полное или частичное совпадение кластера аминокислотных остатков ([рис. 8.30](#)). Результат даже сложного поиска, который может производиться с последовательностью нуклеотидов или аминокислот, возникнет на экране через несколько минут. Такое сравнение может помочь предсказать функцию отдельных белков, белковых семейств или даже большей части белков только что секвенированного организма.

В главе 3 показано, что многие белки, имеющие одинаковую конформацию и выполняющие сходные функции, обладают слишком далеким родством, и их нельзя идентифицировать как гомологичные, только сравнивая их аминокислотную последовательность (см. рис. 3.13). Таким образом, возможность надежно предсказывать трехмерную структуру белка на основе его аминокислотной последовательности улучшила бы нашу способность выводить функцию белка из информации о последовательностях в геномных базах данных. В последние годы наблюдается значительный прогресс в предсказании точной структуры белка. Эти предсказания, с одной стороны, основываются на информации о десятках тысяч структур белков, расшифрованных при помощи рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии,

а с другой — на вычислениях, берущих начало в наших знаниях о действующих на атомы физических силах. Однако предсказание структуры больших или мультидоменных белков или структур с высоким разрешением для компьютерного дизайна лекарств до сих пор остается сложной и важной задачей.

Нахождение для нового белка гомологичных последовательностей и структур может помочь раскрыть его функцию, но обычно эти предсказания необходимо проверить прямым экспериментом. Полученная совмещением последовательностей информация, однако, часто может указать направление экспериментов, что делает этот метод одним из наиболее важных в современной клеточной биологии.

Заключение

Большинство белков функционирует совместно с другими белками. Существует множество методов идентификации и изучения белок-белковых взаимодействий. Малые молекулы-ингибиторы позволяют исследовать функции белков, на которые они действуют, в живой клетке. Поскольку белки со сходной структурой часто выполняют сходные функции, биохимическую активность белка можно предсказать путем поиска в базах данных ранее охарактеризованных белков со сходной аминокислотной последовательностью.

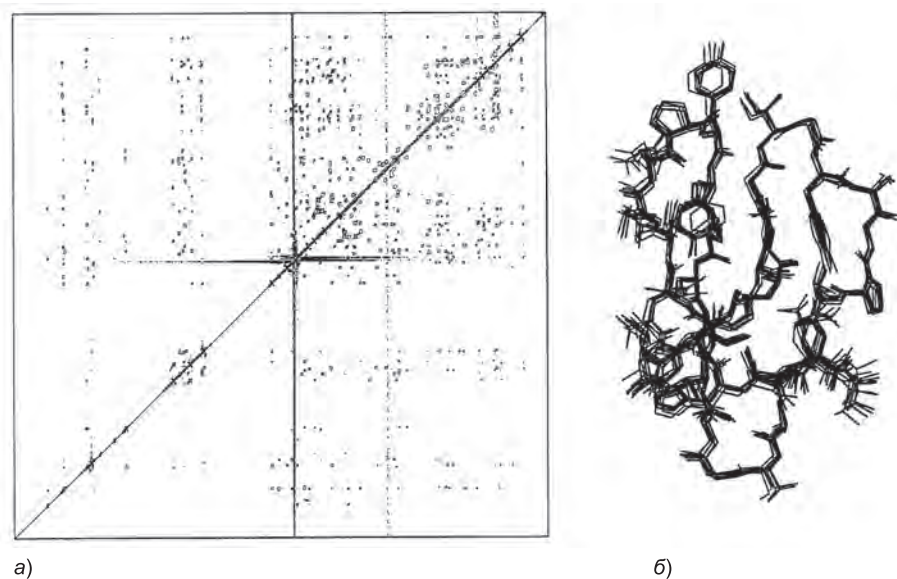


Рис. 8.29. ЯМР-спектроскопия. (а) Пример данных, полученных при помощи установки ЯМР. Данный двумерный спектр ЯМР получен для С-концевого домена фермента целлюлозы. Пятна показывают взаимодействие между ядрами водорода, лежащими в белке вблизи других водородных атомов, и, значит, можно определить расстояния, разделяющие ядра. Сложные вычислительные методы в сочетании с известной аминокислотной последовательностью позволяют получить согласующиеся структуры. (б) Показана суперпозиция десяти структур фермента, равно удовлетворяющих ограничениям на расстояния. Такое представление дает достаточную информацию о возможной трехмерной структуре. (С любезного разрешения Р. Kraulis.)

Таблица 8.2. Основные этапы развития рентгеноструктурного анализа и ЯМР-спектроскопии и их применения к биологическим молекулам

1864	Hoppe-Seyler кристаллизует гемоглобин и дает ему название
1895	Röntgen наблюдает новый вид проникающего излучения при попадании катодных лучей (электронов) на металлическую мишень. Он называет это излучение X-лучами (в русской традиции «рентгеновские лучи»)
1912	von Laue получает первую дифракционную картину при пропускании рентгеновских лучей через кристалл сульфата цинка W. L. Bragg предлагает простое математическое соотношение между дифракционной картиной и расположением атомов в кристалле
1926	Sumner выделяет фермент уреазу из экстракта канавалии мечевидной и показывает, что белок обладает каталитической активностью
1931	Pauling публикует свое первое эссе «Природа химической связи», в котором подробно описывает принципы ковалентного связывания
1934	Bernal и Crowfoot представляют первую подробную рентгеновскую дифракционную картину белка, полученного из кристаллов фермента пепсина
1935	Patterson разрабатывает аналитический метод определения межатомных расстояний из данных рентгеновской кристаллографии
1941	Astbury получает первую рентгенограмму ДНК
1946	Block и Purcell описывают ЯМР
1951	Pauling и Corey предлагают структуры спиральной конформации цепи L-аминокислот — α -спирали — и β -листа. Обе структуры впоследствии обнаружены во многих белках
1953	Watson и Crick на основе рентгенограммы, полученной Franklin и Wilkins , предлагают модель двойной спирали ДНК
1954	Perutz и его коллеги разрабатывают методы тяжелых атомов для решения проблемы фаз в кристаллографии белков
1960	Kendrew подробно описывает структуру белка (миоглобина кашалота) с разрешением 0,2 нм Perutz представляет структуру большого белка гемоглобина с меньшим разрешением
1966	Phillips описывает структуру лизоцима. Это первое подробное описание фермента
1971	Jeener предлагает использовать двумерный ЯМР, Wuthrich и его коллеги впервые используют метод для расшифровки структуры белка в начале 80-х
1976	Kim и Rich и Klug и коллеги последнего подробно описывают трехмерную структуру тРНК, полученную при помощи рентгеноструктурного анализа
1977–1978	Holmes и Klug расшифровывают структуру вируса табачной мозаики (ВТМ), а Harrison и Rossman определяют структуру двух маленьких сферических вирусов
1985	Michel , Deisenhofer и их коллеги при помощи рентгеноструктурного анализа впервые расшифровывают структуру трансмембранного белка (бактериального реакционного центра). Henderson и его коллеги в 1975–1990 гг. получают структуру трансмембранного белка бактериородопсина методами электронной микроскопии высокого разрешения

8.4. Анализ и манипуляция ДНК

Вплоть до 70-х гг. ДНК оставалась наиболее сложной для биохимического анализа молекулой. Очень длинная и химически однородная последовательность нуклеотидов, формирующая генетический материал организма, могла быть иссле-

Очки = 3996 битов (1025), Вероятность = e^{-111}
 Совпадений = 198/290 (68%), Положительные = 241/290 (82%),
 Пропуски = 1/290

```

исслед: 57  MENFNQVEKIGEGTYGVVYKARNKLTGEVVALKKIRLDTTEGVPSTAIREISLLKELNH 116
           ME ++KVEKIGEGTYGVVYKA +K T E +ALKKIRL+ E EGVPSTAIREISLLKE+NH
объект: 1    MEQYEKVEKIGEGTYGVVYKALDKATNETTALKKIRLEQDEGVPSTAIREISLLKEMNH 60

исслед: 117 PNIVKLLDVIHTENKLYLVFEFLHQDLKKFMDASALTGIPLELIKSYLFQLLGGLAFCHS 176
           NIV+L DV+H+E +YLVFE+L DLKKFMD+ LIKSYL+Q+L G+A+CHS
объект: 61  GNIVRLHDVVHSEKRIYLVFEYLDLDLKKFMDSCPEFAKNPTLLIKSYLYQILHGVAYCHS 120

исслед: 177 HRVLHRDLKPQNLLINTEGAIKLADFGLARAFGVPVRTYTHEVVTLWYRAPEILLGCKY 235
           HRVLHRDLKPQNLLI+ A+KLADFGLARAFG+PVRT+THEVVTLWYRAPEILLG+
объект: 121 HRVLHRDLKPQNLLIDRRTNALKLADFGLARAFGIPVRTFTHEVVTLWYRAPEILLGARQ 180

исслед: 236 YSTAVDIWSLGCIFAEMVTRRALFPGDSEIDQLFRIFRTLGTPDEVVWPGVTSMPDYKPS 295
           YST+VD+WS+GCIFAEMV+ + LFPGDSEID+LF+IFR+ LGTP+E WPGV+ +PD+K+ +
объект: 181 YSTPVDVWSVGCIFAEMVNQKPLFPGDSEIDELFKIFRILLGTPNEQSWPGVSCLPDFKTA 240

исслед: 296 FPKWARQDFSKVVPLDEDGRSLLSQMLHYDPNKRISAKAAALAHPFFQDV 345
           FP+W QD+ + VVP LD G LLS+ML Y+P+KRI+A+ AL H +F+D+
объект: 241 FPRWQAQDLATVVPNLDPAGLDLLSKMLRYEPSKRITARQALEHEYFKDL 290

```

Рис. 8.30. Результаты поиска с помощью программы BLAST. В базах данных можно искать сходные аминокислотные или нуклеотидные последовательности. Здесь поиск белков, похожих на человеческий белок-регулятор клеточного цикла Cdc2 (*Query* — *Запрос*), возвращает Cdc2 из кукурузы (*Sbjct* — *Объект*), который по аминокислотной последовательности на 68% идентичен (*Identities* — *Совпадения*) человеческому Cdc2, а на 82% на него похож (*Positives* — *Сходства*). Совмещение начинается с остатка 57 белка *Query*. Это говорит о том, что у человеческого белка есть N-концевой участок, отсутствующий у белка кукурузы. Зеленые блоки показывают различия в последовательностях, а желтые — их совпадение: когда две аминокислотные последовательности идентичны, показывается остаток; консервативные аминокислотные замены обозначают плюсом (+). Введен только один пропуск (*Gap*), он показан красной стрелкой в положении 194 в последовательности *Query*. Это сделано для максимального совмещения. Итог совмещения (*Score*), выражаемый в двух разных единицах измерения, учитывает штрафы за замены и пропуски; чем выше итог совмещения, тем лучше совпадение. Достоверность совпадения отражена в величине *ожидаания* (*Expect*), которая показывает, как часто такое хорошее совмещение может произойти случайно. Чем меньше значение *Expect*, тем достовернее совпадение; здесь *Expect* очень мало (e^{-111}), что говорит о гомологичности белков. Значения *Expect*, превышающие 0,1, показывают, что белки скорее всего не родственны. Например, *Expect* = 0,1 означает, что такое совпадение случайно в 1 из 10 случаев.

дована только косвенно путем секвенирования белков или РНК или с помощью генетического анализа. В настоящее время ситуация полностью изменилась. ДНК перестала быть наиболее сложной для анализа макромолекулой в клетке, наоборот, теперь ее анализировать проще всего. Можно изолировать конкретный участок практически любого генома, получить неограниченное количество его копий и расшифровать его нуклеотидную последовательность всего за несколько часов. На пике проекта «Геном человека» крупные лаборатории круглые сутки со скоростью 1000 нуклеотидов в минуту синтезировали последовательности ДНК на автоматическом оборудовании. Родственные методы позволяют произвольно изменять (конструировать) изолированные гены и переносить их обратно в зародышевые линии животных или растений, где они становятся функционирующей и наследуемой частью генома организма.

Эти технические прорывы в **генной инженерии** — науке, занимающейся высокоточными методами работы с ДНК в пробирке или организме, — повлияли на все аспекты клеточной биологии, невероятно ускорив изучение клеток и их макромолекул. **Методы рекомбинантных ДНК** объединяют несколько методик, часть из которых разработана совсем недавно, а часть позаимствована из других областей, например, генетики микробов (**таблица 8.3**). В основе метода лежат следующие ключевые методы:

1. Расщепление ДНК в специфических сайтах эндонуклеазами рестрикции, значительно ускоряющее изоляцию отдельных генов и работу с ними.

2. Лигирование ДНК, позволяющее проектировать и конструировать молекулы ДНК, не встречающиеся в природе.

3. Клонирование ДНК с использованием либо клонирующих векторов, либо полимеразной цепной реакции, при которой участок ДНК многократно копируется для синтеза миллиардов идентичных молекул.

4. Гибридизация, позволяющая с большой точностью и аккуратностью обнаружить конкретную последовательность ДНК или РНК на основании способности нуклеиновых кислот селективно связываться с комплементарными последовательностями.

5. Быстрая расшифровка любой последовательности ДНК (даже целых геномов), что позволяет идентифицировать гены и определить аминокислотную последовательность кодируемых ими белков.

6. Одновременное наблюдение за уровнем синтезируемой каждым геном в клетке РНК при помощи нуклеотидных микрочипов, в которых одновременно происходят десятки тысяч реакций гибридизации.

В данном разделе мы опишем каждый из этих базовых методов, радикально изменивших область исследования клеточной биологии.

8.4.1. Рестриктазы разрезают большие молекулы ДНК на фрагменты

В отличие от белков, гены в клетке не существуют как отдельные единицы, они представляют собой маленький участок значительно более длинной молекулы ДНК. Несмотря на то что молекулы ДНК в клетке могут быть случайным образом разрушены механической силой, участок, содержащий единственный ген генома млекопитающего, будет лишь одним из сотни тысяч (или даже больше) фрагментов ДНК, в среднем не различающихся по размеру. Как выделить такой ген? Поскольку все молекулы ДНК состоят из примерно одинаковой смеси одних и тех же четырех нуклеотидов, их нельзя быстро очистить, как белки, на основании различных зарядов и способности к связыванию.

Все эти проблемы нашли свое решение с открытием **эндонуклеаз рестрикции (рестриктаз)**. Эти ферменты, выделяемые из бактерий, расщепляют двойную цепочку ДНК в определенных сайтах со специфической нуклеотидной последовательностью. В результате длинная двухцепочечная молекула ДНК оказывается разрезанной на фрагменты определенного размера. Разные рестриктазы специфичны к разным последовательностям нуклеотидов, поэтому найти фермент, способный дать фрагмент ДНК, содержащий нужный ген, относительно просто. Затем на основе размера полученного фрагмента ДНК проводят частичную очистку гена в смеси.

Различные виды бактерий синтезируют различные эндонуклеазы рестрикции, защищающие их от вирусов путем дегградации вирусной ДНК. Каждая бактериальная рестриктаза узнает специфическую последовательность из четырех—восьми

Таблица 8.3. Основные этапы развития метода рекомбинантных ДНК и трансгенных технологий

1869	Miescher впервые выделяет ДНК из белых кровяных телец, полученных из пропитанных гноем бинтов из близлежащей больницы
1944	Avery доказывает, что ДНК, а не белок, является носителем генетической информации во время бактериальной трансформации
1953	Watson и Crick на основе рентгеноструктурных данных Franklin и Wilkins предлагают модель двойной спирали ДНК
1955	Kornberg открывает ДНК-полимеразу, фермент, который в настоящее время используют для создания препаратов меченой ДНК
1961	Marmur и Doty открывают ренатурацию ДНК и показывают специфичность и реализуемость реакций гибридизации нуклеиновых кислот
1962	Arber получает первые доказательства существования эндонуклеаз рестрикции ДНК, что приводит к их выделению и использованию для описания последовательностей ДНК Nathans и H. Smith
1966	Nirenberg , Ochoa и Khorana расшифровывают генетический код
1967	Gellert открывает ДНК-лигазу, фермент, используемый для сшивания фрагментов ДНК друг с другом
1972–1973	Сотрудники лабораторий Boyer , Cohen и Berg , а также их коллеги в Университете Стэнфорда и Университете Калифорнии в Сан-Франциско, разрабатывают методы клонирования ДНК
1975	Southern для обнаружения специфических последовательностей ДНК разрабатывает метод гель-электрофореза и переноса разделенной по длине ДНК на мембранный фильтр для гибридизации
1975–1977	Sanger и Barrel и Maxam и Gilbert разрабатывают методы быстрого секвенирования ДНК
1981–1982	Palmiter и Brinster получают трансгенных мышей; Spradling и Rubin — трансгенных фруктовых мушек
1982	В Национальной лаборатории в Лос-Аламосе создается GenBank — общедоступная база данных генетических последовательностей, поддерживаемая Национальным институтом здоровья США (National Institute of Health, NIH)
1985	Mullis и его сотрудники разрабатывают метод цепной полимеразной реакции (ПЦР)
1987	Capecchi и Smithies представляют метод направленной замены генов в эмбриональных стволовых клетках мышей
1989	Fields и Song разрабатывают метод дрожжевых двугибридных систем для идентификации и исследования белковых взаимодействий
1989	Olson и его коллеги описывают ДНК-маркирующие сайты, уникальные последовательности ДНК, используемые для составления физических карт человеческих хромосом
1990	Lipman и его коллеги выпускают BLAST — алгоритм поиска гомологии среди последовательностей ДНК и белков
1990	Simon и его коллеги изучают, как эффективно использовать бактериальные искусственные хромосомы (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) для переноса больших фрагментов клонированной человеческой ДНК при секвенировании
1991	Hood и Hunkapillar представляют новую автоматизированную технологию секвенирования ДНК
1995	Venter и его коллеги впервые секвенируют целый геном. Это геном бактерии <i>Haemophilus influenzae</i>

1996	Goffeau и международный консорциум ученых объявляют о завершении проекта по расшифровке первого эукариотического генома дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
1996–1997	Lockhart и его коллеги Brown и DeRisi создают ДНК-чипы, позволяющие одновременно наблюдать за тысячами генов
1998	Sulston и Waterston и их коллеги получают первую полную последовательность генома многоклеточного организма, круглого червя <i>Caenorhabditis elegans</i>
2001	Консорциум ученых объявляет о получении предварительной последовательности человеческого генома
2004	Публикация «конечной» последовательности человеческого генома

нуклеотидов. Эти последовательности в местах, где они встречаются в геноме самой бактерии, защищены от рестрикции метилированием нуклеотидов А или С; последовательности в чужеродной ДНК обычно не метилированы и поэтому они расщепляются рестриктазами. Из различных видов бактерий выделено множество эндонуклеаз рестрикции; несколько сотен, большинство из которых распознают различные нуклеотидные последовательности, есть в продаже.

Некоторые эндонуклеазы рестрикции вносят ступенчатые разрывы, в результате чего на концах каждого фрагмента ДНК остаются короткие одноцепочечные «хвостики» (рис. 8.31). Такие концы называются *липкими*, поскольку каждый «хвостик» может комплементарно спариться с «хвостиком» на конце любого другого фрагмента, полученного при помощи той же рестриктазы (рис. 8.32). Полученные при помощи эндонуклеаз рестрикции липкие концы позволяют легко соединять друг с другом любые два фрагмента ДНК, если эти фрагменты получены при помощи одной и той же рестриктазы (или другой рестриктазы, дающей такие же липкие концы). Молекулы ДНК, полученные путем соединения двух или более фрагментов ДНК, носят название **рекомбинантных молекул ДНК**.

8.4.2. Гель-электрофорез позволяет разделить молекулы ДНК различных размеров

Методы гель-электрофореза, подтвердившие свою полезность для анализа белков, точно так же позволяют определить длину и чистоту молекул ДНК. Процесс даже проще, чем в случае белков: поскольку каждый нуклеотид в молекулах нуклеиновых кислот изначально несет один отрицательный заряд (на фосфатной группе), нет необходимости добавлять отрицательно заряженный детергент ДСН, который нужен для того, чтобы молекулы белков двигались в сторону положительного электрода. Для фрагментов ДНК длиной менее 500 нуклеотидов, разработаны специальные полиакриламидные гели, позволяющие разделять молекулы, отличающиеся по длине всего на один нуклеотид (рис. 8.33, а). Однако поры в полиакриламидных гелях слишком малы для того, чтобы пропускать очень большие молекулы ДНК; для разделения крупных молекул из разбавленных растворов агарозы (полисахарида, выделяемого из морских водорослей) делают более пористые гели (рис. 8.33, б). Эти методы разделения ДНК широко используют как для аналитических, так и препаративных целей.

Одна из разновидностей электрофореза в агарозном геле — *гель-электрофорез в градиенте пульсирующего поля*, позволяющий разделять даже очень длинные молекулы ДНК. Обычный гель-электрофорез не способен идентифицировать такие

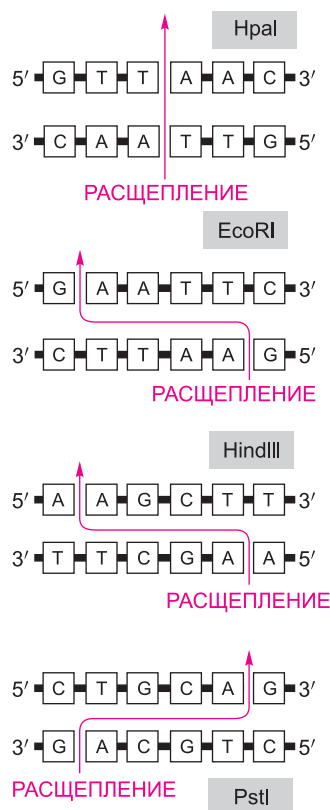


Рис. 8.31. Нуклеотидные последовательности ДНК, распознаваемые четырьмя широко применяемыми эндонуклеазами рестрикции.

На рисунке видно, что такие последовательности часто содержат шесть пар нуклеотидов и являются палиндромами (то есть нуклеотидная последовательность остается такой же при повороте спирали на 180 градусов вокруг центра распознаваемого ферментом короткого участка молекулы). Ферменты расщепляют обе цепочки ДНК вблизи распознаваемой последовательности или в ее центре. Некоторые эндонуклеазы рестрикции, например HpaI, оставляют после расщепления тупые концы; другие же, например EcoRI, HindIII и PstI, вносят ступенчатые разрывы, приводящие к образованию липких концов. Эндонуклеазы рестрикции получают из различных видов бактерий: HpaI из *Haemophilus parainfluenzae*, EcoRI из *Escherichia coli*, HindIII из *Haemophilus influenzae*, а PstI из *Providencia stuartii*.

молекулы, потому что постоянное электрическое поле заставляет их вытягиваться таким образом, что они движутся через гель концом вперед в змеевидных конфигурациях со скоростью, не зависящей от их длины. При гель-электрофорезе в градиенте пульсирующего поля направление электрического поля периодически меняется, что заставляет молекулы переориентироваться, прежде чем они продолжают свое змеевидное движение через гель. Такая переориентация длится гораздо дольше в случае крупных молекул, поэтому длинные молекулы движутся медленнее, чем короткие. В результате даже целые бактериальные или дрожжевые хромосомы в геле с градиентом пульсирующего поля

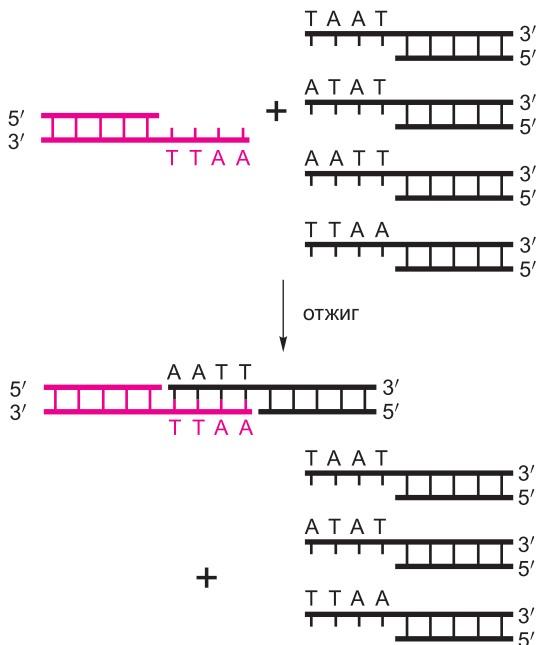
разделяются на отдельные полосы, и становятся возможными их классификация и идентификация на основе размера (рис. 8.33, в). Несмотря на то что типичная хромосома млекопитающих, состоящая из 10^8 п. н., слишком велика для очистки этим методом, большие участки этих хромосом легко разделяют и идентифицируют, если предварительно хромосомную ДНК обработать рестриктазами, расщепляющими ДНК по редко встречающимся сайтам (единожды на каждые 10 тыс. или более нуклеотидных пар).

Полосы ДНК в агарозном или полиакриламидном геле невидимы, если ДНК не была окрашена или помечена. Один из наиболее чувствительных методов окрашивания ДНК — обработка ее красителем бромидом этидия, который при связывании с ДНК флуоресцирует в ультрафиолете (см. рис. 8.33, б, в). В еще более чувствительном методе детекции до электрофореза в молекулу ДНК включают радиоизотоп; часто используют ^{32}P , поскольку его можно включить в фосфатные группы ДНК, и он испускает высокоэнергетическую β -частицу, которую легко зарегистрировать радиоавтографией, как на рис. 8.33 (описание радиоизотопов см. на **стр. 601**).

8.4.3. Очищенные молекулы ДНК можно специфически метить при помощи радиоизотопов или химических маркеров *in vitro*

Для мечения изолированных молекул ДНК широко используют два метода. В первом ДНК-полимераза копирует ДНК в присутствии радиоактивных (обычно

Рис. 8.32. Применение эндонуклеаз рестрикции для получения легко соединяемых друг с другом фрагментов ДНК. Фрагменты с одинаковыми липкими концами можно легко соединить за счет комплементарного спаривания нуклеотидов на их липких концах. В данном примере два сшивающихся друг с другом фрагмента ДНК получены при помощи рестриктазы *EcoRI*, тогда как три других фрагмента — при помощи других рестриктаз, дающих другие липкие концы (см. рис. 8.32). Фрагменты с тупыми концами, получающиеся, например, при использовании *HpaI* (см. рис. 8.31), сшить друг с другом сложнее.



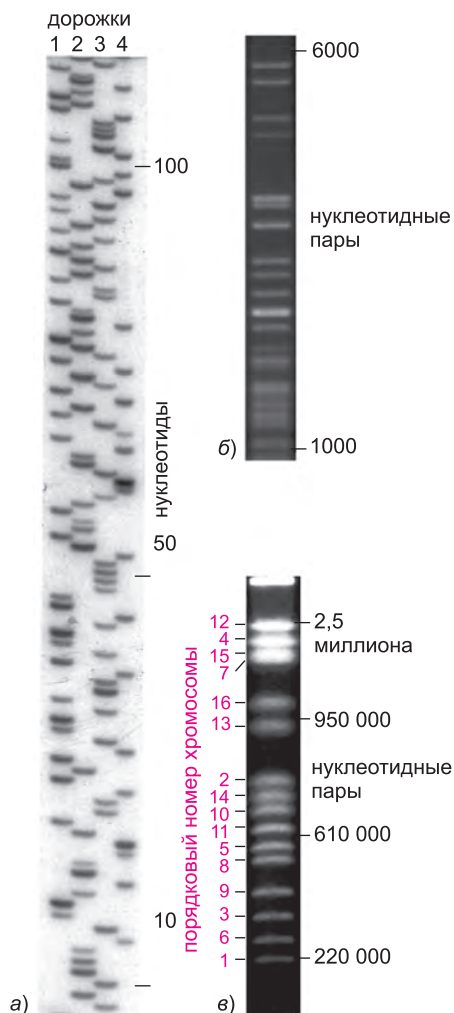
меченных фосфором ^{32}P) или химически маркированных нуклеотидов (рис. 8.34, а). Это позволяет получать для реакций гибридизации нуклеиновых кислот (описанных ниже) «зонды ДНК», содержащие множество меченых нуклеотидов. Во втором фермент бактериофагов полинуклеотидкиназа переносит единственный меченный ^{32}P фосфат с АТФ на 5'-конец каждой цепочки ДНК (рис. 8.34, б). Поскольку киназа вставляет в каждую цепь ДНК только один атом ^{32}P , меченные таким образом молекулы ДНК часто недостаточно радиоактивны, чтобы их можно было использовать в качестве зондов. Однако, поскольку они мечены только с одного конца, их можно использовать в других методах, включая футпринтинг ДНК, описанный в главе 7.

Методы радиоактивного мечения постепенно замещают мечением молекулами, которые можно обнаружить химически или с помощью флуоресценции. Для получения таких нерадиоактивных молекул ДНК, используют специально модифицированные предшественники нуклеотидов (рис. 8.34, в). Синтезированная таким образом молекула ДНК может связываться с комплементарной последовательностью ДНК путем гибридизации, как описано в следующем разделе. Затем ее детектируют при помощи антитела (или другого лиганда), специфически распознающего ее модифицированную боковую цепь (рис. 8.35).

8.4.4. Реакции гибридизации нуклеиновых кислот — чувствительный способ обнаружения специфических последовательностей нуклеотидов

Когда водный раствор ДНК нагревают до 100°C или подвергают действию очень высокого pH ($\text{pH} \geq 13$), комплементарные п. н., которые в нормальных условиях держат вместе цепи двойной спирали ДНК, разрушаются, и двойная спираль быстро диссоциирует на две одиночные цепочки. Этот процесс, носящий название *денатурации ДНК*, много лет считали необратимым. Однако в 1961 г. обнаружили, что комплементарные одиночные цепи ДНК легко восстанавливают двойные спирали в результате процесса, называющегося *гибридизацией* (или *ренатурацией ДНК*), если их держать продолжительное время при температуре 65°C . Сходные

Рис. 8.33. Методы гель-электрофореза для разделения молекул ДНК по размеру. В трех приведенных примерах электрофорез проходит сверху вниз, поэтому самые крупные молекулы ДНК (и поэтому самые медленные) располагаются вверху геля. (а) Для разделения одноцепочечной ДНК использовали полиакриламидный гель с маленькими порами. Молекулы ДНК, состоящие из 10–500 нуклеотидов, можно разделить по размеру с точностью до одного нуклеотида. В данном примере четыре полосы представляют собой наборы молекул ДНК, синтезированных во время ее секвенирования. Секвенируемую ДНК искусственно реплицировали с фиксированного сайта до различных конечных точек, что дало набор частично совпадающих молекул разной длины. (На рис. 8.50 показан синтез таких частичных реплик.) На дорожках 1–4 — все частичные реплики, оканчивающиеся на Г, А, Т и С соответственно. Поскольку в этих реакциях использовали радиоактивно меченые молекулы ДНК, их положение можно определить при помощи радиоавтографии. (б) Для разделения двухцепочечных молекул ДНК использовали агарозный гель с порами среднего размера. Эти молекулы ДНК представляют собой фрагменты, полученные путем расщепления вирусного генома рестриктазами. Полосы зарегистрированы благодаря флуоресценции красителя бромида этидия. (в) Для разделения шестнадцати дрожжевых хромосом, длина которых колеблется в пределах от 220 тыс. до 2,5 млн. п. н., использовали метод гель-электрофореза в градиенте пульсирующего поля. ДНК окрашена, как на (б). Этот метод позволяет разделить молекулы ДНК длиной до 10^7 п. н. (С любезного разрешения Leander Lauffer и Peter Walter (а); Ken Kreuzer (б); D. Vollrath and R. W. Davis, *Nucleic Acids Res.* 15: 7865–7876, 1987. С любезного разрешения Oxford University Press (в).)



реакции гибридизации могут протекать между любыми двумя одноцепочечными нуклеиновыми кислотами (ДНК/ДНК, РНК/РНК или РНК/ДНК) при условии, что они обладают комплементарными последовательностями нуклеотидов. Такие специфичные реакции гибридизации широко применяются для обнаружения и характеристики определенных нуклеотидных последовательностей ДНК и РНК.

Одноцепочечные молекулы ДНК, используемые для обнаружения комплементарных последовательностей, называются **зондами**; длина этих молекул, несущих радиоактивные или химические метки для упрощения их обнаружения, колеблется в пределах от пятнадцати до нескольких тысяч нуклеотидов. Реакции гибридизации с использованием ДНК-зондов настолько чувствительны и селективны, что они позволяют обнаружить комплементарные последовательности, концентрация которых не превышает одной молекулы на клетку. Таким образом, можно определить, сколько копий любой последовательности ДНК содержится в данном образце ДНК. Подобный метод можно использовать для поиска родственных, но не идентичных генов. Например, чтобы найти интересующий ген в организме, чей геном

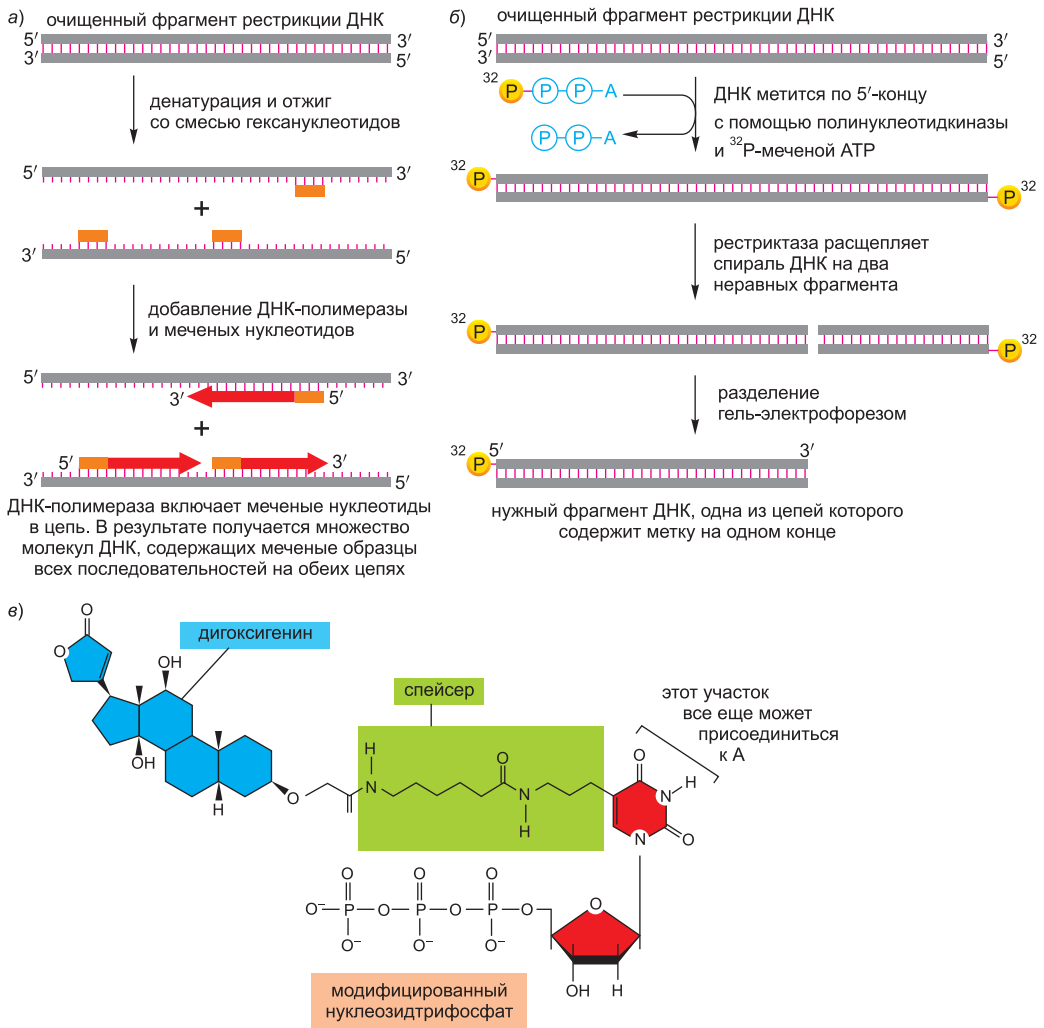
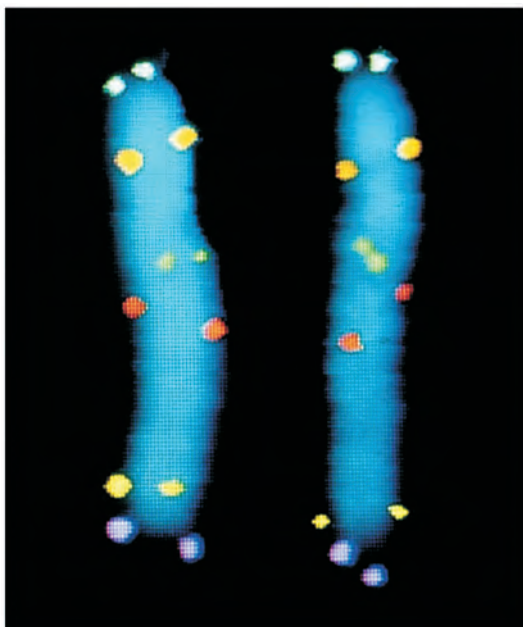


Рис. 8.34. Методы мечения молекул ДНК *in vitro*. (а) Очищенный фермент ДНК-полимераза метит все нуклеотиды в молекуле ДНК, таким образом синтезируя высокорadioактивные ДНК-зонды. (б) Полинуклеотидкиназа метит только 5'-концы цепей ДНК; поэтому, когда за мечением следует расщепление эндонуклеазами рестрикции, можно быстро выделить единственную меченую по 5'-концу цепь. (в) Метод на (а) также используют для синтеза нерадиоактивных молекул ДНК, несущих специфический химический маркер, который можно обнаружить при помощи соответствующего антитела. Показанный на рисунке модифицированный нуклеотид в ДНК может быть введен ДНК-полимеразой, что позволяет молекуле ДНК служить легко обнаруживаемым зондом. Показанное на рисунке основание на нуклеозидтрифосфате является аналогом тимина, в котором метильная группа на Т заменена спейсерной группой, связанной с растительным стероидным гормоном дигоксигенином. Чтобы визуализировать зонд используют антитело к дигоксигенину, связанное с видимым маркером, например флуоресцентным красителем. К нуклеотидам с тем же результатом можно присоединить и другие химические метки, например, биотин.

не был еще секвенирован, в качестве зонда можно использовать часть известного гена (рис. 8.36).

Рис. 8.35. Гибридизация *in situ* для определения местоположения определенных генов в хромосомах. Здесь для маркирования мест расположения соответствующих нуклеотидных последовательностей на хромосоме 5 человека в метафазе использовали шесть различных ДНК-зондов. Зонды метили химическим путем и обнаруживали при помощи флуоресцирующих антител. Показаны обе копии хромосомы 5, расположенные рядом. Каждый зонд дает две точки на каждой хромосоме, так как метафазная хромосома реплицировала свою ДНК и содержит две идентичные спирали ДНК. (С любезного разрешения David C. Ward.)



С другой стороны, ДНК-зонды можно использовать в реакциях гибридизации с РНК, а не ДНК. Это позволяет определить, экспрессирует ли клетка конкретный ген. В этом случае зонд, содержащий участок последовательности гена, гибридизуют с РНК, выделенной из интересующей клетки, и смотрят, содержатся ли в РНК нуклеотидные последовательности, совпадающие с ДНК-зондом, и если да, то в каких количествах. В более трудоемких методах после окончания гибридизации ДНК-зонд подвергают действию специфических нуклеаз для точного нахождения участков зонда, связавшихся с молекулами РНК. Таким образом, можно определить сайты начала и окончания транскрипции РНК, а также точные границы интронных и экзонных последовательностей в гене (рис. 8.37).

Сегодня расположение границ интронов/экзонов обычно определяют при помощи секвенирования *комплементарных последовательностей ДНК (кДНК)*, которые отражают состав экспрессируемых в клетке мРНК, и сравнения их с нуклеотидной последовательностью генома. Мы ниже опишем, как из мРНК получают кДНК.

Гибридизация ДНК-зондов с РНК позволяет определить транскрибируется ли определенный ген. Более того, когда экспрессия гена изменяется, можно определить, вызвано ли изменение транскрипционной или посттранскрипционной регуляцией (см. рис. 7.92). Анализ экспрессии генов сначала проводили с одним ДНК-зондом. *ДНК-чипы* в настоящее время позволяют одновременно следить за сотнями и тысячами генов (рассмотрим этот метод позже). Сегодня методы гибридизации настолько широко применяют в клеточной биологии, что уже трудно представить, как мы могли бы исследовать структуру и экспрессию генов без них.

8.4.5. Нозерн-блоттинг и Саузерн-блоттинг ускоряют гибридизацию с разделенными электрофорезом молекулами нуклеиновых кислот

В сложной смеси нуклеиновых кислот ДНК-зонды часто используют для обнаружения только тех молекул, чьи последовательности частично или полностью комплементарны зонду. Перед началом реакции гибридизации при помощи гель-электрофореза можно разделить по размеру все различные молекулы РНК или

ДНК в необработанной смеси. Если зонд связывается с молекулами только одного или нескольких размеров, можно быть уверенным, что гибридизация специфична. Более того, информация о размерах молекул сама по себе может оказаться нецелесообразной. Приведенный ниже пример иллюстрирует это утверждение.

Предположим, что необходимо определить природу дефекта в мутантной мышце, который приводит к патологически низкому уровню белка альбумина, который обычно в больших количествах секретируется в кровь клетками печени. Сначала необходимо получить идентичные препараты ткани печени мутантных и нормальных мышечей (последние служат в качестве контроля) и разрушить клетки сильным детергентом для инактивации нуклеаз, которые в противном случае могут расщепить нуклеиновые кислоты. Затем нужно отделить РНК и ДНК от других компонентов клеточного гомогената: все белки полностью денатурируют и удаляют многократным осаждением с фенолом — сильным органическим растворителем, частично смешивающимся с водой; оставшиеся в водной фазе нуклеиновые кислоты

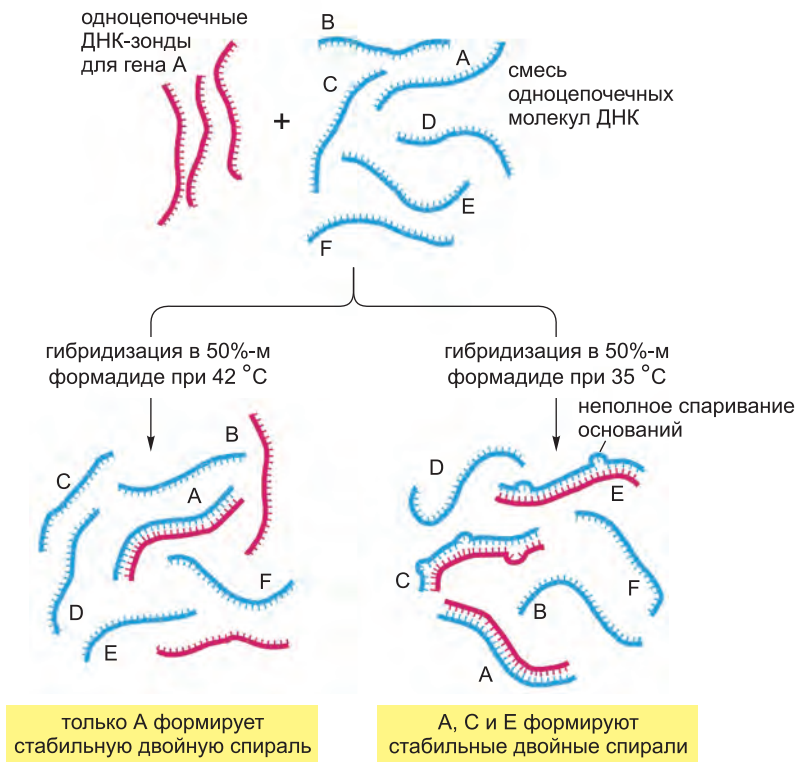


Рис. 8.36. Жесткие и мягкие условия гибридизации. Для нахождения с помощью ДНК-зонда точного совпадения используют жесткие условия гибридизации. Температуру поддерживают таким образом, чтобы она была на несколько градусов меньше, чем температура, при которой идеальная спираль ДНК денатурирует в данном растворителе (*температура плавления*). В результате все образующиеся неидеальные двойные спирали нестабильны. Менее жесткие условия используют, когда ДНК-зонды применяют для обнаружения как близких, так и идентичных последовательностей. Гибридизацию проводят при более низкой температуре, что позволяет образовываться и неидеальным двойным спиральям. Только в условиях пониженной температуры гибридизацию можно применять для поиска неидентичных, но сходных с геном А генов (С и Е в данном примере).

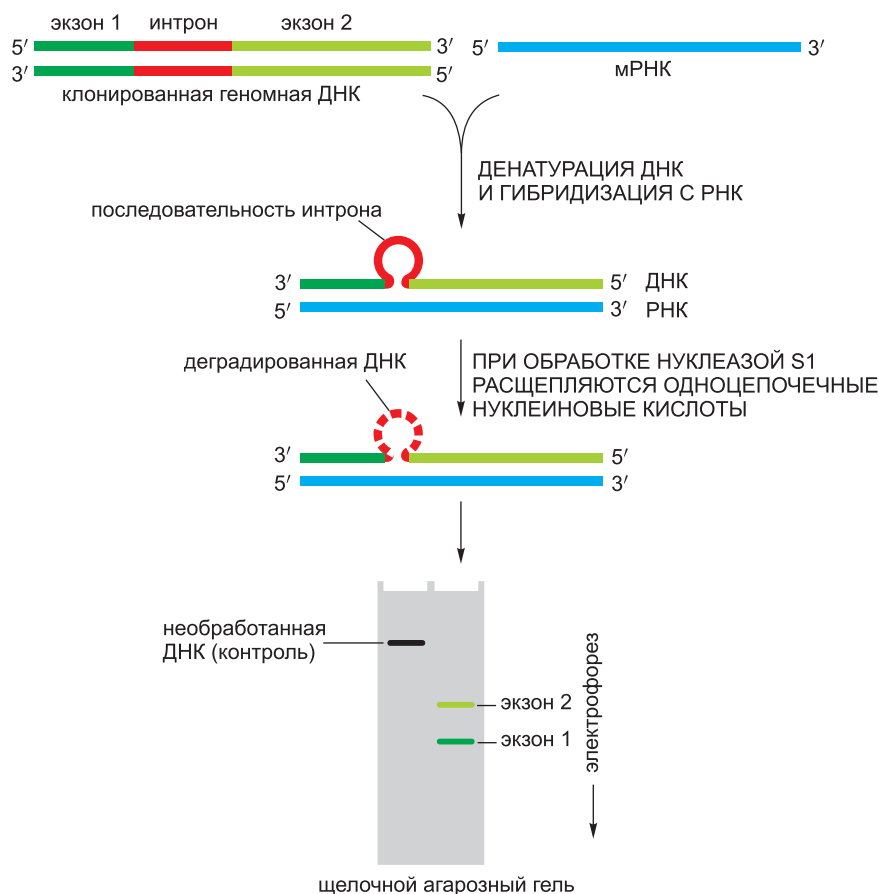


Рис. 8.37. Применение гибридизации нуклеиновых кислот для определения участка фрагмента клонированной ДНК, содержащегося в молекуле мРНК. Метод требует использования нуклеазы, которая разрезает цепочку ДНК только там, где она не спарена с комплементарной цепью РНК. С его помощью определяют расположение интронов в эукариотических клетках. При таком анализе ДНК подвергают электрофорезу через денатурирующий агарозный гель, который заставляет ДНК двигаться в форме одноцепочечных молекул. Расположение каждого конца молекулы РНК можно определить родственными методами.

осаждают спиртом, чтобы отделить их от различных малых молекул клетки. Затем ДНК отделяют от РНК за счет их различной растворимости в спиртах, а все нежелательные загрязняющие нуклеиновые кислоты разрушают путем обработки высокоспецифичными ферментами — РНКазами (рибонуклеазами) или ДНКазами (дезоксирибонуклеазами). мРНК обычно отделяют от РНК других типов молекул РНК на хроматографической колонке, специфически связывающей поли(А) «хвосты» мРНК.

Для анализа кодирующих альбумин мРНК используют метод, носящий название **нозерн-блоттинга** (Northern Blotting). Сначала интактные молекулы мРНК, выделенные из мутантных и контрольных клеток печени, фракционируют на отдельные полосы гель-электрофорезом в соответствии с их размером. Затем, чтобы молекулы РНК стали доступными для ДНК-зондов, создают реплику профиля полос

РНК на геле путем переноса («блоттинга») разделенных молекул РНК на нитроцеллюлозный фильтр или полиамидную бумагу. Фильтр затем инкубируют в растворе, содержащем меченые ДНК-зонды, последовательности которых частично соответствуют цепи, кодирующей мРНК альбумина. Молекулы мРНК, которые будут гибридизироваться с меченым ДНК-зондом на фильтре (так как они комплементарны части нормальной последовательности гена альбумина), затем локализуют путем обнаружения связанного зонда радиоавтографией или химическими способами (рис. 8.38). Размеры вступивших в реакцию гибридизации молекул РНК можно определить путем сравнения со стандартами известного размера при совместном электрофорезе в экспериментальной пробе. Так можно обнаружить, что клетки печени мутантных мышей синтезируют нормального размера мРНК альбумина в нормальном количестве; или что они синтезируют молекулы мРНК нормального размера, но в сильно меньшем количестве. Возможно также, что мутантные мРНК альбумина патологически короткие. В этом случае фильтр для блоттинга можно заново проанализировать с более короткими ДНК-зондами, каждый из которых несет последовательность только части гена, и посмотреть, какая часть нормальной мРНК отсутствует.

Первый метод гель-электрофореза с переносом на мембранный фильтр для гибридизации — **Саузерн-блоттинг** — направлен на анализ ДНК, а не РНК. (Метод назван по фамилии изобретателя — Саузерна (Southern), а нозерн- и вестерн-блоттинг получили свои названия по аналогии: southern по-английски означает южный, northern (нозерн) — северный, а western (вестерн) — западный. Поскольку Саузерн-блоттинг назван в честь ученого, термин пишется с большой буквы, тогда как остальные виды блоттинга — с маленькой.) В методе Саузерн-блоттинга изолированные молекулы ДНК сначала расщепляют эндонуклеазами рестрикции на легко разделяемые фрагменты. Двухцепочечные фрагменты затем фракционируют гель-электрофорезом и проводят блоттинг и гибридизацию с ДНК-зондами (см. рис. 8.38). Чтобы охарактеризовать структуру гена альбумина мутантной мыши, нужно использовать специфичный к альбумину ДНК-зонд и составить подробную карту рестрикции генома в области гена альбумина (она состоит из последовательностей фрагментов ДНК, получающихся при обработке различными рестриктазами). Карта позволяет определить, произошли ли изменения в гене альбумина в мутантных животных, например, могла произойти делеция или вставка короткой последовательности ДНК. Однако большинство однонуклеотидных изменений этим методом обнаружить невозможно.

В методе Саузерн-блоттинга цепи двухцепочечных молекул ДНК на фильтре должны быть разделены до начала процесса гибридизации; для этого ДНК после электрофореза подвергают воздействию щелочи, что ведет к ее денатурации (не показано).

8.4.6. Гены можно клонировать при помощи библиотек ДНК

Любой фрагмент ДНК можно клонировать. В молекулярной биологии термин «**клонирование ДНК**» используют в двух смыслах. Во-первых, в прямом, то есть в отношении процесса создания множества идентичных копий молекулы ДНК — амплификации определенной последовательности ДНК. Во-вторых, термин также описывает выделение конкретного участка ДНК (обычно гена) из всего объема клеточной ДНК, потому что данный процесс значительно ускоряется путем создания множества одинаковых копий интересующей ДНК. Как показано ранее в данной

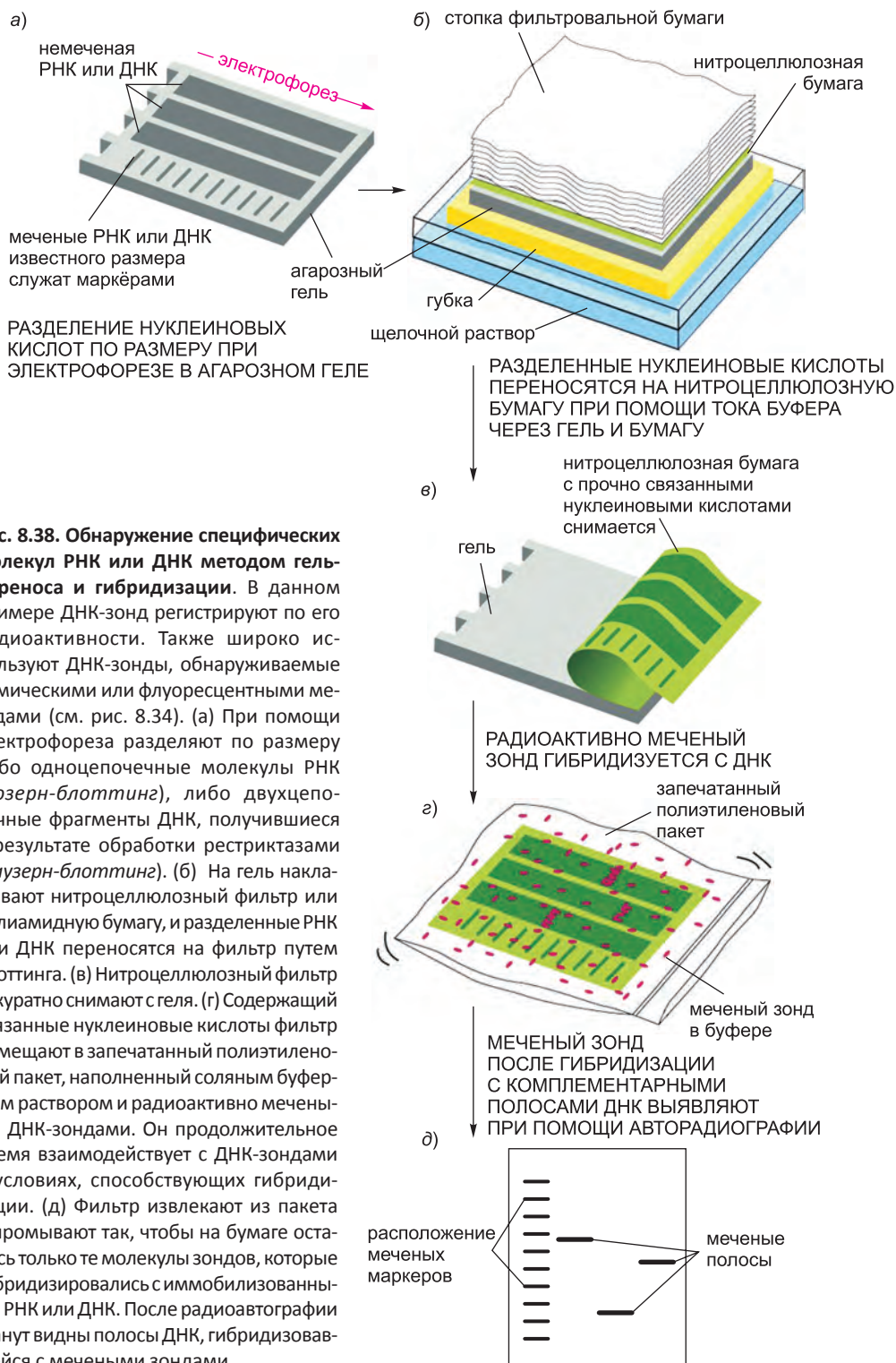


Рис. 8.38. Обнаружение специфических молекул РНК или ДНК методом гелепереноса и гибридизации. В данном примере ДНК-зонд регистрируют по его радиоактивности. Также широко используют ДНК-зонды, обнаруживаемые химическими или флуоресцентными методами (см. рис. 8.34). (а) При помощи электрофореза разделяют по размеру либо одноцепочечные молекулы РНК (нозерн-блоттинг), либо двухцепочечные фрагменты ДНК, получившиеся в результате обработки рестриктазами (Саузерн-блоттинг). (б) На гель накладывают нитроцеллюлозный фильтр или полиамидную бумагу, и разделенные РНК или ДНК переносятся на фильтр путем блоттинга. (в) Нитроцеллюлозный фильтр аккуратно снимают с геля. (г) Содержащий связанные нуклеиновые кислоты фильтр помещают в запечатанный полиэтиленовый пакет, наполненный соляным буферным раствором и радиоактивно мечеными ДНК-зондами. Он продолжительное время взаимодействует с ДНК-зондами в условиях, способствующих гибридизации. (д) Фильтр извлекают из пакета и промывают так, чтобы на бумаге остались только те молекулы зондов, которые гибридизировались с иммобилизованными РНК или ДНК. После радиоавтографии станут видны полосы ДНК, гибридизовавшейся с мечеными зондами.

главе, термин «клонирование», особенно в контексте биологии развития, также может относиться к выращиванию из одной клетки большого числа генетически идентичных клеток или даже созданию генетически идентичных организмов. В любом случае, клонирование — это процесс создания множества генетически одинаковых копий; в данном разделе мы будем использовать термин «клонирование» (или «клонирование ДНК», или «клонирование гена») по отношению к методам, направленным на синтез большого числа идентичных копий участка нуклеиновой кислоты.

Клонирование ДНК в самом общем смысле может быть произведено несколькими способами. Наиболее простой — введение определенного фрагмента ДНК в очищенный геном самореплицирующегося генетического элемента — обычно вируса или плазмиды. Например, фрагмент ДНК, содержащий человеческий ген, может в пробирке быть сшит с хромосомой вируса бактерий. Новую рекомбинантную молекулу ДНК затем можно ввести в бактериальную клетку, где вставленный фрагмент ДНК будет реплицироваться наравне с ДНК вируса. Всего одна такая рекомбинантная молекула ДНК, инфицировавшая единственную клетку, способна, благодаря репликационным механизмам вирусов, дать 10^{12} идентичных молекул вирусной ДНК меньше чем за день. Таким образом, точно во столько же раз увеличится содержание введенного фрагмента человеческой ДНК. Вирусы или плазмиды, применяемые в этом методе, называют *векторами клонирования*, и говорят, что размноженная путем вставки ДНК *клонирована*.

Для изоляции конкретного гена часто начинают с создания *библиотеки ДНК* — исчерпывающего набора клонированных фрагментов ДНК клетки, ткани или организма. Эта библиотека включает в себя (мы надеемся) по крайней мере один участок интересующего гена. Библиотеки можно создать при помощи вирусного или плазмидного векторов, и обычно их поддерживают в популяции бактериальных клеток. Принципы, лежащие в основе методов клонирования генов, одинаковы для обоих типов векторов клонирования, хотя детали могут изменяться. В настоящее время для клонирования чаще используют плазмидные векторы.

Наиболее широко используемые для клонирования генов **плазмидные векторы** — маленькие кольцевые молекулы двухцепочечной ДНК, выделенные из более крупных плазмид, встречающихся в бактериальных клетках в природе. Они обычно содержат лишь малую долю всей ДНК бактериальной клетки-хозяина, но их легко отделить от хромосомной ДНК благодаря небольшому размеру, так как крупные молекулы при центрифугировании осаждаются в виде гранул. Перед использованием в качестве векторов клонирования очищенные кольцевые плазмиды расщепляют рестриктазой для получения линейных молекул ДНК. Геномную ДНК, необходимую для создания библиотеки, расщепляют той же рестриктазой, и полученные фрагменты рестрикции (включая содержащие ген, который нужно клонировать) добавляют к расщепленным плазмидам. Благодаря наличию липких концов в результате отжига образуются рекомбинантные кольцевые молекулы ДНК, содержащие чужеродную по отношению к исходной плазмиде ДНК. Лигаза ковалентно сшивает участки ДНК (**рис. 8.39**).

Следующий шаг создания библиотеки — введение рекомбинантных кольцевых ДНК в бактериальные клетки, которые делают временно проницаемыми для ДНК. Это процесс называется *трансфекцией*. По мере того как клетки растут и делятся, увеличивая свою численность вдвое каждые 30 минут, рекомбинантные плазмиды также реплицируются. В результате получают огромное число копий кольцевых ДНК, содержащих чужеродные гены (**рис. 8.40**). Многие бактериальные плазмиды

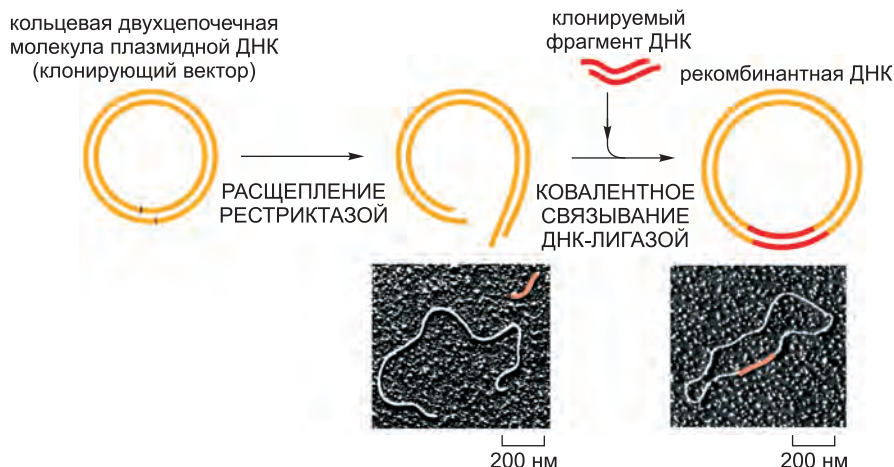


Рис. 8.39. Вставка фрагмента ДНК в бактериальную плазмиду при помощи фермента ДНК-лигазы. Плазмиду расщепляют эндонуклеазой рестрикции (в данном случае с образованием липких концов) и смешивают с фрагментом ДНК, который нужно клонировать (и приготовленным при помощи той же рестриктазы). Добавляют ДНК-лигазу и АТР. Нуклеотиды на липких концах образуют комплементарные пары, и ДНК-лигаза сшивает одноцепочечные разрывы в ДНК. В результате получается рекомбинантная молекула ДНК. (Микрофотографии получены Huntington Potter и David Dressler.)

несут гены устойчивости к антибиотикам (см. главу 24). Это свойство можно использовать для нахождения клеток, трансфекция которых прошла успешно; если бактерии выращивать в присутствии антибиотика, выживут только те клетки, которые содержат плазмиды. Каждая исходная бактериальная клетка, в которую ввели плазмиду, содержит, в общем случае, различный фрагмент чужеродной ДНК. Этот фрагмент наследуется всеми потомками этой бактерии, которые в чашке Петри формируют маленькие колонии.

Много лет плазмиды использовали для клонирования участков ДНК длиной от 1000 до 30 000 п.н. С более крупными фрагментами ДНК было сложнее работать, и их клонировали с трудом. Затем ученые начали использовать *искус-*



Рис. 8.40. Амплификация фрагментов ДНК, вставленных в плазмиду. Для получения большого количества интересующей ДНК рекомбинантную плазмидную ДНК (см. рис. 8.39) посредством трансфекции вводят в бактерию, где она будет по мере размножения бактерий реплицироваться миллионы раз.

ственные хромосомы дрожжей (Yeast Artificial Chromosome, YAC), которые способны включать в себя очень крупные куски ДНК (рис. 8.41). В настоящее время для клонирования фрагментов ДНК длиной от 300 тыс. до 1 млн п. н. используют новый плазмидный вектор, основанный на встречающейся в *E. coli* в естественных условиях F-плазмиде. В отличие от меньших по размеру бактериальных плазмид, F-плазмиды и ее производная — **бактериальная искусственная хромосома** (Bacterial Artificial Chromosome, BAC) — в клетке *E. coli* присутствуют только в одной или двух копиях. Возможно, тот факт, что BAC содержится в бактериальных клетках в таком малом количестве, является причиной ее способности стабильно

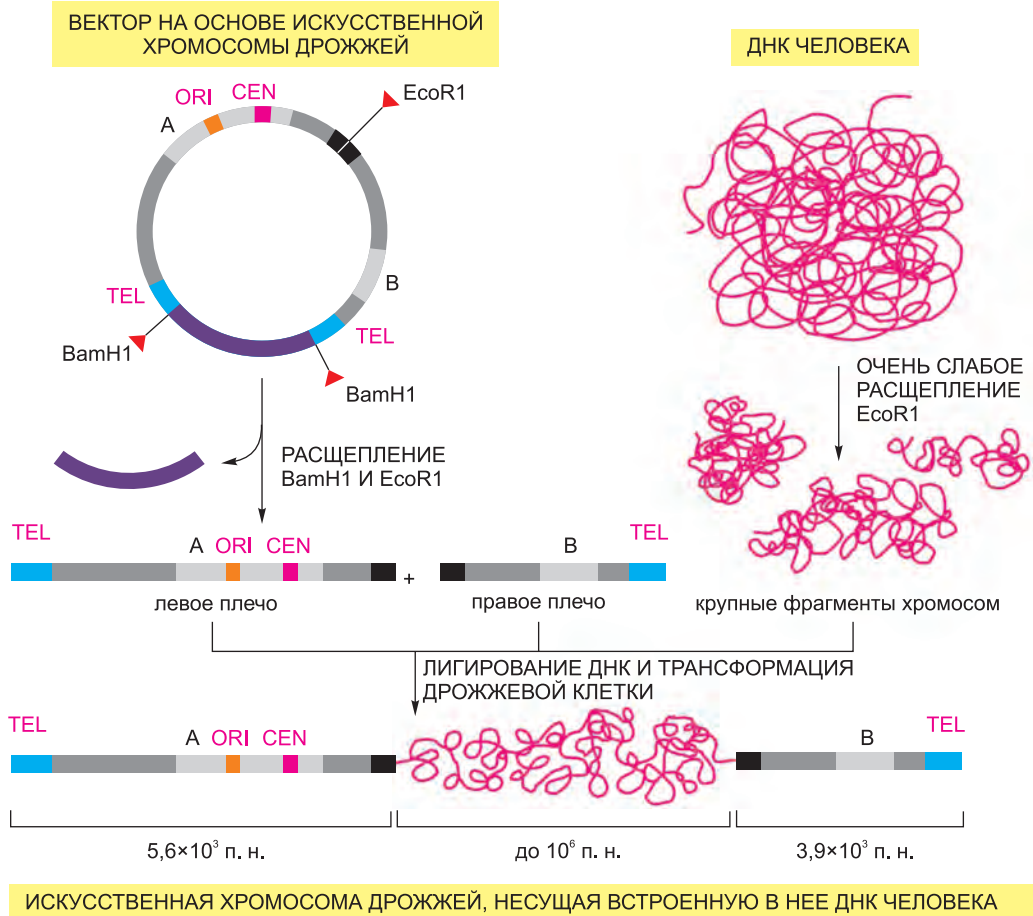


Рис. 8.41. Создание искусственной хромосомы дрожжей (YAC). Вектор YAC позволяет клонировать очень большие молекулы ДНК. TEL, CEN и ORI — это последовательности теломеры, центромеры и точки начала репликации соответственно дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*; все эти участки необходимы для размножения YAC. BamHI и EcoRI — это сайты, по которым соответствующие рестриктазы расщепляют двойную спираль ДНК. Последовательности, обозначенные A и B, кодируют ферменты, служащие селективными маркерами для упрощения идентификации дрожжевых клеток, содержащих искусственную хромосому. Поскольку бактерии делятся быстрее, чем дрожжи, в настоящее время в большинстве широкомасштабных проектов по клонированию для амплификации ДНК используют *E. coli*. (Адаптировано из D. T. Burke, G. F. Carle and M. V. Olson, *Science* 236: 806–812, 1987. С любезного разрешения издательства AAAS.)

поддерживать крупные клонированные последовательности ДНК: при наличии всего нескольких ВАС вероятность нарушения клонированных фрагментов ДНК при рекомбинации с другими копиями плазмиды очень мала. Благодаря их стабильности, способности принимать большие участки ДНК и простоте в обращении бактериальные искусственные хромосомы стали предпочтительными векторами для создания библиотек ДНК сложных организмов, включая геномные библиотеки человека и мыши.

8.4.7. Два типа библиотек ДНК служат различным целям

Расщепление целого генома клетки специфической рестриктазой и клонирование каждого фрагмента, как описано выше, приводит к образованию очень большого числа фрагментов ДНК — порядка миллиона в случае генома млекопитающих. Фрагменты распределены среди миллионов различных колоний бактериальных клеток, претерпевших трансфекцию. В ВАС, в отличие от типичных плазмид, можно вставлять большие фрагменты, поэтому для охвата всего генома требуется меньше бактериальных клеток. В любом случае, каждая колония состоит из клона

клеток, произошедших из единственной клетки-предшественника, и поэтому каждая колония содержит множество копий определенного участка фрагментированного генома (рис. 8.42). Такая плазмида содержит **клон геномной ДНК**, а полный набор плазмид называется **библиотекой геномной ДНК**. Но поскольку геномная ДНК разрезается на фрагменты случайным образом, только некоторые фрагменты содержат гены. Многие клоны геномной ДНК, полученные из ДНК высших эукариотических клеток, содержат только некодирующую ДНК, которая, как показано в главе 4, составляет большую часть таких геномов.

Альтернативный подход состоит в выборе перед началом процесса клонирования только тех последовательностей, которые транскрибируются в мРНК и, таким образом, соответствуют генам, кодирующим белки. С этой целью из клеток выделяют мРНК и затем синтезируют

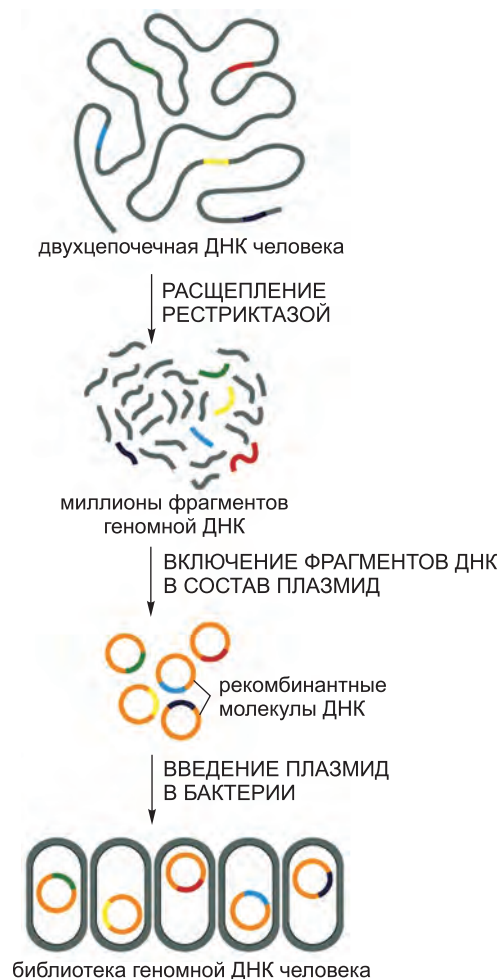


Рис. 8.42. Создание библиотеки человеческой геномной ДНК. Геномные библиотеки обычно поддерживают в популяции бактерий. Каждая бактерия несет какой-то один фрагмент человеческой ДНК. Для простоты показано клонирование только нескольких показательных (изображены цветом) фрагментов. В реальности будут клонированы и все серые участки ДНК.

копию ДНК каждой присутствующей мРНК. Такие молекулы ДНК называются *комплементарными ДНК*, или *кДНК*. Реакция копирования катализируется обратной транскриптазой ретровирусов, которая синтезирует комплементарную цепь ДНК на цепи РНК. Одноцепочечные молекулы кДНК, синтезированные обратной транскриптазой, становятся двухцепочечными за счет действия ДНК-полимеразы, и уже такие молекулы кДНК вводят в плазмидный или вирусный вектор и клонируют (**рис. 8.43**). Каждый полученный таким методом клон называется **клоном кДНК**, а весь набор клонов, полученных из единократного выделения мРНК, составляет **библиотеку кДНК**.

На **рис. 8.44** показаны некоторые важные различия между клонами геномной ДНК и клонами кДНК. Геномные клоны представляют собой случайный набор всех последовательностей ДНК организма, и, за редким исключением, они одинаковы вне зависимости от типа клеток, из которых их получают. Наоборот, клоны кДНК содержат только те участки генома, которые были транскрибированы в мРНК. Поскольку клетки различных тканей синтезируют различные наборы молекул мРНК, для каждого типа клеток получают различные библиотеки кДНК.

8.4.8. Клоны кДНК содержат непрерывные кодирующие последовательности

Использование библиотек кДНК для клонирования генов имеет несколько преимуществ. В первую очередь специализированные клетки синтезируют некоторые белки в больших количествах. В этом случае, кодирующие белок мРНК скорее всего будут содержаться в клетке в таком объеме, что полученная из этих клеток библиотека кДНК будет обогащена молекулами кДНК, кодирующими данный белок, что значительно облегчает задачу идентификации нужного клона в библиотеке (см. рис. 8.44). Гемоглобин, например, в больших количествах синтезируется в развивающихся эритроцитах (красных кровяных тельцах); именно поэтому гены глобинов клонировали одними из первых.

Наиболее важным преимуществом клонов кДНК является тот факт, что они содержат непрерывную кодирующую последовательность гена. Как мы видели, гены эукариот обычно состоят из коротких кодирующих последовательностей ДНК (экзонов), отделенных друг от друга значительно более длинными некодирующими последовательностями (интронами); синтез мРНК включает в себя удаление некодирующих последовательностей из исходного транскрипта РНК и склеивание (сплайсинг) кодирующих последовательностей. Ни в бактериальной, ни в дрожжевой клетках РНК, полученная из гена высшей эукариотической клетки, не будет претерпевать таких модификаций. Таким образом, когда целью клонирования является расшифровка аминокислотной последовательности белка из последовательности ДНК или получение белка в больших количествах путем экспрессии клонированного гена в бактериальной или дрожжевой клетке, предпочтительнее начинать с кДНК. Библиотеки кДНК обладают дополнительными применениями: как описано в главе 7, многим мРНК человека и других сложных организмов свойственен альтернативный сплайсинг, и библиотека кДНК зачастую содержит большинство, если не все, альтернативные варианты мРНК, содержащиеся в данной клеточной линии или ткани.

Геномные библиотеки и библиотеки кДНК — это неисчерпаемые ресурсы, которыми исследователи делятся между собой. Сегодня многие такого рода библиотеки доступны из коммерческих источников.

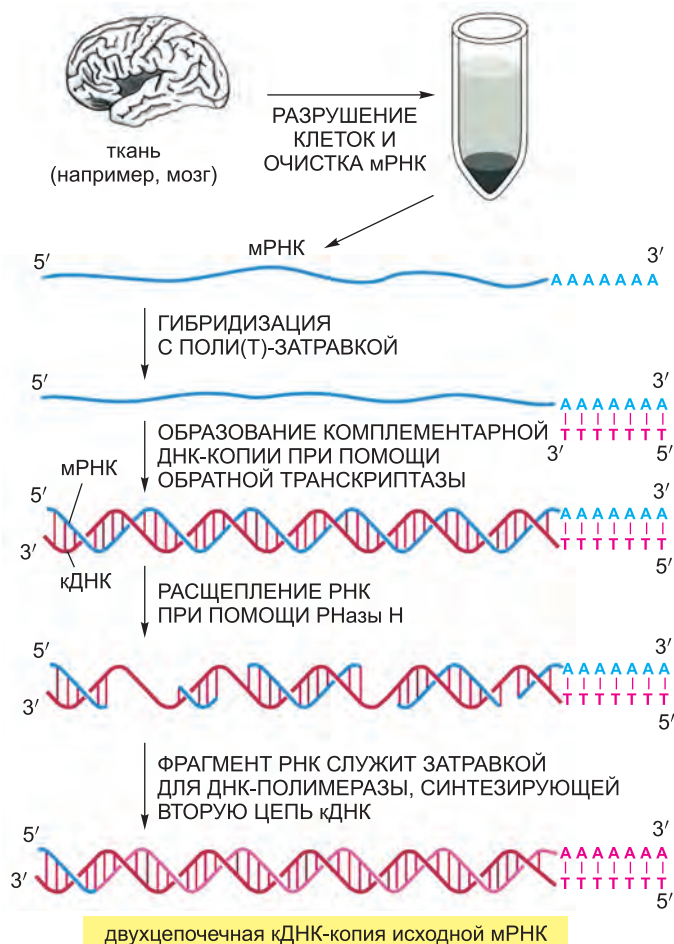


Рис. 8.43. Синтез кДНК. Из ткани выделяют всю мРНК, и фермент обратная транскриптаза синтезирует комплементарные к молекулам РНК молекулы ДНК (кДНК) (см. стр. 320). Для простоты показано копирование в ДНК только одной такой мРНК. Сначала короткий олигонуклеотид, служащий праймером для обратной транскриптазы, гибридизуется с комплементарным поли(А)-хвостом на 3'-конце мРНК (см. главу 6). Затем обратная транскриптаза копирует РНК в комплементарную цепь ДНК, образуя гибридную двойную спираль ДНК/РНК. Обработка гибрида ДНК/РНК ферментом рибонуклеазой H (см. рис. 5.12) приводит к образованию разрывов и пропусков в цепи РНК. Затем фермент ДНК-полимераза копирует оставшуюся одноцепочечную кДНК с образованием двойной спирали кДНК. Праймером этой реакции синтеза служит участок исходной мРНК. Поскольку ДНК-полимераза, используемая для синтеза второй цепочки ДНК, может работать через связанные молекулы РНК, участок РНК, основания которого с 3'-конца спарены с первой цепочкой ДНК, обычно служит праймером для конечного продукта синтеза второй цепи. Эта РНК впоследствии деградирует при клонировании. В результате нуклеотидные последовательности с 5'-концов исходных молекул мРНК часто отсутствуют в библиотекх кДНК.

8.4.9. Гены можно селективно амплифицировать с помощью полимеразной цепной реакции

Сейчас, когда доступно огромное количество геномных последовательностей, гены могут быть клонированы напрямую без предварительного создания библиотеки

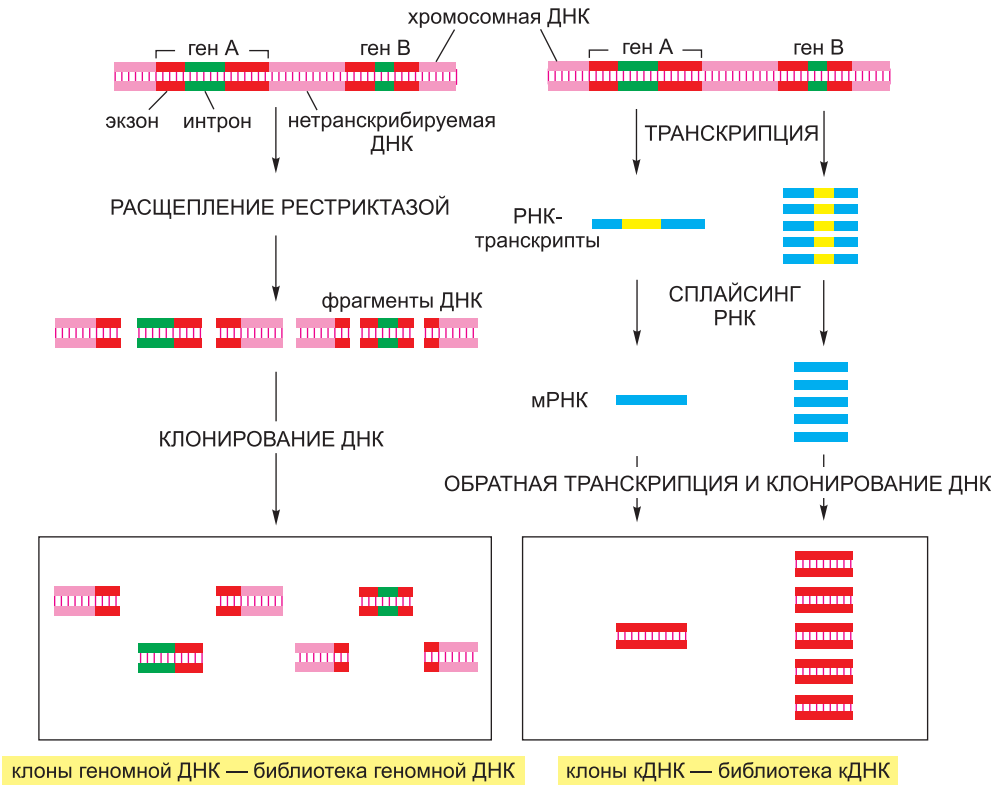


Рис. 8.44. Различия между клонами кДНК и геномной ДНК, полученными из одного участка ДНК. В данном примере ген А транскрибируется редко, тогда как ген В — часто. Оба гена содержат интроны (зеленые). В библиотеке геномной ДНК в клоны будет включена как интронная, так и нетранскрибируемая ДНК (розовая). Причем большинство клонов содержат только часть кодирующей последовательности гена (красная). В клонах кДНК последовательности интронов (желтые) удалены в результате сплайсинга во время формирования мРНК (голубая), и поэтому в каждом клоне содержится непрерывная кодирующая последовательность. Поскольку ген В в клетках, из которых получают библиотеку кДНК, транскрибируется чаще, чем ген А, он и встречается в библиотеке гораздо чаще. В библиотеке геномной ДНК гены А и В будут содержаться в одинаковом количестве.

ДНК. Метод **полимеразной цепной реакции (ПЦР)** сделал возможным быстрое клонирование. Взяв целый геном, ПЦР позволяет амплифицировать ДНК выбранного участка в миллиарды раз, эффективно «очищая» данную ДНК от остального генома.

Сначала химическими методами синтезируют пару олигонуклеотидов ДНК, прилегающих с двух сторон к нужной нуклеотидной последовательности гена. Эти олигонуклеотиды затем используют в качестве праймеров синтеза ДНК на одиночных цепях, полученных путем нагревания ДНК всего генома. Заново синтезированную ДНК получают в реакции, катализируемой *in vitro* очищенной ДНК-полимеразой, и праймеры остаются на 5'-концах конечных фрагментов ДНК (**рис. 8.45, а**).

Во время первого цикла синтеза ДНК ничего особенного не получается; сила метода ПЦР раскрывается только через несколько повторений цикла синтеза ДНК. Каждый цикл удваивает количество синтезированной в прошлом цикле ДНК. По-

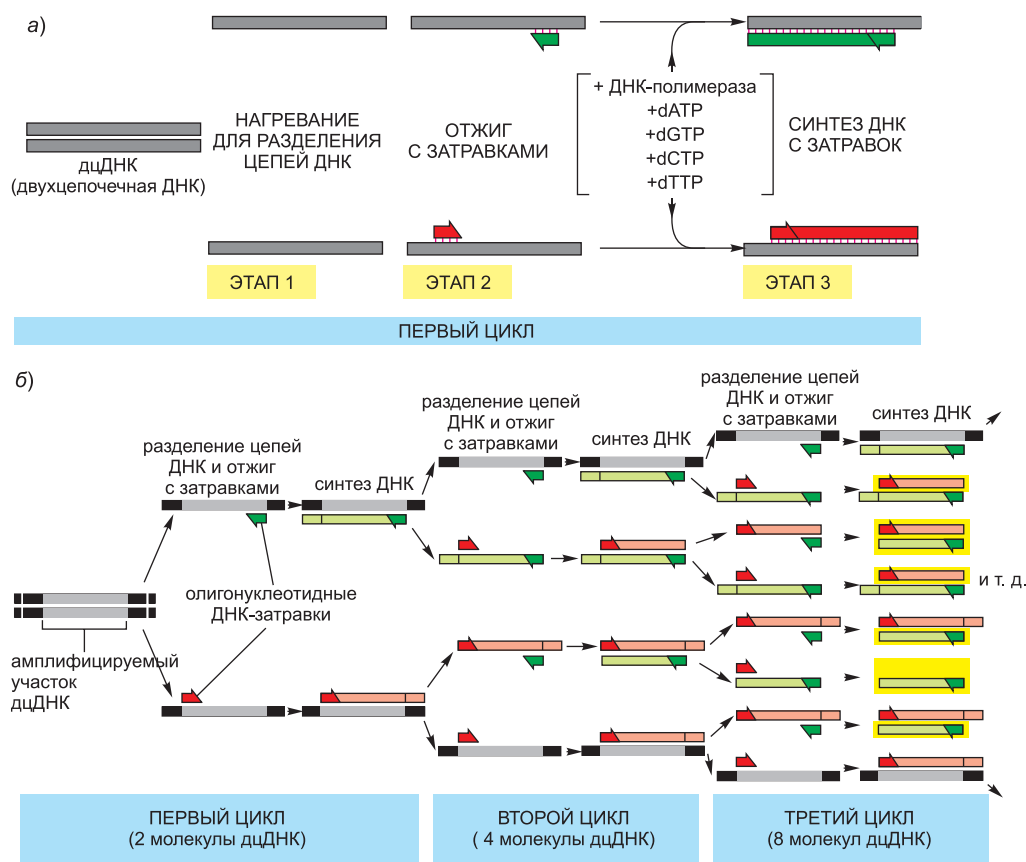


Рис. 8.45. Амплификация ДНК при помощи метода ПЦР. Знание последовательности ДНК, которую необходимо амплифицировать, позволяет создать два синтетических олигонуклеотида ДНК. Один праймер комплементарен последовательности на одной цепи двойной спирали ДНК, а второй — последовательности на другой цепи, но с противоположного конца участка, который нужно размножить. Эти олигонуклеотиды служат в качестве праймеров для синтеза ДНК, катализируемого ДНК-полимеразой *in vitro*, и они определяют участок ДНК, который будет амплифицирован. (а) ПЦР начинается с дцДНК, и в начале каждого цикла происходит краткое нагревание для разделения цепей (шаг 1). После разделения цепей охлаждение ДНК в присутствии избытка олигонуклеотидных праймеров позволяет произойти гибридизации этих праймеров с комплементарными последовательностями на двух цепях ДНК (шаг 2). Затем смесь инкубируют с ДНК-полимеразой и четырьмя дезоксирибонуклеозидтрифосфатами для синтеза ДНК, начинающегося с двух праймеров (шаг 3). Затем цикл повторяют, начиная с нагревания для разделения цепей синтезированной ДНК. (б) По мере того как процесс повторяют снова и снова, новые синтезированные фрагменты служат шаблонами для следующего цикла, и через несколько циклов преимущественная ДНК идентична последовательности, ограниченной и включающей в себя два праймера исходного шаблона. Из ДНК, с которой началась исходная реакция, амплифицируется только последовательность, заключенная между двумя праймерами, поскольку к другим участкам праймеров нет. В приведенном примере (б) три цикла реакции дают 16 цепей ДНК, 8 из которых (заклученные в желтые прямоугольники) обладают такой же длиной и в точности совпадают с одной из цепей исходной ограниченной последовательности, показанной слева; остальные цепи содержат сбоку от исходной последовательности дополнительную ДНК, реплицируемую в нескольких первых циклах. После еще четырех циклов 240 из 256 цепей ДНК будут в точности соответствовать исходной ограниченной последовательности, а еще через несколько циклов, практически все молекулы ДНК будут обладать такой уникальной длиной.

сколько каждый цикл требует краткого нагревания для разделения цепей двойной спирали ДНК, необходимо использование специальной ДНК-полимеразы, которая не будет денатурировать при нагревании. Такую ДНК-полимеразу выделяют из термофильных бактерий, и она устойчива к значительно более высоким температурам, чем обычные белки. С каждым новым циклом синтеза ДНК новые фрагменты служат шаблонами для следующих, и через несколько циклов преимущественным продуктом реакции будет один вид ДНК, чья длина соответствует расстоянию между двумя исходными праймерами (см. рис. 8.45, б).

На практике эффективная амплификация ДНК требует 20–30 реакционных циклов, продукты каждого цикла служат шаблонами ДНК для следующего — отсюда термин полимеразная «цепная реакция». На прохождение одного цикла затрачивается всего около 5 минут, и весь процесс можно легко автоматизировать. Таким образом, ПЦР делает возможным «бесклеточное молекулярное клонирование» фрагмента ДНК за несколько часов, тогда как для стандартного клонирования требуется несколько дней. Этот метод в настоящее время повсеместно используют для прямого клонирования ДНК интересующих генов, когда исходным материалом служит либо геномная ДНК, либо выделенная из клеток мРНК (рис. 8.46).

Метод ПЦР очень чувствителен; он позволяет обнаружить одну единственную молекулу ДНК в образце. Точно так же можно анализировать следовые количества РНК, предварительно транскрибируя их в ДНК при помощи обратной транскриптазы. Метод клонирования ПЦР в значительной мере вытеснил Саузерн-блоттинг из областей диагностики генетических заболеваний и низкого уровня вирусной инфекции. Также он подает большие надежды в области судебно-медицинской экспертизы, где его можно использовать для анализа мельчайших следов крови и других тканей, даже на уровне одной клетки, и идентификации человека, кому этот образец принадлежал, при помощи его или ее генетического «отпечатка пальца» (рис. 8.47).

8.4.10. Клетки как фабрики по производству специфических белков

Основная часть из тысяч различных белков — сюда входят и белки, выполняющие важнейшие ключевые функции, — присутствует в клетке в очень маленьких количествах. Раньше было очень сложно, если вообще возможно, получить более нескольких микрограммов чистого белка. Возможно, наиболее важным вкладом клонирования ДНК и генной инженерии в молекулярную биологию стало то, что они позволили получать любой белок клетки в практически неограниченном количестве.

Большие количества нужного белка получают в живых клетках при помощи **векторов экспрессии** (рис. 8.48). Обычно это плазмиды, созданные для получения больших количеств стабильной мРНК, которую можно эффективно транслировать в белок в претерпевших трансфекцию клетках бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих. Чтобы высокое содержание чужеродного белка не мешало росту клетки, вектор экспрессии часто создают таким образом, чтобы синтез чужеродной мРНК и белка начинался незадолго до того, как клетки собирают и лизируют (рис. 8.49).

Поскольку нужный белок, получаемый при помощи вектора экспрессии, синтезируется внутри клетки, после лизиса клеток его необходимо очистить от белков клетки-хозяина при помощи хроматографии. Но поскольку в клеточном лизате этого белка содержится в избытке (часто 1–10 % от всего белка клетки), очистку легко осуществить всего за несколько шагов. Как показано выше, многие векторы

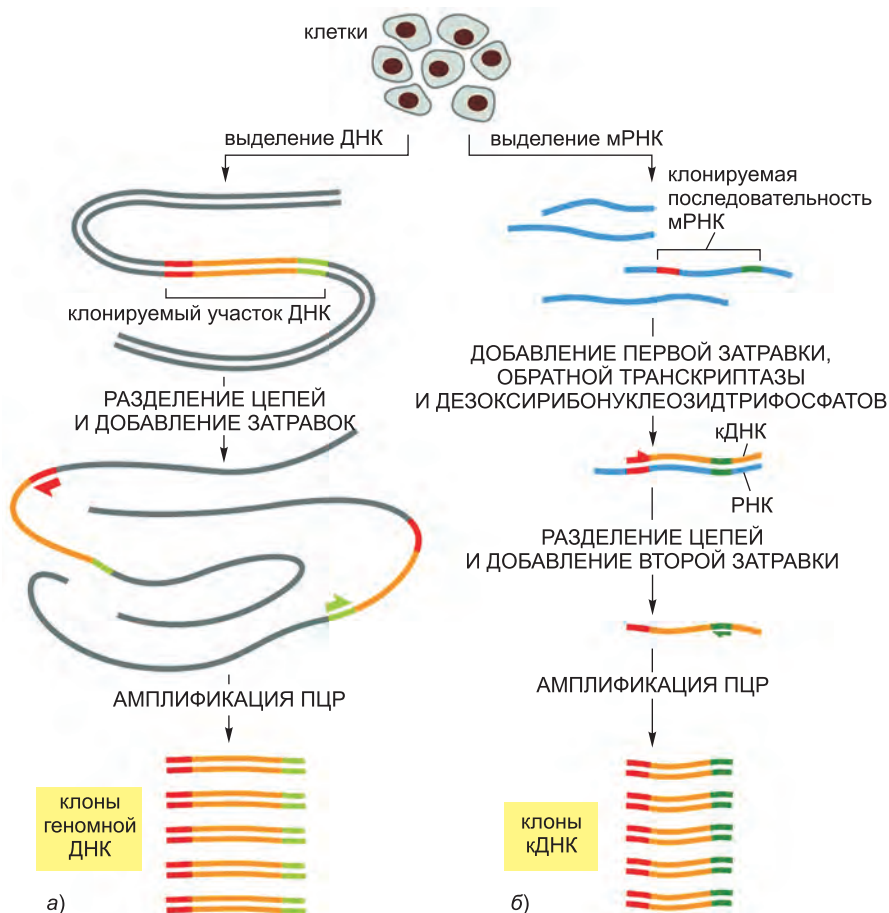


Рис. 8.46. Получение геномного клона или клона кДНК с помощью полимеразной цепной реакции.

(а) Чтобы получить геномный клон, сначала из клеток выделяют хромосомную ДНК. Затем добавляют праймеры для ПЦР, фланкирующие клонируемый участок ДНК, и проводят много циклов реакции (см. рис. 8.45). Поскольку амплифицируется только ДНК, заключенная между (и содержащая) праймеры, ПЦР позволяет селективно получить короткие участки хромосомной ДНК в чистом виде. (б) Для того чтобы использовать ПЦР для получения клона кДНК гена, сначала из клеток выделяют мРНК. Затем к смеси мРНК добавляют первый праймер, и обратная транскриптаза синтезирует комплементарную цепь ДНК. После этого добавляют второй праймер, и одноцепочечная молекула кДНК амплифицируется в последовательных циклах ПЦР, как показано на рис. 8.45. В обоих типах клонирования необходимо заранее знать нуклеотидную последовательность по крайней мере части клонируемого фрагмента.

экспрессии содержат молекулярный маркер — кластер гистидиновых остатков или маленький маркерный белок — в экспрессируемом белке, что облегчает очистку при помощи аффинной хроматографии (см. рис. 8.16). Сейчас доступны разнообразные векторы экспрессии, каждый из которых разработан для определенной клетки, в которой будет производиться белок. Таким образом, клетки можно заставить синтезировать большие количества полезных для медицины белков, например человеческого инсулина и гормона роста, интерферона и вирусных антигенов

к вакцинам. В более общем случае эти методы позволяют производить в больших количествах любой белок, даже такой, который в клетке содержится только в нескольких копиях, для детальных структурных и функциональных исследований, методы которых мы обсудили ранее.

Методы работы с ДНК также позволяют получать большие количества любой молекулы РНК при условии, если ее ген выделен. Исследования сплайсинга РНК, синтеза белков и основанных на РНК ферментов (рибозимов) значительно упрощаются благодаря доступности чистых молекул РНК. Большинство РНК в клетке содержатся в очень маленьких количествах, и их очень сложно очистить от других клеточных компонентов, особенно от десятков тысяч других присутствующих в клетке РНК. Но любую интересующую РНК можно синтезировать в достаточных количествах *in vitro* путем транскрипции ее последовательности ДНК (полученной описанными только что методами) высокоэффективной вирусной РНК-полимеразой. Полученный в результате единственный вид РНК легко отделить от ДНК и РНК-полимеразы.

8.4.11. Белки и нуклеиновые кислоты можно синтезировать напрямую в химических реакциях

Для прямого синтеза специфических последовательностей аминокислот и нуклеиновых кислот разработаны специальные химические реакции. Эти методы представляют собой прямой источник биологических молекул и не требуют использования клеток или ферментов. Химический синтез предпочтителен для получения нуклеиновых кислот длиной до 100 нуклеотидов, что особенно полезно для описанных выше основанных на ПЦР методов. Его также широко используют для создания специфических пептидов, которые при химическом спаривании с другими белками позволяют получать антитела против пептида.

8.4.12. ДНК можно быстро секвенировать

Методы, позволяющие быстро и легко определять нуклеотидную последовательность любого фрагмента ДНК, сделали возможной расшифровку последовательностей ДНК десятков тысяч генов и множества полных геномов (см. табл. 1.1, **стр. 18**). Объем информации о последовательностях ДНК сейчас настолько велик (много десятков миллиардов нуклеотидов), что для ее хранения и анализа требуются мощные компьютеры.

Секвенирование ДНК в больших объемах стало возможным после разработки в середине 70-х гг. метода **дидезокси-секвенирования** ДНК, который основан на синтезе ДНК *in vitro*, протекающем в присутствии терминирующих цепь дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов (**рис. 8.50**).

Несмотря на то что и в настоящее время используют тот же базовый метод, сделано много улучшений. Секвенирование ДНК сейчас полностью автоматизировано: роботы смешивают ингредиенты, а затем загружают их, проводят синтез и считывают последовательность нуклеотидных оснований с геля. Терминирующие цепь нуклеотиды, помеченные флуоресцентными красителями разных цветов, ускоряют процесс; в данном случае все четыре реакции синтеза могут протекать в одной пробирке, а продукты могут быть разделены в одной дорожке геля. Расположенный вблизи нижнего края геля детектор считывает и записывает цвет флуоресцентной метки на каждой полосе, по мере того как они проходят через лазерный луч (**рис. 8.51**).

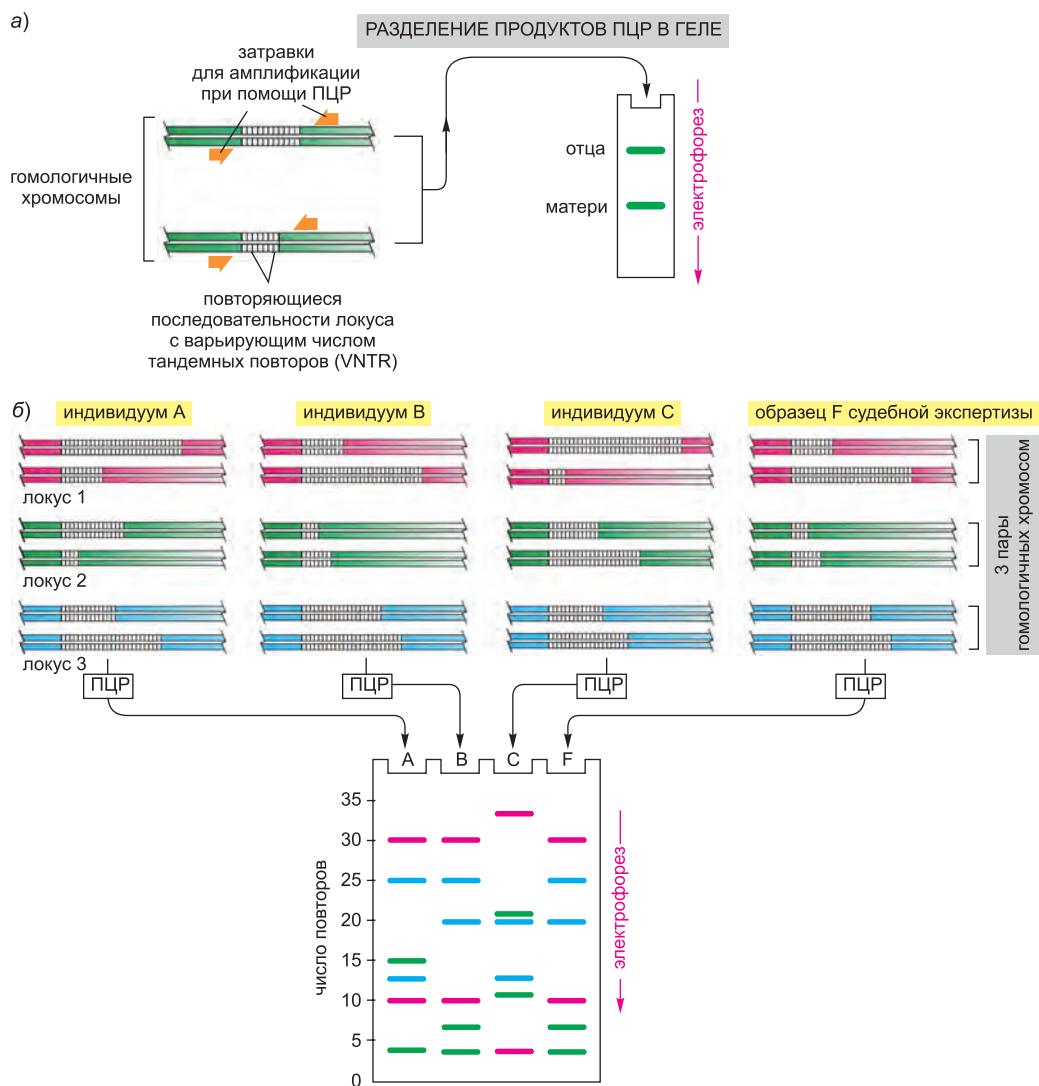


Рис. 8.47 (слева). Использование полимеразной цепной реакции в судебно-медицинской экспертизе. (а) Последовательность ДНК, создающая используемую в анализе вариабельность, состоит из коротких повторяющихся последовательностей, например, CACACA..., которые располагаются в различных участках (локусах) человеческого генома. Количество повторений в каждом случае может быть высоковариабельным в популяции, в пределах от 4 до 40 у разных людей. Последовательность повторов такого типа часто называют *гипервариабельными микросателлитными последовательностями*, — также известными, как *локусы с варьирующим числом tandemных повторов* (*Variable Number of Tandem Repeat, VNTR*). Поскольку в каждом локусе последовательности различаются, люди обычно наследуют различные варианты от матери и от отца; таким образом, не находящиеся в родстве люди обычно не обладают одинаковыми парами последовательностей. ПЦР-анализ с использованием ограничивающих локус праймеров дает пару полос амплифицированной ДНК для каждого человека, одна полоса представляет собой материнский вариант, а вторая — отцовский. Длина амплифицированной ДНК и, следовательно, положение ее полосы после электрофореза зависит от точного числа повторов в локусе. (б) В представленном здесь схематическом примере анализируются три одинаковых локуса VNTR (требующие трех различных пар специально выбранных олигонуклеотидных праймеров) трех подозреваемых (А, В и С), дающие для каждого человека

Затем компьютер считывает и сохраняет эту нуклеотидную последовательность. Некоторые современные системы полностью отказались от традиционного геля, и разделение нуклеиновых кислот в них происходит при помощи капиллярного электрофореза, метода, который еще сильнее ускоряет быструю автоматизацию.

8.4.13. Нуклеотидные последовательности используют для предсказания аминокислотных последовательностей белков

Сейчас, когда секвенирование ДНК стало быстрым и надежным, оно стало предпочтительным методом косвенного определения аминокислотных последовательностей большинства белков. При наличии кодирующей белок нуклеотидной последовательности процесс довольно прост. Несмотря на то что в принципе существует шесть различных рамок считывания, в которых последовательность ДНК может быть транслирована в белок (по три на каждой цепи), правильную обычно можно распознать по отсутствию часто встречаемых в других рамках стоп-кодонов (рис. 8.52). Когда мы обсуждали генетический код в главе 6, то обнаружили, что случайная последовательность нуклеотидов, считываемая в рамке, будет кодировать сигнал остановки синтеза белка примерно каждые 20 аминокислот. Нуклеотидные последовательности, кодирующие более длинные пептидные фрагменты, предположительно могут быть экзонами, и их можно транслировать (при помощи компьютера) в аминокислотную последовательность и сравнить с базами данных для нахождения совпадений с известными белками других организмов. Если необходимо, можно секвенировать небольшую часть аминокислотной последовательности очищенного белка и подтвердить или опровергнуть предсказанную при помощи ДНК последовательность.

Проблема, однако, состоит в том, чтобы определить, какие нуклеотидные последовательности в пределах всего генома являются генами, кодирующими белки. Идентификация генов очень проста, если последовательность ДНК взята из хромосом бактерий или архей, в которых отсутствуют интроны, или из клонированного ДНК. Расположение генов в таких нуклеотидных последовательностях может быть предсказано путем поиска в ДНК определенных отличительных особенностей (описанных в главе 6). Кодирующие белки гены идентифицируют путем поиска в нуклеотидной последовательности *открытых рамок считывания (ОРС)*, которые начинаются с иницирующего кодона, обычно ATG, и заканчиваются терминирующим кодоном TAA, TAG или TGA. Чтобы сократить количество ошибок до минимума, компьютеры, используемые для поиска ОРС, обычно программируют таким образом, чтобы они считали генами только последовательности, длина которых превышает, скажем, 100 кодонов.

после электрофореза в полиакриламидном геле шесть полос ДНК. Несмотря на то что некоторые люди имеют несколько общих полос, в целом картина для каждого человека индивидуальна. Таким образом, состав локусов может служить в качестве «отпечатка пальца» для практически инвариантной идентификации человека. Четвертая полоса (F) содержит продукты той же реакции судебного образца. Исходным материалом для ПЦР может служить единственный волосок или мельчайшая капля крови, оставленные на месте преступления. При исследовании вариабельности в 5–10 различных локусах VNTR вероятность того, что два случайных человека будут обладать одинаковыми генетическими характеристиками, составляет примерно 1 к 10 миллиардам. В показанном здесь случае подозреваемых А и С можно исключить из дальнейшего расследования, тогда как человек, обозначенный В, остается главным подозреваемым в совершении преступления. Подобный подход широко используют для установления отцовства.

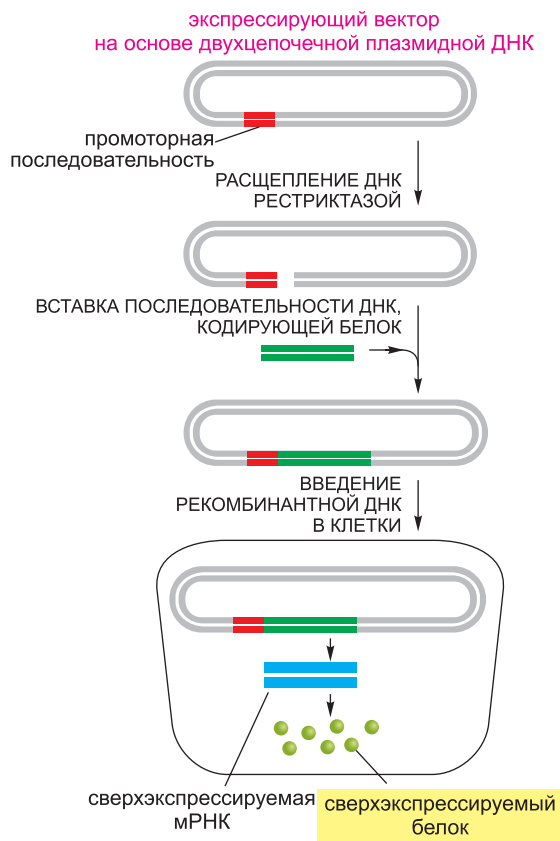


Рис. 8.48. Получение больших количеств белка из кодирующей белок последовательности ДНК, клонированной в векторе экспрессии и введенной в клетку. Плазмидный вектор содержит очень активный промотор, благодаря которому с прилегающего кодирующего белок гена синтезируются ненормально большие количества мРНК. В зависимости от характеристик вектора клонирования плазмиду вводят в клетки бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих, где вставленный в вектор ген эффективно транскрибируется и транслируется в белок.

В случае более сложных геномов, например геномов животных и растений, присутствие больших интронов в пределах кодирующей части гена усложняет процесс. У большинства многоклеточных организмов, включая человека, экзон в среднем состоит всего из 150 нуклеотидов. Таким образом, необходимо искать и другие признаки, указывающие на присутствие гена, например, последовательности, сигнализирующие о границе между интроном и экзоном или отличительные регулятор-

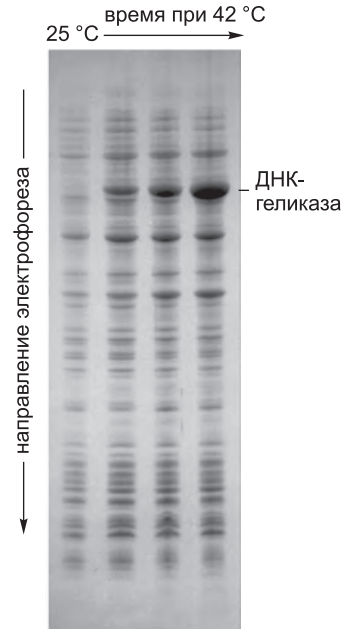
ные участки. Недавние попытки решить проблему предсказания экзонов привели к созданию алгоритмов искусственного интеллекта, позволяющих компьютеру на известных примерах обучаться тому, какие наборы характеристик свойственны границам экзонов.

Второй важный подход к идентификации кодирующих участков в хромосомах — описание нуклеотидных последовательностей обнаруживаемых мРНК (при помощи соответствующих кДНК). мРНК (и получаемые из них кДНК) лишены интронов, регуляторных последовательностей ДНК и ненужной «промежуточной» ДНК, лежащей между генами. Таким образом, полезно секвенировать большие количества кДНК для получения очень подробных баз данных кодирующих последовательностей организма. Эти последовательности затем легко использовать для распознавания в длинной последовательности хромосомной ДНК экзонов, соответствующих генам.

8.4.14. Геномы многих организмов полностью секвенированы

В большой степени благодаря автоматизации процесса секвенирования ДНК полностью расшифрованы геномы многих организмов, включая хлоропласты растений и митохондрии животных, геномы бактерий и архей и модельных организмов, широко изучаемых в лабораториях, например: дрожжей, круглого червя, фруктовой мушки *Drosophila*, модельного растения *Arabidopsis*, мыши, собаки, шимпанзе и,

Рис. 8.49. Получение больших количеств белка при помощи плазмидного вектора экспрессии. В данном примере бактериальные клетки подвергнуты трансфекции кодирующей последовательностью фермента ДНК-хеликазы; транскрипция этой кодирующей последовательности находится под контролем вирусного промотора, который становится активным только при температуре 37° С или выше. Весь белок клетки проанализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН либо в случае бактерий, выращенных при 25° С (хеликаза не синтезируется), либо после переноса той же бактерии в 42° С на 2 часа (фермент хеликаза стала преимущественным видом белка в лизате). (С любезного разрешения Jack Barry.)



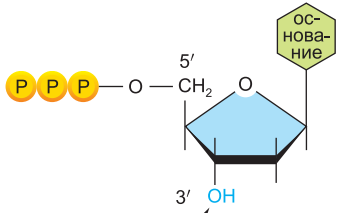
конечно, человека. Исследователи также полностью расшифровали последовательности ДНК разнообразных патогенов человека. Сюда входят геномы бактерий, вызывающих холеру, туберкулез, сифилис, гонорею, болезнь Лайма и язву желудка, а также сотен вирусов, включая вирус оспы и вирус Эпштейна—Барр (который вызывает инфекционный мононуклеоз). Исследование геномов этих патогенов позволяет понять, что делает их инфекционными, и указывает путь к разработке новых и более эффективных способов лечения.

Haemophilus influenzae (бактерия, вызывающая ушные инфекции и менингит у детей) — первый организм, для которого полностью расшифровали последовательность генома — все 1,8 миллионов п. н. — при помощи *секвенирования методом «дробовика»* (*шотган-секвенирование*, *shotgun sequencing method*), наиболее распространенного в настоящее время подхода. В этом методе длинные последовательности ДНК расщепляют случайным образом на более короткие фрагменты. Каждый фрагмент секвенируют, и затем при помощи компьютера, использующего в качестве указателей направления сборки перекрывание последовательностей, эти кусочки собирают в целую хромосому или геном. Метод «дробовика» преимущественно применяют для секвенирования маленьких геномов. Несмотря на то что большие, обладающие множеством повторов геномные последовательности сложнее собирать, метод «дробовика» в сочетании с анализом крупных фрагментов ДНК, клонированных в ВАС, сыграл ключевую роль и в их секвенировании.

Сейчас, когда все чаще в научной литературе публикуют новые последовательности, сравнение полных геномов различных организмов позволяет нам проследить эволюционные отношения между генами и организмами, а также открывать новые гены и предсказывать их функции (см. главы 3 и 4). Приписывание генам функций часто включает в себя сравнение их последовательностей с родственными последовательностями модельных организмов, которые подробно охарактеризованы в лабораториях, например: бактерии *E. coli*, дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe*, круглого червя *C. elegans* и фруктовой мушки *Drosophila* (см. главу 1).

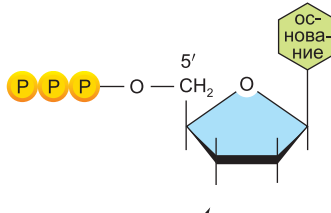
Несмотря на то что организмы, геномы которых расшифрованы, обладают многими одинаковыми биохимическими путями и содержат белки, гомологичные по аминокислотным последовательностям или структуре, функции очень многих недавно идентифицированных белков остаются неизвестными. В зависимости от ор-

а) дезоксирибонуклеозидтрифосфат



возможно удлинение цепи на 3'-конце

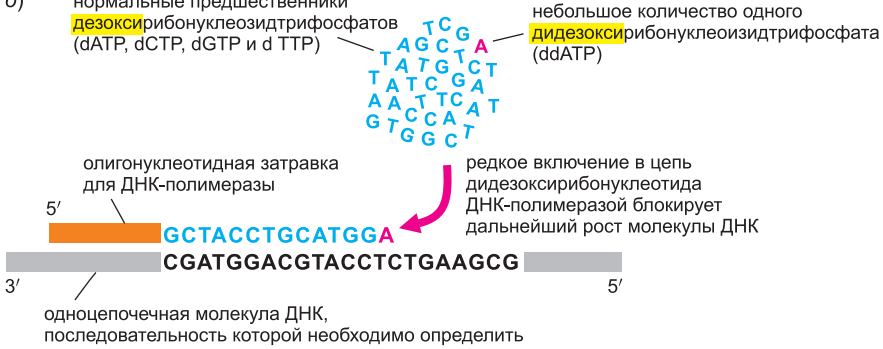
дидезоксирибонуклеозидтрифосфат



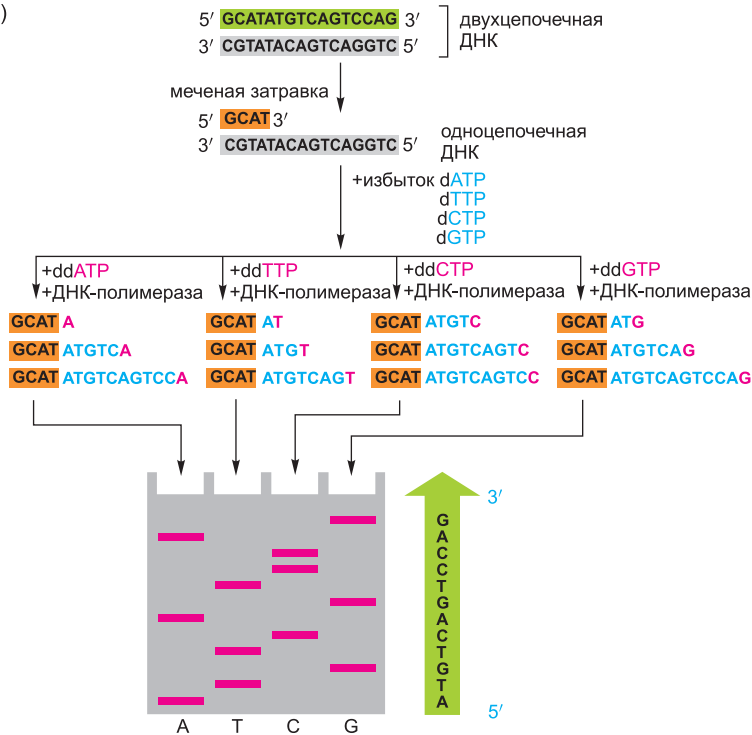
препятствует удлинению цепи на 3'-конце

б) нормальные предшественники дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (dATP, dCTP, dGTP и d TTP)

небольшое количество одного дидезоксирибонуклеозидтрифосфата (ddATP)



в)



последовательность ДНК, прочитываемая с геля снизу вверх, такова
ATGTCAGTCCAG
1 12

Рис. 8.50. Метод ферментативного или дидезокси-секвенирования ДНК. (а) Данный метод основан на использовании дидезоксирибонуклеозидтрифосфатов — производных нормальных дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, у которых отсутствует 3'-гидроксильная группа. (б) Очищенную ДНК синтезируют *in vitro* в смеси, содержащей секвенируемые одноцепочечные молекулы ДНК (*серые*), фермент ДНК-полимеразу, короткий праймер ДНК (*оранжевый*), необходимый, чтобы ДНК-полимераза начала синтез, и четыре дезоксирибонуклеотидтрифосфата dATP, dCTP, dGTP, dTTP: *синие* А, С, Г и Т). Если в смеси также присутствует дидезоксирибонуклеотидный аналог (*красный*) одного из этих нуклеотидов, он может быть вставлен в растущую цепь ДНК. Поскольку в этой цепи не будет 3'-ОН-группы, присоединение следующего нуклеотида заблокировано и цепь ДНК в этой точке терминируется. В приведенном примере в нуклеотидную смесь было добавлено небольшое количество дидезоксиАТФ (ddATP, обозначенный *красной* буквой А). ddATP конкурирует с избытком нормального дезоксиАТФ (dATP, *голубые* А), поэтому ddATP иногда случайным образом включается в растущую цепь ДНК. Такая реакционная смесь, в конце концов, даст набор ДНК различной длины, комплементарных исходной секвенируемой ДНК и обрывающихся на разных А. Точные длины продуктов синтеза ДНК можно затем использовать для определения положения каждого А в растущей цепи. (в) Для определения полной последовательности фрагмента ДНК, двухцепочечную ДНК сначала разделяют на отдельные цепи, и одну из цепей используют в качестве шаблона для секвенирования. Четыре различных терминирующих цепь дидезоксирибонуклеотидтрифосфата (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP, вновь показаны *красным*) используют в четырех отдельных реакциях синтеза ДНК на копиях одной и той же одноцепочечной ДНК (*серая*). Каждая реакция дает набор копий ДНК, обрывающихся в различных точках последовательности. Продукты этих четырех реакций разделяют электрофорезом на четырех параллельных дорожках полиакриламидного геля (отмечены здесь буквами А, С, Г и Т). Синтезированные фрагменты обнаруживают по меткам (радиоактивным или флуоресцентным), вставленным в праймер или в один из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, используемых для удлинения цепи. На каждой дорожке полосы представляют собой фрагменты, терминированные на данном нуклеотиде (например, А в самой левой дорожке), но в разных положениях цепи ДНК. Путем считывания дорожек по порядку, начиная с нижнего края геля и двигаясь поперек всех дорожек, можно определить последовательность синтезированной ДНК. Последовательность изображена как *зеленая стрелка* справа от геля. Эта последовательность комплементарна шаблонной цепи (*серая*) из исходной двухцепочечной молекулы ДНК и идентична части зеленой 5'-3'-цепи.

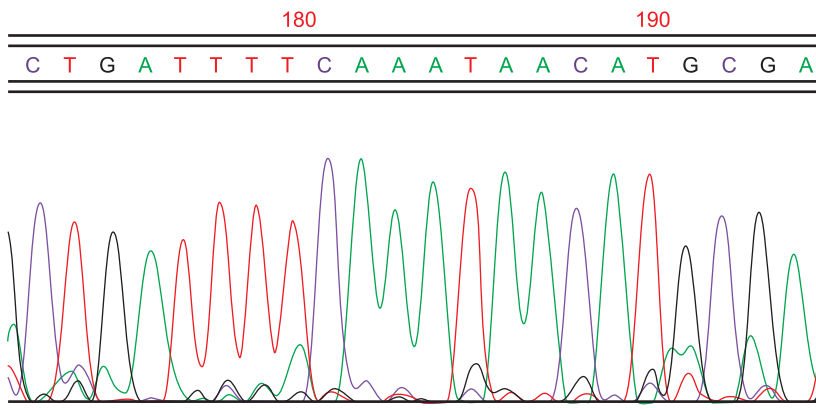


Рис. 8.51. Автоматизированное секвенирование ДНК. Внизу показана небольшая часть полученных при автоматизированном секвенировании ДНК сырых данных, как она выглядит на экране компьютера. Каждый выступающий окрашенный пик представляет собой нуклеотид в последовательности ДНК — здесь можно прочитать нуклеотидную последовательность между положениями 173 и 194, считая от начала последовательности. Маленькие пики вблизи нулевой линии представляют собой фоновый «шум», и до тех пор пока они значительно меньше, чем пики-«сигналы», их игнорируют. Данный пример был взят из международного проекта по определению полной нуклеотидной последовательности генома растения *Arabidopsis*. (С любезного разрешения George Murphy.)

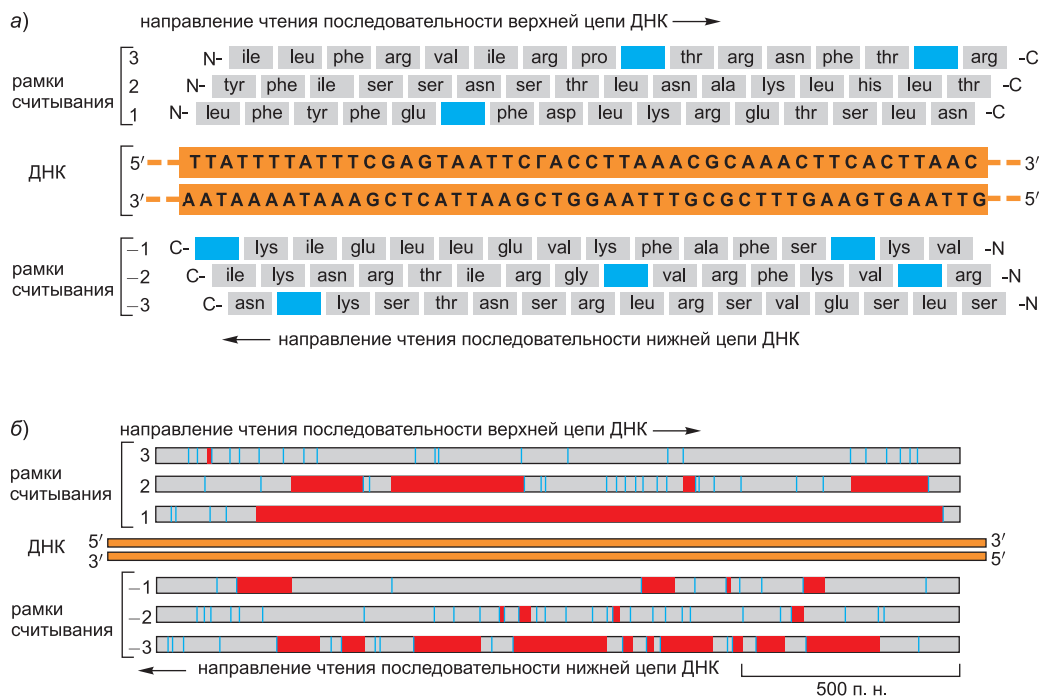


Рис. 8.52. Нахождение участков ДНК, кодирующих белок. (а) Любой участок последовательности ДНК, в принципе, может кодировать шесть различных аминокислотных последовательностей, потому что любая из трех различных рамок считывания на каждой цепи может быть использована для интерпретации нуклеотидной последовательности. Отметим, что нуклеотидная последовательность всегда считывается в направлении 5'-3' и кодирует белок от N-конца к С-концу. В случае случайной последовательности нуклеотидов, считываемой в определенной рамке, стоп-сигнал синтеза белка встречается в среднем каждые 20 аминокислот. В данной последовательности из 48 п. н. каждый такой сигнал (*стоп-кодон*) показан голубым, и только рамка считывания 2 не имеет сигналов остановки. (б) Поиск в последовательности ДНК, состоящей из 1700 п. н., возможных кодирующих белок последовательностей. Информация представлена так же, как на (а): каждый стоп-кодон синтеза белка обозначен голубой линией. Также все участки между возможными сигналами начала и остановки синтеза белка (смотри стр. 381) показаны красным. Только рамка считывания 1 кодирует белок, состоящий из 475 аминокислот

ганизма, около 15–40 % белков, кодируемых расшифрованным геномом, не похожи ни на один биохимически исследованный белок. Это наблюдение подчеркивает ограничения расширяющейся области геномики: несмотря на то что сравнительный анализ геномов дает огромное количество информации о взаимоотношениях между генами и организмами, он зачастую не дает никакой информации о том, как эти гены функционируют, или о том, какую роль они играют в физиологии организма. Например, сравнение полных наборов генов нескольких термофильных бактерий не открыло, почему эти организмы благоденствуют при температурах, превышающих 70° С. А исследование генома невероятно радиостойчивой бактерии *Deinococcus radiodurans* не объясняет, как она способна пережить радиационный взрыв, разбивающий стекло. Чтобы понять, как гены и производимые ими белки функционируют в контексте живых организмов, необходимы дальнейшие биохимические и генетические исследования, описанные в других разделах этой главы.

Заключение

Клонирование ДНК позволяет копировать любую специфическую последовательность ДНК или РНК, выбранную из миллионов других последовательностей в клетке, и синтезировать ее в неограниченных количествах в чистом виде. Последовательности ДНК могут быть амплифицированы после расщепления хромосомной ДНК эндонуклеазами рестрикции и включения полученных фрагментов ДНК в хромосомы самореплицирующегося генетического элемента, например вируса или плазмиды. Обычно используют плазмидные векторы, и получаемая в результате «библиотека геномной ДНК» поддерживается в миллионах бактериальных клеток, каждая из которых содержит различные фрагменты ДНК. Отдельные пролиферирующие клетки из этой библиотеки производят большие количества единственного клонированного фрагмента ДНК. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет напрямую клонировать ДНК термоустойчивой ДНК-полимеразой при условии того, что последовательность интересующей ДНК известна заранее.

Родственные подходы используют для получения клонов ДНК, последовательность которых соответствует молекулам мРНК, за исключением того, что сначала получают ДНК-копию последовательности мРНК, называемую кДНК. В отличие от клонов геномной ДНК, в клонах кДНК отсутствуют последовательности интронов, что делает их предпочтительными клонами для анализа белковых продуктов генов.

Реакции гибридизации нуклеиновых кислот являются чувствительным методом обнаружения генов или любых других интересующих нуклеотидных последовательностей. В жестких условиях гибридизации (при такой комбинации растворителя и температуры, что даже идеальная двойная спираль ДНК становится малоустойчивой), две цепи могут спариваться с образованием «гибридной» спирали только в том случае, если их последовательности почти точно комплементарны. Огромная специфичность такой реакции гибридизации позволяет пометить любую одноцепочечную последовательность нуклеотидов радиоизотопом или химическим соединением и использовать ее в качестве зонда для нахождения комплементарной цепи даже в клетке или клеточном экстракте, содержащих миллионы различных последовательностей ДНК и РНК. Такого рода зонды широко применяются для обнаружения нуклеиновых кислот, соответствующих определенным генам, для ускорения их очистки и описания и определения их расположения в клетках, тканях и организмах.

Нуклеотидные последовательности ДНК можно быстро и просто расшифровать при помощи высокоавтоматизированных методов, основанных на дидеокси-секвенировании ДНК. Это подход позволил определить полные последовательности ДНК геномов многих организмов. Сравнение геномных последовательностей различных организмов позволяет отслеживать эволюционные взаимоотношения между генами и организмами, а также открывать новые гены и предсказывать их функции.

Все вместе, эти методы анализа и манипуляции ДНК сделали возможными идентификацию, выделение и секвенирование генов любого интересующего организма. Соответствующие подходы позволяют ученым получать большие количества белковых продуктов этих генов, необходимые для подробного анализа их структуры и функций, а также для медицинских целей.

8.5. Изучение экспрессии и функционирования генов

В конечном счете ученые хотят узнать, как гены — и кодируемые ими белки — функционируют в интактном организме. Хотя это может показаться противоречащим здравому смыслу, но одним из наиболее показательных способов определения того, что делает ген, является наблюдение за тем, что происходит с организмом, если ген отсутствует. Изучение мутантных организмов, несущих изменения или делеции в нуклеотидных последовательностях, является в биологии проверенной временем практикой и формирует основу важной области **генетики**. Поскольку мутации могут нарушать клеточные процессы, мутанты часто являются ключом к пониманию функции гена. Классический генетический подход начинается с нахождения мутантов, обладающих интересным или необычным внешним видом, например, фруктовых мушек с белыми глазами или изогнутыми крыльями. Работая в обратном направлении от **фенотипа** — внешнего вида или поведения особи, — можно определить **генотип** организма, форму гена, ответственного за эту характеристику (**приложение 8.1**).

Сегодня, когда доступно множество геномных последовательностей, изучение функции гена часто начинается с последовательности ДНК. В данном случае задача состоит в переводе последовательности в функцию. Один из подходов мы описали выше в этой главе. Он состоит в поиске по базам данных подробно охарактеризованных белков, обладающих подобными продукту нового гена аминокислотными последовательностями. Для дальнейшего исследования функции гена применяют методы, описанные в предыдущем разделе. Но для того чтобы напрямую определить функцию гена в клетке или организме, наиболее эффективным подходом является изучение мутантов, у которых этот ген отсутствует или экспрессируется его измененная версия. Понимание того, какой клеточный процесс у таких мутантов был нарушен, обычно проливает свет на биологическую роль гена.

В данном разделе мы опишем несколько подходов к определению функции гена, начиная с последовательности ДНК или организма с интересным фенотипом. Сперва мы рассмотрим классический генетический подход, который начинается с *генетического скрининга* для обнаружения интересных мутантов. За этим следует процесс идентификации гена или генов, ответственных за наблюдаемый фенотип. Затем мы опишем набор методов, в совокупности носящих название *обратной генетики* («от гена к признаку»), в которой исследование для определения функции начинается с гена или последовательности гена. Этот подход часто включает в себя некоторое количество разумных предположений в области поиска гомологичных последовательностей и определения того, когда и где ген экспрессируется, а также создание мутантных организмов и описание их фенотипа.

8.5.1. Классическая генетика начинается с нарушения клеточного процесса путем случайного мутагенеза

До наступления эпохи клонирования генов, большинство генов идентифицировали по отклонениям от нормы, вызванным мутацией гена. Этот классический генетический подход — идентификация генов, ответственных за мутантные фенотипы, — проще всего реализуется в случае быстро размножающихся и легко поддающихся генетическим манипуляциям организмов, например бактерий, дрожжей, круглых червей и фруктовых мушек. Несмотря на то что спонтанные мутации иногда можно обнаружить при изучении очень больших популяций, состоящих из тысяч

и десятков тысяч особей, выделение одной мутантной особи более эффективно, если направленно создавать мутации химическими веществами или радиацией, повреждающими ДНК. Подвергая организмы действию такого рода мутагенов, можно очень быстро создать множество мутантных особей, а затем искать среди них определенный вызывающий интерес дефект, как мы скоро обсудим.

Альтернативой химическому или радиационному мутагенезу служит *инсерционный мутагенез* (мутагенез методом микроинъекций). Этот метод основан на том факте, что экзогенная ДНК при случайном введении в геном может привести к возникновению мутаций, если введенный фрагмент нарушает ген или его регуляторные последовательности. Введенная ДНК, последовательность которой известна, служит молекулярным маркером, способствующим последующей идентификации и клонированию нарушенного гена (рис. 8.53). В случае *Drosophila* использование транспозона P для инактивации генов совершило переворот в изучении функционирования генов фруктовой мушки. Мобильные генетические элементы (см. табл. 5.3, стр. 318) также используют для создания мутаций в бактериях, дрожжах, мышах и цветковом растении *Arabidopsis*.

Такого рода классические генетические исследования хорошо подходят для разложения по полочкам биологических процессов в экспериментальных организмах, но как можно изучать функционирование генов в человеке? В отличие от организмов, над которыми легко проводить генетические манипуляции, люди размножаются медленно, и их нельзя умышленно подвергать действию мутагенов. Более того,



Рис. 8.53. Инсерционный мутант львиного зева, *Antirrhinum*. Мутация в единственном гене, кодирующем регуляторный белок, приводит к формированию листовых побегов вместо цветков. Мутация позволяет клеткам приобрести свойства, которые больше подходят для другой части нормального растения. Мутантное растение изображено *слева*, дикий тип — *справа*. (С любезного разрешения Enrico Coen и Rosemary Carpenter.)

ГЕНЫ И ФЕНОТИПЫ

Ген: функциональная единица наследственности, обычно соответствующая участку кода ДНК единственного белка

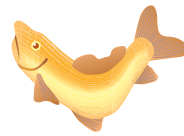
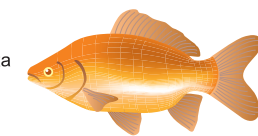
Геном: вся последовательность ДНК организма

локус: место расположения гена в геноме

аллели: альтернативные формы генома

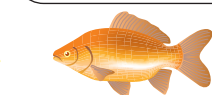
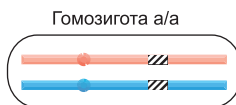
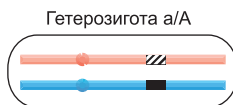
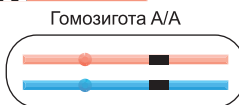
ГЕНОТИП: специфический набор аллелей, формирующий геном особи

ФЕНОТИП: внешние характеристики особи



Дикий тип: нормальный, встречающийся в естественных условиях тип

Мутант: отличается от дикого типа за счет генетического изменения (мутации)

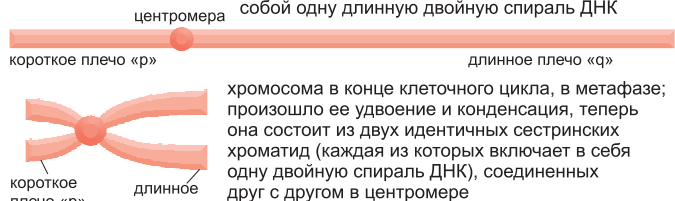


аллель A является **доминантной** (по отношению к a); аллель a является **рецессивной** (по отношению к A)

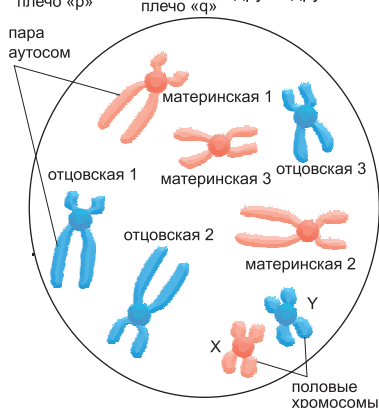
В приведенном выше примере фенотип гетерозиготы совпадает с генотипом одной из гомозигот; в случаях, когда он отличается от фенотипов обеих гомозигот, две аллели считаются кодоминантными.

ХРОМОСОМЫ

хромосома в начале клеточного цикла, в фазе G1; единственная длинная полоса представляет собой одну длинную двойную спираль ДНК

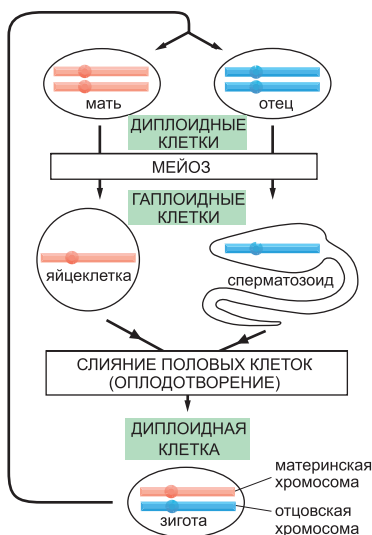


хромосома в конце клеточного цикла, в метафазе; произошло ее удвоение и конденсация, теперь она состоит из двух идентичных сестринских хроматид (каждая из которых включает в себя одну двойную спираль ДНК), соединенных друг с другом в центромере



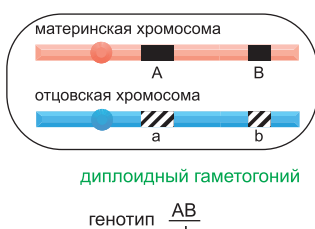
Нормальный диплоидный набор хромосом, видимый на метафазной пластинке и приготовленный путем разрушения клетки в метафазе и окрашивания разбросанных хромосом. В приведенном здесь схематическом примере показаны три пары аутосом (хромосом, симметрично наследуемых от обоих родителей вне зависимости от пола) и две половые хромосомы — X от матери и Y от отца. Количество и тип половых хромосом и их роль в детерминировании пола зависят от класса организма, как и количество пар аутосом.

ГАПЛОИДНО-ДИПЛОИДНЫЙ ЦИКЛ ПОВОГО РАЗМНОЖЕНИЯ

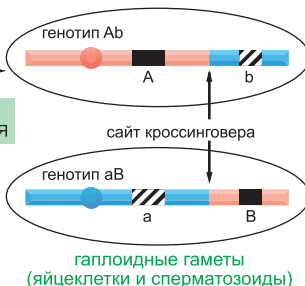


Для простоты цикл показан только для одной хромосомы/хромосомной пары.

МЕЙОЗ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ РЕКОМБИНАЦИЯ



МЕЙОЗ И РЕКОМБИНАЦИЯ



Чем больше расстояние между двумя локусами на одной хромосоме, тем больше вероятность того, что они будут разделены кроссинговером, происходящим в сайте между ними. Если два гена были таким образом перестроены в $x\%$ гамет, то говорят, что разделяющее их расстояние в хромосоме на **генетической карте** составляет x **единиц картирования** (или x **сантиморган**).

ТИПЫ МУТАЦИЙ



ТОЧЕЧНАЯ МУТАЦИЯ: локализована в одном сайте гена и соответствует единственной паре нуклеотидов или очень маленькой части гена



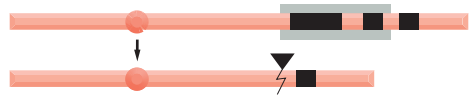
ИНВЕРСИЯ: меняет направление сегмента хромосомы на противоположное

летальная мутация: вызывает преждевременную гибель развивающегося организма

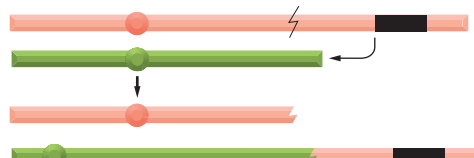
условная мутация: проявляется в фенотипе только при определенных условиях, носящих название *рестриктивных условий*. При других условиях — *пермиссивных* — эффекта мутации не наблюдается. В случае *температурочувствительных* мутаций рестриктивным условием обычно служит высокая температура, а пермиссивным — низкая

мутация с потерей функции: ограничивает или прекращает функционирование гена. Это наиболее распространенный класс мутаций. Мутации с потерей функции обычно *рецессивны* — организм нормально функционирует до тех пор, пока он сохраняет хотя бы одну нормальную копию гена

нуль-мутации: мутация с потерей функции, которая полностью выключает работу гена



ДЕЛЕЦИЯ: удаление сегмента хромосомы



ТРАНСЛОКАЦИЯ: удаление сегмента одной хромосомы и присоединение его к другой

мутация с приобретением функции: увеличивает активность гена или делает его активным в неподходящих условиях; эти мутации обычно доминантные

доминантно-негативная мутация: мутация, которая проявляется как доминантная, но блокирует активность гена, вызывая фенотип с потерей функции даже в присутствии нормальной копии гена. Это явление имеет место, когда продукт мутантного гена мешает функционированию продукта нормального гена

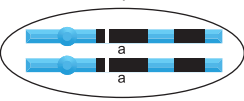
супрессорная мутация: подавляет фенотипическое проявление другой мутации, так что двойной мутант кажется нормальным. Внутригенная супрессорная мутация располагается в пределах гена, несущего первую мутацию; экстрагенная супрессорная мутация располагается во втором гене, обычно том, чей продукт напрямую взаимодействует с продуктом первого

ДВА ГЕНА ИЛИ ОДИН?

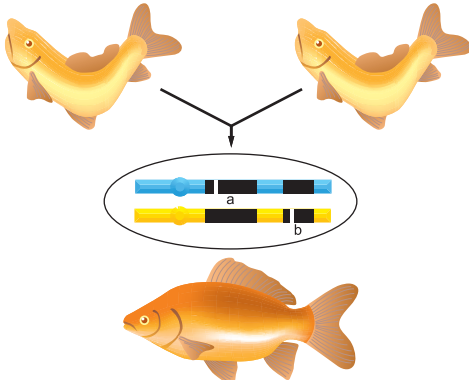
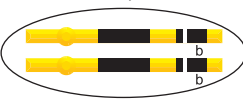
Если существует две мутации, приводящие к формированию одного и того же фенотипа, то как можно узнать, являются ли они мутациями одного гена? Если мутации рецессивны (а обычно так и бывает), то ответ можно дать при помощи **теста на комплементацию**.

КОМПЛЕМЕНТАЦИЯ: МУТАЦИИ В ДВУХ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНАХ

гомозиготная мутантная мать



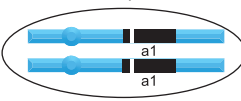
гомозиготный мутантный отец



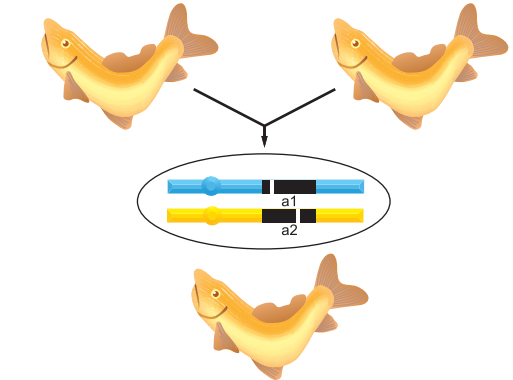
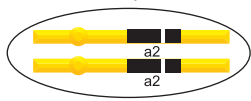
гибридное потомство обладает нормальным фенотипом: присутствует одна нормальная копия каждого гена

НЕТ КОМПЛЕМЕНТАЦИИ: ДВЕ НЕЗАВИСИМЫЕ МУТАЦИИ В ОДНОМ ГЕНЕ

гомозиготная мутантная мать



гомозиготный мутантный отец



гибридное потомство обладает мутантным фенотипом: нормальные копии мутантного гена отсутствуют

любой человек с серьезным дефектом какого-либо важного процесса, например репликации ДНК, погибнет задолго до рождения.

Существует два основных способа изучения человеческих генов. Во-первых, поскольку гены и их функции сохранялись в течение эволюции, изучение менее сложных модельных организмов дает критическую информацию о сходных генах и процессах в человеке. Соответствующие человеческие гены можно затем изучать в культивированных человеческих клетках. Во-вторых, многие не летальные мутации, например тканеспецифические дефекты лизосом или рецепторов на поверхности клетки, возникли в человеческой популяции спонтанно. Анализ фенотипов людей с такого рода нарушениями, наравне с изучением их клеток в культуре, дал немало информации о важных функциях человеческих клеток. Несмотря на то что такие мутации встречаются редко, их легко найти, благодаря уникальному свойству людей: мутантные индивиды привлекают к себе внимание, требуя специальную медицинскую помощь.

8.5.2. Генетический скрининг позволяет идентифицировать мутанты со специфическими отклонениями

Как только создана коллекция мутантов модельного организма, например дрожжей или мушек, для обнаружения интересующего измененного фенотипа обычно необходимо изучить тысячи особей. Такой поиск называется **генетическим скринингом**, и чем больше геном, тем меньше вероятность того, что какой-либо определенный ген будет нести мутацию. Таким образом, чем больше геном организма, тем труднее становится скрининг. Фенотип, поиск которого осуществляется при помощи скрининга, может быть простым или сложным. Простые фенотипы легко обнаружить: например, можно быстро проверить большое число организмов на мутации, делающие невозможным выживание организма в отсутствие определенной аминокислоты или питательного вещества.

Более сложные фенотипы, например нарушения поведения или способности к обучению, могут потребовать более трудоемкого скрининга (рис. 8.54). Но методы



Рис. 8.54. Обнаружение поведенческого фенотипа при генетическом скрининге. (а) *C. elegans* дикого типа питаются группами. Черви мигрируют, пока не встречают своих соседей, вместе с которыми они приступают к поеданию бактерий. (б) Мутантные животные питаются сами по себе. (Фотографии получены Cornelia Bargmann, *Cell* 94: обложка, 1998. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

генетического скрининга, применяемые даже для анализа сложных физиологических систем, должны быть как можно более простыми и, если возможно, позволять одновременное изучение большого количества мутантов. Например, разработан очень элегантный метод скрининга для поиска генов, участвующих в обработке зрительной информации у рыб данио. В основе этого скрининга, который отслеживает ответ рыб на движение, лежит изменение поведения. Рыбы дикого типа плывут в направлении воспринятого движения, тогда как мутанты с нарушениями в системах обработки зрительной информации плавают в случайных направлениях — такое поведение легко выделить. Одним из мутантов, обнаруженных при таком скрининге, является *lakritz*, у которого отсутствует 80 % клеток ганглия сетчатки, помогающих передавать зрительные сигналы от глаз в мозг. Поскольку клеточная организация сетчатки рыб данио сходна с таковой всех позвоночных, изучение таких мутантов должно способствовать пониманию принципов обработки зрительной информации у людей.

Поскольку дефекты генов, необходимых для фундаментальных клеточных процессов, например синтеза и процессинга РНК или регуляции клеточного цикла, часто являются летальными, функции этих генов обычно исследуют на особях с **условными мутациями**. Мутантные особи нормально функционируют до тех пор, пока они находятся в «пермиссивных» (от англ. *permissive* — разрешающий) условиях. Но как только они подвергаются воздействию «рестриктивных» (от англ. *restrictive* — ограничительный) условий, проявляется нарушение функционирования гена. Например, в организмах с *температурочувствительными мутациями* можно включать и выключать проявление нарушения, просто меняя температуру; таким образом, клетка, содержащая температурочувствительную мутацию в гене, необходимом для выживания, погибнет при рестриктивной температуре, но будет нормально размножаться при пермиссивной (рис. 8.55). Температурочувствительный ген в такой особи обычно содержит точечную мутацию, вызывающую небольшое изменение его белкового продукта.

В бактериальных генах, кодирующих необходимые для репликации ДНК белки, найдено множество температурочувствительных мутаций. Мутанты обна-

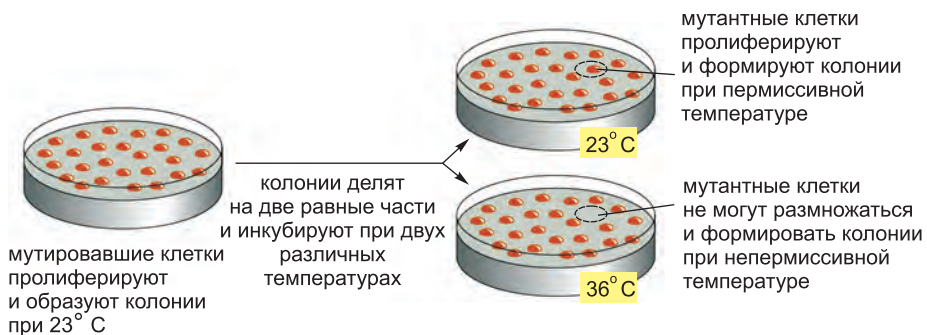


Рис. 8.55. Скрининг на температурочувствительных мутантах бактерий или дрожжей. Обработанные мутагеном клетки растут при пермиссивной температуре. Они делятся и образуют колонии, которые методом отпечатков переносят на две одинаковые чашки Петри. Одну из этих чашек инкубируют при пермиссивной температуре, вторую — при рестриктивной. Клетки, содержащие температурочувствительную мутацию в гене, необходимом для пролиферации, могут делиться при нормальной, пермиссивной температуре, но не могут при рестриктивной (в данном случае, повышенной).

ружили при скрининге подвергнутых действию мутагенов популяций бактерий на наличие клеток, которые перестают синтезировать ДНК при нагревании от 30°С до 42°С. Эти мутанты впоследствии использовали для идентификации и описания соответствующих белков репликации ДНК (см. главу 5). Аналогично, скрининг на температурочувствительные мутации привел к идентификации многих белков, участвующих в регуляции клеточного цикла, а также множества белков, отвечающих за движение пептидов через секреторный путь дрожжей (см. приложение 13.1). Родственные подходы скрининга позволили определить функции ферментов, принимающих участие в принципиальных метаболических путях бактерий и дрожжей (этот вопрос рассмотрен в главе 2), а также идентифицировать продукты генов, ответственных за правильное развитие зародышей *Drosophila* (см. главу 22).

8.5.3. Мутации могут привести к потере или приобретению белком функции

Генные мутации разделяют на два класса: мутации «с потерей функции» и мутации «с приобретением функции». Мутации с потерей функции приводят к тому, что продукт гена либо не работает, либо работает слишком слабо; так можно понять, какую функцию выполняет нормальный ген. Мутации с приобретением функции приводят к тому, что продукт гена либо слишком активен, либо работает в неправильное время и в неправильном месте, либо работает по-другому (рис. 8.56).

На начальных этапах генетического анализа любой мутантной клетки или организма важно узнать, вызывает ли мутация потерю или приобретение функции. Стандартный тест состоит в определении того, является ли мутация *доминантной* или *рецессивной*. Доминантная мутация вызывает формирование мутантного фенотипа даже в присутствии нормальной копии гена. Рецессивная мутация не способна вызвать формирование мутантного фенотипа при наличии единственной копии гена дикого типа. Несмотря на то что были описаны случаи, когда мутация с потерей функции была доминантной, а мутация с приобретением функции — рецессивной, в большинстве случаев рецессивные мутации приводят к потере функции, а доминантные — к приобретению. Определить, является ли мутация рецессивной или



Рис. 8.56. Мутации генов, по-разному влияющие на белковые продукты. В данном примере белок дикого типа обладает в клетке специфической функцией, обозначенной красными лучами. Показаны мутации, которые отключают, усиливают или изменяют функцию при увеличении температуры. Белок с температурочувствительной условной мутацией несет аминокислотную замену (красная), которая препятствует его нормальному фолдингу при 37°С, но позволяет ему нормально сворачиваться и функционировать при 25°С. Такие условные мутации особенно полезны для исследования жизненно необходимых генов; для изучения функционирования гена организм можно выращивать в перmissive условиях, а затем переносить в restrictive условия.

доминантной, легко. Нужно просто скрестить мутанта с диким типом и получить диплоидные клетки или организмы. Полученное потомство будет гетерозиготным по мутации. Если мутантный фенотип в потомстве не найден, можно сделать вывод о рецессивности мутации и, скорее всего, она приведет к потере функции.

8.5.4. Тесты на комплементацию показывают, расположены ли две мутации в одном гене или в разных

Широкомасштабный генетический скрининг может дать много разных мутаций, проявляющихся в одинаковом фенотипе. Эти дефекты могут быть расположены в различных генах, функционирующих в одном и том же процессе, или могут быть разными мутациями одного гена. Альтернативные формы гена называют **аллелями**. Наиболее распространенное различие между аллелями — замена одной нуклеотидной пары, но различные аллели также могут нести делеции, замены или дупликации. Как тогда можно узнать, расположены ли две мутации, дающие одинаковый фенотип, в одном гене или в разных? Если мутации рецессивны, например, они приводят к потере функции определенного гена, можно провести **тест на комплементацию**, позволяющий определить, содержатся ли мутации в одном или разных генах. Для тестирования на комплементацию в диплоидном организме гомозиготную по одной мутации особь, обладающую двумя одинаковыми аллелями мутантного гена, скрещивают с особью, гомозиготной по второй мутации. Если обе мутации расположены в одном гене, то потомство будет иметь мутантный фенотип, потому что оно не будет обладать нормальными копиями данного гена (см. приложение 8.1). Если, наоборот, мутации лежат в различных генах, то полученное потомство будет относиться к нормальному фенотипу, потому что оно будет нести одну нормальную копию (и одну мутантную) каждого гена. Таким образом мутации дополняют друг друга и восстанавливают нормальный фенотип. Тест обнаруженных при генетическом скрининге мутантов на комплементацию показал, например, что дрожжам для переваривания сахара галактозы требуется 5 генов, *E. coli* для формирования функционирующих ресничек нужно 20 генов, в сборке вирусных частиц бактериофага Т4 участвует 48 генов и сотни генов необходимы для развития из оплодотворенного яйца взрослого круглого червя.

8.5.5. Порядок работы генов в метаболическом пути можно определить при помощи эпистаза

Обычно следующим шагом после идентификации набора генов, участвующих в определенном биологическом процессе, является определение порядка, в котором эти гены функционируют. Порядок генов проще всего объяснить на примере метаболических путей, где, например, фермент А необходим для синтеза субстрата для фермента В. В этом случае можно сказать, что в метаболическом пути ген, кодирующий фермент А, работает до гена, кодирующего фермент В. Точно так же в случае, если один белок регулирует активность другого, мы скажем, что первый ген работает до второго. Порядок генов во многих случаях можно определить просто при помощи генетического анализа без каких-либо знаний о механизме действия продуктов генов.

Предположим, что у нас есть биосинтетический процесс, состоящий из последовательных этапов, причем выполнение этапа В происходит только после завершения этапа А. Предположим также, что для этапа А необходим *ген* А, а для этапа В — *ген* В. Тогда нуль-мутация (мутация, отключающая функцию)

в гене А остановит процесс на этапе А, вне зависимости от того, функционирует ген В или нет. С другой стороны, нуль-мутация в гене В вызовет остановку на этапе В только тогда, когда ген А все еще активен. В таком случае говорят, что ген А является *эпистатическим* по отношению к гену В. Сравнение фенотипов различных комбинаций мутаций позволяет определить порядок работы генов. Такой анализ называется **эпистазом**. При помощи эпистаза проанализирован путь секреции белков у дрожжей. Различные мутации в этом пути приводят к не наблюдающейся в норме аккумуляции белков в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) или аппарате Гольджи. Когда создают клетку дрожжей, несущую мутацию, блокирующую процессинг белков в ЭР и мутацию, блокирующую процессинг в аппарате Гольджи, белки скапливаются в ЭР. Это указывает на то, что до секреции белки должны пройти через ЭР, прежде чем они будут отправлены в аппарат Гольджи (**рис. 8.57**). Строго говоря, эпистаз может дать информацию о порядке генов в метаболическом пути только в том случае, если обе мутации являются нулевыми аллелями. Когда мутации частично восстанавливают свою функцию, их эпистатические взаимоотношения интерпретировать сложно.

Иногда двойной мутант может показать новый или более поврежденный фенотип по сравнению с любым из одиночных мутантов. Такой тип генетического взаимодействия называется *синтетическим* фенотипом, и если фенотип приводит к гибели организма, то он называется *синтетической леталью*. В большинстве случаев синтетический фенотип указывает на то, что два гена работают в двух разных параллельных путях, каждый из которых способен опосредовать один и тот же клеточный процесс. Таким образом, когда в двойном мутанте оба пути изменены, процесс полностью нарушается и наблюдается синтетический фенотип.

8.5.6. Гены, идентифицированные посредством мутаций, можно клонировать

Следующий шаг после получения в генетическом скрининге мутантных организмов — идентификация гена или генов, ответственных за измененный фенотип.

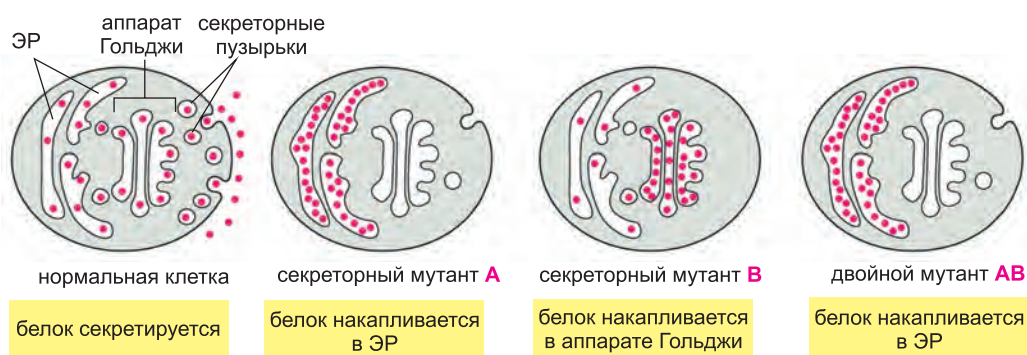


Рис. 8.57. Использование генетики для определения порядка функционирования генов. В нормальных клетках секретируемые белки погружаются в пузырьки, которые сливаются с плазматической мембраной и выбрасывают свое содержимое во внешнюю среду. Два мутанта, А и В, не способны секретировать белки. В мутанте А секреторные белки скапливаются в ЭР, в мутанте В секреторные белки — в аппарате Гольджи, а в двойном мутанте АВ белки — в ЭР. Это говорит о том, что в секреторном пути дефектный ген мутанта А работает до дефектного гена мутанта В.

Если фенотип создан путем инсерционного мутагенеза, определить положение нарушенного гена довольно просто. Фрагменты ДНК, содержащие вставку (например, транспозон или ретровирус), выделяют, амплифицируют при помощи ПЦР и расшифровывают нуклеотидную последовательность фланкирующей ДНК. Затем можно провести поиск по геномным базам данных открытых рамок считывания, содержащих эту фланкирующую последовательность.

Если для создания мутаций использовали повреждающее ДНК химическое соединение, задача идентификации инактивированного гена усложняется, но ее можно решить несколькими способами. В одном из них первым шагом является экспериментальное определение локализации гена в геноме. Для картирования нового гена сначала оценивают, как далеко он лежит от известных генов. Это дает его примерное положение на хромосоме. Оценку расстояния между генными локусами обычно производят путем *анализа групп сцепления*. Этот метод основан на том, что близко лежащие в хромосоме гены имеют тенденцию наследоваться вместе. Однако даже расположенные рядом гены могут быть разделены при рекомбинации в мейозе. Чем больше расстояние между локусами генов, тем больше вероятность того, что они будут разделены при кроссинговере (см. приложение 8.1). Расчет частоты рекомбинации между двумя генами дает примерное расстояние между ними. Если положение в геноме одного гена известно, то тогда можно оценить положение другого.

Поскольку гены не всегда локализованы настолько близко друг к другу, что можно точно указать их локализацию, для оценки положения неизвестного гена в анализе групп сцепления часто используются физические маркеры, расположенные вдоль генома. Этими маркерами обычно служат короткие нуклеотидные участки с известными последовательностями и локализацией в геноме, существующие по крайней мере в двух аллельных формах. Наиболее простыми маркерами служат *однонуклеотидные полиморфизмы* (*Single-Nucleotide Polymorphism, SPN*; на русском научном сленге их иногда называют «снипами»), короткие последовательности, различающиеся у особей популяции на одну нуклеотидную пару. SNP могут быть обнаружены при помощи методов гибридизации. Для различных организмов найдено множество таких физических маркеров, распределенных по всей длине хромосом. Если эти маркеры расположены достаточно плотно, анализ групп сцепления, направленный на поиск совместного наследования одного или нескольких SNP с мутантным фенотипом, позволяет свести потенциальную локализацию гена к области хромосомы, содержащей всего несколько последовательностей генов. Затем напрямую исследуют структуру и функцию этих генов и определяют, который из них ответственен за исходный мутантный фенотип.

8.5.7. Генетика человека обладает особыми задачами и возможностями

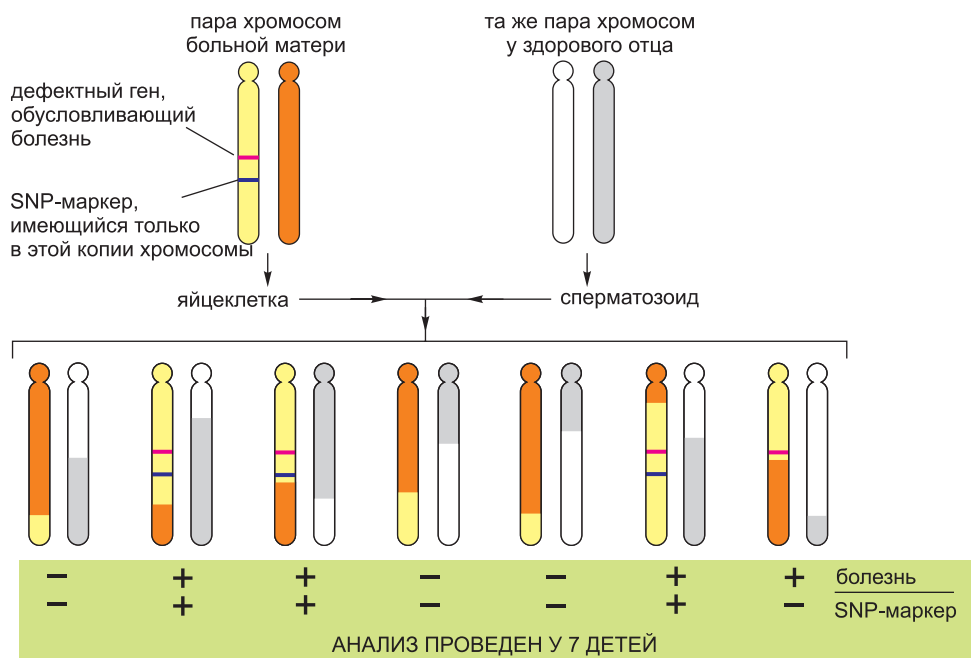
Несмотря на то что генетические эксперименты на людях считаются неэтичными и запрещены законом, люди страдают от большого количества генетических заболеваний. Описанный выше анализ групп сцепления может быть использован для идентификации генов, ответственных за такие наследственные состояния. Такого рода исследования требуют образцов ДНК большого количества семей, страдающих одним наследственным заболеванием. Эти образцы исследуют на присутствие физических маркеров, например SNP, которые могут быть тесно сцеплены с геном

заболевания, то есть наследоваться всеми больными людьми, но не их здоровыми родственниками. Затем ген заболевания локализируют, как описано выше (рис. 8.58). Например, так открыты гены муковисцидоза и болезни Хантингтона.

Отметим, что яйцеклетка или сперматозоид будут передавать от родителя ребенку только одну из пары хромосом.

8.5.8. Гены человека наследуются гаплотипными блоками, что помогает в поиске мутаций, вызывающих болезни

Обладая полной последовательностью человеческого генома, сейчас мы можем изучать генетику человека способами, недоступными еще несколько лет назад. Например, мы можем начать идентифицировать различия ДНК, благодаря которым один человек отличается от другого. Не существует двух людей (за исключением



ВЫВОД: ген, обуславливающий заболевание, наследуется вместе с SNP-маркером от больной матери с вероятностью 75 %. При схожей корреляции, наблюдаемой у других обследованных семей ген, обуславливающий заболевание, выявляется на этой же хромосоме близко к SNP. Замечено, что SNP, находящийся либо на той же хромосоме, но далеко от гена, либо расположенный на другой хромосоме, будет совместно наследоваться только в 50 % случаев.

Рис. 8.58. Анализ групп сцепления при помощи физических маркеров ДНК для нахождения гена у человека. Показано сцепленное наследование специфического человеческого фенотипа (здесь — генетического заболевания) с маркером SNP. Если люди, наследующие болезнь, также почти всегда наследуют маркер SNP, то вызывающий заболевание ген и SNP, скорее всего близко расположены в хромосоме, как показано на рисунке. Чтобы доказать статистическую достоверность наблюдаемого сцепления, необходимо протестировать сотни людей. Отметим, что сцепление будет абсолютным только в том случае, если маркер SNP расположен в самом гене. Таким образом, SNP иногда будет отделен от гена заболевания при кроссинговере в мейозе во время формирования яйцеклетки или сперматозоида: этот случай показан в самой правой паре хромосом. При работе с секвенированным геномом процедуру будут повторять с SNP, расположенными по обеим сторонам от исходного SNP, до тех пор, пока не будет найдено абсолютное сцепленное наследование.

однойцевых близнецов) с одинаковым геномом. Каждый из нас несет набор полиморфизмов — различий в нуклеотидной последовательности, — которые делают нас уникальными. Эти полиморфизмы можно использовать в качестве маркеров для создания генетических карт и проведения генетического анализа для соотношения определенных полиморфизмов со специфическими заболеваниями или предрасположенностью к ним.

Проблема состоит в том, что нуклеотидные последовательности двух людей обычно различаются на 0,1% (примерно одно различие на 1000 п. н.). Это дает 3 миллиона различий между двумя людьми. Теоретически для идентификации одного или двух таких полиморфизмов, ответственных за наследственную болезнь или предрасположенность к ней, необходимо просмотреть 3 миллиона полиморфизмов. Чтобы сократить количество работы, исследователи используют недавнее открытие того факта, что человеческие гены наследуются блоками.

Человеческий вид относительно молод, и считается, что мы произошли от относительно небольшой популяции людей, живших в Африке 10 тысяч лет назад. Поскольку всего несколько сотен поколений отделяют нас от этой праотческой популяции, большие участки человеческих хромосом перешли от родителей ребенку не тронутыми происходящей в мейозе рекомбинацией. На самом деле мы видим, что определенные наборы аллелей (включая SNP) наследуются в пределах хромосом крупными блоками. Предковые участки хромосом — наборы аллелей, наследовавшиеся от поколения к поколению кластерами с незначительными генетическими изменениями, — называются **гаплотипными блоками**. Как и гены, SNP и другие генетические маркеры, существующие в различных аллельных формах, гаплотипные блоки также имеют всего несколько разновидностей, свойственных человеческой популяции, каждая из которых представляет собой комбинацию аллелей, унаследованную от общего предка много сотен лет назад.

В настоящее время исследователи создают карту человеческого генома, основанную на этих гаплотипных блоках, носящую название **карты гаплотипов** (haplotype map — hapmap). Ученые-генетики надеются, что карта гаплотипов человека сделает поиск вызывающих болезни генов и генов восприимчивости легче достижимым. Вместо перебора всех многих миллионов SNP человеческой популяции, сейчас для идентификации гаплотипного блока, наследуемого людьми, страдающими наследственным заболеванием, достаточно просмотреть значительно меньший набор избранных SNP. (Эти исследования до сих пор требуют образцов ДНК большого количества людей, и поиск по SNP сейчас обычно производится при помощи роботизированных методов.) Если определенный гаплотипный блок чаще встречается у больных людей, чем у здоровых, то мутация, связанная с заболеванием, скорее всего будет расположена в том же участке ДНК (**рис. 8.59**). Затем для поиска гена, связанного с заболеванием, исследователи могут сосредоточиться на специфическом участке в пределах блока. Такой подход, в принципе, должен позволить анализировать генетику таких распространенных заболеваний, в которых несколько генов вызывают восприимчивость.

Подробное исследование гаплотипных блоков может даже указать нам на аллели, наследованию которых способствовал естественный отбор. Как правило, когда появляется новая аллель гена, не способствующая отбору особи, необходимо длительное время для того, чтобы эта аллель стала в популяции распространенной. Чем распространеннее и, соответственно, древнее аллель, тем меньше должен быть окружающий ее гаплотипный блок, поскольку от поколения к поколению вероят-

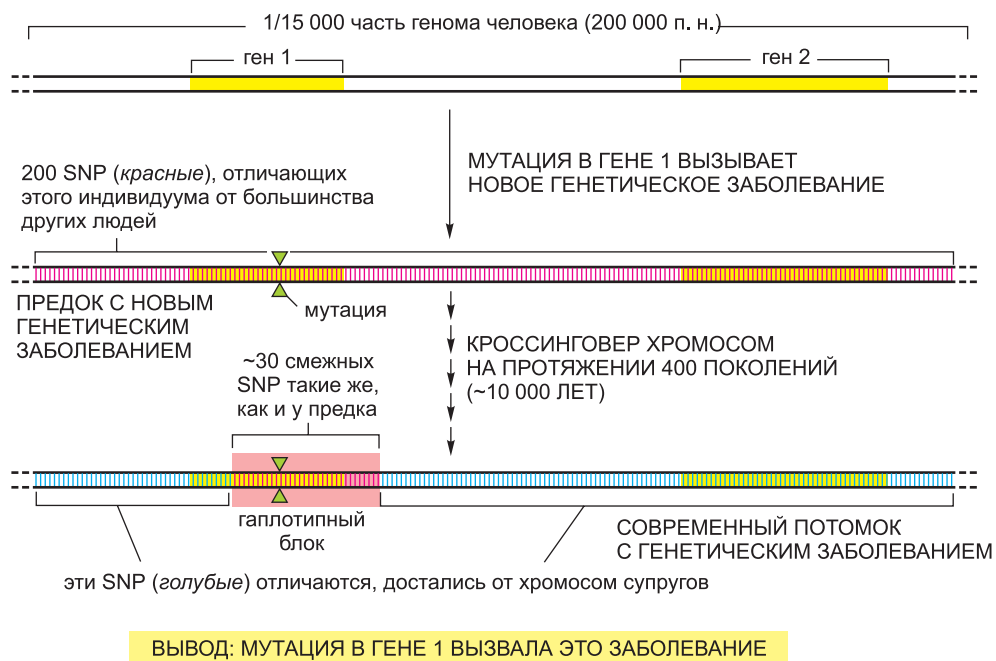


Рис. 8.59. Отслеживание наследования SNP в пределах гаплотипного блока для локализации вызывающего заболевание гена. Предок, приобретший вызывающую заболевание мутацию в гене 1, передаст ее своим потомкам. Часть этого гена расположена в гаплотипном блоке (красная штриховка) — кластере вариаций (около 30 SNP), который наследовался от предка непрерывно. За 400 поколений, отделяющих предка от современных потомков, несущих заболевание, SNP, расположенные в большей части предковой 200-тысячной нуклеотидной последовательности, в геноме потомка были перетасованы мейотической рекомбинацией (голубой). (Отметим, что перекрытие желтых и красных участков выглядит оранжевым, в перекрытие желтых и голубых — зеленым.) Однако 30 SNP в гаплотипном блоке наследовались вместе, поскольку они никогда не участвовали в кроссинговере. Чтобы локализовать ген, вызывающий заболевание, необходимо проанализировать распределение SNP у больных людей. Человек, страдающий этим наследственным заболеванием, сохранит предковое распределение SNP, расположенных в показанном гаплотипном блоке. В результате будет показано, что вызывающая болезнь мутация лежит в пределах гаплотипного блока, то есть в гене 1. Изящество использования карт гаплотипов для такого рода анализа состоит в том, что нужно исследовать только часть всех SNP: для локализации гена необходимо провести поиск среди примерно 10% от 3 миллионов полезных SNP человеческого генома.

ность ее отделения от соседних вариаций путем рекомбинации во время мейоза становилась все выше.

Новая аллель может быстро распространиться в популяции, только если она обеспечивает организму какое-нибудь значительное преимущество. Например, могут быть отобраны мутации или вариации, которые делают организм более устойчивым к инфекциям, поскольку такие организмы имеют больше шансов выжить и передать мутацию своему потомству. Работая с картами гаплотипов отдельных генов, исследователи обнаружили вероятный отбор двух таких человеческих генов, отвечающих за устойчивость к малярии. Эти аллели, снижающие восприимчивость к болезни, широко распространены в популяции, но они расположены в необычно крупных гаплотипных блоках. Это указывает на то, что они возникли в человеческом генофонде недавно (рис. 8.60).

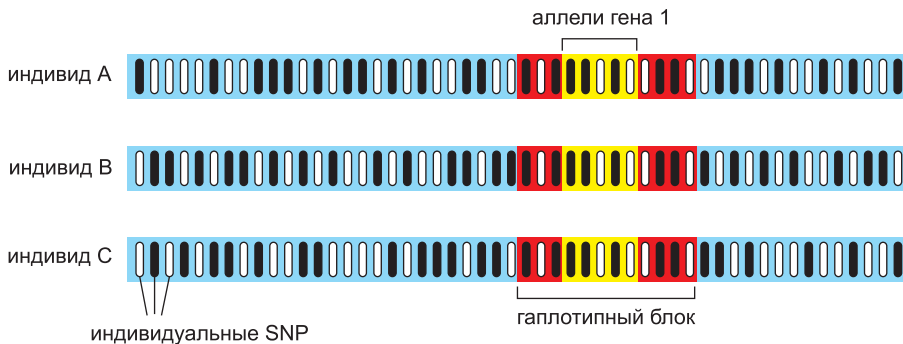
Открывая пути, по которым эволюционировал человек, карты гаплотипов позволяют заглянуть в наше прошлое; помогая нам открывать гены, делающие нас восприимчивыми или устойчивыми к заболеваниям, карты также могут дать нам примерные сведения о нашем будущем.

8.5.9. На сложные признаки влияет несколько генов

У профессионального пианиста может быть тетьа, играющая на скрипке. В другой семье все родители и дети могут быть толстыми. В третьей семье бабушка может быть алкоголичкой, а ее внук употреблять наркотики. До какой степени эти характеристики — музыкальные способности, ожирение и зависимость — генетически наследуются? На этот вопрос очень сложно ответить. Некоторые признаки или заболевания характерны для определенных семей, но проявляются только у некоторых родственников или без очевидной логики.

Характеристики, не следующие простым (иногда называемым менделевскими) принципам наследования, но обладающие наследственным компонентом, называют **сложными признаками**. Эти признаки часто **полигенны**, то есть на них влияют

- а) размер гаплотипного блока, окружающего типичный аллель



- б) исключительно крупный гаплотипный блок, окружающий особый аллель гена 2

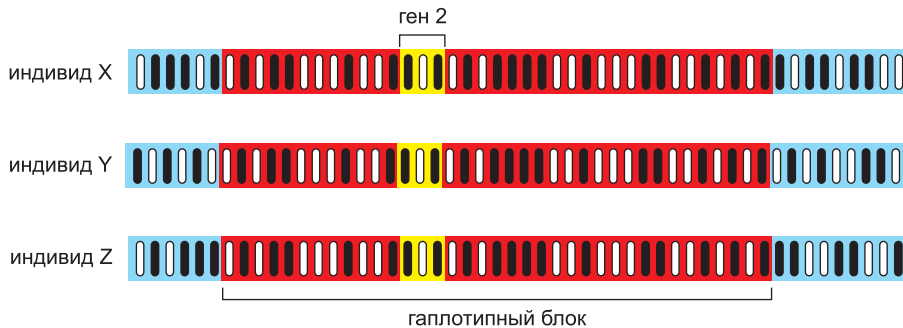


Рис. 8.60. Идентификация аллелей, отобранных в относительно недавний период человеческой истории, по необычно крупным гаплотипным блокам, в которых они расположены. На данной схеме SNP показаны вертикальными полосами, которые окрашены *белым* или *черным* в зависимости от их последовательности ДНК. Гаплотипные блоки показаны *красным*, гены — *желтым*, остальные части хромосомы — *голубым*. Эти данные говорят о том, что данная аллель гена 2 возникла относительно недавно в человеческой истории.

несколько генов, каждый из которых вносит вклад в результирующий фенотип. Влияние этих генов аддитивно, все вместе эти гены создают непрерывный спектр варьирующих характеристик популяции. Передачу потомству отдельных генов, вносящих вклад в полигенный признак, легко отследить, но поскольку они все влияют на фенотип, принципы формирования наследственных признаков часто бывают очень сложными.

Простым примером полигенного признака является цвет глаз, который определяют ферменты, управляющие синтезом и распределением пигмента меланина: чем больше синтезируется меланина, тем темнее цвет глаз. Поскольку в формировании меланина задействовано множество генов, цвет глаз у людей очень сильно изменяется: от бледно-серого до шоколадно-коричневого.

Несмотря на то что заболевания, вызванные мутациями единственного гена (например, серповидно-клеточная анемия и гемофилия), были одними из первых открытых наследуемых фенотипов человека, лишь малая часть признаков определяется одним геном. Наиболее очевидные человеческие фенотипы — от роста, веса, цвета глаз и волос до интеллекта, темперамента, общительности и чувства юмора — являются продуктом взаимодействия многих генов. Сейчас с уверенностью можно сказать, что предрасположенность к наиболее распространенным человеческим заболеваниям, таким как диабет, сердечные болезни, высокое кровяное давление, аллергии, астма и различные психические расстройства, включая серьезные депрессии и шизофрению, также определяется несколькими генами. Исследователи ищут новые подходы, включая использование рассмотренных выше карт гаплотипов, для понимания сложных взаимодействий между генами, работающими вместе для создания многих «чисто человеческих» признаков.

8.5.10. Обратная генетика начинает с известного гена и определяет клеточный процесс, в котором необходимо его функционирование

Как показано выше, классическая генетика начинает с мутантного фенотипа (или, в случае людей, набора признаков) и идентифицирует ответственные за него мутации (а затем и гены). Методы рекомбинантных ДНК в сочетании с секвенированием генома сделали возможным другой тип генетического подхода. Вместо того чтобы начинать с мутантного организма и использовать его для нахождения гена и белка, исследователь может начать с определенного гена и делать в нем мутации, создавая мутантные клетки или организмы для анализа функции гена. Поскольку такой подход движется в обратном направлении по отношению к традиционным генетическим изысканиям, двигаясь от гена к мутациям, а не наоборот, его часто называют **обратной генетикой**.

Обратная генетика начинается с клонированного гена, выделенного из клетки белка, обладающего интересными свойствами, или просто с геномной последовательности. Если начальной точкой служит белок, сначала идентифицируют кодирующий его ген и, если необходимо, определяют его нуклеотидную последовательность. Затем для создания мутантной версии последовательность гена можно изменить *in vitro*. Такой сконструированный мутантный ген вместе с подходящим регуляторным участком переносят в клетку, где он может встроиться в хромосому, становясь постоянной частью генома. Все потомки модифицированной клетки будут содержать мутантный ген.

Если исходной клеткой, использованной для переноса гена, была оплодотворенная яйцеклетка, то можно получить целый многоклеточный организм, содержащий мутантный ген, при условии, что мутация не является летальной. В некоторых

из таких животных измененный ген вставляется в предшественники гамет, позволяя мутантному гену передаваться потомству. Такой подход называется *генеративной мутацией*.

8.5.11. Гены можно конструировать несколькими способами

Мы видели, что отсутствие определенного гена у мутантного организма может быстро указать на функцию кодируемого этим геном белка. Поэтому «нокаут» генов, при котором обе копии гена в диплоидном организме инактивируются или удаляются, является особенно полезным типом мутации. Однако существует еще огромное множество доступных экспериментаторам способов перестройки генов. Например, изменяя перед вставкой гена в геном его регуляторный участок, можно создать мутантный организм, в котором продукт гена будет синтезироваться в аномально больших количествах, в другой ткани или в неправильный период развития (**рис. 8.61**). Помещая ген под контроль *индуцируемого промотора*, можно включать и выключать его в любой момент, наблюдая вызываемые этим эффекты. Индуцируемые промоторы, работающие только в определенной ткани, можно использовать для исследования влияния активации (или инактивации) гена только в этой ткани. Наконец, *доминантно-негативные* мутации часто применяют в случае организмов, для которых введение нового измененного гена в геном проще, чем замена уже существующих. В доминантно-негативном подходе используется тот факт, что большинство белков функционирует в составе больших белковых комплексов. Включение всего одного нефункционирующего компонента часто инактивирует такие комплексы. Таким образом, конструируя ген, дающий большие количества неактивного, но способного встроиться в комплекс мутантного белка, часто получают клетки, в которых комплексы не функционируют даже в присутствии нормального белка (**рис. 8.62**).

При обсуждении классической генетики мы отмечали, если белок необходим для выживания клетки (или организма), то доминантно-негативный мутант будет нежизнеспособным. В результате функцию белка установить будет невозможно. Чтобы эта проблема не возникала в обратной генетике, можно сцепить мутантный ген с индуцируемым промотором. Это позволит синтезировать дефектный продукт гена только «по команде», например, в ответ на повышение температуры или в присутствии определенной сигнальной молекулы.

При изучении работы гена и кодируемого им белка не всегда нужно производить серьезные изменения, такие как забивание клетки огромными количествами белка или полное удаление продукта гена. Иногда полезно делать небольшие изменения в белковой структуре, позволяющие начать анализировать, какие части белка важны для его функционирования. Активность фермента, например, можно исследовать путем изменения единственной

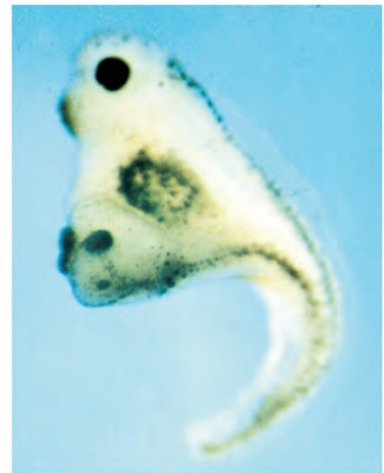


Рис. 8.61. Эктопическая неправильная экспрессия Wnt, сигнального белка, влияющего на формирование оси тела в ранних эмбрионах *Xenopus*. В данном эксперименте мРНК, кодирующую Wnt, ввели в вентральный вегетативный бластомер, что привело к формированию второй оси тела (см. главу 22). (Из S. Sokol et al., *Cell* 67: 741–752, 1991. С любезного разрешения Elsevier.)



Рис. 8.62. Доминантно-негативное действие белка. Создан кодирующий мутантный белок ген, который препятствует нормальным копиям того же белка выполнять свои функции. В приведенном простом примере нормальный белок становится активным только в составе комплекса, а мутантный белок блокирует функцию, формируя смешанный неактивный комплекс. Таким образом, единственная копия мутантного гена в любом месте генома способна инактивировать нормальные продукты других копий гена.

аминокислоты в его активном сайте. Для такой тонкой перестройки генов (и, следовательно, их белковых продуктов) необходимы специальные методы. Первым шагом часто бывает химический синтез короткой молекулы ДНК, содержащей нужный измененный участок нуклеотидной последовательности гена. Эту синтетическую олигонуклеотидную ДНК гибридизуют с одноцепочечной плазмидной ДНК, содержащей последовательность, которую необходимо изменить. Условия гибридизации позволяют спаривание частично комплементарных цепей ДНК. Синтетический олигонуклеотид станет праймером для синтеза ДНК ДНК-полимеразой. В результате получится двойная спираль ДНК, несущая в одной из цепей измененную последовательность. После трансфекции получают плазмиды, содержащие полностью модифицированную последовательность гена. Затем измененную ДНК вводят в вектор экспрессии, чтобы перестроенный белок синтезировать в соответствующем типе клеток и подробно исследовать его функцию. Такой метод изменения аминокислотных остатков в белке, носящий название **сайт-направленного мутагенеза**, позволяет точно определить, какие участки полипептидной цепи играют ключевую роль в сворачивании белков, их взаимодействии с другими молекулами или в ферментативном катализе (рис. 8.63).

8.5.12. Модифицированные гены можно вводить в зародышевые линии многих организмов

Измененные гены можно доставить в клетки несколькими способами. ДНК можно вводить в клетки млекопитающих путем микроинъекции стеклянной микропипеткой или через вирус, несущий чужеродные гены. В клетки растений гены часто вводят методом бомбардировки частицами: образцы ДНК наносят на маленькие золотые гранулы, которыми затем в прямом смысле выстреливают из специально модифицированного пистолета, пробивая клеточную стенку. *Электропорация* — это преимущественный метод введения ДНК в бактерии и некоторые другие клетки. В данном подходе короткий электрический разряд временно делает клеточную мембрану проницаемой, позволяя чужеродной ДНК проникнуть в цитоплазму.

В отличие от высших эукариот (многоклеточных и диплоидных), бактерии, дрожжи и клеточный слизевик *Dictyostelium* обычно существуют в виде гаплоидных

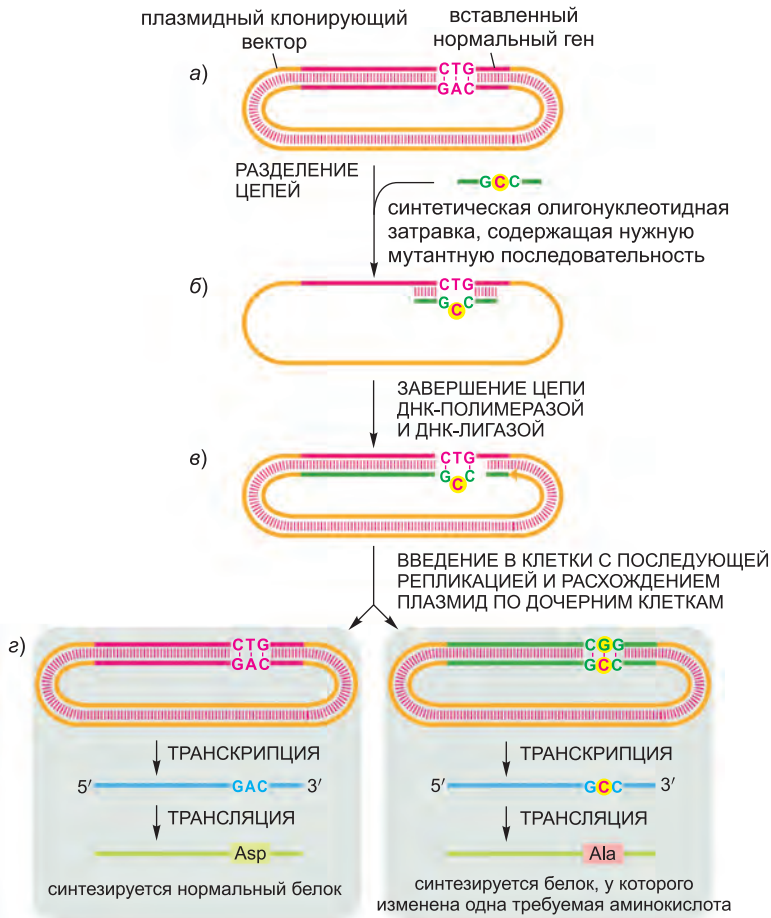


Рис. 8.63. Использование синтетических олигонуклеотидов для модификации кодирующего белок участка гена методом сайт-направленного мутагенеза. (а) Рекombинантная плаزمид, содержащая вставку гена, разделяется на две цепи ДНК. Синтетический олигонуклеотидный праймер, комплементарный части последовательности гена, но содержащий один измененный нуклеотид в определенной точке, добавляют к одноцепочечной ДНК в условиях, допускающих неидеальную гибридизацию (см. рис. 8.36). (б) Праймер гибридизуется с ДНК, создавая одну некомплементарную нуклеотидную пару. (в) Рекombинантную плазмиду делают двухцепочечной путем синтеза ДНК *in vitro* (начиная с праймера) и последующего сшивания разрывов ДНК-лигазой. (г) Двухцепочечную ДНК вводят в клетку, где она реплицируется. Репликация, использующая одну из цепей в качестве шаблона, дает нормальную молекулу ДНК, но репликация с другой цепью (той, которая содержит праймер) дает молекулу ДНК, несущую нужную мутацию. Только половина клеток-потомков будет содержать плазмиду с нужным мутантным геном. Однако клетку-потомка, обладающую мутантным геном, можно идентифицировать, отделить от остальных клеток и культивировать для получения чистой популяции клеток, несущих мутацию. Показано только одно изменение, которое можно создать при помощи данного метода. При помощи олигонуклеотидов с соответствующей последовательностью можно за раз делать больше одной аминокислотной замены, а также вставлять или удалять одну или несколько аминокислот. На рисунке не показано, но можно создавать сайт-специфические мутации при помощи соответствующих олигонуклеотидов и ПЦР для амплификации мутантного гена (вместо репликации плазмид).

одиноким клеткам. В этих организмах искусственно введенная молекула ДНК, несущая мутантный ген, с относительно большой частотой может заменить единственную копию нормального гена путем гомологичной рекомбинации; следовательно, легко получают клетки, в которых нормальный ген заменен на мутантный (рис. 8.64, а). Таким образом, можно создавать клетки, у которых отсутствует определенный белок или синтезируется его альтернативная форма. Возможность проводить прямую замену генов в низших эукариотах в сочетании с эффективностью стандартных методов генетического анализа в этих гаплоидных организмах в значительной степени объясняет, почему исследования этих типов клеток так важны для понимания механизмов клеточных процессов, свойственных всем эукариотам.

8.5.13. Можно изменять геном животных

Также возможно добавлять и заменять гены в животных и растениях, но методология в этом случае сложнее. Животные и растения, генетически модифицированные посредством вставки, удаления или замещения генов, называют **трансгенными организмами**, а любые чужеродные или измененные гены — **трансгенами**. Мы сконцентрируем наше внимание на трансгенных мышах, так как в этой области достигнут огромный прогресс. Если молекулу ДНК, несущую мутантный мышинный ген, перенести в клетку мыши, она обычно встраивается в хромосому случайным образом, но примерно один раз из тысячи она замещает одну или две копии нормального гена путем гомологичной рекомбинации. Пользуясь этими редкими случаями направленного воздействия на гены, любой конкретный ген в клетке мыши можно путем прямой замены изменить или инактивировать. В таком особом случае, когда обе копии интересующего гена полностью инактивированы или удалены, получившихся животных называют **«нокаутными» мышами**.

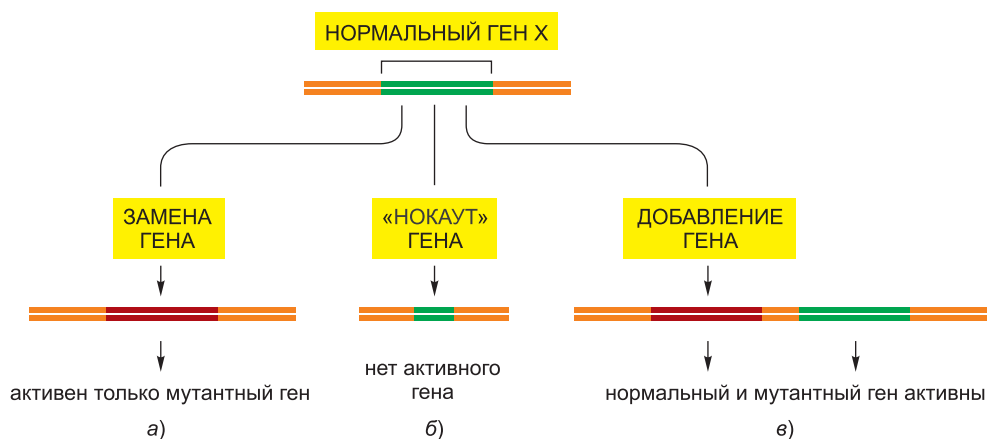


Рис. 8.64. Замена, нокаут и добавление генов. Для создания трансгенного организма нормальный ген можно изменить несколькими способами. (а) Нормальный ген (зеленый) может быть полностью заменен его мутантной копией (красная). Это позволяет получить информацию об активности мутантного гена без вмешательства нормального гена, и, следовательно, можно наблюдать эффекты маленьких мутаций. (б) Нормальный ген можно полностью инактивировать, например, сделав в нем большую делецию. (в) Мутантный ген можно просто добавить в геном. Для некоторых организмов это самый простой в исполнении тип генетической инженерии. Такой подход может дать полезную информацию в случае, когда введенный мутантный ген подавляет функционирование нормального гена, например, при доминантно-негативной мутации (см. рис. 8.62).

Метод заключается в следующем. На первом этапе фрагмент ДНК, содержащий мутантный ген (или фрагмент ДНК, направленный на нарушение последовательности гена-мишени), вводят в вектор, а затем в культивируемые ЭС клетки (см. рис. 8.5), способные давать клетки различных типов. После периода клеточной пролиферации выделяют редкие колонии клеток, в которых, вероятно, произошла гомологическая рекомбинация, приведшая к замене гена. Правильные колонии отбирают методами ПЦР или Саузерн-блоттинга: они будут содержать рекомбинантные последовательности ДНК, в которых введенный фрагмент частично или полностью заменил одну копию нормального гена. На втором этапе отдельные ЭС клетки отобранной колонии помещают в тонкую микропипетку и вводят в ранний эмбрион мыши. Претерпевшие трансфекцию ЭС клетки взаимодействуют с клетками эмбриона-хозяина, что приводит к формированию нормально выглядящей мыши; некоторые части таких химерных животных, включая, если повезет, клетки зародышевой линии, часто развиваются из модифицированных ЭС клеток (рис. 8.65).

Мышей с трансгеном в их зародышевой линии затем разводят для получения самки и самца, гетерозиготных по замене гена (то есть они несут одну нормальную и одну мутантную копию гена). При скрещивании этих двух мышей одна четвертая часть их потомства будет гомозиготна по модифицированному гену. Изучение таких гомозигот позволяет исследовать функционирование измененного гена или влияние инактивации гена в отсутствие соответствующего нормального гена.

Возможность создавать трансгенных мышей, у которых отсутствует нормальный ген, стала прорывом. Сейчас метод используют для определения функций всех мышечных генов (рис. 8.66). Для создания условных мутантов, у которых функционирование интересующего гена нарушено в определенной ткани в конкретный момент развития, применяют специальные методы. Подход основан на сайт-специфическом вырезании — и, следовательно, удалении — системой рекомбинации гена-мишени в определенном месте или в определенное время. Наиболее распространена система рекомбинации, называемая **Cre/lox**, которая широко используется для замены генов в мышах и растениях (см. рис. 5.79). В данном случае ген-мишень в ЭС клетке заменяется на полностью функциональную версию гена, фланкированную парой коротких последовательностей ДНК, называемых *lox-сайтами* и узнаваемых белком *рекомбиназой Cre*. Получающиеся в результате трансгенные мыши обладают нормальным фенотипом. Их скрещивают с трансгенными мышами, у которых экспрессируется ген рекомбиназы Cre под контролем индуцируемого промотора. В определенных клетках или тканях, в которых включают Cre, она катализирует рекомбинацию между lox-последовательностями, вырезая ген-мишень и инактивируя его. Сходные системы рекомбинации используют для создания условных мутаций в *Drosophila* (см. рис. 22.49).

Если исходная модификация гена полностью инактивирует его функцию, то таких гомозиготных мышей называют нокаутными. Когда у таких мышей отсутствуют гены, функционирующие во время развития, они часто погибают задолго до достижения зрелости. Такие летальные дефекты подробно изучают для определения нормальной функции отсутствующего гена.

8.5.14. Трансгенные растения играют важную роль как в клеточной биологии, так и в сельском хозяйстве

Поврежденное растение часто может восстановить себя при помощи процесса, во время которого зрелые дифференцированные клетки «дифференцируются»,

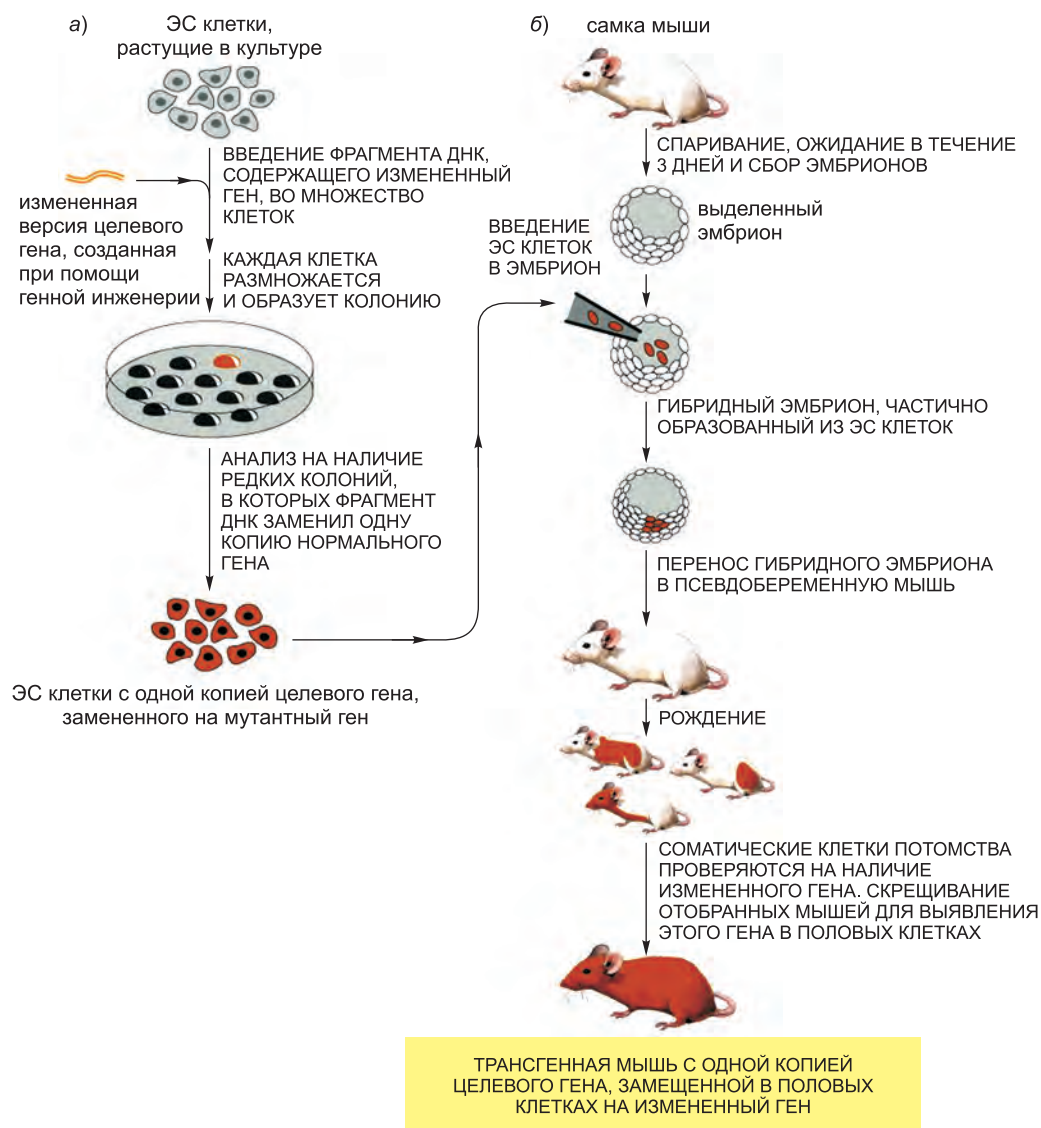


Рис. 8.65. Методы, используемые для замены генов в мышах. На первом этапе (а) модифицированную версию гена вводят в культивируемые ЭС клетки. Лишь в нескольких редких ЭС клетках соответствующие нормальные гены будут заменены на ген, измененный в процессе гомологичной рекомбинации. Несмотря на трудоемкость процедуры, эти редкие клетки можно идентифицировать и культивировать для получения множества потомков, каждый из которых будет нести один мутантный ген вместо одной из двух копий соответствующего нормального гена. На следующем этапе (б) эти модифицированные ЭС клетки вводят в очень ранний мышинный эмбрион. Клетки вживляются в растущий зародыш, и некоторые соматические клетки (показаны *оранжевым*) полученной в результате мыши будут нести измененный ген. Некоторые из этих мышей также будут содержать клетки зародышевой линии с модифицированным геном; при скрещивании с нормальной мышью часть потомства будет нести одну копию измененного гена во всех своих клетках. Если скрестить двух таких мышей (не показано), некоторые их потомки будут содержать два модифицированных гена (по одному на каждой хромосоме) во всех своих клетках.

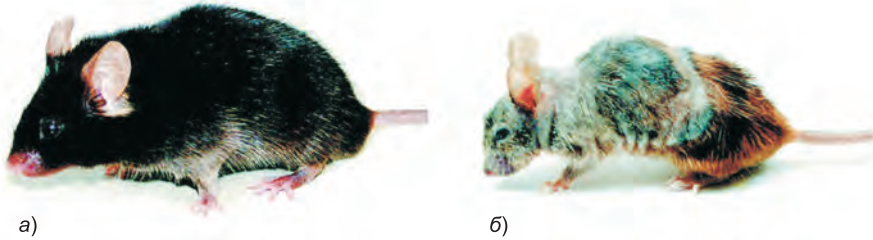


Рис. 8.66. Трансгенные мыши, экспрессирующие мутантную ДНК-хеликазу, преждевременно стареют. Хеликаза, кодируемая геном *Xpd*, участвует в транскрипции и репарации ДНК. По сравнению с мышью дикого типа того же возраста (а) у трансгенной мыши (б), экспрессирующей дефектную версию *Xpd*, проявляется множество признаков преждевременного старения, включая остеопороз, истощение, седину, бесплодие и меньшую продолжительность жизни. Используемая здесь мутация в *Xpd* нарушает активность хеликазы и имитирует мутацию, которая у людей вызывает трихотриодистрофию, заболевание, характеризующееся ломкими волосами, нарушениями развития скелета и очень маленькой продолжительностью жизни. Эти результаты указывают на то, что накопление повреждений ДНК может вносить вклад в процессы старения как у мышей, так и у людей. (Из J. de Boer et al., *Science* 296: 1276–1279, 2002. С любезного разрешения издательства AAAS.)

пролиферируют и затем снова дифференцируются в другой тип клеток. При некоторых условиях дедифференцированные клетки могут даже сформировать апикальную меристему, которая затем даст начало абсолютно новому растению, включая гаметы. Такая удивительная гибкость развития растительных клеток может быть использована для создания трансгенных растений из клеток, растущих в культуре.

Когда образец ткани растения культивируют в стерильной среде, содержащей питательные вещества и соответствующие регуляторы роста, многие клетки пролиферируют бесконечно и беспорядочно, формируя массу относительно недифференцированных клеток, называемую *каллюсом*. Аккуратная манипуляция питательными веществами и регуляторами роста позволяет стимулировать формирование в каллусе апикальных меристем сначала побегов, а потом корней. Для многих видов таким образом можно воссоздать целое новое растение.

Каллюсные культуры можно механически диссоциировать на отдельные клетки, которые будут расти и делиться в суспензионной культуре. В случае некоторых растений, включая табак, петунию, морковь, картофель и *Arabidopsis*, единственную клетку, выделенную из суспензионной культуры, можно вырастить в маленький сгусток (клон), из которого можно воссоздать целое растение. Клетка, из которой может быть выращена любая часть организма, называется **тотипотентной**. Так же, как можно получить мутантную мышь путем генетических манипуляций ЭС клетками в культуре, создают трансгенное растение из единственной тотипотентной растительной клетки, претерпевшей трансфекцию ДНК в культуре (**рис. 8.67**).

Методы получения трансгенных растений значительно ускорили прогресс во многих областях клеточной биологии растений. Например, они сыграли важную роль в выделении рецепторов регуляторов роста и анализе механизмов морфогенеза и экспрессии генов у растений. Также они открыли множество возможностей в сельском хозяйстве, приносящих пользу как потребителям, так и производителям. Например, стало возможным модифицировать липиды, крахмал и белки, запасаемые

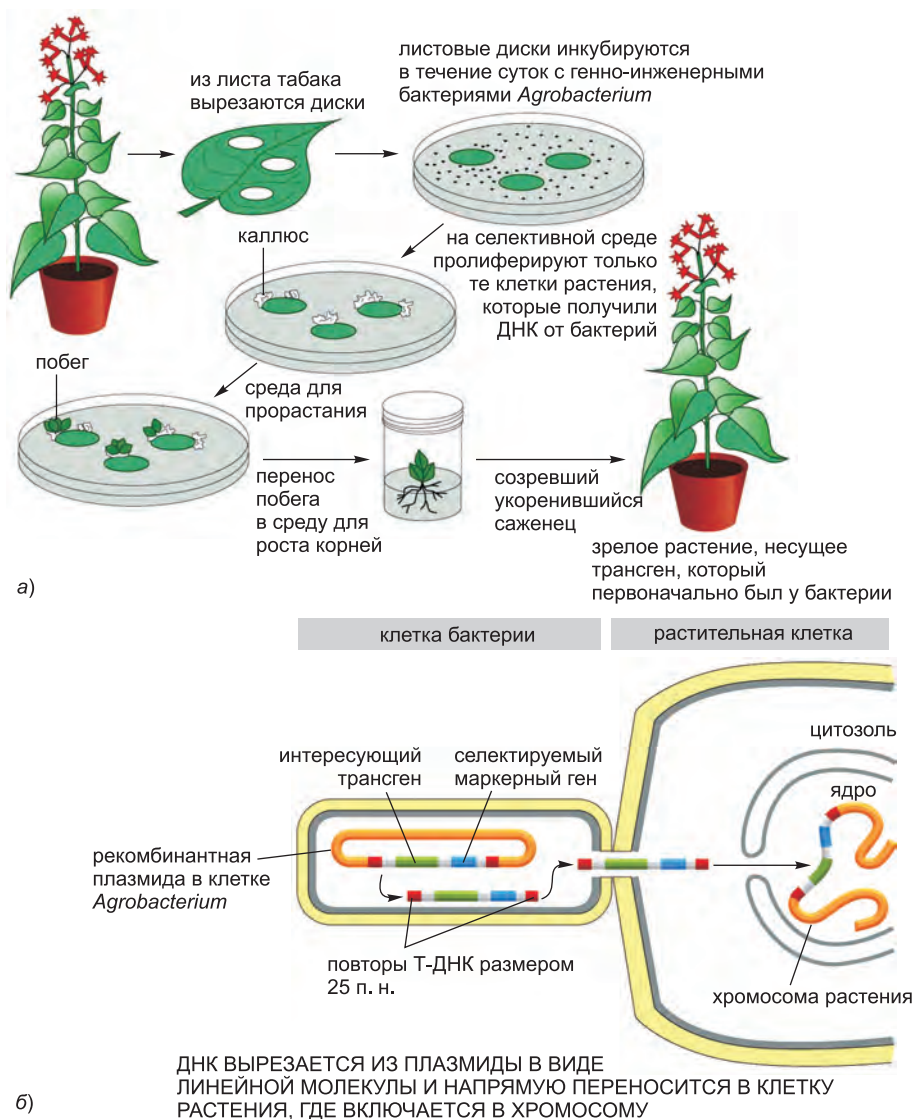


Рис. 8.67. Процесс получения трансгенного растения. (а) Краткий обзор процесса. Из листа вырезают круглый участок и инкубируют его в культуре вместе с клетками *Agrobacterium*, несущими рекомбинантную плазмиду с селективным геном-маркером и нужным трансгеном. Поврежденные клетки на краю диска выделяют вещества, привлекающие клетки *Agrobacterium*. Затем бактерии вводят ДНК в эти клетки. Только те клетки растения, которые приняли соответствующую ДНК и экспрессируют селективный маркерный ген, выживут и будут пролифелировать и образовывать каллус. Манипуляция регуляторами роста и питательными веществами заставляет каллус формировать побеги, которые затем пускают корни и вырастают во взрослые растения, несущие трансген. (б) Приготовление рекомбинантной плазмиды и ее перенос в растительную клетку. Плазмиду *Agrobacterium*, в норме несущую последовательность Т-ДНК, модифицируют, вставляя селективный маркерный ген (например, ген устойчивости к канамицину) и нужный трансген между состоящими из 25 п. н. повторами Т-ДНК. Когда *Agrobacterium* узнает клетку растения, она эффективно передает цепь ДНК, несущую эти последовательности, в растительную клетку при помощи специальных механизмов, которые в норме переносят последовательность Т-ДНК плазмиды.

в семенах, для увеличения устойчивости к паразитам и вирусам, а также создавать растения, способные выживать в экстремальных условиях, например в солончаковых болотах или на сухой почве.

Многие важные прорывы в понимании развития животных сделаны в ходе изучения фруктовой мушки *Drosophila* и круглого червя *C. elegans*, которые легко поддаются классическому генетическому анализу и экспериментальным манипуляциям. Прогресс в биологии развития растений был в прошлом сравнительно медленным. Многие удобные для генетического анализа растения, такие как кукуруза и томат, обладают длинными жизненными циклами и очень крупными геномами, поэтому классический анализ и молекулярный генетический анализ требовали много времени. В последние годы все больше внимания уделяется более быстрорастущему маленькому сорняку резуховидке Таля (*Arabidopsis thaliana*), обладающему несколькими значительными достоинствами в качестве «модельного растения» (см. рис. 1.46 и 22.112). Относительно небольшой геном *Arabidopsis* стал первым полностью расшифрованным растительным геномом. Темпы исследования этого организма в настоящее время догоняют темпы исследования модельных животных.

8.5.15. Крупные собрания меченых нокауты позволяют изучать функции каждого гена организма

Для создания исчерпывающих библиотек мутаций в различных модельных организмах, включая *S. cerevisiae*, *C. elegans*, *Drosophila*, *Arabidopsis* и мышей, необходимы совместные усилия многих лабораторий. В каждом случае конечная цель — получение набора мутантных линий, в которых каждый ген организма систематически удаляется или изменяется так, чтобы он мог быть условно нарушенным. Такие коллекции станут незаменимым источником информации о функционировании генов в масштабе генома. В некоторых случаях отдельные мутации в библиотеке будут экспрессировать индивидуальные молекулярные маркеры в форме уникальных последовательностей ДНК, что сделает идентификацию измененного гена простой и быстрой.

В *S. cerevisiae* задача создания полного набора из 6000 мутантов, в каждом из которых отсутствует только один ген, упрощается благодаря склонности дрожжей к гомологичной рекомбинации. Для каждого гена готовят «кассету делеции». Кассета состоит из специальной молекулы ДНК, окружающей селективный маркер и содержащей 50 нуклеотидов, последовательность которых идентична концам гена-мишени. Более того, для ускорения последующей идентификации каждой полученной мутантной линии в эту молекулу ДНК вставляют специальную последовательность «штрих-код» (рис. 8.68). Затем в различных селективных условиях (например, ограничение по питательным веществам, перепады температуры или присутствие различных лекарств) можно вырастить большое число таких нокаутных мутантов. Выжившие клетки легко идентифицируются по своим уникальным маркерным последовательностям. С того, насколько хорошо себя чувствует каждый мутант в смеси, можно начать оценивать, какие гены являются жизненно важными, какие просто полезными, а какие необязательными для роста в различных условиях.

Сложность получения информации из такого исследования мутантов дрожжей состоит в определении на основе мутантного фенотипа активности гена или его биологической роли. Некоторые дефекты — неспособность жить без гистидина, например, — напрямую указывают на функцию гена дикого типа. Другие связи

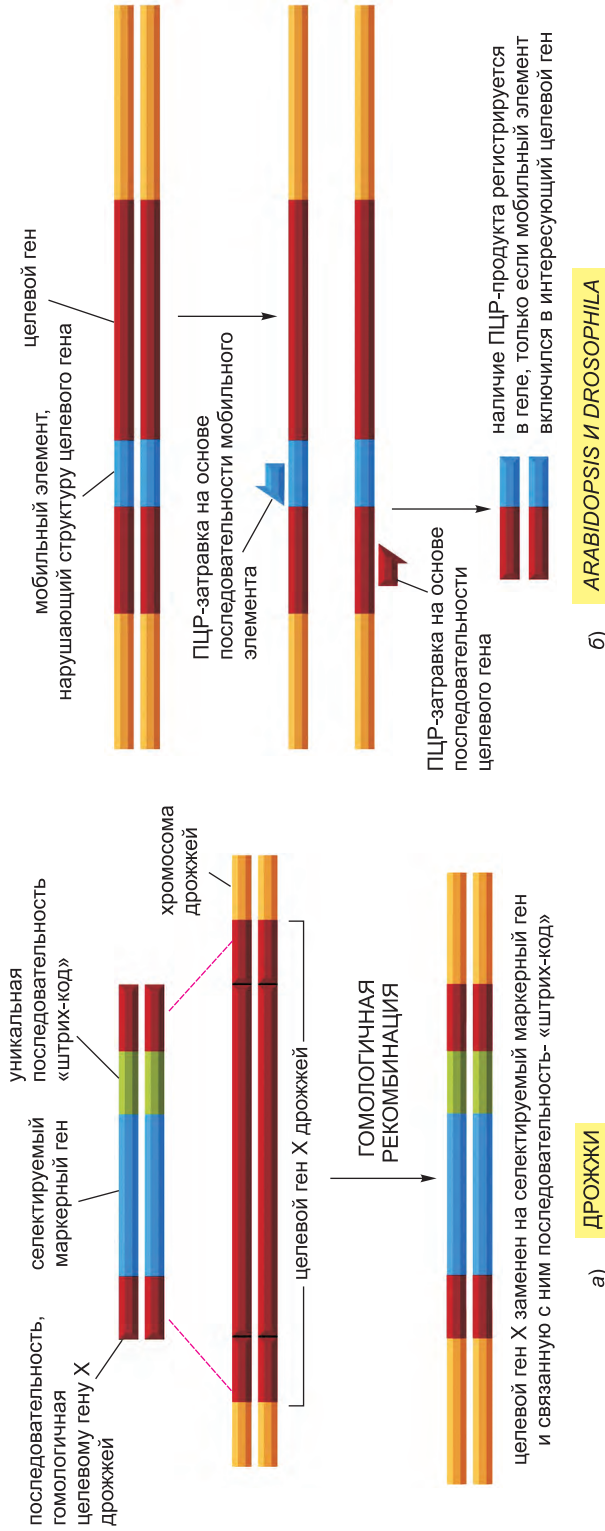


Рис. 8.68. Создание коллекций мутантных организмов. (а) Кассета делеции для использования в дрожжах содержит последовательности ДНК (красные), гомологичные каждому концу гена-мишени X, селективный маркерный ген (синий) и уникальную последовательность «штрих-код» длиной примерно в 20 п. н. (зеленая). Эту ДНК затем вводят в клетки дрожжей, где она заменяет ген-мишень путем гомологичной рекомбинации. Используя набор таких кассет, каждая из которых специфична по отношению к одному определенному гену, можно создать библиотеку мутантов дрожжей, содержащую по одному мутанту для каждого гена. (б) Сходный подход можно применять для приготовления маркированных мутантов *Arabidopsis* и *Drosophila*. В данном случае мутации создают случайной вставкой мобильного генетического элемента в ген-мишень. Затем собирают всю ДНК полученного организма и проверяют ее на нарушение интересующего гена при помощи праймеров ПЦР, связывающихся с мобильным элементом и геном-мишенью. Продукт ПЦР можно обнаружить в геле, только если мобильный генетический элемент вошел в ген-мишень (см. рис. 8.45).

могут быть не настолько очевидными. Что может сказать внезапная чувствительность к холоду о роли определенного гена в дрожжевой клетке? Эти проблемы еще усложняются в более высокоразвитых организмах, чем дрожжи. Потеря функции единственного гена мыши, например, может повлиять на различные типы тканей на разных стадиях развития, тогда как удаление других генов может не иметь никакого видимого эффекта. Адекватное описание мутантных фенотипов мышей часто требует подробного исследования, основанного на глубоком знании анатомии, гистологии, патологии, физиологии и этологии этих животных.

Однако информация, которую может дать анализ библиотек мутантов, будет полезна. Например, изучение исчерпывающей коллекции мутантов *Mycoplasma genitalium*, организма с самым маленьким известным геномом, дало нам минимальный набор генов, необходимый для клеточной жизни. Анализ мутантов показал, что для роста в лабораторных условиях *M. genitalium* требуется примерно три четверти его 480 кодирующих белки генов. Функции примерно 100 из этих жизненно необходимых генов неизвестны. Это говорит о том, что нам предстоит открыть еще удивительно большое количество фундаментальных клеточных механизмов, лежащих в основе жизни.

8.5.16. РНК-интерференция — это простой и быстрый способ анализа функции гена

Несмотря на то что нокаут генов и изучение последствий является, возможно, наиболее эффективным методом исследования функций генов, недавно был открыт значительно более простой способ инактивации генов. Метод **РНК-интерференции** (или, сокращенно, **RNAi**) основан на естественном механизме, используемом многими растениями, животными, грибами и простейшими для защиты от определенных вирусов и мобильных генетических элементов (см. рис. 7.115). В клетку или организм вводят двухцепочечную молекулу РНК (дцРНК), последовательность которой комплементарна части гена, который необходимо инактивировать. После процессинга дцРНК, осуществляемого специальным комплексом белков, она гибридизуется с мРНК гена-мишени и приводит к ее деградации. Затем клетка использует небольшие фрагменты этой деградированной РНК для синтеза новых дцРНК, которые продолжают уничтожать мРНК гена-мишени. Поскольку эти короткие фрагменты РНК могут передаваться клеткам-потомкам, РНКи способна вызывать наследственные изменения экспрессии генов. Но, как мы видели в главе 7, существует второй механизм, благодаря которому РНКи может стабильно инактивировать гены. Образовавшиеся в цитозоле в результате деградации фрагменты РНК могут проникать в ядро и напрямую взаимодействовать с геном-мишенью, направляя его упаковку в недоступную для транскрипции форму хроматина. Такой двойной режим регуляции экспрессии генов делает РНК-интерференцию крайне эффективным инструментом отключения генов одного за другим.

РНКи часто используют для инактивации генов в *Drosophila* и культурах клеточных линий млекопитающих. В самом деле, набор из 15 тысяч молекул интерферирующих РНК *Drosophila* (по одной на каждый ген) позволяет исследователям за несколько месяцев проанализировать роль каждого гена мушки в любом процессе, который можно наблюдать в культуре клеток. Скоро станет возможным проводить такой анализ с 25 тыс. мышинных и человеческих генов. РНКи также широко используют для изучения функционирования генов нематоды *C. elegans*. При работе с червями вводить дцРНК довольно просто: РНК можно напрямую

впрыскивать в кишечник животного или кормить его модифицированной *E. coli*, синтезирующей нужную интерферирующую РНК (рис. 8.69). РНК распределяется по всему телу червя, где она ингибирует экспрессию гена-мишени в различных типах ткани. Поскольку геном *C. elegans* полностью расшифрован, РНКи применяют для присваивания функций всему набору генов червя.

В последнее время родственный метод стали широко применять к мышам. В данном случае для введения интерферирующих РНК не используют инъекцию или корм. Для создания трансгенных мышей, экспрессирующих интерферирующую РНК под контролем индуцируемого промотора, применяют методы рекомбинантных ДНК. Часто это специально сконструированная РНК, способная замыкаться сама на себя и за счет спаривания нуклеотидов образовывать двухцепочечный участок, узнаваемый аппаратом. В результате инактивируются только те гены, последовательность которых точно совпадает с последовательностью интерферирующей РНК. В зависимости от типа индуцируемого промотора интерферирующая РНК может синтезироваться только в определенной ткани или в конкретный момент развития, что позволяет тщательнее исследовать функции генов.

РНК интерферирующей РНК сделала обратную генетику многих организмов простой и эффективной, но она обладает несколькими потенциальными ограничениями, отсутствующими у настоящего нокаута генов. По неизвестным причинам РНК-интерференция неэффективно работает для некоторых генов. Более того, в пределах целого организма некоторые ткани могут быть устойчивыми к действию RNAi (например, нейроны круглых червей). Другая проблема состоит в том, что многие организмы содержат большие семейства генов, члены которых обладают сходными последовательностями. В результате, РНКи иногда инактивирует наравне с геном-мишенью родственные гены. Избежать таких эффектов можно, используя большое число интерферирующих РНК, комплементарных различным участкам одного и того же гена. Результаты любого эксперимента по РНКи должны рассматриваться как серьезный аргумент в пользу функции гена, но он не является ее доказательством.



Рис. 8.69. Создание доминантно-негативной мутации методом РНК-интерференции. (а) Двухцепочечная РНК (дцРНК) может быть введена в *C. elegans* (1) путем кормления червей *E. coli*, экспрессирующей дцРНК, или (2) путем инъекции дцРНК напрямую в кишечник. (б) Эмбрион червя дикого типа вскоре после оплодотворения яйцеклетки. Пронуклеусы яйцеклетки и сперматозоида (красные стрелки) мигрируют и сближаются в задней половине зародыша. (в) Эмбрион червя на той же стадии развития, в котором ген, участвующий в делении клеток, был инактивирован RNAi. Пронуклеусы не могут мигрировать. (б и в из P. Gönczy et al., *Nature* 408: 331–336, 2000. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

8.5.17. Репортерные гены и гибридизация *in situ* показывают, где и когда экспрессируется ген

Важную информацию о функции гена часто можно получить, исследуя, когда и где ген экспрессируется в клетке или в целом организме. Определить временные и пространственные принципы экспрессии генов можно путем замены кодирующей части интересующего гена репортерным геном. В большинстве случаев за экспрессией гена-репортера наблюдают посредством измерения флуоресценции или ферментативной активности его белкового продукта (см. рис. 9.26 и 9.27).

Как подробно описано в главе 7, регуляторные последовательности ДНК, расположенные справа или слева от кодирующего участка, контролируют экспрессию гена. Эти последовательности, точно определяющие, когда и где ген будет экспрессироваться, легко исследовать, поместив под их контроль репортерный ген и введя такие рекомбинантные ДНК в клетку (рис. 8.70).

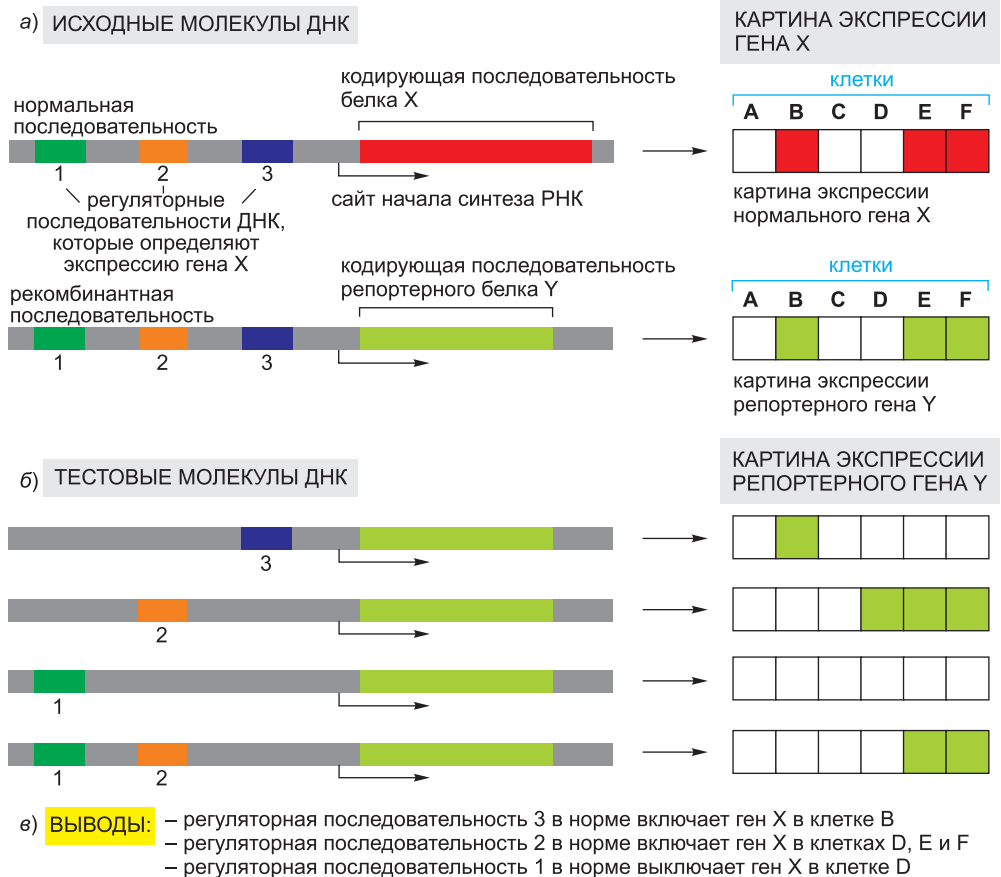


Рис. 8.70. Использование репортерного белка для определения пространственного распределения экспрессии гена. (а) В данном примере кодирующая последовательность белка X заменяется кодирующей последовательностью репортерного белка Y. Картины экспрессии генов X и Y совпадают. (б) Для создания тестовых молекул ДНК, кодирующих репортерный ген Y, в различных комбинациях добавляют фрагменты ДНК, содержащие возможные регуляторные последовательности. Затем проверяют экспрессию этих рекомбинантных молекул ДНК после их трансфекции в различные типы клеток млекопитающих. Результаты приведены на рис. (в).

Также можно напрямую наблюдать время и место экспрессии мРНК гена. Несмотря на то что обычно такой подход дает такую же информацию, что и использование репортерного гена, бывают случаи, когда он может предоставить дополнительные сведения; например, когда ген транскрибируется, а мРНК транслируется не сразу, или когда конечным продуктом гена служит РНК, а не белок. Этот метод, носящий название **гибридизации *in situ***, основан на описанных выше принципах гибридизации нуклеиновых кислот. Обычно ткань мягко фиксируют, так что ее РНК сохраняется в свободной форме, способной к гибридизации с мечеными комплементарными зондами ДНК или РНК. Таким образом, можно наблюдать характер дифференциальной экспрессии генов в ткани и определять месторасположение в клетках определенных РНК (рис. 8.71). В эмбрионе *Drosophila*, например, такой подход дал новую информацию о механизмах формирования различий между клетками в различных частях зародыша во время развития (см. главу 22).

Используя сходные подходы, можно визуализировать определенные последовательности ДНК в клетке. В данном случае препараты тканей, клеток или даже хромосом на короткое время подвергают действию сильнощелочного pH для расщепления нуклеотидных пар. Затем добавляют зонды нуклеиновых кислот, позволяющие им гибридизоваться с ДНК клетки и получают визуализацию (см. рис. 8.35).

В экспериментах на эукариотических клетках чаще всего используют два репортерных белка: фермент β -галактозидазу (β -gal) (см. рис. 7.55, б) и зеленый флуоресцентный белок (GFP) (см. рис. 9.26). На рис. 7.55, б приведен пример использования гена β -gal для наблюдения за активностью регуляторной последовательности гена *Eve* в эмбрионе *Drosophila*.

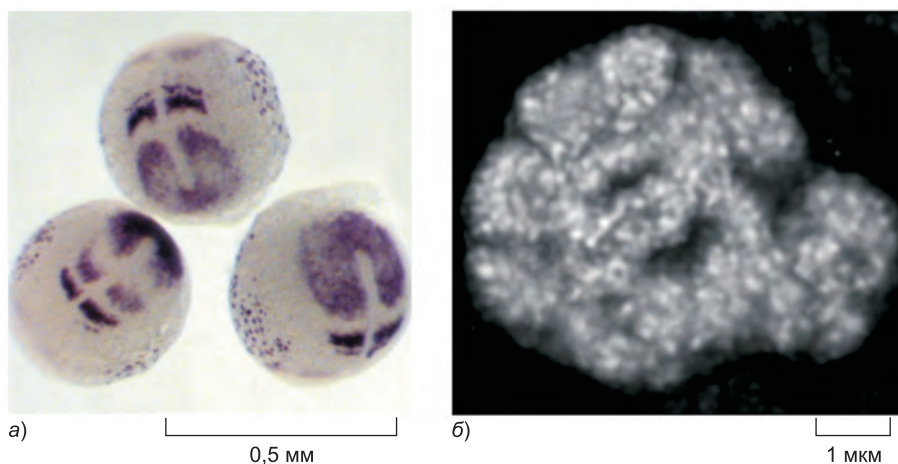


Рис. 8.71. Гибридизация *in situ* для локализации РНК. (а) Пространственное распределение экспрессии мРНК *DeltaC* в раннем эмбрионе рыбки данио. Этот ген кодирует лиганд в Notch-сигнальном пути (описанном в главе 15), а показанное здесь распределение отражает его роль в развитии сомитов — будущих сегментов позвоночного столба и хвоста. (б) Локализация высокого разрешения РНК *in situ* показывает, где в ядре клетки горошка синтезируется рибосомальная РНК. Толстые тяжи диаметром 0,5–1 мкм соответствуют петлям хромосомной ДНК, содержащей кодирующие рРНК гены. Каждое маленькое белое пятно представляет собой транскрипцию единственного гена рРНК. (С любезного разрешения Yun-Jin Jiang; Peter Shaw (б).)

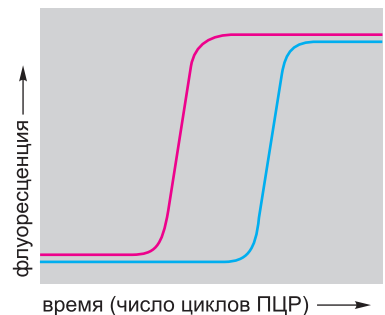
8.5.18. Экспрессия отдельных генов может быть измерена при помощи количественной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией

Несмотря на то что методы репортерных генов и гибридизации *in situ* показывают, где и когда экспрессируются гены, часто бывает полезным количественно описать экспрессию, напрямую измерив уровень мРНК в клетке. Для этого можно адаптировать нозерн-блоттинг (см. рис. 8.38), но существует более точный метод, основанный на принципе ПЦР (рис. 8.72). В этом методе, носящем название **количественной ОТ-ПЦР** (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией), исходным материалом служит вся популяция молекул мРНК, выделенных из ткани или клеточной культуры. Важно, чтобы в образце не содержалось ДНК; ее необходимо удалить или ферментативно деградировать. Добавляют два праймера ДНК, совпадающих с интересующим геном, обратную транскриптазу, ДНК-полимеразу и четыре дезоксинуклеозидтрифосфата, необходимых для синтеза ДНК. Первый этап синтеза состоит в обратной транскрипции мРНК в ДНК с использованием одного из праймеров. Затем последовательные циклы нагревания и охлаждения позволяют ДНК размножиться при помощи обычного ПЦР (см. рис. 8.45). Количественная часть данного метода основана на прямом соотношении между скоростью образования продуктов ПЦР и концентрацией интересующей мРНК в исходном образце. Добавляя в реакцию ПЦР химические красители, флуоресцирующие только при связывании с двухцепочечной ДНК, простая регистрация интенсивности флуоресценции позволяет проследить за ходом реакции и, таким образом, точно определить исходную концентрацию амплифицируемой мРНК (см. рис. 8.72). Хотя описание метода может показаться сложным, проводить количественную ОТ-ПЦР (иногда называемую *ПЦР в реальном времени*) в лаборатории относительно легко и быстро. ОТ-ПЦР заменила нозерн-блоттинг в качестве метода количественного описания уровня мРНК гена.

8.5.19. ДНК-чипы позволяют одновременно следить за экспрессией тысяч генов

До сих пор мы рассматривали методы, применяемые для наблюдений за экспрессией только одного гена (или относительно небольшого их числа). В 90-е годы разработаны **ДНК-чипы**, совершившие переворот в анализе экспрессии генов. Они позволяют одновременно следить за РНК-продуктами тысяч генов. Благодаря этому методу мы начинаем обнаруживать и изучать принципы экспрессии генов, лежащие в основе физиологии клетки: мы можем увидеть, какие гены включаются (или вы-

Рис. 8.72. Уровень мРНК можно измерить при помощи количественной ОТ-ПЦР. Измеряемую флуоресценцию создают красителем, который флуоресцирует только при связывании с двухцепочечными ДНК-продуктами реакции ОТ-ПЦР (см. рис. 8.46, б). Красный образец имеет большую концентрацию мРНК, чем синий, так как ему для достижения полумаксимальной концентрации двухцепочечной ДНК необходимо меньше циклов ПЦР. На основании этих различий можно точно определить относительное содержание мРНК в двух образцах.



ключаются), когда клетки растут, делятся, дифференцируются или подвергаются действию гормонов или токсинов.

ДНК-чипы — это не просто предметные стекла, утыканные большим числом фрагментов ДНК, каждый из которых несет последовательность нуклеотидов, служащую зондом для определенного гена. Наиболее компактные из этих чипов могут содержать десятки тысяч таких фрагментов на области меньшей, чем почтовая марка, что позволяет параллельно протекать тысячам реакций гибридизации (рис. 8.73). Некоторые ДНК-чипы готовят из полученных при помощи ПЦР крупных фрагментов ДНК, которые робот затем помещает на предметное стекло. Другие содержат короткие олигонуклеотиды, синтезированные на поверхности стеклянной пластинки методами, подобными вытравливанию электросхем на компьютерных чипах. В любом случае известна точная последовательность и расположение каждого зонда на чипе. Таким образом, любой нуклеотидный фрагмент, вступающий на чипе в реакцию гибридизации с зондом, может быть идентифицирован как продукт конкретного гена просто по положению, в котором он связался.

Чтобы использовать ДНК-чипы для наблюдения за экспрессией генов, сначала из исследуемых клеток выделяют мРНК и переводят ее в кДНК (см. рис. 8.43). Затем кДНК метят флуоресцентными зондами. Микрочип инкубируют с этим меченым образцом кДНК, чтобы прошла реакция гибридизации (см. рис. 8.73). Затем микрочип промывают, удаляя некрепко связанную кДНК, и определяют положение на чипе связавшихся фрагментов ДНК при помощи автоматического сканирующего лазерного микроскопа. Положения на микрочипе затем соотносят с определенным геном, чей образец ДНК обнаружен в данной точке.

Обычно флуоресцирующую ДНК из экспериментальных образцов (меченую, например, красным флуоресцентным красителем) смешивают с контрольным образцом фрагментов кДНК, меченных флуоресцентным красителем другого цвета (например, зеленого). Таким образом, если в интересующей клетке количество экспрессированной РНК от этого конкретного гена возрастает по сравнению с контрольным образцом, получившееся пятно будет красным. И наоборот, если экспрессия гена снижается по сравнению с контрольным образцом, пятно будет зеленым. Если изменений нет, пятно будет желтым. Используя такое внутреннее сравнение, можно составлять очень точные профили экспрессии генов.

На данный момент ДНК-чипы используют для изучения чего угодно: от изменения экспрессии генов, вызывающего созревание клубники, до отличительных черт экспрессии генов различных типов человеческих раковых клеток (см. рис. 7.3); или от изменений, происходящих в ходе клеточного цикла, до изменений, вызванных внезапными перепадами температур. В самом деле, поскольку микрочипы позволяют одновременно следить за большим количеством генов, они позволяют обнаружить тонкие изменения в клетке, изменения, которые могут никак не проявляться в ее внешнем виде или поведении.

Подробное изучение экспрессии генов также дает дополнительный слой информации, полезной для предсказания функций генов. Ранее мы обсуждали, как идентификация белков-партнеров может пролить свет на функцию данного белка. Сходный принцип работает и для генов: информация о функции гена может быть получена путем идентификации генов, обладающих такой же картиной экспрессии. Используя метод *кластерного анализа*, можно обнаружить наборы генов, которые регулируются скоординированно. Гены, которые включаются и выключаются вместе при различных условиях, скорее всего, работают в клетке совместно: они могут

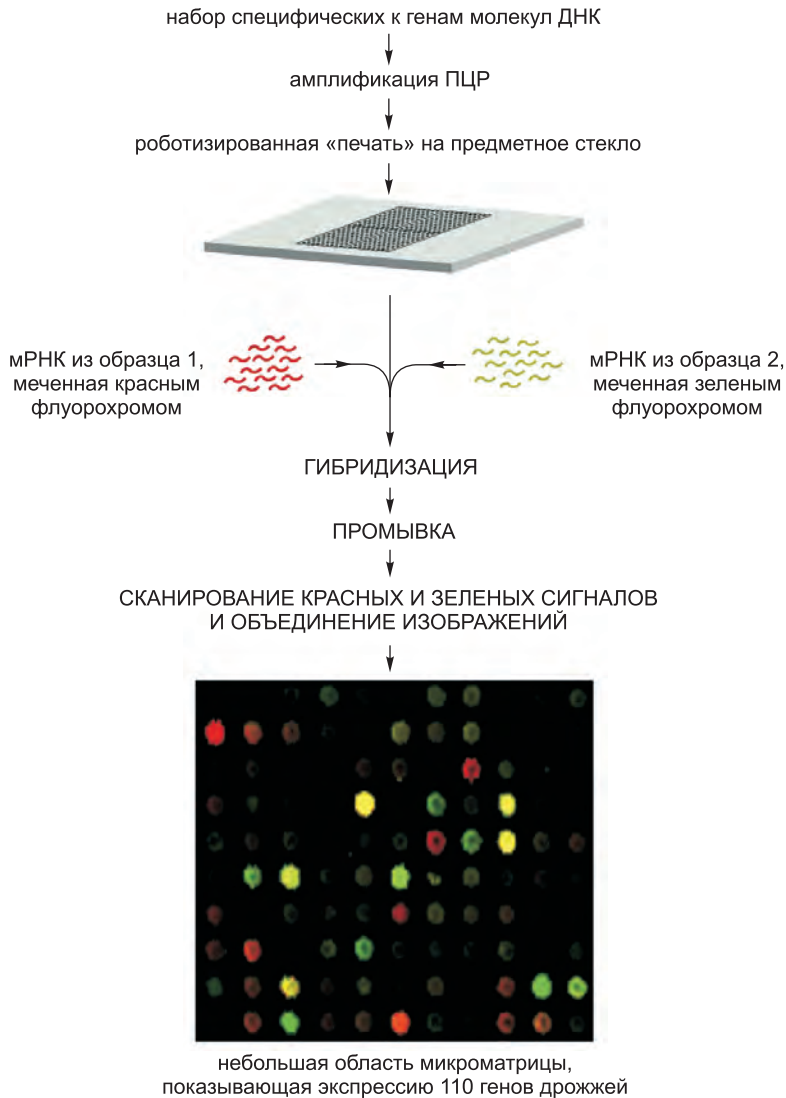


Рис. 8.73. Использование ДНК-чипов для одновременного наблюдения за экспрессией тысяч генов. Чтобы приготовить микрочип, фрагменты ДНК, каждый из которых соответствует гену, автоматически помещают на предметное стекло. Существует большое число уже готовых коммерческих микрочипов. В приведенном примере мРНК выделяют из двух различных клеточных образцов для прямого сравнения их относительных уровней экспрессии генов. Например, образцы можно взять из клеток, обработанных гормоном, и клеток того же типа, но нетронутых. Эти образцы переводят в кДНК и метят, один — красным флуорохромом, другой — зеленым. Меченые образцы смешивают и на микрочипе проводят реакцию гибридизации. После инкубации чип отмывают и измеряют флуоресценцию. В приведенной части микрочипа, соответствующей 110 дрожжевым генам, *красные* пятна указывают на то, что ген в образце 1 экспрессируется сильнее, чем соответствующий ген в образце 2; *зеленые* пятна указывают на то, что экспрессия гена в образце 2 выше, чем в образце 1. *Желтые* пятна соответствуют генам, экспрессия которых в обоих образцах одинакова. Темные пятна указывают на слабую экспрессию или полное ее отсутствие в обоих образцах гена, чей фрагмент расположен в данной точке микрочипа. (Микрочип получен J. L. DeRisi et al., *Science* 278: 680–686, 1997. С любезного разрешения издательства AAAS.)

кодировать белки, входящие в состав одного мультисубъединичного комплекса, или белки, выполняющие сложную скоординированную функцию, например, репликацию ДНК или сплайсинг РНК. Описание гена с неизвестной функцией путем его группировки с известными генами, обладающими таким же транскрипционным поведением, иногда называют «виной в соучастии». Кластерный анализ используют для анализа профилей экспрессии генов, лежащих в основе многих интересных биологических процессов, включая заживление ран у людей (рис. 8.74).

Помимо наблюдения за уровнем мРНК, соответствующим каждому гену генома, ДНК-чипы имеют множество других применений. Например, их можно использовать для слежения за ходом репликации ДНК в клетке (см. рис. 5.32) и, в сочетании с иммунопреципитацией, для определения участков генома, занятых регуляторными белками данного гена (см. рис. 7.32). Микрочипы также можно использовать для быстрой идентификации вызывающих болезни микробов путем гибридизации ДНК инфицированных тканей с чипами, содержащими последовательности геномной ДНК больших наборов патогенов.

8.5.20. Анализ экспрессии генов в одной клетке выявляет биологический «шум»

Описанные выше методы мониторинга мРНК дают средние уровни экспрессии каждой мРНК для большой популяции клеток. Используя флуоресцентный репортерный белок, чья экспрессия находится под контролем интересующего промотора, можно точно измерять уровни экспрессии отдельных клеток. Такие новые подходы выявили удивительный уровень вариабельности в пределах отдельных клеток однородной популяции, часто называемый *биологическим шумом*. Эти исследования также показали, что в популяциях присутствуют отдельные субпопуляции, чье существование было бы не замечено, если бы рассматривали среднее по всей популяции. Например, бимодальное распределение уровней экспрессии указало бы на то, что клетки могут существовать в двух различных состояниях (рис. 8.75). Тогда средний уровень экспрессии популяции был бы промежуточным между ними. Поведение отдельных клеток имеет важное значение для понимания биологии, например, указывая на то, что некоторые клетки постоянно и очень быстро переходят из одного состояния в другое.

В настоящее время существует два подхода для мониторинга экспрессии генов в отдельных клетках. Во-первых, живые клетки можно поместить на предметное стекло и наблюдать в флуоресцентный микроскоп. Преимущество этого метода состоит в том, что определенную клетку можно наблюдать во времени, измеряя изменения экспрессии. Во-вторых, в проточной цитометрии разбавленный раствор клеток пропускают мимо источника света и измеряют интенсивность флуоресценции отдельных клеток, когда они проходят мимо детектора (см. рис. 8.2). Достоинством этого метода является то, что можно точно измерять уровни экспрессии множества клеток, но проточная цитометрия не позволяет наблюдать определенную клетку во времени, следовательно, она лишь дополняет микроскопические методы.

Заключение

Генетика и генетическая инженерия предоставляют эффективные методы изучения функционирования генов как в клетках, так и в целых организмах. В классическом генетическом подходе случайный мутагенез сочетается со скри-

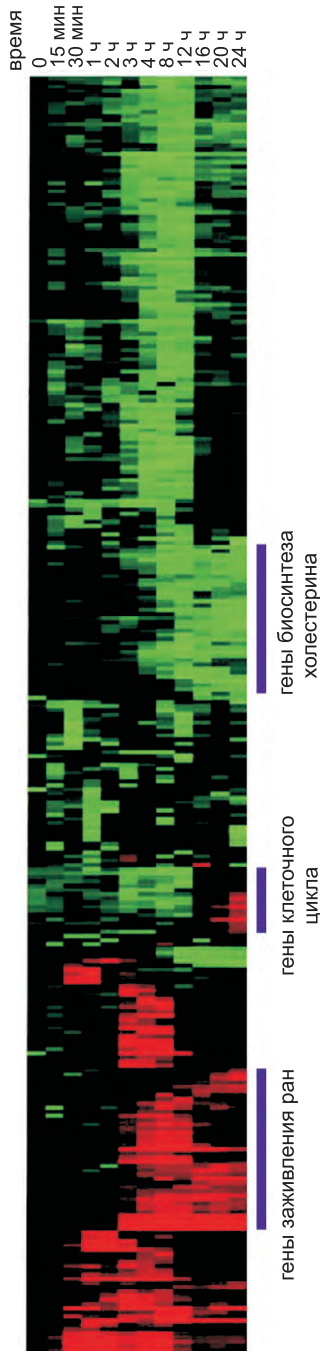


Рис. 8.74. Использование кластерного анализа для идентификации наборов генов, регулируемых совместно. Гены, принадлежащие одному кластеру, могут участвовать в одном и том же метаболическом пути или процессе. Для проведения кластерного анализа при помощи микрочипов получают данные для клеточных образцов в различных условиях, и гены, проявляющие скоординированные изменения экспрессии, объединяют в одну группу. В данном эксперименте фибробласты человека 48 часов держали в условиях нехватки сыворотки. Отсчет времени вели после добавления к культурам сыворотки, и клетки собирали для анализа на микрочипах в различных моменты времени. Из 8 600 генов, проанализированных на ДНК-чипе, только чуть более 300 показали трехкратные и выше изменения экспрессии в ответ на повторное введение сыворотки. Здесь *красным* показано усиление экспрессии, *зеленым* — ее ослабление. На основе результатов многих экспериментов с микрочипами 8 600 генов объединены в кластеры в соответствии со сходными профилями экспрессии. Результаты этого анализа показывают, что гены, участвующие в заживлении ран, в ответ на сыворотку крови включаются, тогда как гены, участвующие в регуляции хода клеточного цикла и биосинтеза холестерина, выключаются. (Из M. V. Eisen et al., *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 95: 14863–14868, 1998. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

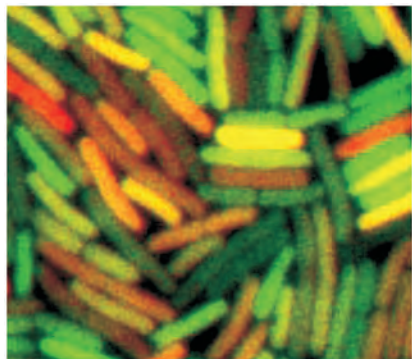


Рис. 8.75. Различные уровни экспрессии генов отдельных клеток в популяции бактерии *E. coli*. В данном эксперименте в клетки бактерий ввели два различных репортерных белка (один, флуоресцирующий, — зеленым, другой — красным), контролируемых копией одного промотора. При освещении некоторые клетки экспрессируют только одну копию гена, и, следовательно, выглядят красными или зелеными, тогда как другие клетки экспрессируют обе копии и выглядят желтыми. Этот эксперимент также показывает разные уровни флуоресценции, что говорит о различных уровнях экспрессии генов в пределах на первый взгляд однородной популяции клеток. (M. B. Elowitz, A. J. Levine, E. O. Siggia and P. S. Swain, *Science* 297: 1183–1186, 2002. С любезного разрешения издательства AAAS.)

нингом для идентификации мутантов, обладающих дефектами в определенных биологических процессах. Затем эти мутанты используют для локализации и изучения генов, ответственных за этот процесс.

Функции генов также можно установить при помощи обратной генетики. Методы инженерии ДНК могут быть использованы для изменения генов и введения их в хромосомы, где они становятся постоянной частью генома. Если для переноса генов используют оплодотворенные яйцеклетки (в случае животных) или тотипотентные растительные клетки в культуре, можно получить трансгенные организмы, экспрессирующие мутантный ген и передающие его по наследству. Для клеточной биологии особенно важны методы крайне специфического изменения клеток и организмов, позволяющие уловить влияние на клетку или организм изменения отдельного белка или молекулы РНК.

Многие из этих методов стали применять для изучения функций генов в масштабе генома. Создание библиотек мутаций, в которых каждый отдельный ген организма систематически удален или нарушен, предоставляет незаменимые инструменты для исследования роли каждого гена в продуманном молекулярном механизме, дающем начало жизни. Такие методы, как ДНК-чипы, позволяют одновременно наблюдать за экспрессией тысяч генов, что дает нам подробные и всесторонние «снимки» динамического поведения генной экспрессии, лежащего в основе сложных клеточных процессов.

Задачи

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

8.1. Поскольку моноклональное антитело узнает только специфический антигенный сайт (эпитоп), оно связывается только с тем белком, против которого оно было создано.

8.2. Благодаря неотвратимости технологического прогресса кажется неизбежным, что в конце концов чувствительность методов детекции молекул превысит йоктомолярный уровень (10^{-24} моль).

8.3. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) измеряет константы ассоциации k_{on} и диссоциации k_{off} молекул в реальном времени, используя небольшие

количества немеченых молекул, но он не дает информации, необходимой для определения константы связывания.

8.4. Если в каждом цикле ПЦР удваивается количество ДНК, синтезированной в предыдущем цикле, то 10 циклов увеличат содержание ДНК в 10^3 раз, 20 циклов — в 10^6 раз, а 30 циклов — в 10^9 раз.

Решите следующие задачи

8.5. При выделении животных клеток из образца ткани их обрабатывают трипсином, коллагеназой и ЭДТА. Почему такая обработка необходима, и что делает каждый из компонентов? Почему такая обработка не убивает клетки?

8.6. Как вы думаете, станет ли возможным получение антитела к другому антителу? Объясните свой ответ.

8.7. Объясните разницу между методами скоростной седиментации и седиментационного равновесия. Для каких целей используется каждый из них? Какой из них, по вашему мнению, больше подходит для разделения двух белков разного размера?

8.8. Коэффициент седиментации тропомиозина, масса которого составляет 93 кДа, равен 2,6 S, тогда как коэффициент седиментации гемоглобина массой 65 кДа равен 4,3 S. (Коэффициент седиментации S является линейной мерой скорости седиментации: оба увеличиваются или уменьшаются параллельно.) Модели α -углеродных скелетов этих двух белков изображены на **рис. Q8.1**. Почему более крупный белок осаждается медленнее, чем небольшой? Можете ли вы придумать аналогию из повседневной жизни, которая могла бы помочь ответить на этот вопрос?

8.9. В классической работе, которая доказала полуконсервативную репликацию ДНК, Месельсон (Meselson) и Сталь (Stahl) начали с того, что показали, как ДНК сама по себе будет формировать полосу при седиментационном равновесии. Они смешали случайным образом расщепленную ДНК *E. coli* с раствором CsCl. Плотность конечного раствора составила 1,71 г/мл. Как показано на **рис. Q8.2**, с увеличением продолжительности центрифугирования при 70000 g ДНК, которая сначала была распределена по всей центрифужной пробирке, сконцентрировалась в полосе в центре.

А. Объясните, что происходит со временем и почему ДНК формирует выделенную полосу.

Б. Чему равна плавучая плотность ДНК? (Плотность раствора, при которой ДНК «плавает» в равновесии определяет ее «плавучую плотность».)

В. Даже если бы ДНК центрифугировали в два раза дольше, ширина полосы останется примерно такой же, как внизу рис. Q8.2. Почему полоса не становится более узкой? Предложите несколько возможных объяснений ширины полосы ДНК в равновесии.

8.10. Метод гибридом позволяет создавать моноклональные антитела практически к любому белку. Почему же тогда мечение белков эпитопами настолько

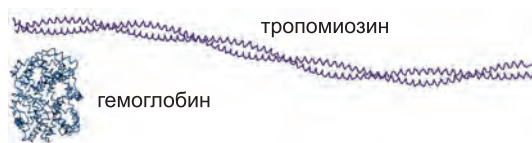


Рис. Q8.1. Модели углеродных скелетов тропомиозина и гемоглобина (задача 8.8).

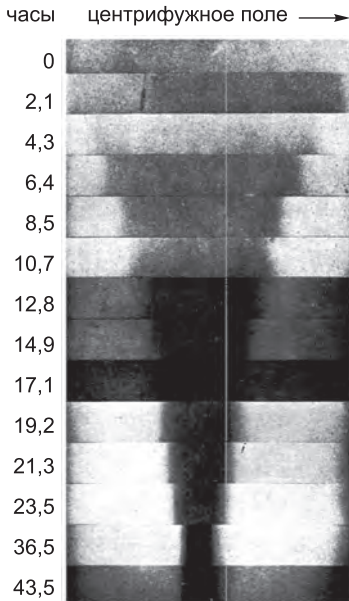


Рис. Q8.2. Фотографии поглощения ультрафиолета, показывающие последовательные стадии образования полосы ДНК *E. coli* (задача 8.9). ДНК, поглощающая ультрафиолет, на фотографиях выглядит как темные области. Дно центрифужной пробирки расположено справа. (M. Meselson and F. W. Stahl, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 44: 671–682, 1958. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

распространенная практика, особенно если учесть, что эпитопные метки могут влиять на функционирование белка?

8.11. Сколько копий белка должно присутствовать в клетке, чтобы его можно было увидеть в геле? Предположим, что вы можете поместить в гель 100 мкг клеточного экстракта и зарегистрировать при помощи окрашивания серебром 10 нг. Концентрация белка в клетке составляет примерно 200 мг/мл, типичный объем клетки млекопитающего равен примерно 100 мкм³, а бактерии — 1 мкм³. При данных значениях параметров рассчитайте количество копий

белка массой 120 кДа в клетках млекопитающего и бактерии, необходимых для того, чтобы белок давал видимую полосу в геле. До точных расчетов можете оценить порядок величины.

8.12. Вы хотите амплифицировать ДНК между двумя участками последовательности, показанными на [рис. Q8.3](#). Выберите из приведенных праймеров те, которые позволят вам амплифицировать ДНК при помощи ПЦР.

8.13. На самом первом этапе ПЦР с использованием геномной ДНК с праймеров начинается синтез, который заканчивается только по завершении цикла (или когда встречается случайный конец ДНК). Однако в конце 20 или 30 циклов (обычное число для амплификации) единственный видимый продукт точно определяется концами праймеров. В каком цикле впервые синтезируется двухцепочечный фрагмент правильного размера?

8.14. Объясните разницу между мутацией с приобретением функции и доминантно-негативной мутацией. Почему обе эти мутации обычно бывают доминантными?

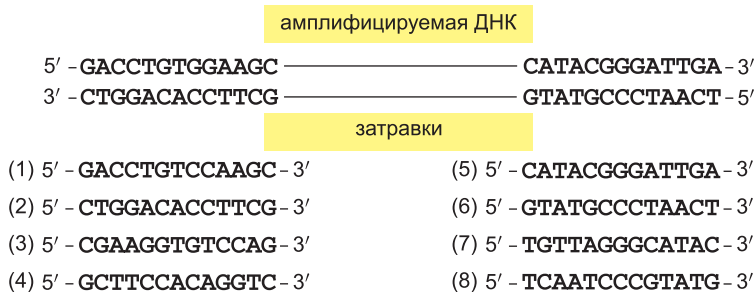


Рис. Q8.3. ДНК для амплификации и потенциальные праймеры ПЦР (задача 8.12).

8.15. Обсудите следующее утверждение: «Мы не имели бы сегодня ни малейшего представления о значении инсулина как регуляторного гормона, если бы его отсутствие не было связано с тяжелым заболеванием человека — диабетом. Только серьезные последствия его отсутствия направили ранние исследования в сторону идентификации и изучения нормальной роли инсулина в физиологии».

Литература

Общая

Ausubel F.M., Brent R., Kingston R.E. et al. (eds) (2002) *Short Protocols in Molecular Biology*, 5th ed. New York: Wiley.

Brown T.A. (2002) *Genomes 2*, 2nd ed. New York: Wiley-Liss.

Spector D.L., Goldman R.D. & Leinwand L.A. (eds) (1998) *Cells: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Watson J.D., Caudy A.A., Myers R.M. & Witkowski J.A. (2007) *Recombinant DNA: Genes and Genomes—A Short Course*, 3rd ed. New York: WH Freeman.

Выделение клеток и выращивание их в культуре

Emmert-Buck M.R., Bonner R.F., Smith P.D. et al. (1996) Laser capture microdissection. *Science* 274: 998–1001.

Ham R.G. (1965) Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined, synthetic medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53: 288–293.

Harlow E. & Lane D. (1999) *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Herzenberg L.A., Sweet R.G. & Herzenberg L.A. (1976) Fluorescence-activated cell sorting. *Sci. Am.* 234: 108–116.

Levi-Montalcini R. (1987) The nerve growth factor thirty-five years later. *Science* 237: 1154–1162.

Lerou P.H. & Daley G.Q. (2005) Therapeutic potential of embryonic stem cells. *Blood Rev.* 19: 321–31.

Milstein C. (1980) Monoclonal antibodies. *Sci. Am.* 243: 66–74.

Очистка белков

de Duve C. & Beaufay H. (1981) A short history of tissue fractionation. *J. Cell. Biol.* 91: 293s–299s.

Krogan N.J., Cagney G., Yu H. et al. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* 440: 637–43.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.

Nirenberg M.W. & Matthaei J.H. (1961) The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* on naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 47: 1588–1602.

O'Farrell P.H. (1975) High-resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007–4021.

Palade G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347–358.

Scopes R.K. & Cantor C.R. (1994) *Protein Purification: Principles and Practice*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag.

Анализ белков

Branden C. & Tooze J. (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Fields S. & Song O. (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340: 245–246.

Giepmans B.N., Adams S.R. et al. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217–24.

Kendrew J.C. (1961) The three-dimensional structure of a protein molecule. *Sci. Am.* 205: 96–111.

Knight Z.A. & Shokat K.M. (2007) Chemical genetics: Where genetics and pharmacology meet. *Cell* 128: 425–30.

Rigaut G., Shevchenko A., Rutz B. et al. (1999) A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. *Nature Biotechnol.* 17: 1030–1032.

Washburn M.P., Wolters D. and Yates J.R. (2001) Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nature Biotechnol.* 19: 242–7.

Wuthrich K. (1989) Protein structure determination in solution by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Science* 243: 45–50.

Выделение, клонирование и секвенирование ДНК

Adams M.D., Celniker S.E., Holt R.A. et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195.

Alwine J.C., Kemp D.J. & Stark G.R. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diabenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5350–5354.

Blattner F.R., Plunkett G., Bloch C.A. et al. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1474.

Cohen S., Chang A., Boyer H. & Helling R. (1973) Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 3240–3244.

International Human Genome Sequencing Consortium (2000) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.

International Human Genome Sequencing Consortium (2006) The DNA sequence, annotation and analysis of human chromosome 3. *Nature* 440: 1194–1198.

Jackson D., Symons R. & Berg P. (1972) Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69: 2904–2909.

Maniatis T. et al. (1978) The isolation of structural genes from libraries of eukaryotic DNA. *Cell* 15: 687–701.

Mullis K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* 262: 56–61.

Nathans D. & Smith H.O. (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of dna molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 44: 273–293.

Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S. et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487–491.

Sambrook J., Russell D. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 5463–5467.

Smith M. (1994) Nobel lecture. Synthetic DNA and biology. *Biosci. Rep.* 14: 51–66.

Southern E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503–517.

The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.

The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018.

Venter J. C., Adams M. A., Myers E. W. et al. (2000) The sequence of the human genome. *Science* 291: 1304–1351.

Изучение экспрессии и функционирования генов

Boone C., Bussey H. & Andrews B.J. (2007) Exploring genetic interactions and networks with yeast. *Nature Rev. Genet.* 8: 437–449.

Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314–331.

DeRisi J.L., Iyer V.R. & Brown P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680–686.

International HapMap Consortium (2005) A haplotype map of the human genome. *Nature* 437: 1299–1320.

Lockhart D.J. & Winzler E.A. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 405: 827–836.

Mello C.C. & Conte D. (2004) Revealing the world of RNA interference. *Nature* 431: 338–342.

Nusslein-Volhard C. & Weischaus E. (1980) Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287: 795–801.

Palmiter R.D. & Brinster R.L. (1985) Transgenic mice. *Cell* 41: 343–345.

Rubin G.M. & Spradling A.C. (1982) Genetic transformation of *Drosophila* with transposable element vectors. *Science* 218: 348–353.

Sabeti P.C., Schaffner S.F., Fry B. et al. (2006) Positive natural selection in the human lineage. *Science* 312: 1614–1620.

Weigel D. & Glazebrook J. (2001) *Arabidopsis*: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

9

Визуализация клеток

Поскольку клетки маленькие и сложные, увидеть их структуру и определить молекулярный состав сложно, но еще труднее узнать, как функционируют их компоненты. Имеющиеся в нашем распоряжении инструменты определяют, что мы можем узнать о клетках. Часто появление новых методов приводит к прорывам в клеточной биологии. Таким образом, для того чтобы понять современную клеточную биологию, необходимо знать кое-что об этих методах.

В этой главе мы кратко опишем некоторые важнейшие методы микроскопии, используемые для изучения клеток. Понимание структурной организации клеток — первая предпосылка для изучения функционирования клеток. Мы начнем с оптической микроскопии, потому что клеточная биология началась со светового микроскопа, и он до сих пор служит незаменимым инструментом. В последние годы оптическая микроскопия приобрела даже большее значение благодаря развитию методов специфического мечения и визуализации отдельных клеточных составляющих и реконструкции их трехмерной структуры. Важное преимущество оптической микроскопии состоит в том, что свет, в общем, не нарушает и не изменяет структуру. Вводя в специфические клеточные компоненты флуоресцентные зонды, например флуоресцентные белки, мы можем наблюдать их движение, динамику и взаимодействия в живой клетке. Разрешение оптической микроскопии ограничено длиной волны видимого света. В электронной микроскопии вместо света используют пучок электронов, что позволяет визуализировать макромолекулярные комплексы внутри клетки практически в атомном разрешении и в трех измерениях.

Оптическая микроскопия и электронная микроскопия — важные методы, но по-настоящему интересными их делают те открытия в области структурной организации клеток, которые они позволили ученым сделать. Используйте эту главу в качестве справочника и читайте ее вместе с последующими главами, а не как введение в них.

9.1. Наблюдая клетки в световой микроскоп

Диаметр типичной животной клетки составляет 10–20 мкм, что примерно равно одной пятой самой маленькой частички, видимой невооруженным глазом. Только после того как в первой половине XIX века стали доступны хорошие световые микроскопы, Schleiden и Schwann предположили, что все ткани растений и животных представляют собой агрегаты отдельных клеток. Это открытие, произошедшее в 1838 г. и носящее название **клеточной доктрины**, отмечает формальное рождение клеточной биологии.

Животные клетки не только очень малы, они еще бесцветны и прозрачны. Вследствие этого открытие их основных внутренних свойств зависело от разработки во второй половине XIX века различных красителей, делавших клетки достаточно

контрастными для того, чтобы рассматривать их внутреннее строение. Точно так же появившийся в начале 40-х гг. XX века значительно более мощный электронный микроскоп потребовал развития новых методов фиксации и окрашивания клеток. Только после этого тонкости внутренней структуры клеток смогли стать достоянием ученых. До сих пор микроскопия зависит от методов приготовления препаратов точно так же, как и от рабочих характеристик микроскопа. Следовательно, мы будем в равной степени уделять внимание как обоим инструментам, так и приготовлению препаратов. Начнем со светового микроскопа.

Серия изображений на [рис. 9.1](#) иллюстрирует воображаемый переход от большого пальца до атомов. Каждое последующее изображение представляет собой увеличенное в десять раз предыдущее. Невооруженным глазом можно увидеть только

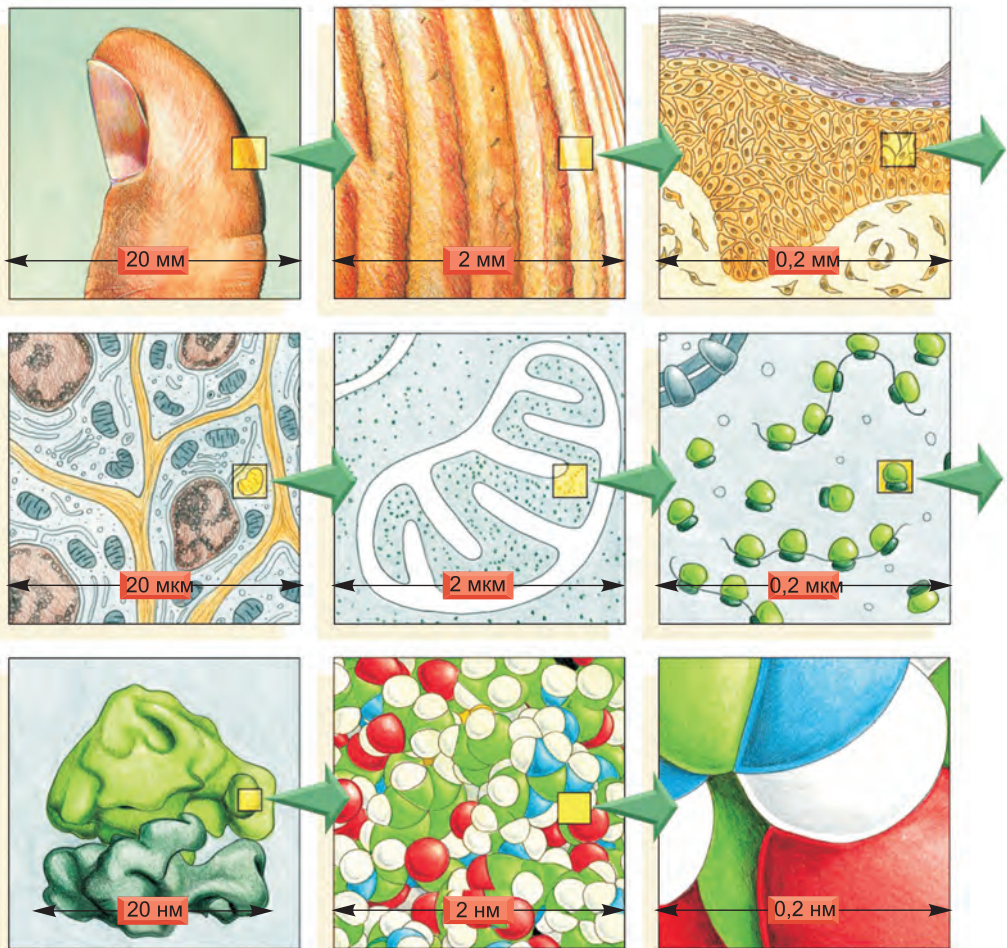


Рис. 9.1. Соотношение масштабов живых клеток и атомов. На каждой картинке показано изображение, увеличенное в десять раз по сравнению с предыдущим, в воображаемом ряду от большого пальца, через клетку кожи, до рибосомы и набора атомов, составляющего одну из множества белковых молекул нашего организма. Атомное строение макромолекул, как показано на двух последних картинках, обычно лежит за пределами мощности электронного микроскопа.

то, что изображено на первых двух картинках, разрешение светового микроскопа распространяется до четвертой, электронного — примерно до седьмой–восьмой. На **рис. 9.2** показаны размеры различных клеточных и субклеточных структур и пределы визуализации различных микроскопов.

9.1.1. Световой микроскоп разрешает детали изображения на расстоянии 0,2 мкм друг от друга

Фундаментальное ограничение всех микроскопов состоит в том, что данный тип излучения не может быть использован для исследования деталей структуры, меньших, чем его длина волны. Таким образом, ограничение разрешения светового микроскопа задается длиной волны видимого света, которая находится в пределах от 0,4 мкм (фиолетовый) до 0,7 мкм (темно-красный). На практике это означает, что бактерии и митохондрии, ширина которых составляет примерно 500 нм (0,5 мкм), являются самыми маленькими объектами, форму которых можно ясно разглядеть в **световом микроскопе**. Меньшие объекты будут зашумлены за счет эффектов, связанных с волновой природой света. Чтобы понять, почему так происходит, мы должны проследить путь луча света по мере его прохождения через линзы микроскопа (**рис. 9.3**).

Свет имеет волновую природу, поэтому он не следует идеализированной прямой траектории, предсказываемой геометрической оптикой. Вместо этого, световые волны идут по оптической системе по нескольким немного отличным друг от друга путям. В результате световые волны интерферируют друг с другом, что приводит к возникновению явления *оптической дифракции*. Если два волновых пакета, достигших одной и той же точки разными путями, находятся точно *в фазе* (пик совпадает с пиком, минимум — с минимумом), они усилят друг друга и яркость увеличится. Наоборот, если волновые пакеты находятся *в противофазе*, они будут интерферировать таким образом, что полностью или частично друг друга нейтрализуют (**рис. 9.4**). Взаимодействие света с объектом изменяет соотношение фаз световых волн, что приводит к возникновению сложных интерференционных

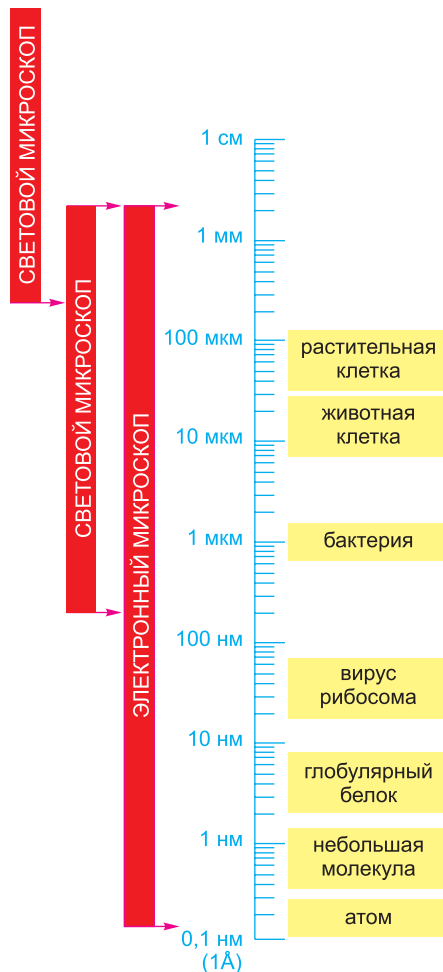


Рис. 9.2. Разрешающая способность. Размеры клеток и их компонентов приведены на логарифмической шкале, объекты, легко разрешимые невооруженным глазом, световым и электронным микроскопами. В микроскопии часто используют следующие единицы длины:

1 мкм (μм, микрометр) = 10^{-6} м

1 нм (нанометр) = 10^{-9} м

1 Å (ангстрем) = 10^{-10} м.

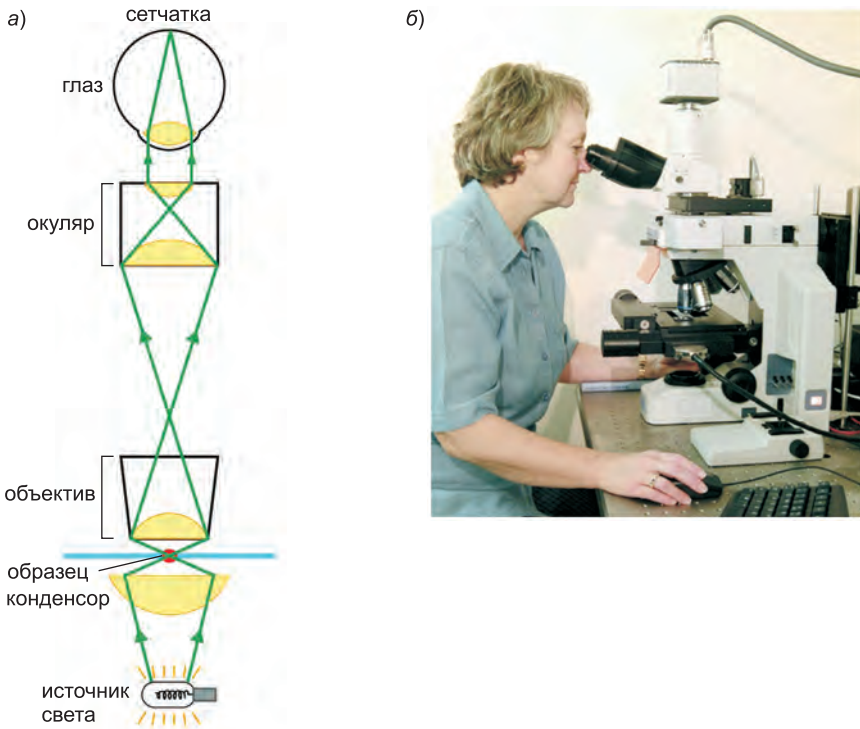


Рис. 9.3. Световой микроскоп. (а) Схема прохождения света в микроскопе. Свет фокусируется на препарате линзами конденсора. Линзы объектива и окуляра настраивают таким образом, чтобы фокусировать изображение освещенного препарата в глазе. (б) Современный исследовательский световой микроскоп. (б, с любезного разрешения Andrew Davies.)

картин. Например, при большом увеличении тень границы, равномерно освещенной светом одной длины волны, выглядит как набор параллельных линий (рис. 9.5), а круглое пятно — как набор концентрических окружностей. По той же причине единственная точка через микроскоп будет видаться как размытый диск, а два близкорасположенных точечных объекта могут давать перекрывающиеся изображения или сливаться в одно. Улучшение качества линз не способно преодолеть это ограничение, накладываемое волновой природой света.

Минимальное расстояние, на котором два объекта различимы по отдельности — **предел разрешения**, — зависит как от длины волны света, так и от *числовой апертуры* используемой системы линз. Числовая апертура — это мера ширины входного зрачка микроскопа, масштабированная относительно расстояния до объекта; чем шире микроскоп «раскрывает свой глаз», тем «острее» он «видит» (рис. 9.6). При наилучших условиях, с фиолетовым светом (длина волны = 0,4 мкм) и численной апертурой 1,4, световой микроскоп теоретически способен дать разрешение около 0,2 мкм. В конце XIX века изготовители микроскопов достигли такого разрешения, и оно редко встречается в современных, производимых на заводах микроскопах. Несмотря на то что всегда можно *увеличить* изображение настолько, насколько мы этого хотим, например, проецируя его на экран, в световой микро-

ДВЕ ВОЛНЫ СОВПАДАЮТ ПО ФАЗЕ ДВЕ ВОЛНЫ НЕ СОВПАДАЮТ ПО ФАЗЕ

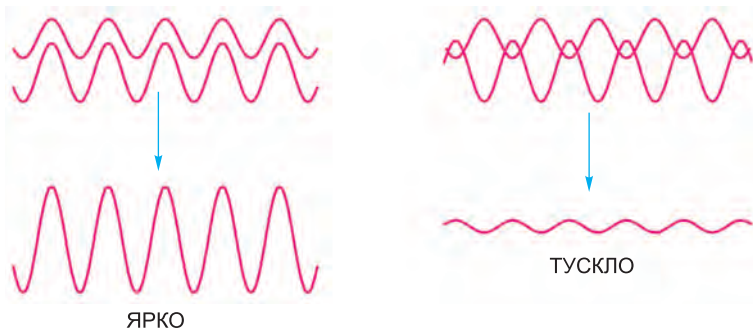


Рис. 9.4. Интерференция световых волн. Когда две световые волны совпадают по фазе, амплитуда и яркость результирующей волны возрастают. Две волны света, находящиеся в противофазе, частично нейтрализуют друг друга и дают волну, амплитуда и, следовательно, яркость которой меньше, чем у двух исходных волн.

скоп невозможно разрешить два объекта, находящихся на расстоянии меньшем чем $0,2 \text{ мкм}$; они будут видны как один объект. Обратите внимание на различие между *разрешением*, о котором мы говорили выше, и *регистрацией*. Если небольшой объект, размеры которого меньше, чем предел разрешения, сам по себе испускает свет, то мы можем его увидеть или зарегистрировать. Таким образом, мы способны

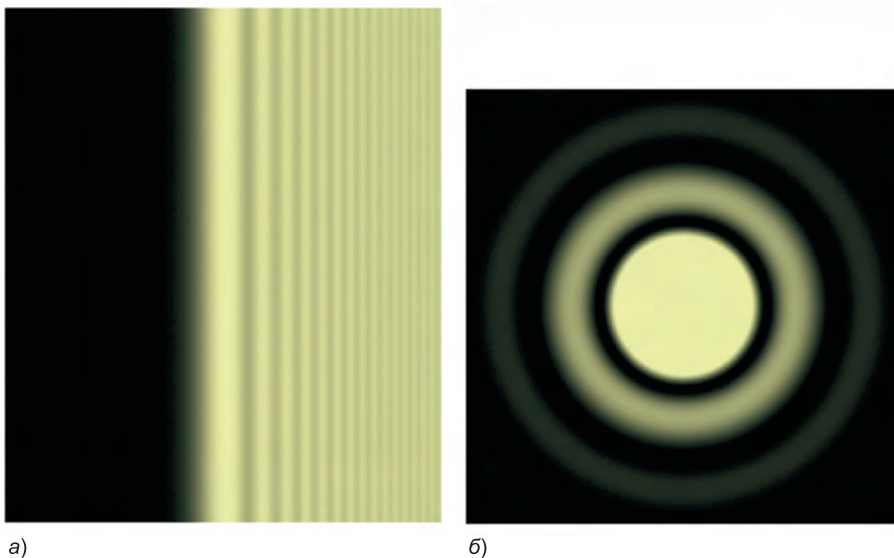


Рис. 9.5. Изображения границы и точечного источника света. (а) Интерференционные полосы, видимые при большом увеличении, когда свет определенной длины волны проходит мимо границы твердого объекта, находящегося между источником света и наблюдателем. (б) Изображение точечного источника света. За счет дифракции мы видим сложную картину концентрических окружностей, ширина которых зависит от числовой апертуры оптической системы: чем меньше апертура, тем больше (более размыта) дифракционная картина. Два точечных источника могут быть разрешены, только если центр первого лежит на первом темном кольце второго: так определяют предел разрешения.

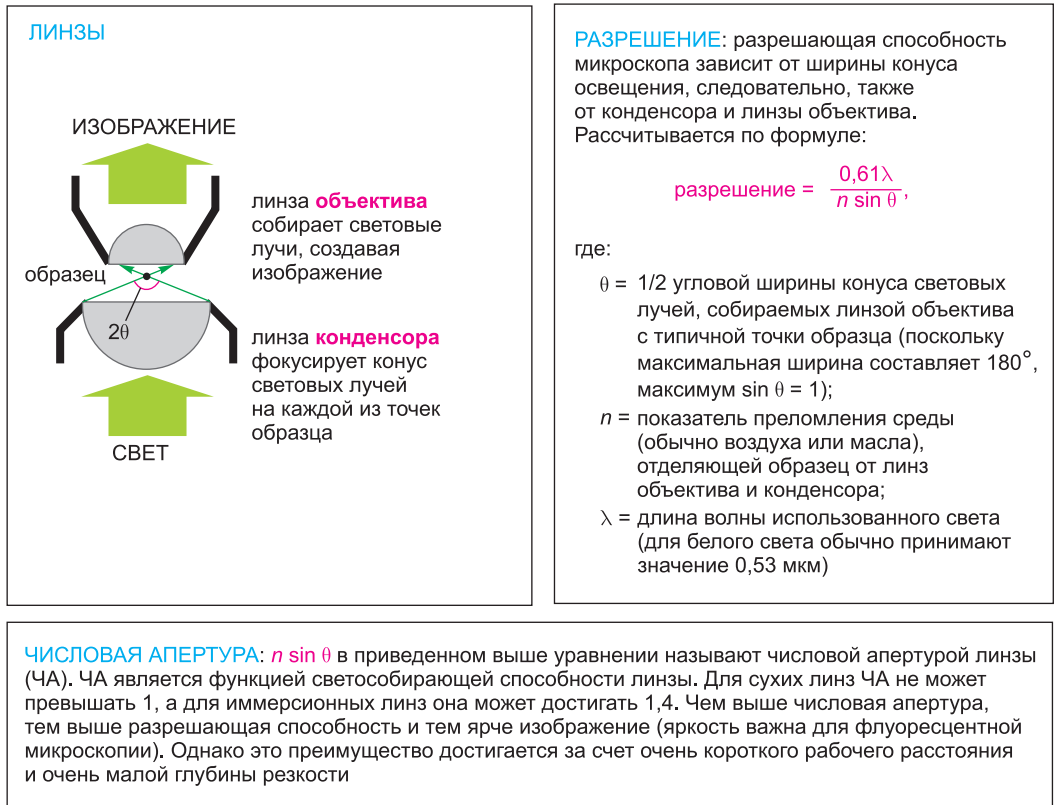


Рис. 9.6. Числовая апертура. Траектория световых лучей, проходящих через прозрачный образец в микроскопе, иллюстрирует понятие числовой апертуры и ее соотношения с пределом разрешения.

наблюдать единственную флуоресцентно меченую микротрубочку, хотя ее толщина примерно в десять раз меньше, чем предел разрешения светового микроскопа. Явление дифракции, однако, приведет к тому, что она будет выглядеть размытой, а ее толщина будет составлять по крайней мере 0,2 мкм (см. рис. 9.17). Благодаря яркому свету, испускаемому звездами, мы способны видеть их в ночном небе, хотя их размер гораздо меньше углового разрешения невооруженного глаза. Они все кажутся одинаковыми точками света, различаясь только по цвету или яркости. При помощи чувствительных методов обнаружения мы можем регистрировать и следить в световом микроскопе за поведением единственной флуоресцирующей белковой молекулы.

Далее мы увидим, как можно использовать интерференцию и дифракцию для изучения живых неокрашенных клеток.

9.1.2. Живые клетки хорошо видны в фазово-контрастном или дифференциальном интерференционном контрастном микроскопе

В микроскопии всегда существует вероятность потери или нарушения некоторых компонентов клетки в процессе приготовления препарата. Единственным способом избежать этого является исследование клеток, когда они еще живы,

без фиксации или заморозки. Для этого используют световые микроскопы со специальными оптическими системами.

Когда свет проходит через живую клетку, фаза световой волны меняется в соответствии с показателем преломления клетки: относительно толстая или плотная часть клетки, например ядро, затормаживает проходящий через нее свет. Следовательно, фаза волны сдвигается относительно фазы света, прошедшего через прилегающий более тонкий слой цитоплазмы. В **фазово-контрастных микроскопах** и более сложных **дифференциальных интерференционных контрастных микроскопах** используется явление интерференции, происходящей при соединении этих двух наборов волн и, следовательно, формировании изображения структуры клетки (**рис. 9.7**). Оба типа световой микроскопии широко применяют для визуализации живых клеток.

Более простой способ увидеть некоторые свойства живых клеток — наблюдение света, рассеянного их различными компонентами. В **темнопольном микроскопе** лучи источника света направлены сбоку, поэтому на линзы микроскопа попадают только рассеянные лучи. Таким образом, клетка выглядит как светлый объект на темном фоне. В обычном **светлопольном микроскопе** свет, проходящий через клетку в культуре, формирует изображение напрямую. На **рис. 9.8** показано сравнение изображений одной и той же клетки, полученных четырьмя методами световой микроскопии.

Фазово-контрастная, дифференциальная интерференционная контрастная и темнопольная микроскопия делают возможным наблюдение движений, происходящих при таких процессах, как митоз и миграция клеток. Поскольку обычно клеточное движение происходит слишком медленно, для того чтобы за ним можно

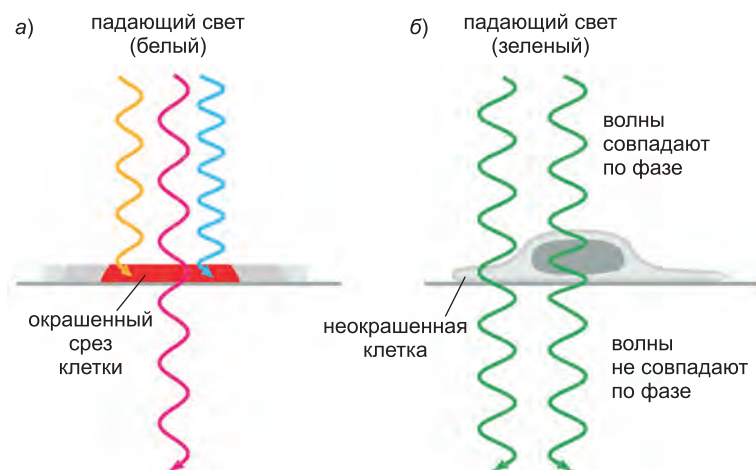


Рис. 9.7. Два способа получения контрастного изображения в световой микроскопии. (а) Окрашенная часть клетки будет поглощать свет некоторых длин волн, в зависимости от красителя, но остальные длины волн будут проходить через нее. Таким образом, получается цветное изображение клетки, видимое в обычный светлопольный микроскоп. (б) Амплитуда света, проходящего через неокрашенную живую клетку, почти не меняется, поэтому даже при очень большом увеличении невозможно рассмотреть подробности структуры. Фаза света, однако, изменяется за счет прохождения луча через более толстые или плотные участки клетки. При помощи интерференции в фазово-контрастном или дифференциальном интерференционном контрастном микроскопе можно сделать видимыми небольшие изменения фазы.

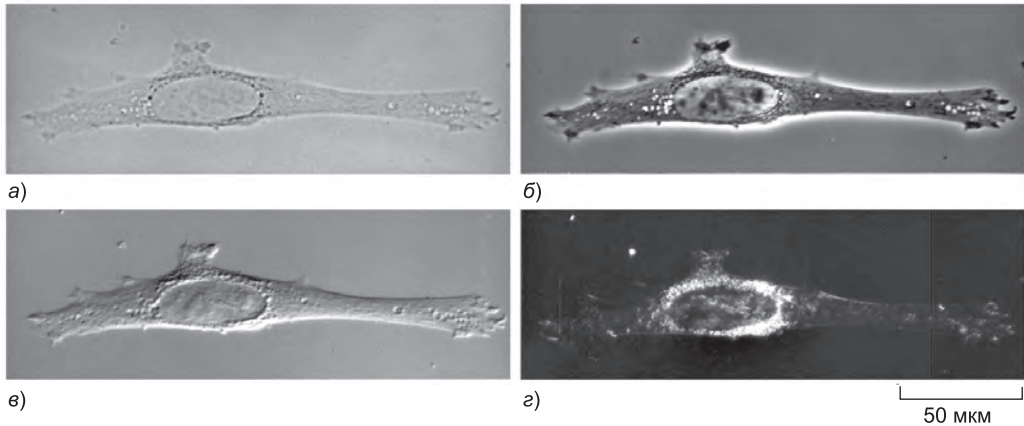


Рис. 9.8. Четыре вида световой микроскопии. Показаны четыре изображения одной и той же клетки фибробласта в культуре. Все изображения можно получить в большинстве современных микроскопов с взаимозаменяемыми компонентами оптической системы. (а) Светлопольная микроскопия. (б) Фазово-контрастная микроскопия. (в) Дифференциальная интерференционная контрастная микроскопия Нормарского. (г) Темнопольная микроскопия.

было следить в реальном времени, часто удобно использовать съемку в замедленном времени. В данном случае камера снимает последовательные кадры, разделенные короткими промежутками времени, поэтому на полученном в результате наборе изображений, показанном на нормальной скорости, события кажутся ускоренными.

9.1.3. Изображения можно увеличивать и анализировать цифровыми методами

В последние годы электронные, или цифровые, системы построения изображений и связанные с ними методы **обработки изображений** в значительной степени повлияли на световую микроскопию. Преодолены определенные практические ограничения микроскопов, связанные с несовершенством оптических систем. Электронные системы построения изображений также позволили обойти два фундаментальных ограничения человеческого глаза: глаз не способен видеть при очень тусклом свете и он не может воспринимать небольшие различия в интенсивности света на ярком фоне. Для усиления нашей способности видеть клетки в условиях слабого освещения мы можем присоединить к микроскопу чувствительную цифровую видеокамеру. Такие камеры содержат прибор с зарядовой связью (ПЗС), похожий на устройства в обычных цифровых камерах. Такие камеры с ПЗС часто охлаждают для уменьшения шума изображения. После этого становится возможным продолжительное время наблюдать клетки при очень маленькой интенсивности света, которая позволяет избежать разрушительного действия яркого света (и повышенной температуры). Такого рода камеры слабой освещенности особенно полезны для наблюдения флуоресцентных молекул в живых клетках, как описано ниже.

Поскольку полученные при помощи камер с ПЗС изображения сохраняют в электронной форме, их легко оцифровать, ввести в компьютер и обработать различными способами для извлечения скрытой информации. Такая обработка изображений компенсирует различные оптические недостатки микроскопов и позволяет получить теоретически возможный предел разрешения. Более того, при помощи цифровой

обработки изображений можно значительно увеличить контрастность и преодолеть ограничения глаза, не позволяющие различить небольшие отклонения интенсивности света. Несмотря на то что такая обработка также усиливает эффекты случайных фоновых неровностей оптической системы, цифровое вычитание изображения пустой области решает и эту проблему. Этот метод позволяет увидеть маленькие прозрачные объекты, которые ранее было невозможно отличить от фона.

Высокая контрастность, достигаемая компьютерной дифференциальной интерференционной контрастной микроскопией, позволяет увидеть такие маленькие объекты, как отдельные микротрубочки (рис. 9.9), диаметр которых составляет 0,025 мкм, что меньше чем одна десятая длины волны света. Отдельные микротрубочки, если они флуоресцентно мечены, также можно увидеть в флуоресцентный микроскоп (см. рис. 9.15). В обоих случаях, однако, неизбежные дифракционные эффекты размывают изображение, поэтому кажется, что ширина микротрубочек составляет по крайней мере 0,2 мкм, и становится невозможным отличить одну микротрубочку от скопления нескольких.

9.1.4. Обычно перед микроскопией интактные ткани фиксируют и изготавливают их срезы

Поскольку толщина большинства образцов тканей слишком велика, чтобы напрямую исследовать отдельные клетки при большом увеличении, их необходимо нарезать на очень тонкие прозрачные слои, или *срезы*. Чтобы сначала иммобилизовать, убить и сохранить клетки в ткани, их нужно обработать *фиксатором*. Наиболее распространенные фиксаторы — формальдегид и глутаральдегид, которые образуют ковалентные связи со свободными аминокислотными группами белков и сшивают их друг с другом, стабилизируя и закрепляя их положение.

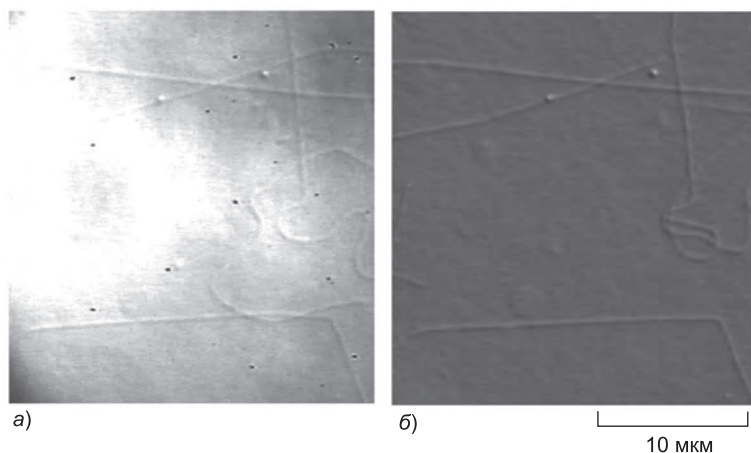


Рис. 9.9. Обработка изображений. (а) Показано необработанное цифровое изображение неокрашенных микротрубочек, полученное при помощи дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии. (б) Изображение обработали, во-первых, путем цифрового вычитания неравномерно освещенного фона, во-вторых, путем цифрового увеличения контрастности. Полученное в результате обработанное изображение значительно легче интерпретировать. Обратите внимание: микротрубочки динамичны и некоторые из них изменили свою длину или положение между изображениями «до и после». (С любезного разрешения Viki Allan.)

Обычно даже после фиксации ткани остаются мягкими и хрупкими, поэтому перед изготовлением срезов их необходимо поместить в поддерживающую среду. Большой частью в качестве среды для заливки используют воски или смолы. В жидком состоянии эти среды проникают в фиксированную ткань и окружают ее; затем их можно сделать твердыми (путем охлаждения или полимеризации). В результате получают твердый блок, из которого легко изготовить срезы на микротоме — приборе с острым лезвием, работающем как ломтерезка (рис. 9.10). Затем срезы (толщиной 1–10 мкм) помещают на поверхность приборного стекла микроскопа.

В клетках (на 70% состоящих из воды) содержится мало компонентов, способных задержать прохождение световых лучей. Поэтому большинство клеток в естественном состоянии, даже после фиксации и изготовления срезов, практически невидимы в обычный световой микроскоп. Существует три основных подхода к работе со срезами ткани, позволяющих увидеть клетки сами по себе или определенные их компоненты.

Во-первых, традиционно срезы обрабатывают органическими красителями, обладающими специфическим сродством к определенным субклеточным компонентам. Краситель *гематоксилин*, например, обладает сродством к отрицательно заряженным молекулам и в результате позволяет увидеть распределение в клетке ДНК, РНК и кислых белков (рис. 9.11). Однако химические принципы специфичности многих красителей неизвестны.

Во-вторых, срезы тканей можно использовать для визуализации специфических профилей дифференциальной экспрессии генов. Гибридизация *in situ*, которую мы обсуждали выше (стр. 573), показывает распределение клеток и содержание определенных молекул РНК в срезе материала или тотальном препарате маленького организма или органа (рис. 9.12). Третий и очень чувствительный подход, повсеместно применяемый для локализации интересующих белков, основан на использовании флуоресцентных зондов и маркеров (см. ниже).

9.1.5. Определенные молекулы можно обнаружить в клетках при помощи флуоресцентной микроскопии

Флуоресцентные молекулы поглощают свет одной длины волны и испускают свет большей длины волны. Если мы будем освещать такое соединение его длиной волны поглощения и смотреть на него через фильтр, пропускающий только свет испускаемой длины волны, то мы увидим светящуюся молекулу на темном фоне. Поскольку фон будет темным, можно обнаружить даже ничтожное количество флуоресцентного красителя. Наблюдая обычными методами такое же число молекул простого красителя, мы

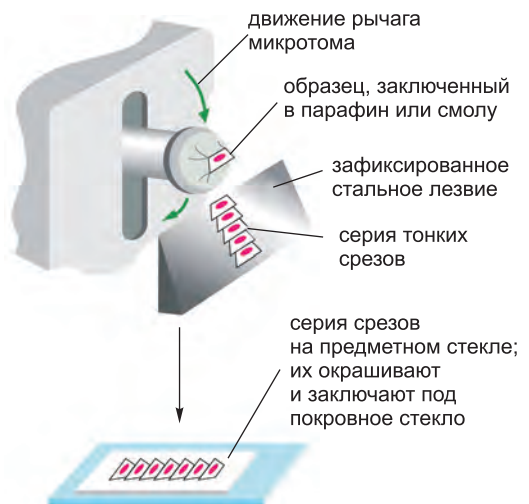


Рис. 9.10. Изготовление срезов ткани. На рисунке показано, как для исследования в световом микроскопе фиксированной ткани в микротоме предварительно изготавливают ее срезы.

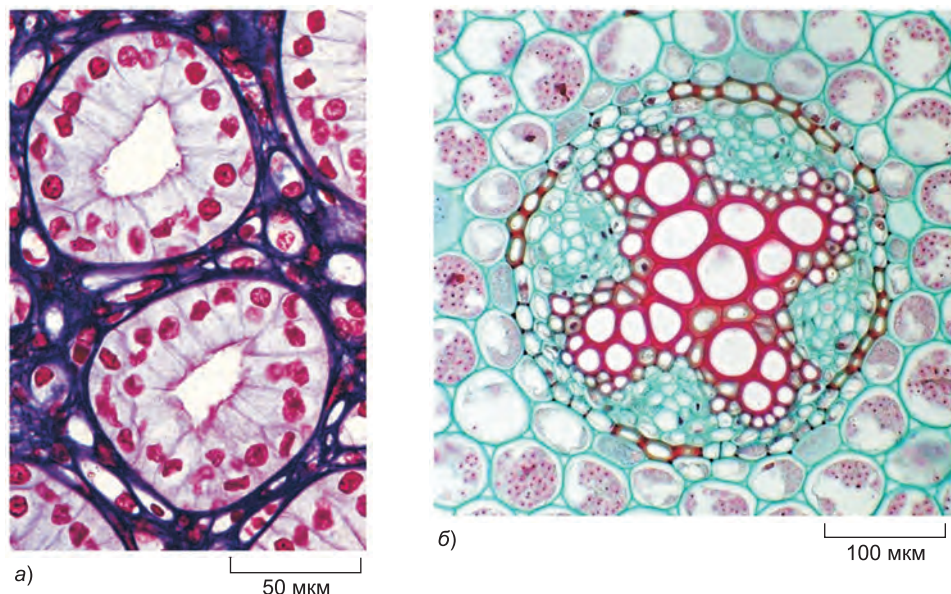


Рис. 9.11. Окрашивание клеточных компонентов. (а) Данный срез собирательных трубочек почек окрашен двумя красителями, гематоксилином и эозином, широко используемыми в гистологии. Каждая трубочка состоит из плотно прилегающих клеток (их ядра окрашены *красным*), формирующих кольцо. Кольцо окружено внеклеточным матриксом, окрашенным *фиолетовым*. (б) Данный срез молодого корня растения обработан двумя красителями, сафранином и прочным зеленым. Прочный зеленый окрашивает целлюлозные клеточные стенки, тогда как сафранин окрашивает одревесневшие клетки ксилемы в ярко-красный. (а, из P. R. Wheater et al., *Functional Histology*, 2nd ed. London: Churchill Livingstone, 1987; б, с любезного разрешения Stephen Grace.).

практически ничего не увидим, так как молекулы будут лишь немного окрашены при просвечивании меченой части образца.

Флуоресцентные красители, используемые для мечения клеток, можно увидеть в флуоресцентный микроскоп. Этот микроскоп похож на обычный световой, за исключением того, что свет из мощного источника проходит через два набора фильтров: один фильтр отсекает ненужные длины волн до того, как они достигнут образца, другой фильтрует свет, испускаемый образцом. Первый фильтр пропускает только те длины волн, которые возбуждают данный флуоресцентный краситель, тогда как второй блокирует этот свет и пропускает только длины волн, испускаемые при флуоресценции образца (**рис. 9.13**).

Флуоресцентную микроскопию чаще всего применяют для обнаружения определенных белков или других молекул в клетках и тканях. Очень эффективный и широко распространенный метод — присоединение флуоресцентных красителей к молекулам антител, которые затем служат в качестве высокоспецифичных и универсальных окрашивающих реагентов, селективно связывающихся с определенными макромолекулами, которые они узнают в клетках или внеклеточном матриксе. С этой целью широко применяют два флуоресцентных красителя. Во-первых, это *флуоресцеин* с ярко-зеленой флуоресценцией при возбуждении синим светом. Во-вторых, это *родамин*, испускающий темно-красный свет при возбуждении зелено-желтым светом (**рис. 9.14**). Сшивая одно антитело с флуоресцеином, а другое — с рода-

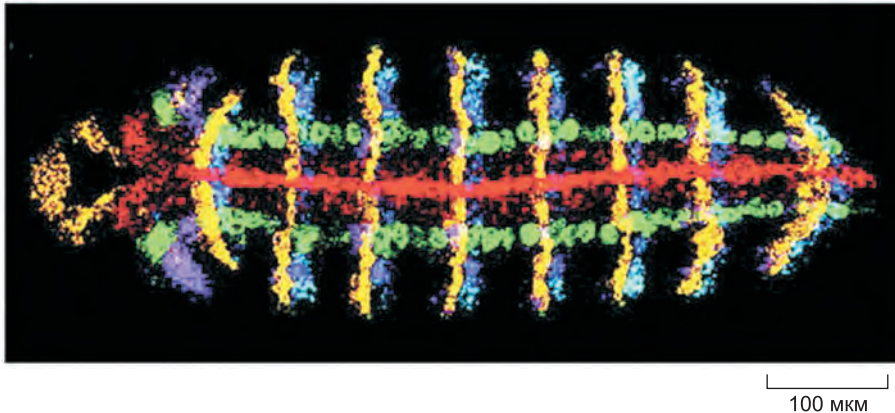


Рис. 9.12. Гибридизация РНК *in situ*. В главе 8 (см. рис. 8.71) описано, как при помощи гибридизации *in situ* можно визуализировать распределение различных РНК в тканях. Здесь на примере одного эмбриона плодовой мушки показан транскрипционный профиль пяти различных генов, участвующих в формировании раннего зародыша. Все зонды РНК флуоресцентно помечены различными способами (напрямую или косвенно). Результирующие изображения были ложно окрашены и совмещены так, чтобы каждый отдельный транскрипт был хорошо виден. Здесь показаны профили экспрессии генов *wingless* (желтый), *engrailed* (синий), *short gastrulation* (красный), *intermediate neuroblasts defective* (зеленый) и *muscle specific homeobox* (фиолетовый). (D. Kosman et al., *Science* 305: 846, 2004. С любезного разрешения издательства AAAS.)

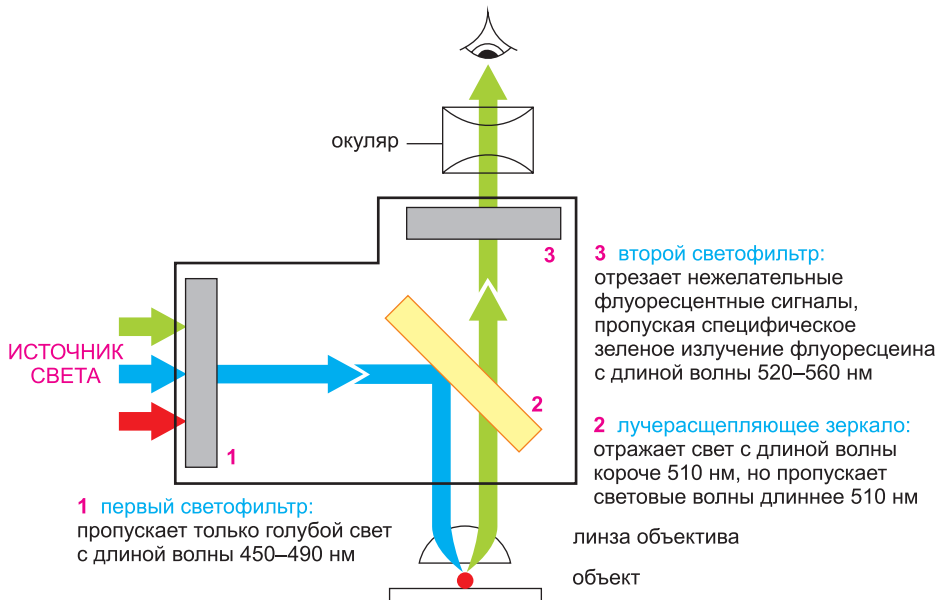


Рис. 9.13. Оптическая система флуоресцентного микроскопа. Набор фильтров состоит из фильтров возбуждения (1), эмиссии (или запирающего фильтра) (3) и дихроичного (светоделительного) зеркала (2). Здесь показан пример набора фильтров для регистрации флуоресцентной молекулы флуоресцеина. В данном виде микроскопии особенно важно наличие объективов с высокой числовой апертурой, поскольку при данном увеличении яркость флуоресцентного изображения пропорциональна четвертой степени числовой апертуры (см. также рис. 9.6).

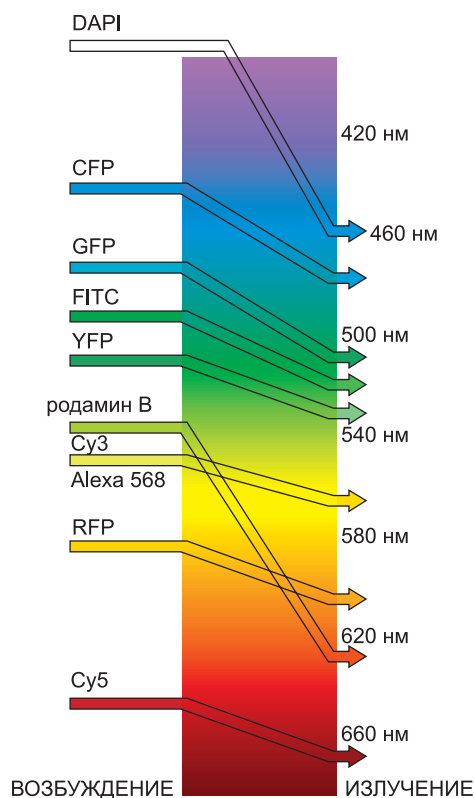


Рис. 9.14. Флуоресцентные зонды. Показаны максимальные длины волн поглощения и испускания нескольких широко применяемых флуоресцентных зондов в соответствии с цветовым спектром. Фотон, испускаемый флуоресцентной молекулой, обязательно обладает меньшей энергией (большей длиной волны), чем поглощенный фотон. Этим можно объяснить разницу между максимумами поглощения и флуоресценции. CFP, GFP, YFP и RFP — это голубой, зеленый, желтый и красный флуоресцентные белки соответственно. Это не красители, и мы подробно обсудим их ниже в этой главе. ДАФИ (4,6-диамидино-2-фенил, *англ.* DAPI) широко используют в качестве общего флуоресцентного зонда ДНК. Он поглощает УФ и флуоресцирует ярко-синим. ФИТЦ (*англ.* FITC) — это сокращение для флуоресцеина изотиоцианата, широко применяемого производного флуоресцеина, испускающего ярко-зеленый свет. Остальные зонды обычно используют для флуоресцентного мечения антител и других белков.

мином, можно сравнивать распределение различных молекул в клетке. Молекулы красителей в микроскоп будут видны по отдельности при переключении между двумя наборами фильтров, каждый из которых специфичен к определенному красителю.

Как показано на [рис. 9.15](#), точно так же

можно использовать три флуоресцентных метки для локализации трех различных молекул в одной и той же клетке. В последнее время разработано несколько специальных красителей для флуоресцентной микроскопии; к ним относятся, например, Cy3, Cy5 и Alexa (см. [рис. 9.14](#)). Эти органические флуорохромы обладают несколькими недостатками. Они возбуждаются светом очень узкого промежутка длин волн (хотя для разных красителей длины волн разные) и довольно быстро тускнеют при постоянном освещении. Однако недавно разработаны более стабильные неорганические флуорохромы. Мельчайшие кристаллы полупроводниковых материалов, называемые наночастицами, или *квантовыми точками*, возбуждаются широким спектром синего света. Цвет испускаемого ими света зависит от точного размера нанокристалла, диаметр которого обычно находится в пределах от 2 до 10 нм. Более того, их флуоресценция очень медленно затухает со временем ([рис. 9.16](#)). Эти наночастицы после присоединения к другим зондам, например антителам, идеально подходят для наблюдения за молекулами во времени. После введения в живую клетку, например в эмбрион, потомков исходной клетки можно наблюдать даже через несколько дней по их флуоресценции. Таким образом, можно проследивать клеточные линии.

Методы флуоресцентной микроскопии, обсуждаемые ниже в этой главе, можно также применять для наблюдения за изменением концентрации и местоположения определенных молекул внутри *живых* клеток (см. [стр. 592](#)).

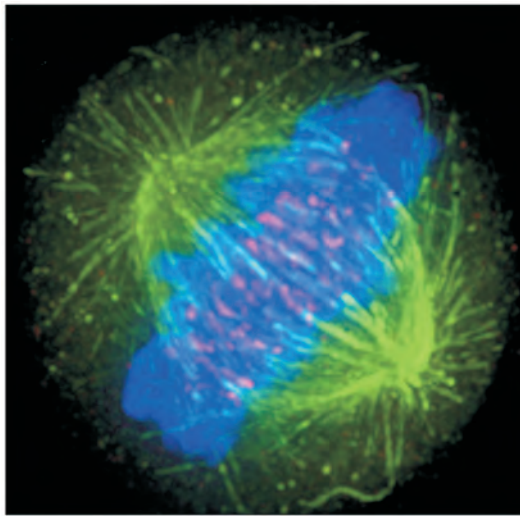


Рис. 9.15. Флуоресцентная микроскопия с несколькими зондами. Для получения данной композиционной микрофотографии клетки в митозе использованы три различных флуоресцентных зонда для окрашивания трех различных клеточных компонентов. Микротрубочки веретена деления помечены *зеленым* флуоресцентным антителом, центромеры — *красным*, а ДНК конденсированных хромосом — *синим* флуоресцентным красителем DAPI. (С любезного разрешения Kevin F. Sullivan.)

9.1.6. Антитела можно использовать для обнаружения определенных молекул

Антитела — это белки, синтезируемые в иммунной системе позвоночных для защиты против инфекции (см. обсуждение в главе 24). Это уникальные

белки, поскольку они синтезируются в миллиардах различных форм, каждая из которых несет отличный сайт связывания, узнающий определенную молекулу-мишень (или *антиген*). Высокая специфичность антител к антигенам делает их эффективным инструментом в руках клеточного биолога. Меченные флуоресцентными зондами антитела незаменимы для обнаружения при помощи флуоресцентной микроскопии специфических молекул в клетках (**рис. 9.17**). Меченные электронно-плотными частицами, например частицами коллоидного золота, антитела применяют для сходных целей в электронной микроскопии (см. ниже).

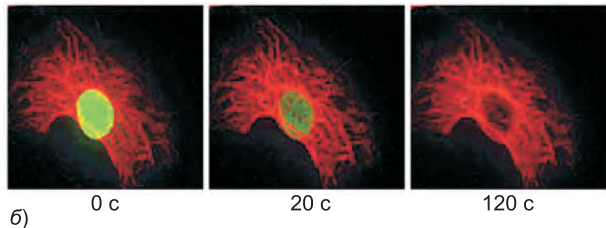
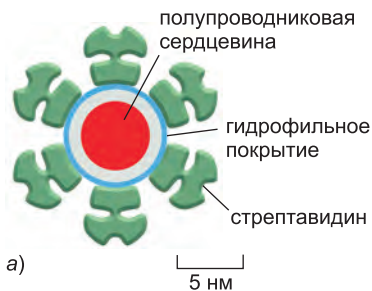


Рис. 9.16. Флуоресцентные наночастицы, или квантовые точки. Квантовые точки — это мельчайшие наночастицы полупроводника селенида кадмия, покрытые специальным соединением для того, чтобы они стали растворимыми в воде (а). Их можно сшивать с белковыми зондами, например антителами или стрептавидином. При введении в клетку они будут связываться с интересующим белком. Квантовые точки разных размеров испускают свет разных длин волн — чем больше точка, тем больше длина волны, — но возбуждаются они одинаковым синим светом. (б) Квантовые точки, в отличие от большинства органических красителей, способны светиться неделями. В данной клетке ядерный белок (*зеленый*) помечен органическим флуоресцентным красителем (Alexa 488), а микротрубочки окрашены (*красный*) квантовыми точками, сшитыми со стрептавидином. При продолжительном освещении синим светом флуоресцентный краситель быстро выцветает, тогда как квантовые точки продолжают флуоресцировать. (б, из X. Wu et al. *Nat. Biotechnol.* 21: 41–46, 2003. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

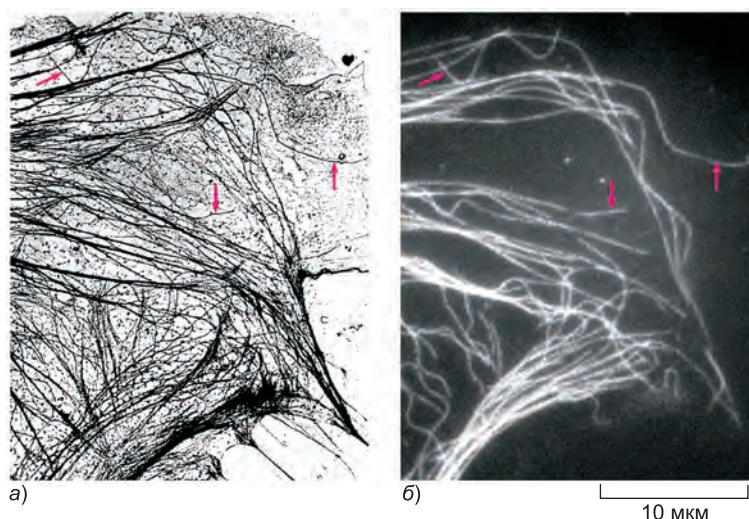


Рис. 9.17. Иммунофлуоресценция. (а) Микрофотография края культивированной клетки эпителия, полученная при помощи трансмиссионного электронного микроскопа. Видно распределение микротрубочек и других филаментов. (б) Та же область, окрашенная флуоресцентными антителами против тубулина, белка, из которого собираются микротрубочки. Изображение получено при помощи метода непрямого иммуноцитохимии (см. рис. 9.18). Красные стрелки указывают на отдельные микротрубочки, видимые на обоих изображениях. Обратите внимание, что за счет дифракции в световом микроскопе толщина микротрубочек кажется равной 0,2 мкм, хотя реальный их диаметр составляет 0,025 мкм. (M. Osborn, R. Webster and K. Weber, *J. Cell Biol.* 77: R27–R34, 1978. С любезного разрешения The Rockefeller University Press.)

При использовании антител для обнаружения и анализа определенных молекул в клетках мы часто усиливаем сигнал флуоресценции химическими методами. Например, несмотря на то что такая маркерная молекула, как флуоресцентный краситель, может быть напрямую сшита с используемым для специфического узнавания антителом — *первичным антителом*, — более сильный сигнал можно получить при помощи немеченого первичного антитела, которое затем взаимодействует со связывающим его набором меченых *вторичных антител* (рис. 9.18). Этот процесс носит название *непрямой иммуноцитохимии*.

В наиболее чувствительных методах усиления сигнала в качестве маркерной молекулы, сшитой со вторичным антителом, используют фермент. Фермент щелочная фосфатаза, например, в присутствии соответствующих химических соединений дает неорганический фосфат, который, в свою очередь, приводит к образованию окрашенного осадка. В результате можно определить локализацию вторичного антитела и, следовательно, местоположение комплекса антиген-антитело. Поскольку каждая молекула фермента катализирует реакцию образования тысяч молекул продукта, можно обнаружить даже очень маленькое количество антигена. Основанный на данном принципе твердофазный иммуноферментный анализ (англ. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) в планшетах часто используется в медицине в качестве очень чувствительного метода анализа, например, в тестах на беременность или различные типы инфекций. Несмотря на то что ферментативное усиление делает иммуноферментные анализы очень чувствительными, диффузия

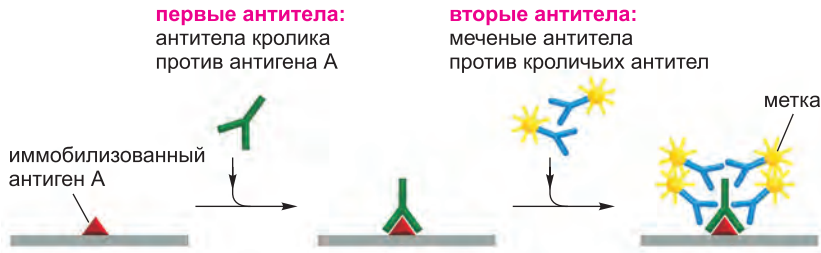


Рис. 9.18. Непрямая иммуноцитохимия. Данный метод обнаружения очень чувствителен, поскольку каждое первичное антитело узнается множеством молекул вторичного антитела. Вторичные антитела ковалентно связаны с маркерной молекулой, позволяющей их легко обнаружить. В качестве таких молекул широко используют флуоресцентные красители (для флуоресцентной микроскопии), фермент пероксидазу хрена (для обычной световой микроскопии или электронной микроскопии), частицы коллоидного золота (для электронной микроскопии) и ферменты щелочную фосфатазу или пероксидазу (для биохимического обнаружения).

окрашенного осадка ограничивает пространственное разрешение данного метода в микроскопии. Для более точной визуальной локализации используют флуоресцентные красители.

Антитела проще всего получать путем многократного введения образца антигена в организм животного, например кролика или козы, и последующего сбора обогащенной антителами сыворотки. Такая *иммунная сыворотка*, или *антисыворотка*, содержит неоднородную смесь антител, каждое из которых синтезировано отличной антитело-секретирующей клеткой (В-лимфоцитом). Различные антитела узнают различные части молекулы антигена (называемые антигенными детерминантами, или эпитопами), а также посторонние примеси в образце антигена. Удаление нежелательных молекул антител, связывающих другие молекулы, увеличивает специфичность иммунной сыворотки к определенному антигену; например, антисыворотка к белку X при пропускании через колонку для аффинной хроматографии, содержащей антигены X, будет связываться с ними, а остальные антитела пройдут насквозь. Затем очищенное анти-X антитело можно элюировать из колонки. Однако неоднородность таких иммунных сывороток иногда ограничивает их применимость. Эта проблема решается путем использования моноклональных антител (смотри рис. 8.8). Впрочем, с моноклональными антителами также связаны некоторые проблемы. Поскольку это белковые антитела одного вида, они демонстрируют практически идеальную специфичность к единственному сайту или эпитопу на антигене, но доступность эпитопа и, следовательно, эффективность антитела, может зависеть от процесса приготовления образца. Например, некоторые моноклональные антитела будут взаимодействовать только со свободными антигенами, другие — только после использования определенных фиксаторов, а третьи — только с белками, денатурированными в полиакриламидном геле в присутствии ДСН, а не с белками в их нативной конформации.

9.1.7. Оптический микроскоп позволяет визуализировать сложные трехмерные объекты

Как мы видели, в случае обычной световой микроскопии необходимо изготовить тонкие срезы ткани; чем тоньше срез, тем четче изображение. В результате

процесса изготовления срезов мы теряем информацию о третьем пространственном измерении. Как тогда можно получить изображение трехмерной архитектуры клетки или ткани, и как мы можем увидеть микроскопическую структуру образца, который, по какой-либо причине нельзя сперва нарезать? Несмотря на то что оптический микроскоп фокусируется на определенной фокальной плоскости в пределах сложного трехмерного образца, все остальные части образца, расположенные ниже и выше плоскости фокуса, также освещаются. Свет, исходящий от этих областей, также вносит вклад в изображение, давая расфокусированную размытость. В результате интерпретация деталей изображения может значительно усложниться, а тонкая структура станет неясной за счет света «не в фокусе».

Эту проблему решают при помощи двух различных, но дополняющих друг друга подходов: вычислительного и оптического. Эти методы построения трехмерного микроскопического изображения позволяют сфокусироваться в толстом образце на выбранной плоскости, игнорируя свет, идущий от расфокусированных областей под и над этой плоскостью. Таким образом, можно увидеть четкий, тонкий *оптический срез*. Из набора таких оптических срезов, сделанных на разной глубине образца, на компьютере легко восстановить трехмерное изображение. Эти методы дают микроскопистам то же, что томография (другими способами) дает радиологам, изучающим человеческое тело: оба аппарата воссоздают подробные изображения срезов внутреннего устройства интактной структуры.

Вычислительный подход часто называют *обращенной сверткой изображения*. Чтобы понять то, как он работает, вспомним, что за счет волновой природы света в системе линз микроскопа точечный источник света видится как маленький размытый диск (см. рис. 9.5). Его размытость возрастает, если источник света лежит ниже или выше фокальной плоскости. Такое размытое изображение точечного источника света называют *функцией рассеяния точки*. Тогда каждую точку препарата можно заменить на соответствующий размытый диск. В результате мы получим размытое изображение сложного объекта. Для обращенной свертки мы, обычно при помощи охлажденной камеры с ПЗС, сначала получаем набор (размытых) изображений, поочередно фокусируя микроскоп на разных фокальных плоскостях. Затем набор цифровых изображений обрабатывается компьютером для максимально возможного избавления от размытости. По существу, компьютерная программа использует функцию рассеяния точки микроскопа для определения того, как повлияет размытость на изображение, и затем применяет эквивалентную «обратную размытость» (обращенную свертку), превращая нечеткое трехмерное изображение в набор чистых оптических срезов. Требуемые вычисления довольно сложны и раньше серьезно ограничивали исследователей. Однако сейчас, когда компьютеры стали быстрее и дешевле, метод обращенной свертки изображения набирает популярность. На [рис. 9.19](#) показан пример применения данного подхода.

9.1.8. Конфокальный микроскоп позволяет получить оптические срезы путем исключения расфокусированного света

Конфокальный микроскоп решает ту же задачу, что и обращенная свертка, но путем манипуляции светом перед его измерением; это аналоговый метод, а не цифровой. Оптическая система **конфокального микроскопа** очень сложна, но основной принцип, проиллюстрированный на [рис. 9.20](#), довольно прост. По получаемым результатам конфокальная микроскопия значительно превосходит обычную

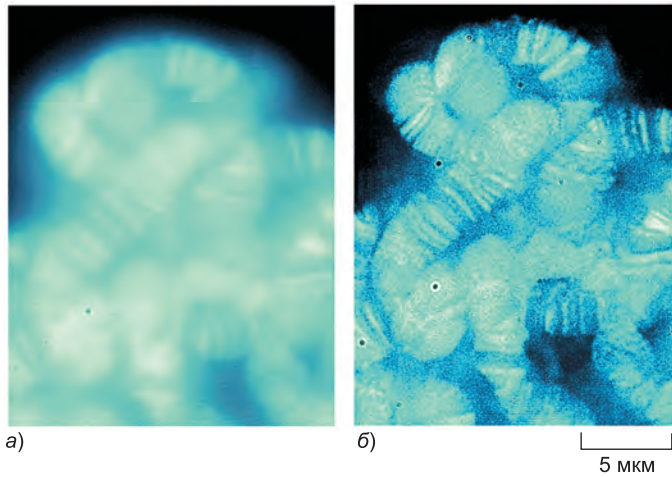


Рис. 9.19. Обращенная свертка изображения. (а) Световая микрофотография крупной политенной хромосомы *Drosophila*, окрашенной ДНК-связывающим флуоресцентным красителем. (б) После обращенной свертки изображения становится видна полосатость хромосом. Каждая полоса имеет ширину около 0,25 мкм, что близко к разрешающей способности микроскопа. (С любезного разрешения John Sedat Laboratory.)

оптическую микроскопию (рис. 9.21).

Обычно в микроскопе используют флуоресцентную оптику (смотри рис. 9.13), но, вместо того чтобы освещать весь образец одновременно, как это обычно делается, оптическая система в каждый момент времени фокусирует пятно света на единственной точке на определенной глубине образца. Для этого требуется очень яркий точечный источник света; обычно используют лазер, пучок которого пропускают через диафрагму очень малого диаметра. Испускаемую освещаемым веществом флуоресценцию собирают и переносят на изображение при помощи подходящего детектора света. Перед детектором устанавливают диафрагму с точечным отверстием в *конфокальном* положении по отношению к диафрагме лазера, то есть лучи, испускаемые освещенной точкой образца, находятся точно в фокусе. Таким образом, свет от этой точки препарата сходится на диафрагме и идет на детектор.

С другой стороны, свет от областей вне фокальной плоскости освещения также находится не в фокусе точечной диафрагмы и, следовательно, большей частью отсекается от детектора (см. рис. 9.20). Для построения двумерного изображения последовательно считывают данные с каждой точки фокальной плоскости путем растрового сканирования всей плоскости (как на экране телевизора). Изображение выводится на видеозэкран. На рис. 9.20 не показано, что сканирование обычно производится путем отражения луча колеблющимся зеркалом, расположенным между дихроичным зеркалом и линзой объектива так, чтобы освещающий пучок лазера и конфокальная диафрагма находились строго в одном регистре.

Конфокальный микроскоп позволил расшифровать структуры множества сложных трехмерных объектов (рис. 9.22), включая сети волокон цитоскелета в цитоплазме и распределение хромосом и генов в ядре.

Сравнительная ценность методов обращенной свертки и конфокальной микроскопии для трехмерной оптической микроскопии все еще остается под вопросом.

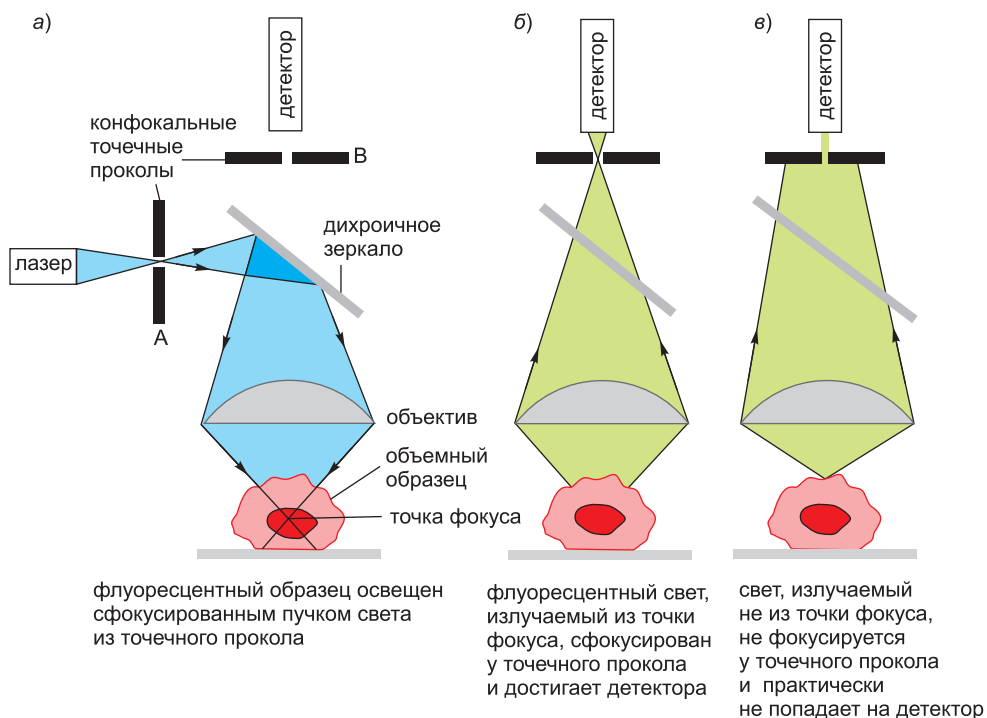


Рис. 9.20. Конфокальный флуоресцентный микроскоп. На данной упрощенной схеме видно, что расположение оптических составляющих сходно со стандартным флуоресцентным микроскопом, изображенным на рисунке 9.13. Основное отличие состоит в том, что для освещения диафрагмы с точечным отверстием, чье изображение фокусируется на единственной точке образца, используется лазер (а). Испущенная данной точкой образца флуоресценция фокусируется на второй (конфокальной) диафрагме (б). Свет, испускаемый другими областями образца, не фокусируется на диафрагме и, следовательно, не вносит вклада в конечное изображение (в). Путем сканирования образца лучом лазера строится очень четкое двумерное изображение фокальной плоскости, не нарушаемое светом других областей препарата.

Конфокальные микроскопы в общем случае проще в использовании, чем системы обращенной световой микроскопии, и конечные оптические срезы можно быстро увидеть. С другой стороны, охлажденные камеры с ПЗС (приборами с зарядовой связью), применяемые в системах обращенной световой микроскопии, очень эффективно собирают свет малой интенсивности, и их можно использовать для создания подробных трехмерных изображений слабоокрашенных или легко повреждаемых светом конфокального микроскопа препаратов.

Оба метода, однако, имеют еще один недостаток: они плохо работают с толстыми образцами. Методы обращенной световой микроскопии быстро становятся неэффективными на глубине препарата, большей чем 40 мкм, тогда как конфокальные микроскопы способны получать изображения до глубины 150 мкм. В настоящее время в специальных конфокальных микроскопах используют принцип возбуждения флуоресцентных молекул для проникновения глубже в образец. Обычно флуоресцентные молекулы возбуждаются единственным высокоэнергетическим фотоном, длина волны которого меньше, чем испускаемый свет, но их можно дополнительно возбудить поглощением двух (или более) фотонов меньшей энергии при условии, что они

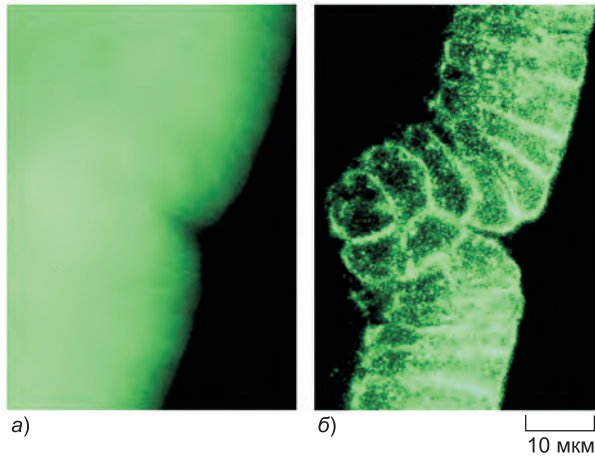


Рис. 9.21. Сравнение традиционной и конфокальной микроскопии. Это две микрофотографии одного и того же зародыша *Drosophila* на стадии гастрюлы, окрашенного флуоресцентным зондом к актиновым филаментам. (а) Обычное, необработанное изображение размыто из-за присутствия флуоресцирующих структур ниже и выше фокальной плоскости. (б) На конфокальном изображении эта расфокусированная информация удаляется, и получается четкий оптический срез клеток зародыша. (С любезного разрешения Richard Warn и Peter Shaw.)

достигают молекулы за фемтосекунду или меньше. Применение такого возбуждения большей длиной волны несет несколько важных преимуществ. Помимо снижения фонового шума, красный или почти инфракрасный свет способен проникать глубже в образец. Мультифотонные конфокальные микроскопы, сконструированные с использованием такого «**двухфотонного**» эффекта, обычно способны давать четкие изображения даже на глубине образца 0,5 мм. Это особенно ценно при изучении живых тканей, например, для визуализации динамической активности синапсов и нейронов вблизи поверхности живого мозга (**рис. 9.23**).

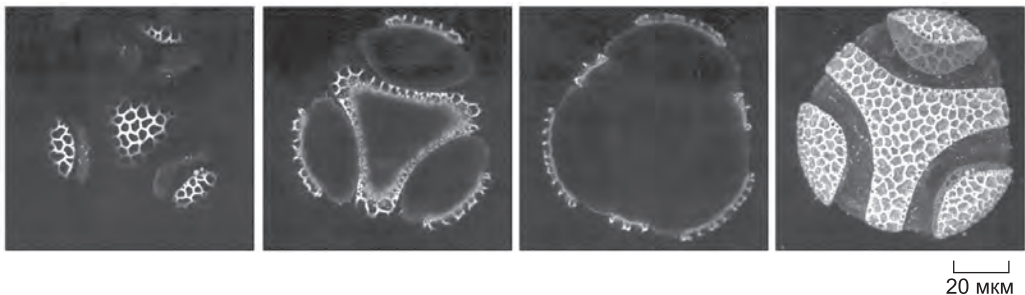


Рис. 9.22. Трехмерная реконструкция изображений конфокального микроскопа. Пыльца, в данном случае страстоцвета, обладает сложной скульптурированной клеточной стенкой, содержащей флуоресцентные соединения. Изображения, полученные на разной глубине пыльцевого зерна, могут быть объединены для получения трехмерной структуры целой пылинки (показана справа). Три отдельных оптических среза из полного набора из 30, на каждом из которых почти не видно вклада соседних срезов, показаны слева. (С любезного разрешения Brad Amos.)

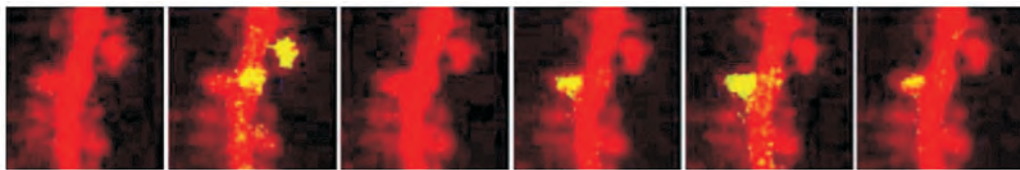


Рис. 9.23. Мультифотонное получение изображений. Инфракрасный свет обладает меньшим повреждающим действием на живые клетки и способен проникать глубже в живые ткани. Двухфотонный эффект, при котором флуорохром может быть возбужден при одновременном поглощении двух инфракрасных фотонов вместо единственного высокоэнергетического фотона, позволяет нам видеть на глубину 0,5 мм внутрь коры живого головного мозга мыши. Краситель, флуоресценция которого изменяется в зависимости от концентрации кальция, позволяет увидеть изменяющиеся во времени активные синапсы (желтые) на дендритных шипиках (красные). (С любезного разрешения Karel Svoboda.)

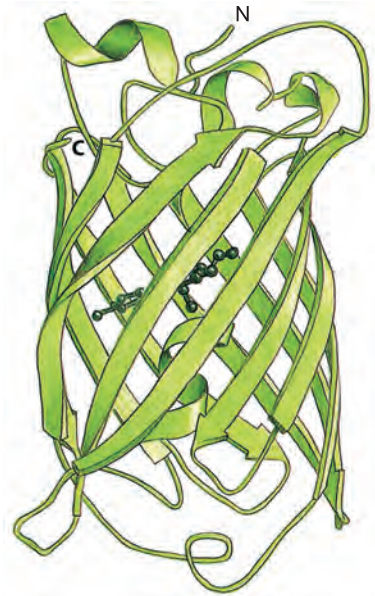
9.1.9. Флуоресцентные белки можно использовать для маркирования отдельных белков в живых клетках и организмах

Даже наиболее стабильные клеточные структуры должны быть собраны, разобраны и преобразованы в течение жизненного цикла клетки. Другие структуры, часто огромного размера в молекулярном масштабе, быстро изменяются, движутся и перестраивают себя по мере того, как клетка управляет своими внутренними процессами и реагирует на окружающую среду. Сложные, высокоорганизованные элементы молекулярного аппарата перемещают компоненты по клетке, контролируя движение внутрь ядра и из него, из одной органеллы в другую и в саму клетку и из нее.

Разработано несколько методов, позволяющих сделать определенные компоненты живых клеток видимыми в микроскоп. Большинство этих подходов включает в себя использование флуоресцентных белков, и они требуют компромисса между сохранностью структуры и эффективным мечением. Все описанные выше флуоресцентные молекулы синтезируются вне клетки и затем искусственно вводятся в нее. Сейчас, после обнаружения генов, кодирующих по своей природе флуоресцентные молекулы белков, открыты новые возможности. Генная инженерия теперь позволяет создавать клеточные линии или организмы, синтезирующие свои собственные видимые маркеры и метки без введения чужеродных молекул. Такие клетки выставляют напоказ свое внутреннее устройство в ярком флуоресцентном свете.

Главным среди флуоресцентных белков, используемых для этих целей, является **зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein, GFP)**, выделенный из медузы *Aequoria victoria*. Этот белок в норме кодируется единственным геном, который можно клонировать и ввести в клетки других организмов. Синтезированный белок сначала не флуоресцирует, но где-то через час (больше или меньше в случае некоторых аллелей генов) он претерпевает автокаталитические посттрансляционные модификации для формирования эффективного и яркого флуоресцирующего центра, окруженного внутренним объемом бочкообразного белка (рис. 9.24). Интенсивный сайт-специфический мутагенез последовательности исходного гена привел к получению полезной флуоресценции в разнообразных организмах — от животных и растений до грибов и микробов. Также улучшена эффективность флуоресценции и созданы альтернативные формы белка, отличающиеся по спектрам поглощения

Рис. 9.24. Зеленый флуоресцентный белок (GFP). На схематически изображенной здесь структуре GFP хорошо видны одиннадцать β -листов, образующих стенки «бочки». Внутри «бочки» расположен активный хромофор (*темно-зеленый*), который формируется посттрансляционно из выступающих боковых цепей трех аминокислотных остатков. (Адаптировано из M. Ormö et al., *Science* 273: 1392–1395, 1996. С любезного разрешения издательства AAAS.)



и испускания в сине-зелено-желтых пределах. Недавно открытое в кораллах родственное семейство флуоресцентных белков позволило использовать красную область спектра (смотри рис. 9.14).

Одно из самых простых применений GFP является его использование в качестве репортерной молекулы — флуоресцентного зонда для наблюдения экспрессии генов. Можно создать трансгенный организм, у которого GFP-кодирующая последовательность будет находиться под транскрипционным контролем промотора интересующего гена. Это позволяет напрямую наблюдать профиль экспрессии генов в живом организме (**рис. 9.25**). Другое применение — присоединение к GFP сигнального пептида для направления его в определенный компартмент клетки, например, эндоплазматический ретикулум или митохондрию. В результате органелла освещается, и можно наблюдать ее в живом состоянии (см. рис. 12.35, б).

Кодирующую последовательность ДНК GFP также можно вставить в начало или конец гена другого белка, что приводит к синтезу химерного продукта, состоящего из этого белка и присоединенного к нему GFP-домена. Во многих случаях такой химерный белок с GFP ведет себя так же, как и исходный белок, напрямую указывая на его положение

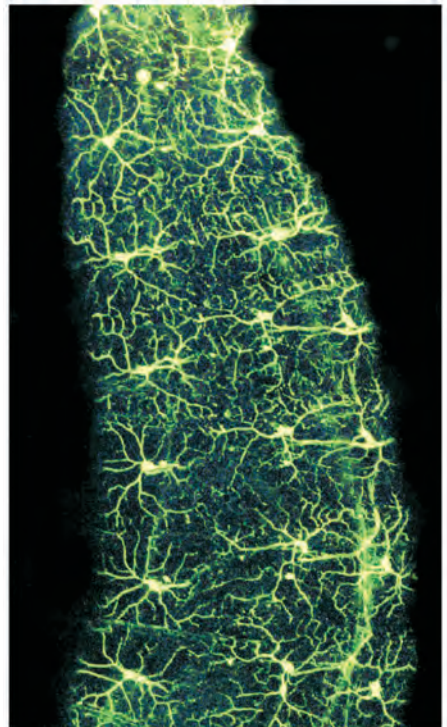


Рис. 9.25. Использование зеленого флуоресцентного белка (GFP) в качестве репортера. В данном эксперименте, проводившемся на фруктовой мушке, ген GFP присоединяли (методом рекомбинантных ДНК) к мушиному промотору, активному только в определенном наборе нейронов. Данное изображение живого эмбриона мушки было получено при помощи флуоресцентного микроскопа. На фотографии видны примерно 20 нейронов, из каждого выходят длинные отростки (аксоны и дендриты), сообщающиеся с другими (нефлуоресцирующими) клетками. Эти нейроны расположены прямо под поверхностью животного и позволяют ему чувствовать его ближайшее окружение. (W. B. Grueber et al., *Curr. Biol.* 13: 618–626, 2003. С любезного разрешения Elsevier.)

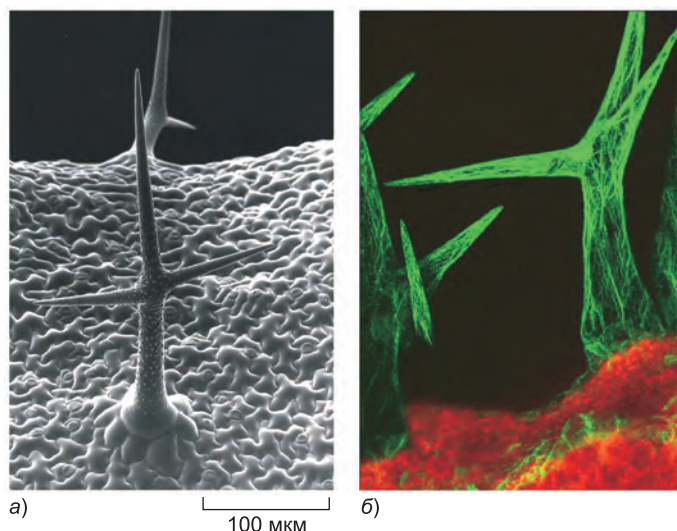


Рис. 9.26. Белки, меченные GFP. (а) Верхняя поверхность листьев растения *Arabidopsis* покрыта огромными разветвленными одноклеточными волосками, выступающими над плоскостью эпидермиса. Эти волоски, или трихомы, можно увидеть в сканирующем электронном микроскопе. (б) Если *Arabidopsis* трансформировать последовательностью ДНК, кодирующей талин (актин-связывающий белок) и сшитой с кодирующей последовательностью GFP, синтезируемый флуоресцентный белок талин связывает актиновые филаменты во всех живых клетках трансгенного растения. Конфокальная микроскопия позволяет наблюдать динамику всего актинового цитоскелета трихомы (зеленый). Красная флуоресценция исходит от хлорофилла клеток листа, лежащих под эпидермисом. (С любезного разрешения Paul Linstead (а) и Jaideep Mathur (б).)

ние и функционирование, благодаря генетически закодированному окрашиванию (рис. 9.26). Часто можно доказать, что химерный белок с GFP функционально эквивалентен немеченому белку; например, можно использовать его для спасения мутанта, у которого исходный белок отсутствует. Мечение GFP является наиболее прозрачным и однозначным способом показать распределение и динамику белка в живом организме (рис. 9.27).

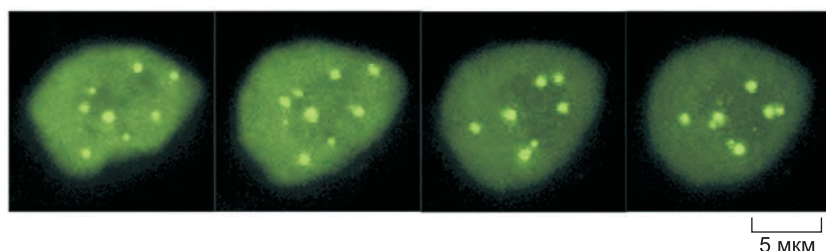


Рис. 9.27. Динамика мечения GFP. На данной последовательности микрофотографий показан набор трехмерных изображений живого ядра, полученных в течение часа. Клетки табака были стабильно трансформированы GFP, сшитым с белком сплайсосом, концентрирующимся в маленьких ядерных тельцах — тельцах Кахали (см. рис. 6.48). Флуоресцирующие тельца Кахали, хорошо видимые в живой клетке при помощи конфокальной микроскопии, — динамические структуры, передвигающиеся по ядру. (С любезного разрешения Kurt Boudonck, Liam Dolan и Peter Shaw.)

9.1.10. Динамику белков можно наблюдать в живых клетках

В настоящее время флуоресцентные белки используют не только для локализации определенного белка в клетке, но и для изучения его кинетических свойств и взаимодействия с другими белками. Здесь мы опишем три метода, в которых GFP и родственные ему белки используют для этих целей.

Первый метод — это наблюдение за взаимодействием одного белка с другим при помощи **резонансного переноса энергии флуоресценции** (Fluorescence Resonance Energy Transfer, **FRET**). В данном подходе, принцип которого описан выше (см. рис. 8.26), две интересующие молекулы метят разными флуорохромами, подобранными таким образом, чтобы спектр испускания одного из них перекрывался со спектром поглощения другого. Если два белка связываются друг с другом и их флуорохромы сближаются на расстояние меньше 5 нм, один флуорохром переносит энергию поглощенного света на другой. Таким образом, когда комплекс освещают светом длины волны возбуждения первого флуорохрома, регистрируемая флуоресценция будет иметь длину волны испускания второго флуорохрома. В данном методе в качестве флуорохромов можно использовать две различные спектральные формы GFP и наблюдать такие процессы, как взаимодействие сигнальных молекул с рецепторами или белков в макромолекулярных комплексах (рис. 9.28).

Высокая организация и быстрота многих внутриклеточных процессов, например действия сигнальных молекул или движения белков цитоскелета, усложняют их изучение на уровне единственной клетки. В идеале мы хотим вводить в живую клетку любую интересующую молекулу в точно заданный момент времени и в точно заданном положении и следить за последующим поведением и ответом клетки на эту молекулу. Микроинъекции не позволяют точно контролировать место и время доставки молекулы. Более эффективный подход — синтез неактивной формы интересующей флуоресцентной молекулы, введение ее в клетку и внезапная активация в выбранном клеточном сайте путем фокусирования на нем луча света. Этот процесс называют **фотоактивацией**. Такого рода неактивные светочувствительные молекулярные предшественники, часто называемые *«запертыми» молекулами*, сконструированы для многих флуорохромов. Для фокусировки интенсивного пучка света лазера на мельчайшей области клетки можно использовать микроскоп, так что экспериментатор способен контролировать, где и когда будет фотоактивирована флуоресцентная молекула.

Один из классов «запертых» флуоресцентных белков получают путем присоединения фотоактивируемого флуоресцентного маркера к очищенному белку. Важно, чтобы модифицированный белок оставался биологически активным: мечение «запертым» флуоресцентным красителем добавляет на поверхность белка объемную группу, которая легко может изменить свойства белка. Удовлетворительный протокол мечения обычно составляется путем проб и ошибок. Как только биологически активный меченый белок синтезирован, его необходимо ввести в клетку (см. рис. 9.34), где можно наблюдать за его поведением. Например, меченный «запертым» флуоресцеином тубулин при введении в делящуюся клетку может встраиваться в микротрубочки митотического веретена деления. Когда небольшой участок веретена деления освещают лазером, меченый тубулин начинает флуоресцировать, что позволяет с легкостью следить за его движением вдоль микротрубочек (рис. 9.29).

Метод фотоактивации усовершенствован после открытия того факта, что гены, кодирующие GFP и родственные флуоресцентные белки, могут быть мутированы

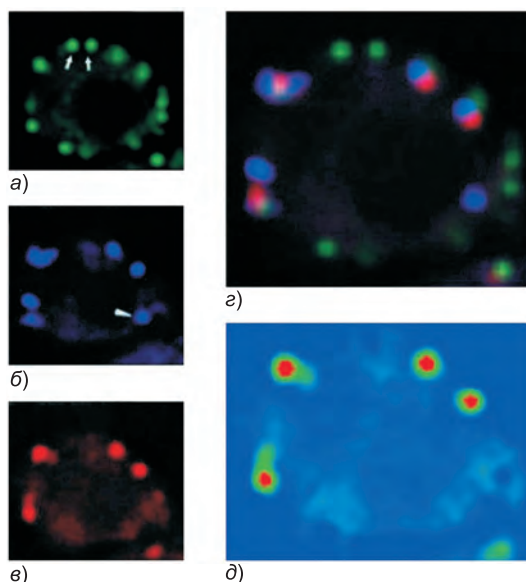


Рис. 9.28. Резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET). Данный эксперимент показывает, что белок Sla1p может плотно взаимодействовать с белком Abp1p, участвующим в присоединении кортикального актина к поверхности клеток почкующихся дрожжей. Sla1p экспрессируется в дрожжевой клетке (а) в качестве химерного белка с желтым производным GFP (YFP). Abp1p экспрессируется в качестве химерного белка (б) с голубой формой GFP (CFP). Сигнал FRET (см. также рис. 8.26), показанный здесь *красным* (в), получается путем возбуждения CFP, но регистрации флуоресценции YFP, которая будет испускаться, только если два белка находятся близко друг к другу (на расстоянии меньше 0,5 нм). На кортексе (г) после объединения (а), (б) и (в) видны три типа пятен: пятна одиночного Sla1p (*стрелки* на а), пятна одиночного Abp1p (*стрелка* на б) и пятна дающего сигнал FRET комплекса этих белков, ложноокрашенное и скорректированное изображение которого показано на (д). Поскольку уже известно, что Sla1p участвует в формировании клеточных включений, данный эксперимент физически связал этот процесс с процессом присоединения актина к клеточному кортексу. (Из D. T. Warren et al., *J. Cell Sci.* 115: 1703–1715, 2002. С любезного разрешения The Company of Biologists.)

(обычно заменой единственной аминокислоты) для синтеза белковых форм, которые в нормальных условиях возбуждения флуоресцируют слабо, но которые можно заставить интенсивно флуоресцировать путем активации их ярким лучом света отличной длины волны. По существу, микроскопист затем может *in vivo* следить за локальным поведением любого белка, который может быть экспрессирован как химерный белок с одной из таких форм GFP. Благодаря таким генетически закодированным фотоактивируемым флуоресцентным белкам отпадает необходимость введения зонда в клетку. Более того, они позволяют изучать жизненный цикл и поведение любого белка независимо от других заново синтезированных белков (**рис. 9.30**).

Третьим способом применения химерных белков с GFP является использование сфокусированного пучка света лазера для тушения флуоресценции GFP в определенной области клетки. Анализ временной зависимости того, как оставшиеся молекулы флуоресцентного белка мигрируют в отбеленную область, позволяет получить информацию о кинетических параметрах белка. Данный метод, обычно требующий использования конфокального микроскопа, известен как **восстановление флуоресценции после фотоотбеливания** (ВФПФ; Fluorescence Recovery after

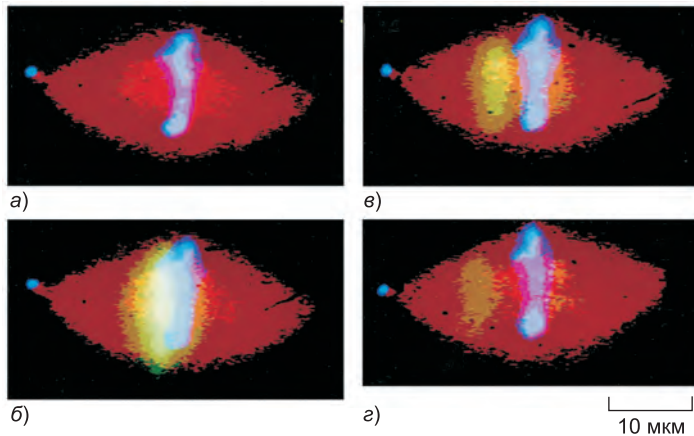


Рис. 9.29. Визуализация движения микротрубочек в митотическом веретене деления при помощи «запертого» флуоресцеина, связанного с тубулином. (а) В метафазное веретено деления, образовавшееся *in vitro* в экстракте икринок *Xenopus*, включены три флуоресцентных маркера: меченный родамином тубулин (красный) для маркирования всех микротрубочек, синий ДНК-связывающий краситель для меченного хромосомом и меченный «запертым» флуоресцеином тубулин, который также встраивается во все микротрубочки, но его не видно, потому что он не флуоресцирует до активации ультрафиолетовым светом. (б) Луч УФ-света локально активирует меченный «запертым» флуоресцеином тубулин слева от метафазной пластинки. В течение следующих нескольких минут (на в — через 1,5 минуты, на г — через 2,5 минуты) сигнал «запертого» флуоресцеина-тубулина мигрирует к левому полюсу веретена деления. Это указывает на то, что тубулин постоянно движется, хотя веретено деления (видимое благодаря красной флуоресценции меченного родамином тубулина) остается большей частью неизменным. (Из К. Е. Sawin and T. J. Mitchison, *J. Cell Biol.* 112: 941–954, 1991. С любезного разрешения The Rockefeller University Press.)

Photobleaching, **FRAP**) и, как и фотоактивация, может дать ценные количественные данные об интересующем белке, например, коэффициенты диффузии, скорости активного транспорта или скорости связывания и диссоциации при взаимодействии с другими белками (рис. 9.31).

9.1.11. Испускающие свет индикаторы позволяют измерять быстро изменяющиеся внутриклеточные концентрации ионов

Один из способов изучения химии отдельной живой клетки — прямое введение во внутренний объем клетки через плазматическую мембрану кончика тонкого стеклянного ион-селективного **микроэлектрода**. Этот метод используют для измерения внутриклеточной концентрации неорганических ионов, например H^+ , Na^+ , K^+ , Cl^- и Ca^{2+} . Однако ион-селективные микроэлектроды измеряют концентрацию ионов только в одной точке клетки, и для ионов, концентрация которых мала, например Ca^{2+} , сигнал медленный и нестабильный. При этом такие микроэлектроды не приспособлены для регистрации быстрых и нестационарных изменений концентрации цитоплазматического Ca^{2+} , играющего важную роль в ответе клеток на внеклеточные сигналы. Такого рода изменения можно анализировать при помощи **ион-селективных индикаторов**, испускание света которыми отражает локальную концентрацию ионов. Эти индикаторы делятся на испускающие свет спонтанно (люминесцентные) и при освещении (флуоресцентные).

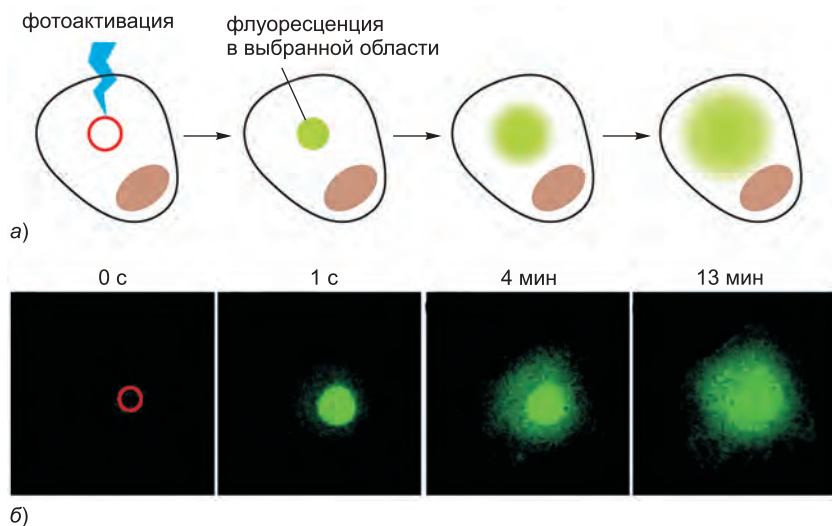


Рис. 9.30. Фотоактивация. Фотоактивация — это вызываемый светом переход молекулы из инертного состояния в активное. В данном эксперименте фотоактивируемая форма GFP экспрессируется в культивируемой животной клетке. До активации (время 0) в выбранной области (красный круг) при возбуждении синим светом с длиной волны 488 нм флуоресценция GFP не регистрируется совсем или ее уровень очень низок. Однако после активации GFP при помощи пучка света лазера с длиной волны 413 нм GFP в выбранной области начинает ярко флуоресцировать (зеленый). Можно количественно описать движение GFP при его диффузии из этой области. Поскольку в клетке флуоресценцией обладают только активированные молекулы, можно наблюдать за путями миграции, оборота и деградации белков. (6, из J. Lippincott-Schwartz and G. H. Patterson, *Science* 300: 87–91, 2003. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Экворин — это люминесцентный белок, выделенный из морской медузы; он испускает свет в присутствии Ca^{2+} и реагирует на изменение концентрации Ca^{2+} в пределах от 0,5 μM до 10 μM . Например, при введении в яйцеклетку экворин испускает вспышку света в ответ на внезапное локальное высвобождение Ca^{2+} в цитоплазму, которое происходит при оплодотворении (**рис. 9.32**). Экворин также экспрессировали методами генной инженерии в растениях и других организмах для получения метода наблюдения ионов Ca^{2+} во всех клетках без необходимости проведения микроинъекций, что может быть непростой процедурой.

Биолюминесцентные молекулы типа экворина испускают очень маленькое количество света, в лучшем случае несколько фотонов на одну индикаторную молекулу, которые сложно измерить. Флуоресцентные индикаторы производят на порядок больше фотонов в расчете на одну молекулу; таким образом, их проще измерять, и они дают лучшее пространственное разрешение. Синтезировали флуоресцентные индикаторы для Ca^{2+} , которые крепко связывают Ca^{2+} и поглощают или испускают свет немного различающихся длин волн в свободном и связанном с Ca^{2+} состояниях. Измеряя отношение интенсивностей флуоресценции при двух длинах волн возбуждения или испускания, можно определить отношение концентраций связанного с Ca^{2+} индикатора и свободного индикатора, и, таким образом, аккуратно измерить концентрацию свободного Ca^{2+} . Такого рода индикаторы используют для посекундного наблюдения за изменением концентрации внутриклеточного Ca^{2+} в различных частях клетки в флуоресцентном микроскопе (**рис. 9.33**).

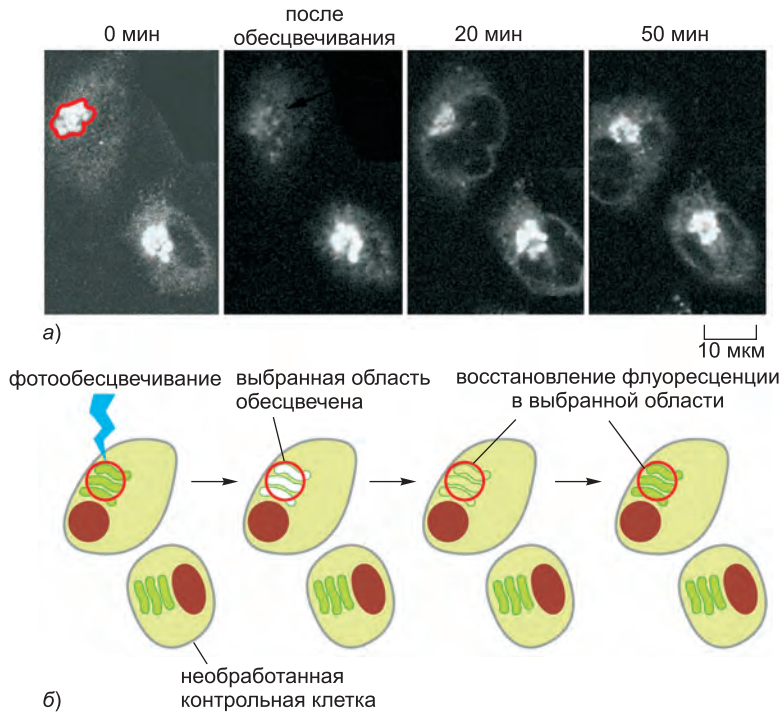


Рис. 9.31. Восстановление флуоресценции после фотоотбеливания (FRAP). Интенсивный сфокусированный свет лазера тушит, или отбеливает, флуоресценцию GFP. Путем селективного фотоотбеливания набора флуоресцентно меченых белков в заданной области клетки микроскопист может во времени наблюдать восстановление, по мере того как оставшиеся флуоресцентные молекулы мигрируют в отбеленную область. В эксперименте, показанном на (а), использовались клетки обезьяны в культуре, синтезирующие галактозилтрансферазу, фермент, который постоянно циркулирует между аппаратом Гольджи и эндоплазматическим ретикулумом. Аппарат Гольджи в одной из двух клеток был фотоотбелен, а синтез нового флуоресцирующего белка был блокирован путем обработки клеток циклогексимидом. Восстановление, происходящее в результате миграции флуоресцентного фермента из ЭР в Гольджи, можно наблюдать во времени. (б) Схема эксперимента, показанного на (а). (а, из J. Lippincott-Schwartz et al., *Histochem. Cell Biol.* 116: 97–107, 2001. С любезного разрешения Springer-Verlag.)

Сходные флуоресцентные индикаторы применяют для измерения других ионов; некоторые, например, реагируют на H^+ и, следовательно, позволяют определить pH. Некоторые из этих индикаторов могут проникать в клетку посредством диффузии, и поэтому их не надо вводить микроинъекцией; это позволяет одновременно наблюдать во флуоресцентный микроскоп большое количество отдельных клеток. Новые типы индикаторов, используемые в сочетании с современными методами обработки изображений, привели к возникновению быстрых и точных методов анализа изменений концентрации множества различных малых молекул в клетке.

9.1.12. Доступно несколько методов введения в клетку веществ, для которых мембрана непроницаема

Часто бывает полезно ввести в живую клетку молекулы, для которых мембрана непроницаема. Это могут быть антитела, узнающие внутриклеточные белки, нормальные белки клетки, меченные флуоресцентным маркером, или молекулы,

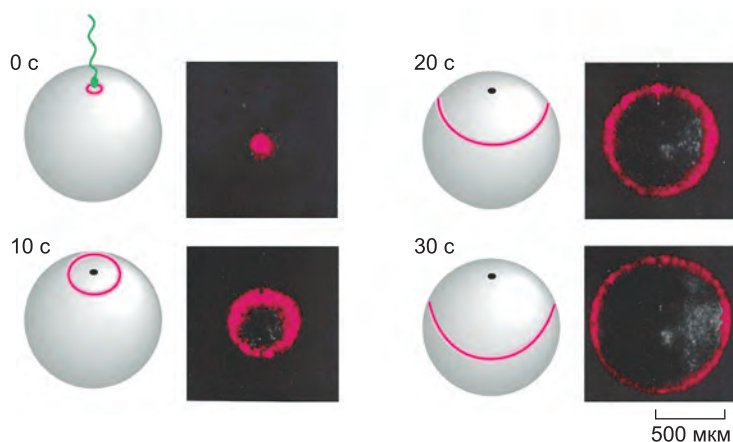


Рис. 9.32. Экворин, люминесцентный белок. Люминесцентный белок экворин испускает свет в присутствии свободного Ca^{2+} . Здесь в яйцеклетку рыбы медяки ввели экворин, который диффундировал по всей цитозолю. Затем яйцеклетку оплодотворили сперматозоидом и наблюдали при помощи высокочувствительной камеры. С интервалом в 10 секунд сделаны четыре фотографии со стороны точки входа сперматозоида. На изображениях видны волны высвобождения в цитозоль Ca^{2+} из внутриклеточных депо под поверхностью плазматической мембраны. Эта волна распространяется от места проникновения сперматозоида по всей яйцеклетке, как показано на рисунках *слева*. (Фотографии воспроизведены из J. C. Gilkey, L. F. Jaffe, E. B. Ridgway and G. T. Reynolds, *J. Cell Biol.* 76: 448–466, 1978. С любезного разрешения The Rockefeller University Press.)

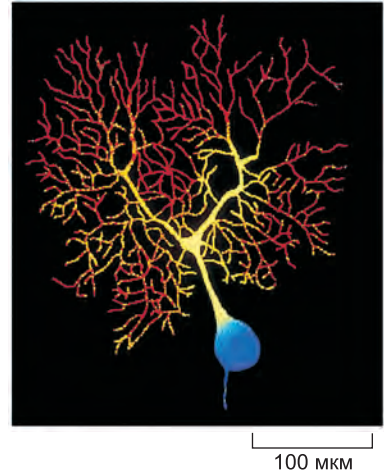
влияющие на функционирование клетки. Один из подходов — это микроинъекция молекул в клетку при помощи стеклянной микропипетки.

После микроинъекции в клетку антитела могут блокировать функцию молекулы, с которой они взаимодействуют. Например, анти-миозин II антитела при введении в оплодотворенную яйцеклетку морского ежа не позволяют ей делиться надвое, несмотря на то что деление ядра протекает нормально. Это наблюдение говорит о том, что миозин II играет ключевую роль в процессах сокращения, разделяющих цитоплазму во время деления клетки, но не требуется для деления ядра.

Микроинъекция, хотя и широко используется, требует введения микропипетки в каждую клетку по отдельности. Следовательно, одновременно удастся изучать всего несколько сотен клеток. Другие подходы позволяют одновременно делать проницаемыми мембраны больших популяций клеток. Например, частичное нарушение плазматической мембраны клеток делает ее более проницаемой; для этого обычно используют мощный удар электрического тока или химические соединения, например слабые растворы детергентов. Достоинство электрического подхода состоит в том, что он позволяет создавать в плазматической мембране большие поры, не повреждая при этом внутриклеточные мембраны. В зависимости от типа клетки и силы тока поры позволяют проникать в клетку (и покидать ее) даже макромолекулам. Такой процесс *электропорации* также ценен для молекулярной генетики в качестве метода введения молекул ДНК в клетки. При ограниченном использовании большинство клеток восстанавливает свою плазматическую мембрану и выживает.

Третьим методом введения крупных молекул в клетки является слияние замкнутых мембранных везикул, содержащих эти молекулы, с плазматической

Рис. 9.33. Визуализация концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при помощи флуоресцентного индикатора. Разветвленное дерево дендритов клетки Пуркинье в мозжечке получает более 100 тысяч синапсов от других нейронов. Сигнал от клетки передается вдоль единственного аксона, выходящего из тела клетки внизу рисунка. Это изображение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в отдельной клетке Пуркинье (из мозга морской свинки) получено при помощи высокочувствительной камеры и Ca^{2+} -селективного флуоресцентного индикатора fura-2. Концентрация свободного Ca^{2+} показана разными цветами: *красный* соответствует максимальной концентрации, *синий* — минимальной. Наибольший уровень Ca^{2+} обнаружен в тысячах ветвей дендритов. (С любезного разрешения D. W. Tank, J. A. Connor, M. Sugimori и R. R. Llinas.)



мембраной. Таким образом, их «груз» попадает в клетки. Этот метод широко используют для доставки нуклеиновых кислот в клетки млекопитающих, например, ДНК для изучения трансфекции или РНК для экспериментов с РНКи (описанных в главе 8). В области медицины данный подход применяют для направленной доставки новых лекарственных соединений.

Наконец, ДНК и РНК можно нанести на мельчайшие золотые частицы и выстрелить ими в клетку с большой скоростью. Живые клетки, поглотившие эти покрытые нуклеиновыми кислотами золотые частицы (их диаметр обычно меньше 1 мкм), способны эффективно встраивать введенную РНК (используемую для изучения временной экспрессии или РНКи, например) или ДНК (для стабильной трансфекции). Все четыре метода, представленные на [рис. 9.34](#), широко используют в клеточной биологии.

9.1.13. Свет можно использовать не только для визуализации микроскопических объектов, но и для манипуляции ими

Фотоны обладают небольшим импульсом. Это означает, что объект, который поглощает или отражает луч света, испытывает действие небольшой силы. В случае обычных источников света такое давление излучения слишком мало, чтобы его стоило учитывать. Но оно важно в космическом масштабе (препятствуя гравитационному коллапсу звезд) и, в некоторой степени, в биологической лаборатории, где интенсивный луч лазера способен давать достаточную силу для передвижения маленьких объектов внутри клетки. Если луч лазера направлен на объект, чей показатель преломления выше чем у окружения, луч отражается и очень большое число фотонов меняет свое направление. Ход отражения фотонов заставляет объект оставаться в фокусе луча; если он начинает смещаться от своего положения, давление излучения возвращает его обратно, сильнее действуя на одну его сторону. Таким образом, управляя сфокусированным лучом лазера, обычно инфракрасного, потому что он меньше всего поглощается компонентами клетки, можно создать «**оптический пинцет**» для передвижения субклеточных объектов, например органелл и хромосом. Данный метод, который иногда называют лазерным пинцетом, применяют для измерения сил, налагаемых отдельными актин-миозиновыми молекулами, отдельными микротрубочками и РНК-полимеразами ([рис. 9.35](#)).

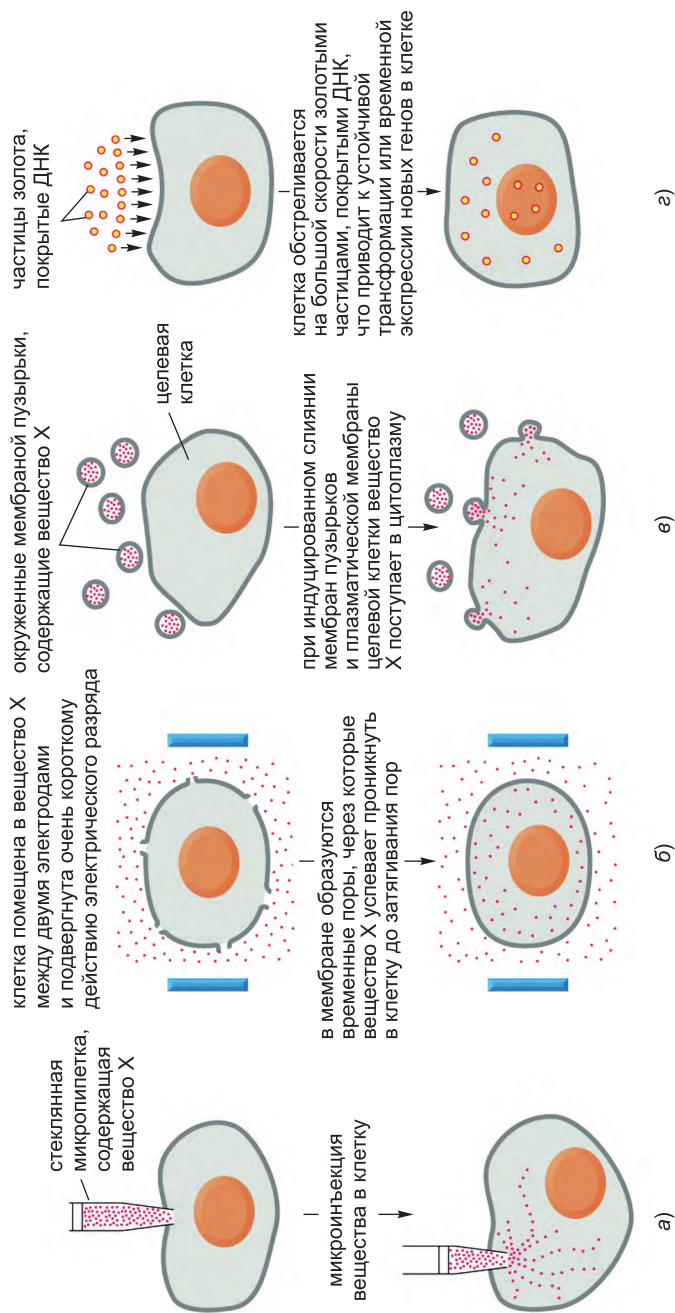


Рис. 9.34. Методы введения в клетку веществ, для которых мембрана непроницаема. (а) Вещество вводится через микропипетку, либо путем приложения давления, либо, если вещество несет электрический заряд, путем наложения разности потенциалов, которая заставляет соединение идти в клетку с ионным потоком (метод *ионофореза*). (б) Клеточную мембрану делают временно проницаемой для вещества путем нарушения ее структуры коротким, но сильным ударом электрического тока (2 000 В/см в течение 200 мкс, например). (в) В замкнутые мембранные везикулы помещают нужное вещество и заставляют их сливаться с клеткой-мишенью. (г) Покрытые ДНК частицы золота используются для введения нового гена в ядро.

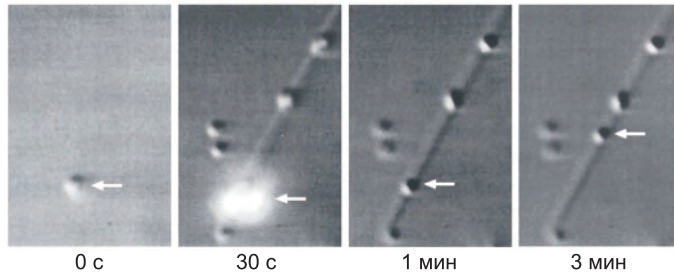


Рис. 9.35. Оптический пинцет. Сфокусированный луч лазера можно использовать для захвата микроскопических частиц и целенаправленного их передвижения. В данном эксперименте такой оптический пинцет используется для захвата маленькой кремниевой гранулы (0,2 нм, *стрелка*), покрытой несколькими молекулами кинезина (0 с), и переноса ее на изолированный мерцательный аксонемный комплекс, состоящий из микротрубочек (30 с). Видимое на рисунке яркое свечение — это отражение лазера от поверхности раздела между водой и покровным стеклом. Кинезин на высвобожденной грануле (1 мин) сопрягает гидролиз АТФ с движением вдоль микротрубочек, и снабжает энергией транспорт гранулы вдоль аксонемного комплекса (3 мин). (Из S. M. Block et al., *Nature* 348: 348–352, 1990. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

Интенсивные направленные лазерные лучи, которые хорошо поглощаются биологическими объектами, можно использовать для менее изящных манипуляций в качестве оптических скальпелей для убийства отдельных клеток, прожигания или вырезания в них дырок или для отделения одного внутриклеточного компонента от другого. Таким образом, оптические приборы могут служить базовыми инструментами для клеточной микрохирургии.

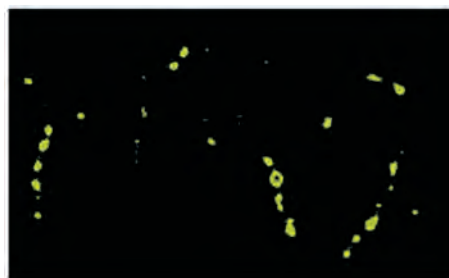
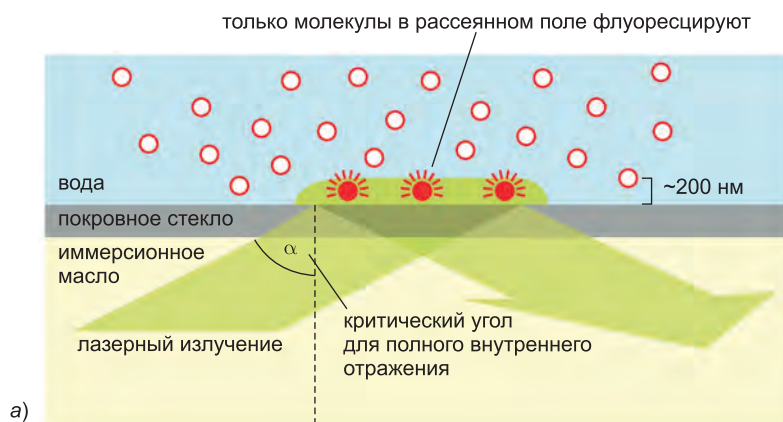
9.1.14. Отдельные молекулы можно визуализировать при помощи флуоресцентной микроскопии полного внутреннего отражения

Гранулы можно использовать для слежения за движением белков, но предпочтительнее иметь возможность визуализировать белки сами по себе. В принципе, этого можно достичь путем мечения белка флуоресцентным маркером, либо химически присоединяя маленькую флуоресцентную молекулу к изолированному белку, либо экспрессируя флуоресцентную химерную конструкцию (см. [стр. 593](#)). Однако в обычных микроскопах невозможно надежно регистрировать отдельные флуоресцентные молекулы. Это ограничение не связано с пределом разрешения, оно вытекает из интерференции света, испускаемого находящимися не в фокусе молекулами. В результате флуоресценция интересующей молекулы затеняется. Эта проблема решается при помощи специального оптического метода, носящего название микроскопии флуоресценции полного внутреннего отражения (Total Internal Reflectance Fluorescence, TIRF). В микроскопе луч лазера светит на поверхность покровного стекла точно под критическим углом полного отражения ([рис. 9.36, а](#)). Благодаря полному внутреннему отражению свет не проникает в образец, и поэтому большинство флуоресцентных молекул не освещается. Однако электромагнитная энергия распространяется в форме затухающего поля на очень короткое расстояние под поверхность покровного стекла и, соответственно, в образец. В результате возбуждаются только те молекулы, которые лежат ближе всего к покровному стеклу. Когда эти молекулы флуоресцируют, испускаемый ими свет уже не конкурирует

со светом нижележащих молекул, и, следовательно, его можно зарегистрировать. Метод TIRF позволил провести несколько эффектных экспериментов, например, визуализацию единственного моторного белка, движущегося вдоль микротрубочки, или формирования и ветвления единственного актинового филамента. На данный момент метод ограничен тонким слоем вблизи поверхности клетки толщиной около 100–200 нм (рис. 9.36, б и в).

9.1.15. Отдельные молекулы можно захватывать и передвигать при помощи атомно-силовой микроскопии

TIRF позволяет визуализировать отдельные молекулы, это исключительно пассивный метод наблюдения. Чтобы получить информацию о функции молекулы, очень полезно иметь возможность манипулировать молекулами как таковыми, и атомно-силовая микроскопия (atomic force microscopy, AFM) позволяет это де-



4 мкм

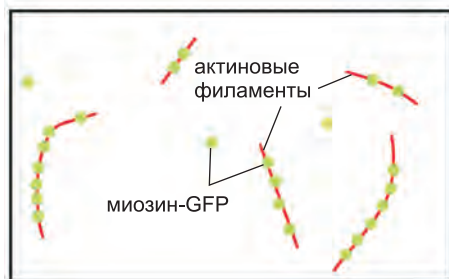


Рис. 9.36. Микроскопия TIRF позволяет регистрировать отдельные флуоресцентные молекулы. (а) В микроскопии TIRF используется возбуждающий лазерный луч для освещения поверхности покровного стекла под критическим углом отражения света от поверхности раздела вода-стекло. Некоторое количество электромагнитной энергии проникает на короткое расстояние в форме затухающего поля и возбуждает молекулы, лежащие вблизи поверхности. (б) В данном случае микроскопию TIRF используют для визуализации отдельных молекул миозина-GFP (зеленые точки), связанных с нефлуоресцирующими актиновыми филаментами (в), которые невидимы, но прикреплены к поверхности покровного стекла. (С любезного разрешения Dmitry Cherny и Clive R. Bagshaw.)

лать. В атомно-силовом микроскопе расположен очень маленький и острый зонд, сделанный из кремния или нитрида кремния методами нанотехнологий, сходными с методами производства полупроводников. Зонд AFM прикреплен к гибкому кантилеверу, соединенному с высокоточной системой управления положением, позволяющей передвигать его на очень маленькие расстояния. В дополнение к возможности точного изменения положения AFM способна измерять механическую силу, налагаемую на зонд при его движении вдоль поверхности (рис. 9.37, а). AFM разработана для визуализации и измерения молекулярных свойств поверхности. В этом режиме зонд сканирует поверхность, двигаясь вверх и вниз так, чтобы сила его взаимодействия с образцом оставалась постоянной. Таким образом, AFM позволяет обнаружить любые объекты, например, белки, расположенные на плоской поверхности (см. рис. 10.14 и 10.32). Однако AFM не ограничивается простой визуализацией поверхности и также может служить для захвата и переноса отдельных молекул. Фактически, это описанный выше оптический пинцет в молекулярном масштабе. При помощи данного метода можно измерить механические свойства отдельных белковых молекул. Например, AFM используют для разворачивания изолированных белковых молекул и измерения энергетики фолдинга (рис. 9.37, б). Потенциал механического зондирования белков и их организации в заданные структуры сейчас только начинает раскрываться, но кажется маловероятным, что данный метод в будущем приобретет большое значение.

9.1.16. Молекулы можно метить радиоизотопами

Как мы видели, в клеточной биологии часто бывает важно определить количества определенных молекул, знать, где они располагаются в клетке и как их уровень и локализация меняются в ответ на внеклеточные сигналы. Среди таких молекул могут быть как маленькие неорганические ионы, например Ca^{2+} и H^+ , так и крупные макромолекулы, например определенные белки, РНК или последовательности ДНК. Мы обсудили, как для анализа таких молекул можно применять чувствительные флуоресцентные методы, а также следить за их динамическим поведением внутри клетки. В заключение данного раздела мы опишем, как для слежения за определенными молекулами внутри клетки используют радиоизотопы.

Большинство встречающихся в природе простых веществ представляет собой смесь слегка различающихся изотопов. Они отличаются друг от друга массой ядра атома, но поскольку они обладают одинаковым количеством протонов и электронов, одинаковы и их химические свойства. В радиоактивных изотопах, или радиоизотопах, ядро нестабильно и претерпевает случайный распад с образованием другого ядра. В процессе распада испускаются либо высокоэнергетические субатомные частицы, например электроны, либо излучение, к примеру гамма-лучи. Используя химический синтез для включения одного или нескольких радиоактивных изотопов в малую молекулу, например сахар или аминокислоту, можно проследить судьбу этой молекулы (и ее отдельных атомов) в течение любой биологической реакции.

Несмотря на то что в природе радиоизотопы встречаются редко (из-за их нестабильности), их можно получать в больших количествах в ядерных реакторах, в которых стабильные атомы бомбардируются высокоэнергетическими частицами. В результате доступны радиоизотопы многих важных с биологической точки зрения элементов (таблица 9.1). Испускаемое ими излучение можно измерять различными способами. Электроны (β -частицы) можно регистрировать в счетчике Гейгера благодаря создаваемой ими ионизации газа, или в сцинтилляционном счетчике, наблюдая

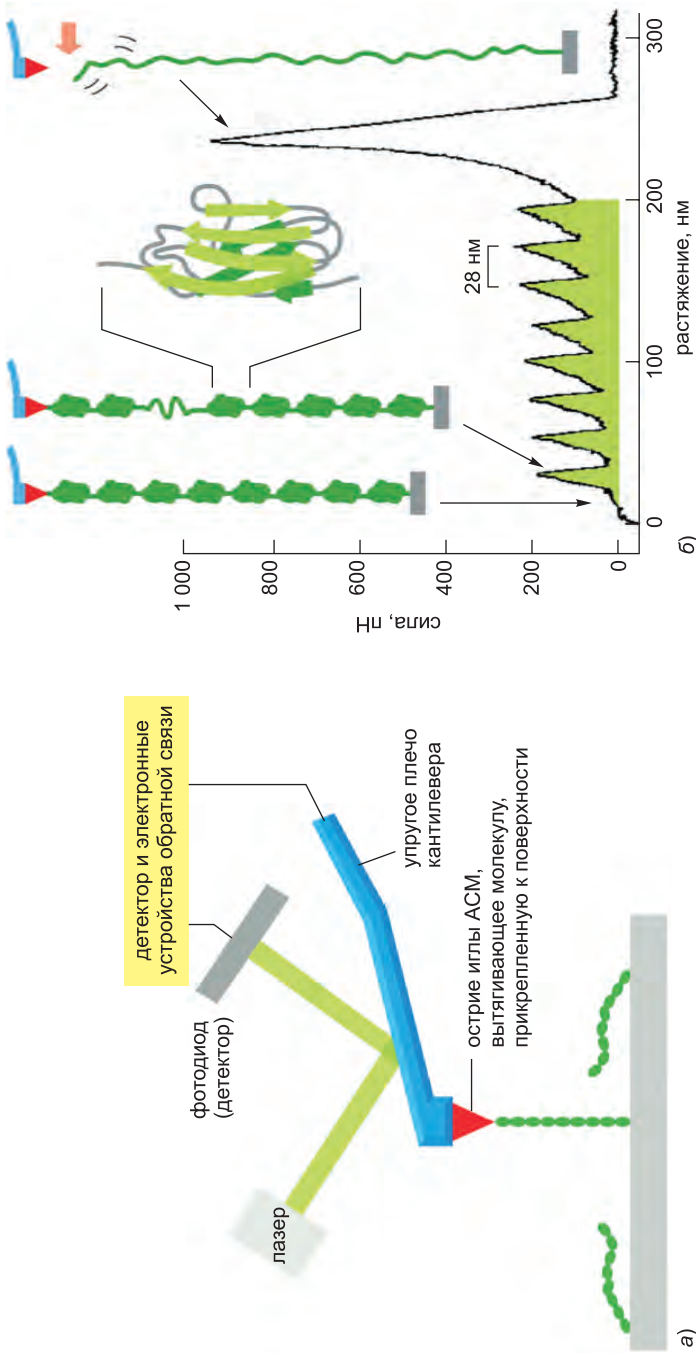


Рис. 9.37. Отдельными белковыми молекулами можно манипулировать при помощи атомно-силового микроскопии. (а) Схематическое изображение ключевых компонентов атомно-силового микроскопа (AFM). На рисунке показан чувствительный к силе зонд, прикрепленный к отдельной белковой молекуле, как в эксперименте, описанном на (б). (б) Титин – это огромная белковая молекула, за счет которой мышцы обладают пассивной эластичностью (см. рис. 16.76). Растяжимость этой молекулы можно проанализировать напрямую при помощи короткого искусственно синтезированного белка, содержащего восемь повторяющихся Ig-доменов одной из областей титина. В данном эксперименте зонд AFM используют для захвата и постепенного растягивания отдельной молекулы до тех пор, пока она не порвется. При приложении силы каждый Ig-домен внезапно начинает разворачиваться, и можно зарегистрировать необходимую в каждом случае силу (около 200 pN). Область кривой «сила-растяжение», показанная зеленым, описывает последовательное разворачивание каждого из восьми белковых доменов. (Адаптировано из W. A. Linke et al., *J. Struct. Biol.* 137: 194–205, 2002. С любезного разрешения Elsevier.)

маленькие вспышки света, которые они индуцируют в сцинтилляционной жидкости. Эти методы позволяют точно измерять содержание определенного радиоизотопа в биологическом образце. При помощи световой или электронной микроскопии также можно определить местоположение радиоизотопа в образце радиоавтографией, как мы опишем ниже. Все эти методы детекции очень чувствительны: в благоприятных условиях можно зарегистрировать почти каждый распад и, следовательно, каждый распадающийся радиоактивный атом.

Изотопы расположены в порядке уменьшения энергии испускаемого β -излучения (электронов). ^{131}I также испускает γ -радиацию. Период полураспада — это время, необходимое для распада 50% атомов изотопа.

Таблица 9.1. Некоторые широко применяемые в биологии радиоизотопы

Изотоп	Период полураспада
^{32}P	14 дней
^{131}I	8,1 дней
^{35}S	87 дней
^{14}C	5 570 лет
^{45}Ca	164 дня
^3H	12,3 лет

9.1.17. Радиоизотопы используются для слежения за молекулами внутри клеток и организмов

Одним из первых случаев применения радиоизотопов в биологии было отслеживание химических превращений углерода в процессе фотосинтеза. Одноклеточные зеленые водоросли выращивали в атмосфере, содержащей радиоактивно меченый CO_2 ($^{14}\text{CO}_2$). В разные моменты времени после освещения их растворимое содержимое разделяли бумажной хроматографией. Малые молекулы, содержащие полученные из CO_2 атомы ^{14}C , регистрировали при помощи листа фотографической пленки, который клали поверх высохшей бумажной хроматограммы. Такой подход позволил идентифицировать большинство ключевых компонентов процесса фотосинтеза от CO_2 до сахара.

Радиоактивные молекулы можно использовать для наблюдения за ходом практически любого процесса в клетках. В типичном эксперименте клетки снабжают радиоактивной молекулой-предшественником. Радиоактивные молекулы смешивают с исходно присутствовавшими в клетке немечеными соединениями; и те, и другие воспринимаются клеткой одинаково, поскольку они различаются только массой ядра атома. Изменения локализации или химической формы радиоактивных молекул можно отслеживать во времени. Разрешение таких экспериментов часто улучшается при использовании протокола мечения с вытеснением метки (pulse-chase), в котором радиоактивное вещество (стадия pulse) добавляют только на короткий промежуток времени, затем его отмывают и заменяют на нерадиоактивные молекулы (стадия chase). Через равные промежутки времени собирают образцы, в каждом из которых определяют химическую форму или локализацию радиоактивной метки (рис. 9.38). Эксперименты с вытеснением метки в сочетании с радиоавтографией сыграли важную роль, например, в определении того, как секреторные белки попадают из ЭР во внеклеточное пространство.

Радиоизотопное мечение является уникальным способом отличить химически идентичные, но обладающие разной историей молекулы, например молекулы, синтезирующиеся в разное время. При помощи этого метода показано, что почти все молекулы в живой клетке непрерывно деградируют и заменяются новыми, даже если клетка не растет и, на первый взгляд, находится в стационарном состоянии.

Такой «круговорот», который иногда происходит очень медленно, было бы практически невозможно обнаружить без радиоизотопов.

Сегодня почти все распространенные малые молекулы доступны в радиоактивной форме из коммерческих источников, и практически любую биологическую молекулу, какой бы сложной она ни была, можно радиоактивно пометить. Можно синтезировать соединения с радиоактивными атомами в определенных положениях, что позволяет независимо проследить судьбы различных частей одной и той же молекулы в процессе биологических реакций (**рис. 9.39**).

Как отмечено выше, одно из важных применений радиоактивности в клеточной биологии — локализация радиоактивного соединения в срезах клеток или тканей при помощи радиоавтографии. В данном методе живые клетки на короткий промежуток времени подвергают действию определенного радиоактивного соединения и инкубируют некоторое время, давая метке проникнуть в клетки. Затем их фиксируют и подготавливают для световой или электронной микроскопии. На каждый препарат накладывают тонкую пленку фотографической эмульсии и оставляют образцы на несколько дней в темноте. Это позволяет радиоизотопу распасться. Затем эмульсию проявляют и положение радиоактивности в каждой клетке определяют по положению проявленных серебряных зерен (см. рис. 5.29). Например, если клетки обработать ^3H -тимидином, радиоактивным предшественником ДНК, можно показать, что ДНК синтезируется и хранится в ядре (**рис. 9.40**). И наоборот, если обработать клетки ^3H -уридином, радиоактивным предшественником РНК, окажется, что РНК сначала появляется в ядре, а затем быстро мигрирует в цитоплазму. Радиоактивные метки также можно регистрировать радиоавтографией после их очистки от других молекул гель-электрофорезом: таким способом часто определяют положение в геле как белков (см. рис. 8.23), так и нуклеиновых кислот (см. рис. 8.33, *a*).

Заключение

Доступно множество методов оптической микроскопии, направленных на наблюдение клеток. Фиксированные и окрашенные клетки можно наблюдать в обычный световой микроскоп, тогда как связанные с флуоресцентными красителями антитела можно использовать для локализации определенных молекул в клетке при помощи флуоресцентного микроскопа. Живые клетки можно наблюдать в фазово-контрастном, дифференциальном интерференционном контрастном,

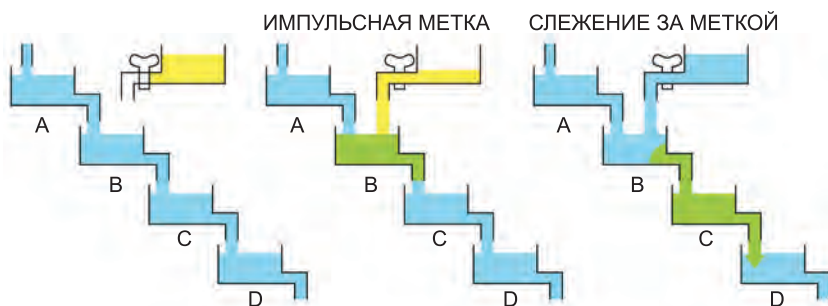
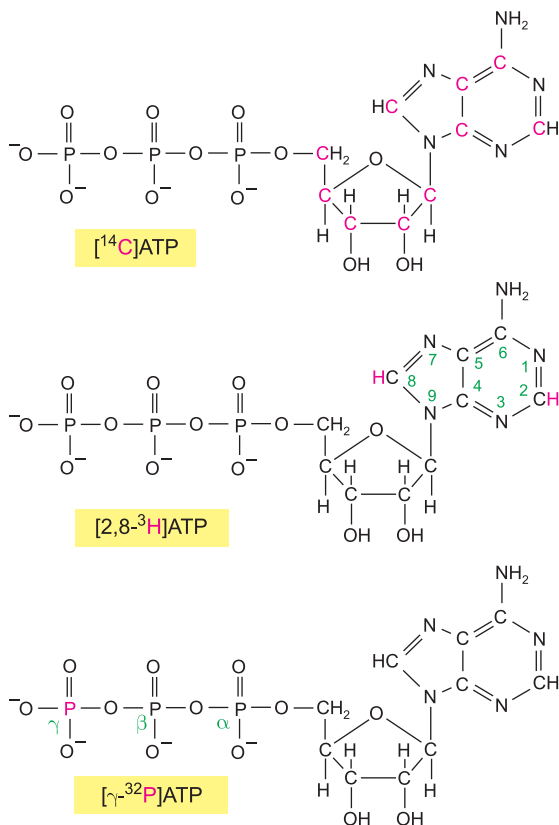


Рис. 9.38. Логика типичного эксперимента с вытеснением метки с использованием радиоизотопов. Камеры, помеченные A, B, C и D, могут представлять собой либо различные компартменты клетки (регистрируемые радиоавтографией или экспериментами по фракционированию клеток) или различные химические соединения (регистрируемые хроматографией или другими химическими методами).

Рис. 9.39. Молекулы, меченные радиоизотопами. Три доступные из коммерческих источников радиоактивные формы АТФ. Радиоактивные атомы показаны красным. Также на рисунке показана номенклатура, принятая для обозначения положения и типа радиоактивного атома.



темнопольном и светlopольном микроскопах. Все виды световой микроскопии могут использоваться в сочетании с методами обработки изображений, которые служат для усиления чувствительности и очистки изображения. Конфокальная микроскопия и обращенная свертка позволяют получать тонкие оптические срезы и воссоздавать трехмерные изображения.

Сейчас существуют методы обнаружения, измерения и слежения за практически любой нужной молекулой в живой клетке. Флуоресцентные индикаторные красители позволяют измерять концентрации определенных ионов в отдельных клетках или в разных частях клеток. Флуоресцентные белки представляют собой особенно удобные зонды, которые можно присоединить к другим белкам при помощи генетических манипуляций. Практически любой интересующий белок можно экспрессировать в форме флуоресцентного химерного белка и визуализировать его в клетке при помощи флуоресцентной микроскопии. Динамическое поведение и взаимодействия многих соединений, часто на уровне единственной молекулы, можно наблюдать в живых клетках, используя различные флуоресцентные белковые метки. Радиоактивные изотопы также можно применять для биохимического и микроскопического наблюдения за судьбой определенных молекул.

9.2. Изучение клетки и молекулы в электронный микроскоп

Световая микроскопия ограничена в разрешении. Микроскопы, в которых используют другие типы излучения, — в особенности электронные микроскопы — способны разрешать гораздо меньшие структуры, чем световые микроскопы. За большее разрешение приходится платить: процесс приготовления препаратов для электронной микроскопии значительно сложнее. Более того, трудно сказать, насколько соответствует то, что мы видим на изображении, реальной исследуемой структуре. Однако сейчас стало доступным очень быстрое замораживание для сохранения структур для электронной микроскопии. Цифровой анализ изображений можно использовать для восстановления трехмерных объектов, объединяя инфор-

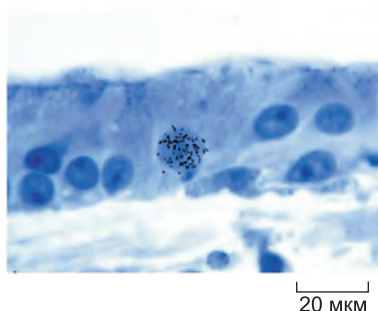


Рис. 9.40. Радиоавтография. Данную ткань непродолжительное время обрабатывали ^3H -тимидином. Клетки, реплицировавшие свою ДНК, включили метку в ядро, что позволило визуализировать их при помощи радиоавтографии. Серебряные зерна, видимые здесь на фотографической эмульсии на поверхности среза как *черные точки*, указывают на клетки, синтезирующие новую ДНК. Изображенные здесь меченые ядра принадлежат нейроэпителию внутреннего уха цыпленка. (С любезного разрешения Mark Warchol и Jeffrey Corwin.)

мацию о множестве отдельных частиц или изображения единственного объекта, полученные под разными углами. В сочетании эти подходы увеличивают разрешение и возможности электронной микроскопии до уровня, на котором становится возможным получать адекватные изображения структуры отдельных макромолекул и образуемых ими комплексов.

9.2.1. Электронный микроскоп разрешает тонкую структуру клетки

Зависимость предела разрешения от длины волны освещения (см. рис. 9.6) справедлива для любого вида излучения, будь то луч света или пучок электронов. Однако в случае электронов предел разрешения можно сделать очень маленьким. Длина волны электрона уменьшается с увеличением его скорости. В **электронном микроскопе** с ускоряющим напряжением 100 000 В длина волны электрона составляет 0,004 нм. В теории разрешение такого микроскопа должно быть около 0,002 нм, что в 100 тысяч раз меньше, чем у светового микроскопа. Однако, поскольку aberrации магнитных линз корректировать значительно сложнее, чем неровности стеклянных линз, на практике разрешающая способность большинства современных электронных микроскопов составляет, в лучшем случае 0,1 нм (1 Å) (**рис. 9.41**). Это происходит потому, что используется только самый центр магнитной линзы, и в результате эффективная числовая апертура очень мала. Более того, сложности

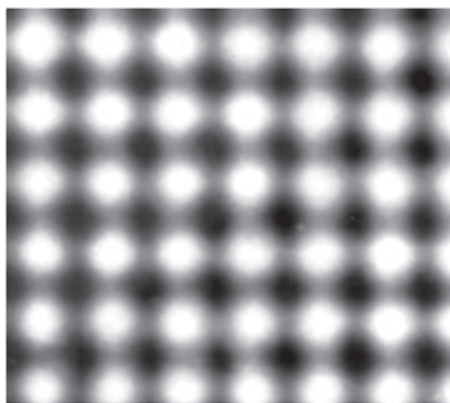


Рис. 9.41. Предельное разрешение электронного микроскопа. На данной микрофотографии, полученной при помощи трансмиссионного электронного микроскопа, показан тонкий слой золота. Яркие пятна — это отдельные цепочки атомов в кристалле. Расстояние между соседними цепочками атомов составляет примерно 0,2 нм (2 Å). (С любезного разрешения Graham Hills.)

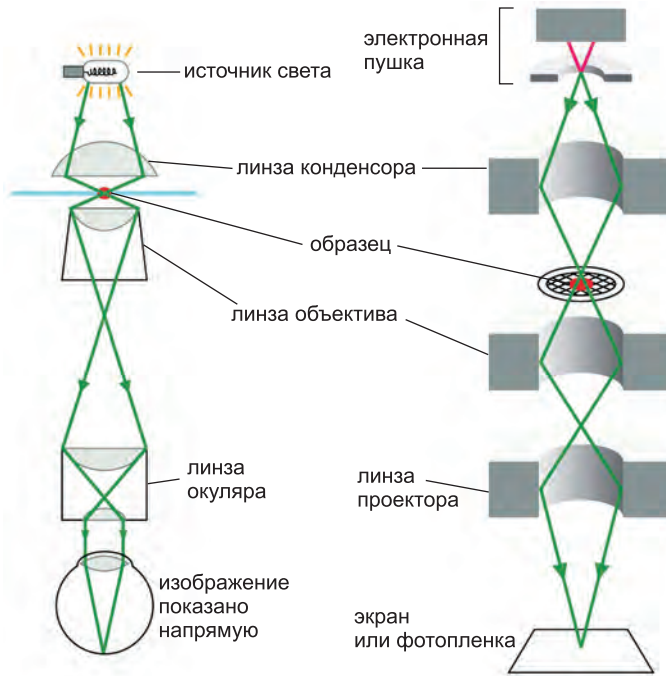


Рис. 9.42. Принципиальное строение светового микроскопа и трансмиссионного электронного микроскопа. На данном рисунке отмечено сходство внутреннего устройства микроскопов. Стеклянным линзам светового микроскопа в электронном микроскопе соответствуют магнитные катушки. В электронном микроскопе необходимо, чтобы образец находился в вакууме. На фотографии показан рабочий трансмиссионный микроскоп. (Фотография приведена с юбезного разрешения FEI Company Ltd.)

с приготовлением препаратов, контрастностью и радиационными повреждениями снизили нормальное эффективное разрешение биологических объектов до 1 нм (10 Å). Однако это все равно в 200 раз лучше, чем у светового микроскопа. Также в последние годы производительность электронных микроскопов значительно улучшена благодаря развитию новых источников пучка электронов — автоэлектронных эмиссионных пушек. Эти очень яркие и когерентные источники могут в будущем улучшить достигнутое на данный момент разрешение.



В целом устройство трансмиссионного (просвечивающего) электронного микроскопа (ТЕМ) сходно с таковым светового микроскопа, но он значительно больше и «перевернут вверх ногами» (рис. 9.42). Источником освещения служит нить накаливания или катод, испускающий электроны в верхней части цилиндрической колонки высотой около 2 м. Поскольку электроны рассеиваются при столкновении

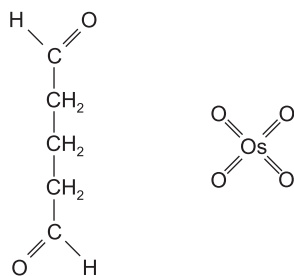
с молекулами воздуха, воздух из колонки должен откачиваться для создания вакуума. Затем электронам нити накаливания при помощи расположенного рядом анода придается ускорение, и они, проходя через очень маленькое отверстие, формируют пучок, который идет вниз по колонке. Магнитные катушки, расположенные по всей длине колонки фокусируют электронный пучок точно так же, как стеклянные линзы фокусируют свет в световом микроскопе. Препарат через воздушную разделительную камеру помещают в вакуум на пути пучка электронов. Как и в световой микроскопии, препарат обычно окрашен — в данном случае электронно-плотным веществом (см. следующий раздел). Некоторые проходящие через образец электроны рассеиваются структурами, окрашенными электронно-плотным веществом; остальные фокусируются для формирования изображения аналогично построению изображения в световом микроскопе. Изображение можно наблюдать на люминесцентном экране или записать на фотопластинку или цифровую камеру высокого разрешения. Поскольку рассеянные электроны уходят из пучка, на изображении плотные участки препарата соответствуют областям сниженного потока электронов и выглядят темными.

9.2.2. Биологические образцы нужно специально подготавливать для электронной микроскопии

В первые дни применения к биологическим объектам электронная микроскопия позволила увидеть множество ранее невообразимых структур клетки. Но до того как эти открытия могли быть сделаны, микроскопистам пришлось разработать новые методы фиксации, разрезания и окрашивания тканей.

Поскольку в электронном микроскопе препарат подвергается воздействию глубокого вакуума, живую ткань обычно убивают и сохраняют путем фиксации сначала *глутаральдегидом*, который ковалентно связывает молекулы белков с их соседями, а затем *тетраоксидом осмия*, который, связываясь с липидными бислоями, стабилизирует их и белки (рис. 9.43). Поскольку электроны обладают очень ограниченной проникающей способностью, до того, как смотреть на фиксированные ткани, их надо очень тонко нарезать (толщина срезов должна быть около 50–100 нм, что составляет примерно 1/200 толщины клетки). Для этого образец обезвоживают и пропитывают мономерной смолой, которая полимеризуется с образованием единого пластикового блока; затем блок нарезают в микротоме тонким стеклянным или алмазным ножом. Такие *тонкие срезы (микросрезы)*, лишенные воды и других испаряющихся растворителей, затем помещают на маленькую круглую металлическую сетку для наблюдения в микроскопе (рис. 9.44).

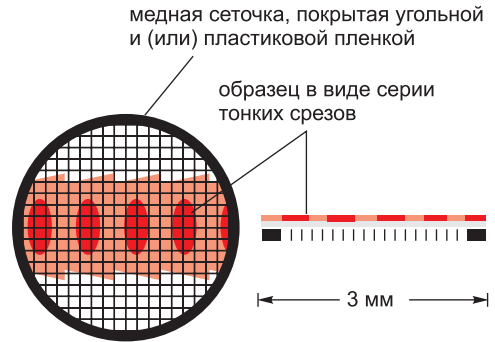
Этапы приготовления биологического материала для визуализации в электронном микроскопе с самого начала создавали трудно-



глутаральдегид тетраоксид осмия

Рис. 9.43. Два распространенных химических фиксатора, применяемых в электронной микроскопии. Две реакционно-способные группы глутаральдегида позволяют ему сшивать различные типы молекул, формируя между ними ковалентные связи. Тетраоксид осмия образует поперечно сшитые комплексы со многими органическими соединениями, в процессе чего он восстанавливается. Данная реакция особенно полезна для фиксации клеточных мембран, поскольку двойные связи $C=C$, присутствующие во многих жирных кислотах, взаимодействуют с тетраоксидом осмия.

Рис. 9.44. Медная сетка, поддерживающая тонкий срез образца в ТЕМ.



сти для исследователей. Откуда нам знать, что наконец-то видимое нам изображение фиксированного, обезвоженного и заключенного в смолу препарата хоть как-то соответствует хрупкой и заполненной водой биологической системе, которая исходно присутствовала в клетке? Наилучший современный подход к этой проблеме основан на быстром замораживании. Если водную

систему достаточно быстро охладить до достаточно низкой температуры, вода и другие компоненты системы не успевают реорганизоваться или кристаллизуются до льда. Вместо этого вода переохлаждается до жесткого, но некристаллического состояния, называемого стекловидным льдом. Такого состояния можно достичь несколькими способами. Во-первых, путем нанесения препарата на охлажденный жидким гелием полированный медный блок. Во-вторых, погружая образец в хладоагент или опрыскивая его струей хладоагента, в качестве которого может служить, например, жидкий пропан. В-третьих, охлаждение можно проводить при высоком давлении.

Некоторые замороженные образцы можно исследовать напрямую в электронном микроскопе, используя специальный охлажденный держатель для препаратов. В других случаях замороженный блок можно разбить для выявления внутренних поверхностей или окружающий лед можно испарить для разоблачения внешней поверхности. Однако зачастую мы хотим исследовать тонкие срезы и окрасить их для достижения адекватной контрастности изображения электронного микроскопа (смотри ниже). Таким образом, в качестве компромисса ткань быстро замораживают, замещают воду, поддерживаемую в стекловидном состоянии, органическими растворителями и заключают ткань в пластмассу на основе смолы. Затем изготавливают срезы и проводят окрашивание. Несмотря на то что с технической точки зрения этот процесс все еще трудоемок и непрост, он позволяет стабилизировать и сохранить ткань в виде, очень близком к ее исходному живому состоянию (рис. 9.45).

Контрастность электронного микроскопа зависит от атомного номера атомов образца: чем выше атомный номер, тем больше рассеивается электронов и тем выше контрастность. Биологические ткани состоят из атомов с очень маленькими атомными номерами (в основном, углерода, кислорода, азота и водорода). Для того чтобы сделать их видимыми, их обычно пропитывают (до или после изготовления срезов) солями тяжелых металлов, например урана или свинца. Уровень пропитки, или «окрашивания», этими солями позволяет увидеть с разной степенью контрастности различные клеточные компоненты. Жиры после фиксации осмием, например, темноокрашены, что позволяет определить расположение клеточных мембран.

9.2.3. Определенные макромолекулы можно локализовать при помощи иммунной электронной микроскопии коллоидного золота

Мы видели, как для локализации определенных макромолекул антитела можно использовать в сочетании с флуоресцентной микроскопией. Аналогичный метод — **иммунная электронная микроскопия коллоидного золота** — можно применить

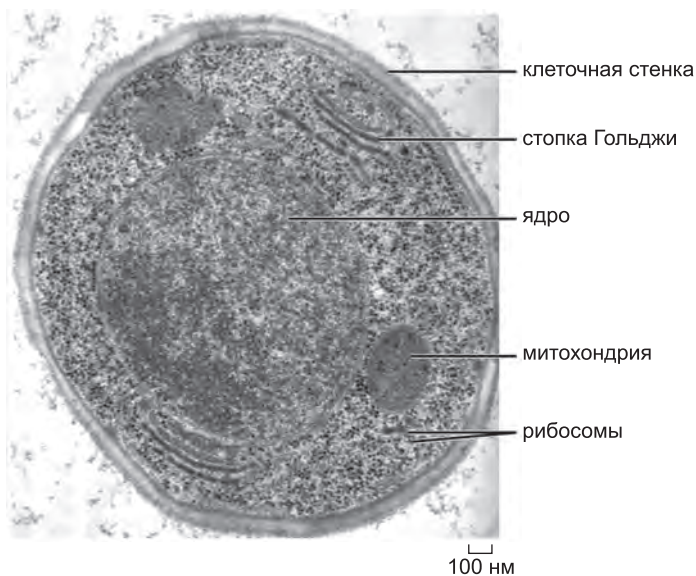


Рис. 9.45. Тонкий срез клетки. Данный тонкий срез принадлежит очень быстро замороженной дрожжевой клетке, в которой стекловидный лед был замещен сначала органическим растворителем, а затем пластмассой на основе смолы. Хорошо видны ядро, митохондрии, клеточная стенка, аппарат Гольджи и рибосомы в состоянии, которое можно считать настолько приближенным к живой клетке, насколько это возможно. (С любезного разрешения Andrew Staehelin.)

в электронном микроскопе. Обычно тонкий срез инкубируют с определенным первичным антителом, а затем со вторичным антителом, к которому прикреплена частица коллоидного золота. Золотая частица является электронно-плотной, и в электронном микроскопе она выглядит как черная точка (**рис. 9.46**).

Тонкие срезы в ТЕМ часто не способны передать трехмерную организацию клеточных компонентов и могут направить исследователей по ложному пути. Линейная структура, например микротрубочка, может на срезе выглядеть точечным объектом, а срез через выступающие части единого сплошного тела неправильной формы может заставить его выглядеть как два отдельных объекта. Третье измерение может быть восстановлено при помощи серии срезов (**рис. 9.47**), но это все равно продолжительный и трудоемкий процесс.

Однако даже тонкие срезы обладают значительной глубиной по сравнению с разрешением электронного микроскопа, так что они могут вводить в заблуждение по противоположной причине. Оптическая структура электронного микроскопа, а именно очень маленькая апертура, дает большую глубину поля, поэтому видимое изображение соответствует суперпозиции (проекции) структур на разной глубине. Следующая сложность метода мечения коллоидным золотом состоит в том, что антитела и золотые частицы не проникают в смолу, применяемую для заключения ткани; следовательно, обнаружить можно только антигены на поверхности среза. Это означает, что, во-первых, мала чувствительность обнаружения, так как молекулы антигена, расположенные в более глубоких частях среза, недоступны, и, во-вторых, можно получить ложное представление о том, какие структуры содержат антиген, а какие нет. Решение этой проблемы состоит в мечении образца до заключения его в смолу, когда клетки и ткани еще полностью доступны для меток. Очень маленькие

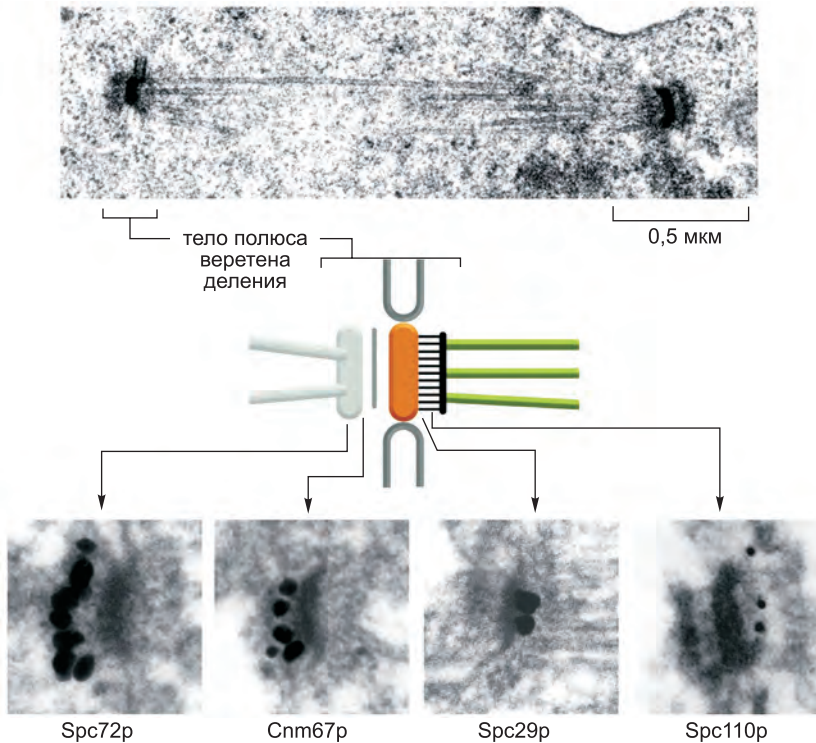


Рис. 9.46. Локализация белков в электронном микроскопе. Здесь иммунную электронную микроскопию коллоидного золота используют для локализации четырех различных белковых компонентов полюса веретена деления дрожжевой клетки. На верхней микрофотографии изображен тонкий срез дрожжевого митотического веретена деления. Микротрубочки пересекают ядро и соединяются с полюсами веретена деления, погруженными в ядерную оболочку. Схема компонентов полюса веретена деления показана ниже. Использованы антитела против четырех различных белков полюса веретена деления в сочетании с частицами коллоидного золота (*черные точки*), указывающими на то, где в сложной структуре расположен каждый белок. (С любезного разрешения John Kilmartin.)

частицы золота, диаметр которых составляет около 1 нм, лучше всего подходят для данного метода. Такие золотые частицы обычно невозможно напрямую увидеть на конечных срезах, поэтому вокруг них наращивают дополнительную серебряную или золотую оболочку. Этот процесс очень похож на проявление фотографий.

9.2.4. Изображения поверхностей можно получить при помощи сканирующей электронной микроскопии

Сканирующий (растровый) электронный микроскоп (SEM) позволяет напрямую получить изображение трехмерной структуры поверхности образца. SEM обычно более компактный, простой в управлении и дешевый прибор, чем трансмиссионный электронный микроскоп. При этом в TEM для формирования изображения используют электроны, прошедшие через образец, в SEM электроны рассеиваются образцом или испускаются из него. Исследуемый препарат фиксируют, высушивают и покрывают тонким слоем тяжелого металла. Альтернативно его можно быстро заморозить и перенести на предметный столик для прямого на-

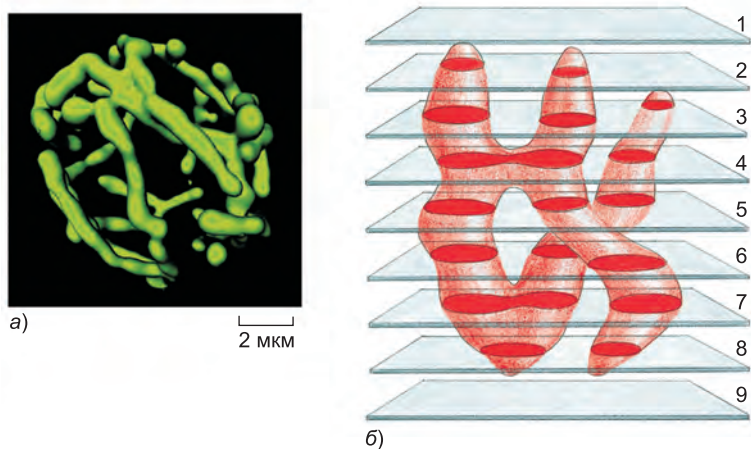


Рис. 9.47. Трехмерная реконструкция при помощи серии срезов. (а) Трехмерная реконструкция митохондрии живой дрожжевой клетки, полученная путем объединения набора оптических срезов, позволяет увидеть сложную разветвленную структуру компартамента. Отдельные тонкие срезы такой структуры в электронном микроскопе могут создавать ложное впечатление. В примере (б) может показаться, что большинство срезов через клетку, содержащих разветвленную митохондрию, содержат две или три отдельные митохондрии (сравни рис. 9.45). Однако изображения на срезах 4 и 7 можно интерпретировать как митохондрии в процессе деления. Истинную трехмерную структуру можно воссоздать из серии срезов. (а, с любезного разрешения Stefan Hell.)

блюдения под микроскопом. Зачастую в микроскоп можно поместить целую часть растения или маленького животного почти безо всякой обработки (**рис. 9.48**). Затем препарат, приготовленный одним из этих способов, сканируют очень тонким пучком электронов. Измеряют количество электронов, рассеянных или испущенных при бомбардировке первичным пучком каждой точки металлической поверхности.

Эту величину используют для регуляции интенсивности второго пучка, движущегося синхронно с первым и формирующего изображение на телевизионном экране. Таким образом строится увеличенное изображение поверхности как целого (**рис. 9.49**).

Метод SEM обладает очень большой глубиной поля; более того, поскольку величина рассеяния электронов зависит от угла между поверхностью и пучком, на изображении видны освещенные участки и тени, придающие ему трехмерный вид (см. рис. 9.48 и **рис. 9.50**). Однако так можно исследовать только свойства поверхностей, и в большинстве видов SEM достигается не очень большое разрешение (около 10 нм

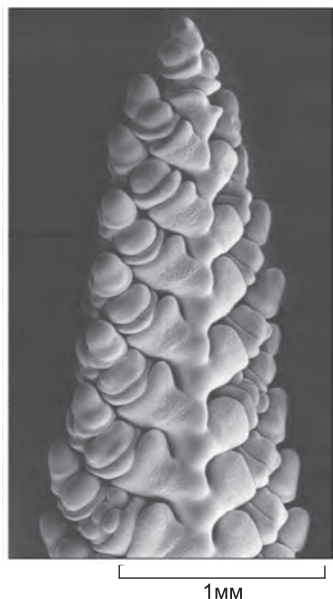


Рис. 9.48. Развивающийся цветок пшеницы, или колос. Этот хрупкий колосок быстро заморозили, покрыли тонкой металлической пленкой и исследовали в замороженном состоянии в SEM. Данная фотография, полученная с небольшим увеличением, демонстрирует большую глубину фокуса микроскопа. (С любезного разрешения Kim Findlay.)

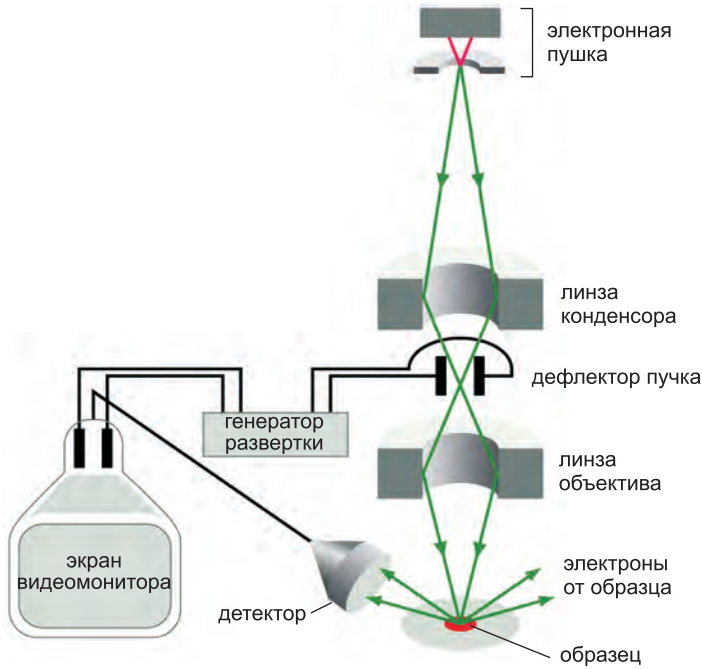


Рис. 9.49. Сканирующий электронный микроскоп. Образец сканируют пучком электронов, фокусирующимся на препарате электромагнитными катушками, исполняющими роль линз. Детектор измеряет количество рассеянных или испущенных электронов при последовательной бомбардировке каждой точки поверхности образца и контролирует интенсивность точек на изображении, формирующемся на видеоэкране. SEM позволяет получать удивительные изображения трехмерных объектов с большой глубиной фокуса и разрешением от 3 нм до 20 нм в зависимости от прибора. (Фотография приведена с любезного разрешения Andrew Davies.)

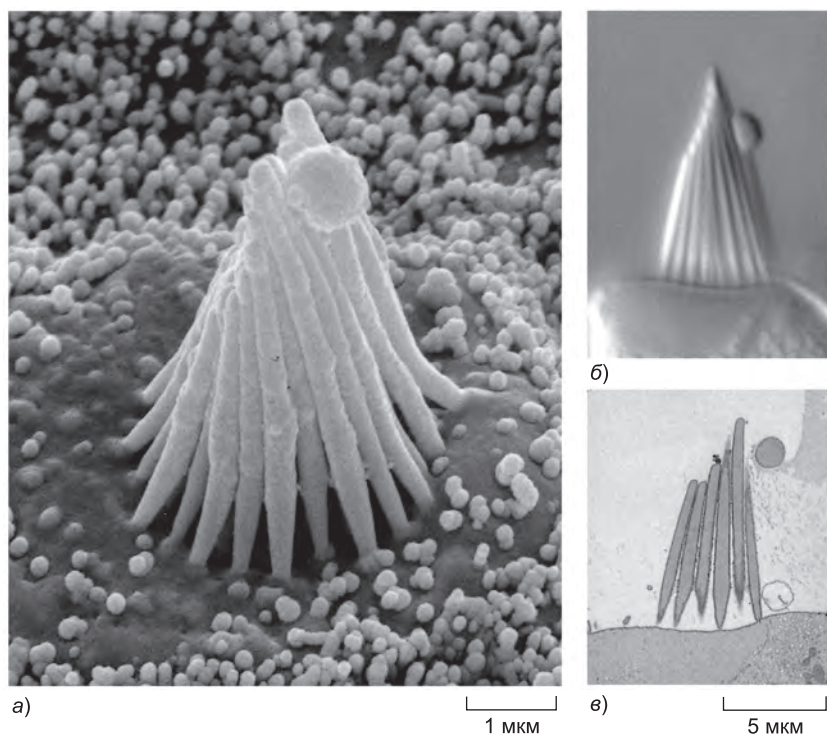


Рис. 9.50. Сканирующая электронная микроскопия. (а) Полученная с помощью сканирующего электронного микроскопа микрофотография стереоцилии, выступающей из волосковой клетки внутреннего уха лягушки-быка. (б) Дифференциальная интерференционная контрастная световая микроскопия и (в) трансмиссионная электронная микроскопия тонкого среза. (С любезного разрешения Richard Jacobs и James Hudspeth.)

с эффективным увеличением до 20 тысяч раз). В результате метод обычно используют для изучения целых клеток и тканей, а не субклеточных органелл. Однако разработаны микроскопы очень высокого разрешения, в которых в качестве источника электронов выступает когерентная автоэлектронная эмиссионная пушка. Они могут соперничать с трансмиссионными в разрешении (рис. 9.51).

9.2.5. Металлическое напыление позволяет исследовать свойства поверхностей при помощи трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения

ТЕМ также можно использовать для исследования поверхности образца и обычно с лучшим разрешением, чем SEM, например, для определения структуры отдельных макромолекул. Как и в сканирующей электронной микроскопии, на высушенный образец наносят тонкую пленку тяжелого металла, например платины. Однако в данном случае металл распыляют под углом, чтобы покрывающий слой был в одних местах толще, чем в других. Данный метод, называемый *напылением металла*, создает эффект оттенения (отсюда английский термин *metal shadowing*), благодаря чему изображение выглядит трехмерным.

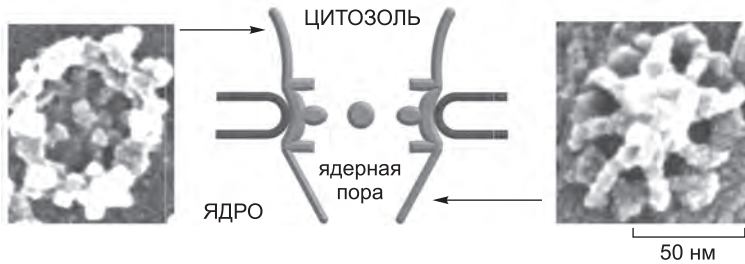


Рис. 9.51. Ядерная пора. Быстрозамороженные ядерные оболочки визуализированы при помощи SEM высокого разрешения, снабженного в качестве источника электронов автоэлектронной эмиссионной пушкой. Данные изображения обеих сторон поры показывают предел разрешения микроскопа, и их нужно сравнивать с рис. 12.9. (С любезного разрешения Martin Goldberg и Terry Allen.)

Некоторые обработанные таким образом препараты достаточно тонки или малы для того, чтобы электроны напрямую в них проникали. Это справедливо для отдельных молекул, макромолекулярных комплексов и вирусов, которые до напыления металла можно высушить на плоской поддерживающей пленке, изготовленной из относительно прозрачного для электронов материала, например, углерода или пластика. Также при помощи напыления металла можно визуализировать внутреннюю структуру клеток. В этом случае образцы быстро замораживают (как описано выше) и расщепляют лезвием ножа. Содержание льда в разрушенной поверхности уменьшают путем испарения льда в вакуум при повышении температуры — этот процесс носит название лиофилизации (замораживания-высушивания). На части клетки, экспонированные в этом процессе *травления*, напыляют металл для создания металлической копии. Оставшийся органический материал клетки должен быть растворен, для того чтобы осталась лишь тонкая металлическая *реплика* поверхности образца. Затем ее укрепляют углеродной пленкой, помещают на сетку и исследуют в трансмиссионном электронном микроскопе (рис. 9.52). Данный метод позволяет визуализировать структуру внутреннего содержания клетки и ее трехмерную организацию с удивительной четкостью (рис. 9.53).

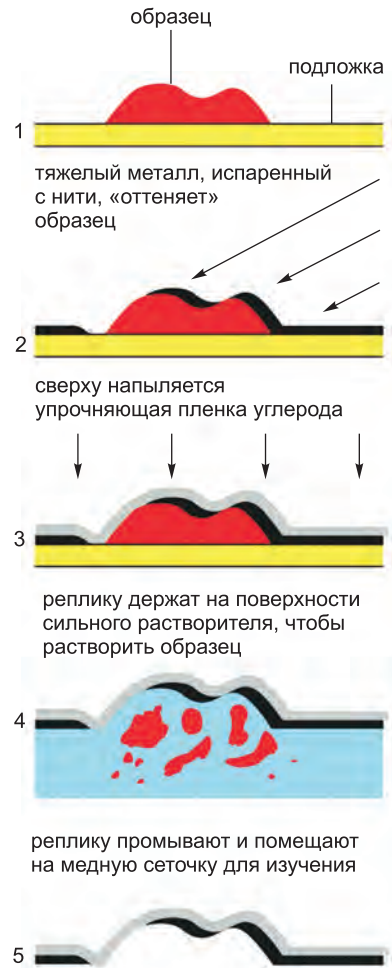


Рис. 9.52. Приготовление металлической реплики поверхности образца. Обратите внимание, что толщина металла отражает контур поверхности исходного образца.

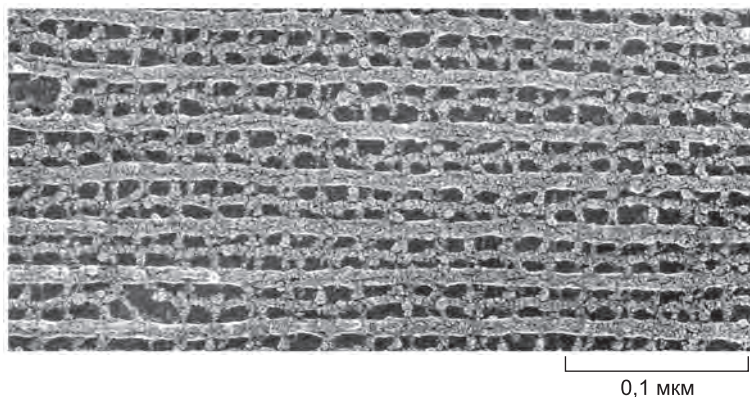


Рис. 9.53. Регулярное расположение белковых филаментов в мышце насекомого. Для получения данного изображения мышечные клетки быстро заморозили до температуры жидкого гелия, расщепили по цитоплазме и подвергли глубокому травлению. Затем была изготовлена и исследована при большом увеличении металлическая реплика. (С любезного разрешения Roger Cooke и John Heuser.)

9.2.6. Негативное окрашивание и криоэлектронная микроскопия позволяют видеть макромолекулы с высоким разрешением

Несмотря на то что изолированные макромолекулы, например ДНК и крупные белки, можно визуализировать в электронном микроскопе путем напыления тяжелого металла для создания контрастности, более тонкую структуру можно увидеть, используя **негативное окрашивание**. По этому методу молекулы, нанесенные на тонкую углеродную пленку, смешивают с раствором соли тяжелого металла, например уранилацетата. После того как образец высыхает, очень тонкий слой соли металла покрывает углеродную пленку, за исключением областей, где расположена адсорбированная макромолекула. Поскольку электроны проходят через макромолекулы значительно лучше, чем через окружающую соль тяжелого металла, создается обратное негативное изображение молекулы. Негативное окрашивание особенно эффективно для визуализации макромолекулярных агрегатов, например вирусов и рибосом, и субъединичной структуры белковых филаментов (**рис. 9.54**).

Напыление металла и негативное окрашивание позволяют получить изображения маленьких макромолекулярных ансамблей в высоком разрешении, но предел разрешения обоих методов ограничивает размер самой маленькой металлической частицы в окрашивании или напылении. Недавно разработанные альтернативные подходы позволяют напрямую визуализировать в высоком разрешении даже внутреннее содержимое таких трехмерных структур, как вирусы и органеллы. В данном методе, носящем название **криоэлектронной микроскопии**, ключевым моментом опять является быстрое замораживание для создания стекловидного льда. На микроскопической сетке приготавливают очень тонкую (около 100 нм) пленку водной суспензии вируса или очищенного макромолекулярного комплекса. Затем образец быстро охлаждают путем помещения его в хладоагент. Для поддержания такого водного препарата при температуре -160°C в вакууме микроскопа используют специальный держатель, в котором образец можно наблюдать напрямую без фиксации, окрашивания или высушивания. В отличие от негативного окрашивания, в котором мы видим окрашивание вокруг исключенного образца, водная криоэлектронная

микроскопия создает изображение макромолекулярной структуры самой по себе. Однако для извлечения максимально возможного объема информации о структуре необходимо использование специальных методов обработки изображения, которые мы опишем ниже.

9.2.7. Для увеличения разрешения можно объединять несколько изображений

Любое изображение, полученное электронным или световым микроскопом, составлено из частиц — электронов или фотонов, — попадающих в некоторый детектор. Но эти частицы подчиняются законам квантовой механики, поэтому число достигших детектора частиц можно предсказать только статистически. При предельно большом числе частиц распределение в детекторе достаточно точно определяется визуализируемым образцом. Однако при меньшем количестве частиц исходная структура на изображении зашумляется флуктуациями числа регистрируемых частиц на каждом участке образца. Термин «шум» описывает случайные отклонения, ухудшающие реальное изображение образца. Шум играет большую роль в световой микроскопии при маленькой интенсивности освещения, но в электронной микроскопии он создает серьезные сложности при работе с неокрашенными макромолекулами. Молекула белка, не повреждаясь, выдерживает только несколько десятков электронов на квадратный нанометр, и эта доза на несколько порядков ниже, чем необходимо для получения изображения в атомном разрешении.

Решение состоит в получении изображений множества одинаковых молекул — до десятков тысяч отдельных микрофотографий — и объединении их для создания усредненного изображения, на котором будут видны детали структуры, скрытые шумом на исходных изображениях. Этот метод называется **одночастичной реконструкцией изображений**. Однако до объединения отдельных изображений их необходимо совместить друг с другом. Иногда можно заставить белки и комплексы образовывать кристаллическую структуру, в которой каждая молекула расположена

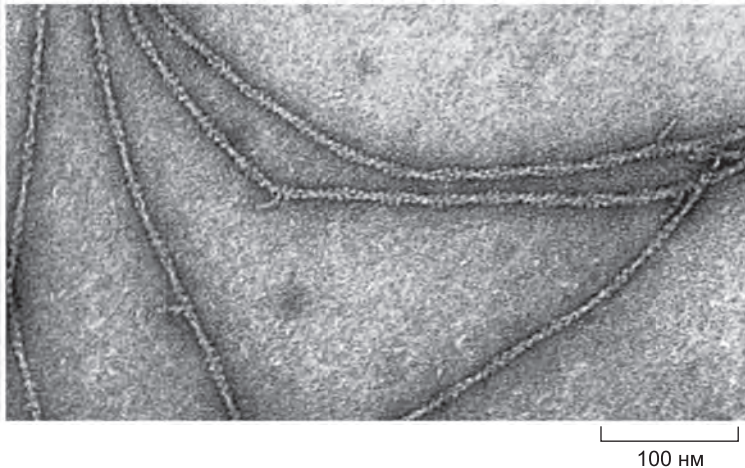


Рис. 9.54. Негативно окрашенные актиновые филаменты. На данной микрофотографии, полученной при помощи трансмиссионной электронной микроскопии, каждый филамент имеет толщину около 8 нм и при ближайшем рассмотрении состоит из спиральной цепи глобулярных молекул актина. (С любезного разрешения Roger Craig.)

в определенной ориентации в узлах регулярной решетки. В данном случае проблема совмещения легко решается, и такой тип электронной кристаллографии позволил расшифровать несколько структур белков в атомном разрешении. Однако, в принципе, нет строгой необходимости в кристаллических решетках. При помощи компьютера можно обработать и объединить цифровые изображения случайно распределенных и по-разному ориентированных молекул для получения реконструкций высокого разрешения. Несмотря на то что структуры, обладающие некоторой внутренней симметрией, упрощают процесс совмещения и делают его более точным, этот метод применяют и для структур, лишенных симметрии, например рибосом. На **рис. 9.55** показана структура икосаэдрического вируса, расшифрованная с высоким разрешением при помощи сочетания множества частиц и совмещения изображений.

В случае регулярных кристаллических решеток электронная микроскопия достигает разрешения 0,3 нм. Этого достаточно для того, чтобы наблюдать внутреннее

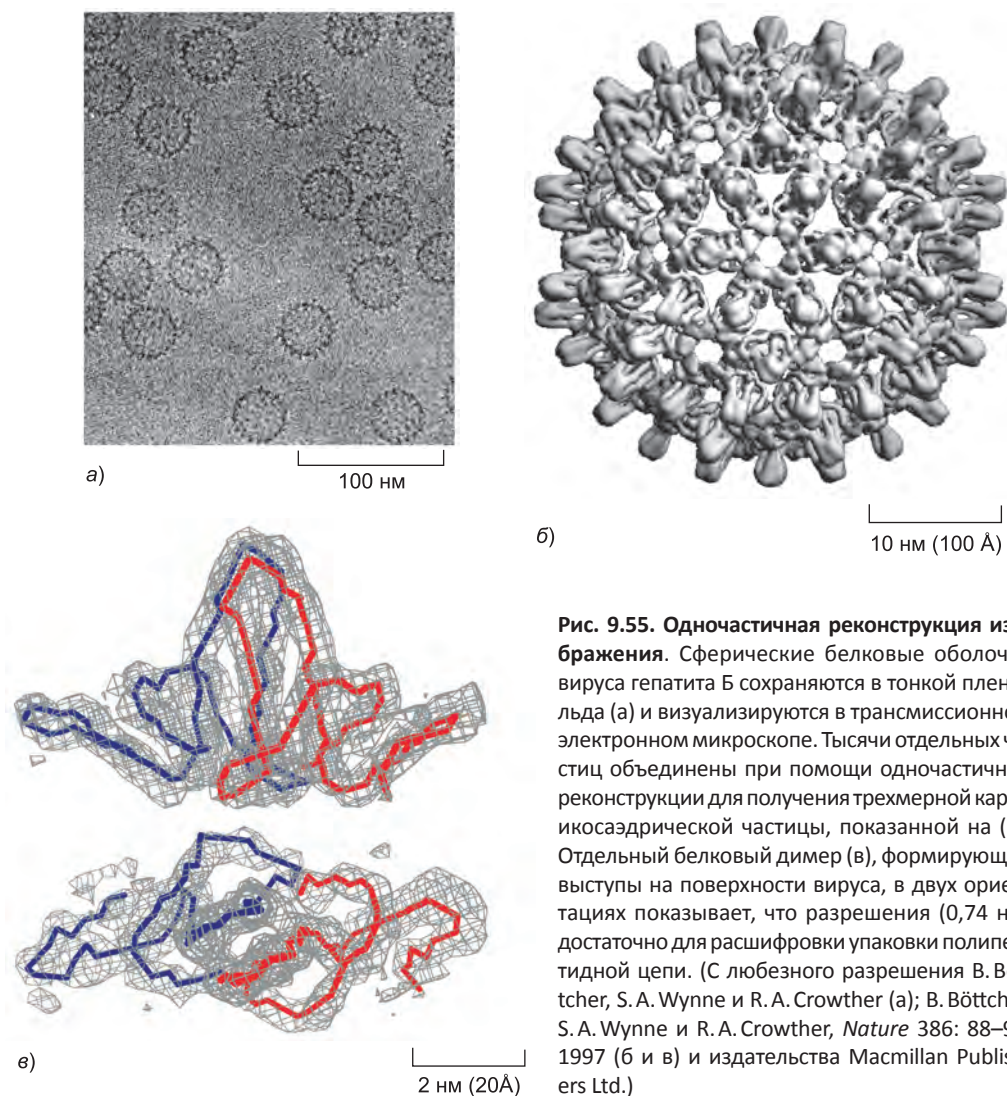


Рис. 9.55. Одночастичная реконструкция изображения. Сферические белковые оболочки вируса гепатита Б сохраняются в тонкой пленке льда (а) и визуализируются в трансмиссионном электронном микроскопе. Тысячи отдельных частиц объединены при помощи одночастичной реконструкции для получения трехмерной карты икосаэдрической частицы, показанной на (б). Отдельный белковый димер (в), формирующий выступы на поверхности вируса, в двух ориентациях показывает, что разрешения (0,74 нм) достаточно для расшифровки упаковки полипептидной цепи. (С любезного разрешения B. Böttcher, S. A. Wynne и R. A. Crowther (а); B. Böttcher, S. A. Wynne и R. A. Crowther, *Nature* 386: 88–91, 1997 (б и в) и издательства Macmillan Publishers Ltd.)

атомное строение белков. Более того, разрешение в данном случае может соперничать с рентгеноструктурным анализом. Предел разрешения одночастичной реконструкции изображений сейчас составляет около 0,5 нм, достаточно для идентификации субъединиц и доменов белков и, частично, вторичной структуры белка. Несмотря на то что электронная микроскопия вряд ли заменит рентгеноструктурный анализ (см. главу 8) в качестве метода определения структуры макромолекул, она обладает несколькими очевидными преимуществами. Во-первых, ей далеко не всегда требуются кристаллические образцы. Во-вторых, она способна визуализировать очень большие комплексы — структуры, которые могут быть слишком крупными или изменчивыми для получения удовлетворительных кристаллов.

Анализ крупных и сложных макромолекулярных структур упрощается, если известна, например, из рентгеноструктурного анализа, атомная структура одной или нескольких субъединиц комплекса. Молекулярные модели тогда могут быть математически «вписаны» в оболочку структуры, определенной в меньшем разрешении при помощи электронного микроскопа. На **рис. 9.56** показана структура рибосомы и определенное данным методом положение связанного с ней фактора освобождения (см. также рис. 6.74 и 6.75).

9.2.8. Различные ракурсы одного объекта можно объединить для получения трехмерной реконструкции

Детекторы, применяемые для записи изображений электронных микроскопов, дают двумерные изображения. Благодаря большой глубине поля микроскопа все части трехмерного образца находятся в фокусе, и конечное изображение пред-

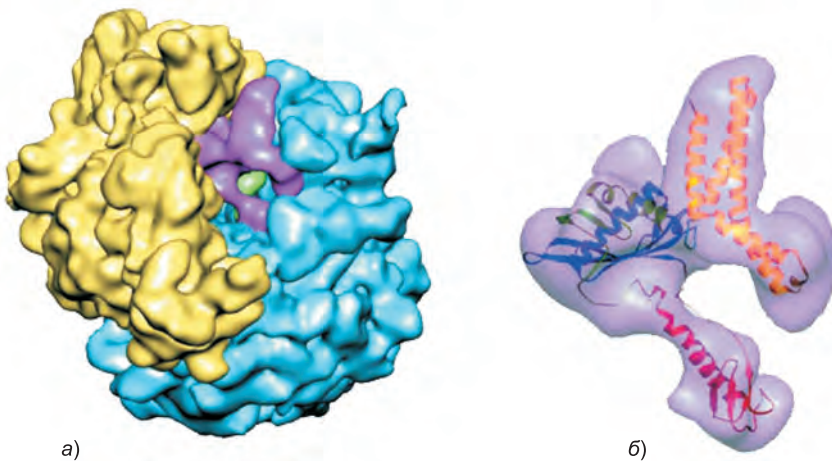


Рис. 9.56. Одночастичная реконструкция изображения и подбор молекулярной модели. Бактериальные рибосомы, содержащие освобождающий фактор, необходимый для высвобождения белка из рибосомы, и без него, использованы для получения трехмерных крио-ЭМ карт с разрешением, превышающим 1 нм. Почти 20 тысяч изображений отдельных рибосом, сохраненных во льду, использовали для получения одночастичной реконструкции. На (а) 30S-субъединицу (желтая) и 50S-субъединицу рибосомы (синяя) можно отличить от дополнительной электронной плотности, соответствующей фактору терминирования RF2 (розовый). Затем известную молекулярную структуру RF2 вписали методами молекулярного моделирования в эту электронную плотность. (Из U. B. S. Rawat et al., *Nature* 421: 87–90, 2003. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

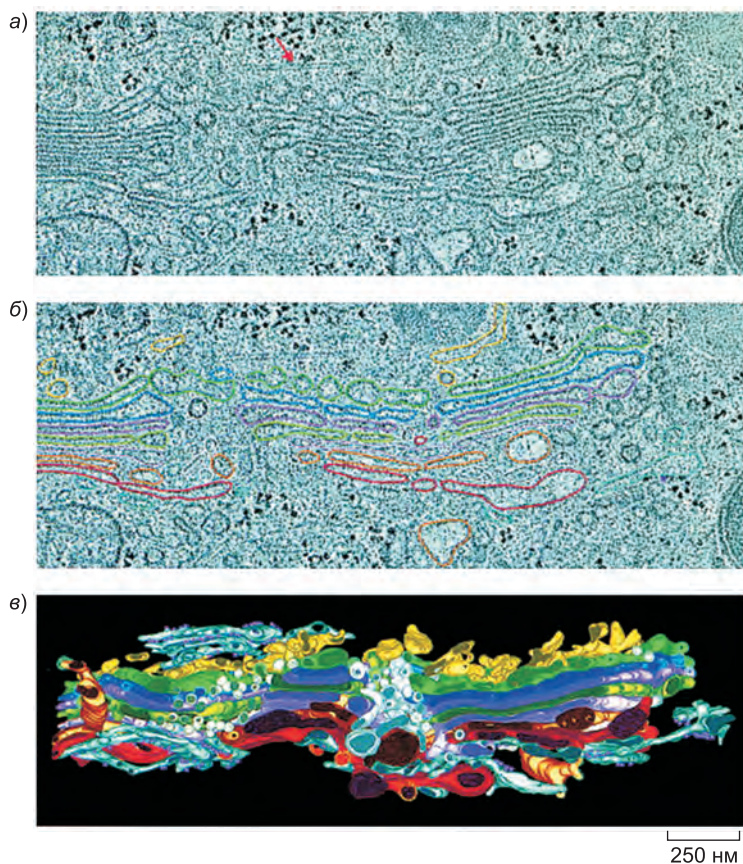


Рис. 9.57. Электронная (клеточная) томография. Быстрозамороженные, криозамещенные и заключенные в пластик образцы сохраняют в виде, очень близком к исходному живому состоянию. Этот эксперимент показывает данные анализа трехмерной структуры приготовленного таким образом аппарата Гольджи клетки почки крысы. Несколько толстых срезов (250 нм) клетки поворачивали по двум осям в электронном микроскопе высокого напряжения и записывали около 160 различных ракурсов. При помощи методов электронной томографии цифровые данные объединили для получения конечной трехмерной реконструкции с разрешением около 7 нм. Затем на компьютере можно сделать очень тонкие срезы всего набора трехмерных данных, или томограммы, и получить тонкие срезы толщиной всего 4 нм, показанные здесь на (а) и (б). Картина очень мало изменяется при переходе от одного среза к другому, но используя полный набор данных и вручную кодируя цвета мембран (б), можно получить полное трехмерное изображение аппарата Гольджи и связанных с ним везикул (в). (Из M. S. Ladinsky et al., *J. Cell Biol.* 144: 1135–1149, 1999. С любезного разрешения The Rockefeller University Press.)

ставляет собой проекцию структуры вдоль направления наблюдения. Потерянную информацию в третьем измерении можно восстановить, если у нас есть изображения этого же образца в различных ракурсах. Вычислительные алгоритмы для данного метода разработаны в 60-х гг., и их широко используют в медицинской компьютерной томографии (КТ). В КТ устройство получения изображений движется вокруг пациента для получения различных ракурсов. В **электронной (клеточной) томографии** держатель образца в микроскопе наклоняется, что позволяет достичь такого же результата. Таким образом, мы можем получить трехмерную реконструк-

цию в выбранной стандартной ориентации путем объединения набора различных ракурсов одного объекта в поле зрения микроскопа. Каждое отдельное изображение будет сильно зашумлено, но их совмещение и усреднение в трех пространственных измерениях значительно снижает уровень шума, давая четкое изображение молекулярной структуры. Начиная с толстых срезов заключенного в пластмассу материала, трехмерные реконструкции, или *томограммы*, широко используют для подробного описания анатомии маленьких областей клетки, например аппарата Гольджи (рис. 9.57) или цитоскелета. Однако все чаще исследователи применяют клеточную томографию к неокрашенным замороженным водным срезам и еще более быстро замороженным целым клеткам или органеллам (рис. 9.58). В настоящее время электронная микроскопия — мост между масштабами отдельной молекулы и целой клетки.

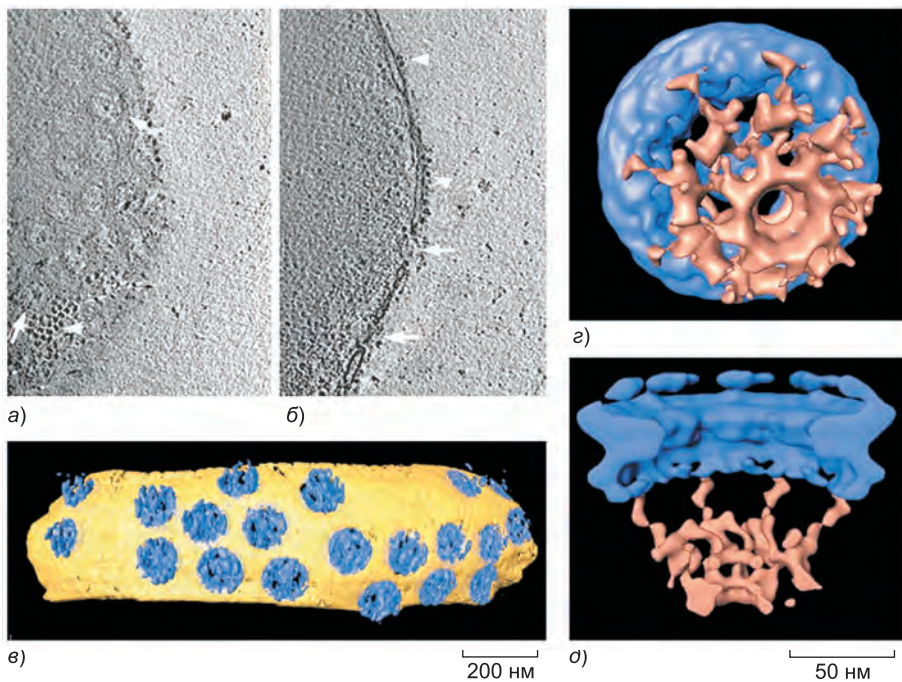


Рис. 9.58. Использование крио-электронной микроскопии в сочетании с одночастичной реконструкцией. Помимо срезов, метод электронной томографии можно применять к маленьким нефиксированным быстрозамороженным образцам, которые исследовали в микроскопе при помощи поворачивающегося держателя. В данном эксперименте аккуратно выделили маленькое ядро *Dictyostelium* и быстро заморозили его перед записью набора повернутых относительно друг друга изображений. Эти дифференциальные цифровые изображения объединяют методами клеточной томографии для получения трехмерной томограммы. Показаны два тонких цифровых среза (10 нм), проходящих через эту томограмму, на которых можно увидеть вид отдельных ядерных пор сверху (а) и сбоку (б). В трехмерной модели (в) видна поверхность пор (синяя), погруженная в ядерную оболочку (желтая). Из серии томограмм удалось получить данные о более 300 отдельных ядерных пор, чьи структуры затем усреднили при помощи методов одночастичной реконструкции. Вид поверхности одной из таких пор на поверхности ядра показан на (г), а срез — на (д); их нужно сравнивать с рис. 12.10. Поровый комплекс окрашен синим, а ядерная корзинка — коричневым. (Из М. Beck et al., *Science* 306: 1387–1390, 2004. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Заключение

Определение тонкой структуры мембран и органелл клетки требует высокого разрешения, достигаемого трансмиссионным электронным микроскопом. Определенные макромолекулы можно локализовать при помощи коллоидного золота, связанного с антителами. Трехмерные изображения поверхностей клеток и тканей получают при помощи сканирующей электронной микроскопии. Также электронная микроскопия позволяет определить форму изолированных молекул, оттененных напылением металла или очерченных негативным окрашиванием. Вычислительные методы используют для объединения множества изображений или ракурсов под различными углами для получения подробных реконструкций макромолекул и молекулярных комплексов методами электронной томографии и одночастичной реконструкции. Эти методы часто применяют к замороженным образцам. Получаемое этими методами разрешение означает, что атомная структура отдельных макромолекул часто может быть «вписана» в изображения, полученные при помощи электронной микроскопии, и что ТЕМ все чаще способна заполнить разрыв между структурами, расшифрованными при помощи рентгеноструктурного анализа и светового микроскопа.

Задачи

Какие из этих утверждений соответствуют действительности?

Объясните почему

9.1. Поскольку двойная спираль ДНК имеет ширину всего 10 нм, далеко за пределами разрешения светового микроскопа, в живых клетках невозможно увидеть хромосомы без специального окрашивания.

9.2. Флуоресцентная молекула, поглотившая фотон света одной длины волны, всегда испускает фотон большей длины волны.

9.3. «Запертые» молекулы можно ввести в клетку и активировать интенсивной вспышкой лазера в выбранный экспериментатором момент времени в определенной точке клетки.

Решите следующие задачи

9.4. На схемах на [рис. Q9.1](#) показаны траектории прохождения света через образец при использовании сухих линз и масляно-иммерсионных линз. Объясните, почему масляно-иммерсионные линзы должны давать лучшее разрешение. Показа-

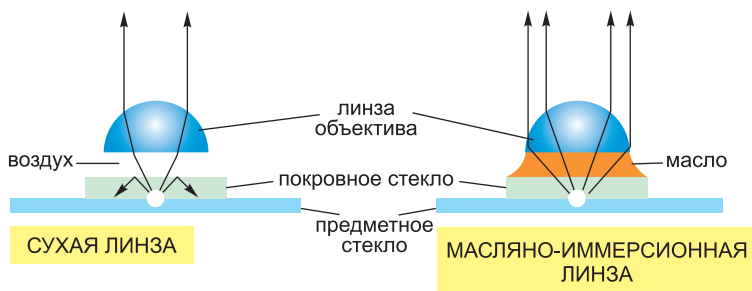


Рис. Q9.1. Траектории света, проходящего через сухую и масляно-иммерсионную линзы (задача 9.4). Белый кружок в источнике световых лучей представляет собой образец.

тели преломления воздуха, стекла и масла равны 1,00, 1,51 и 1,51 соответственно.

9.5. На **рис. Q9.2** изображена схема человеческого глаза. Показатели преломления структур на пути света равны: роговица — 1,38, внутриглазная жидкость — 1,33, хрусталик — 1,41 и стекловидное тело — 1,38. Где происходит основное преломление (основное фокусирование)? Какую роль, по-вашему, играет хрусталик?

9.6. Почему люди так плохо видят под водой? И почему помогают очки для подводного плавания?

9.7. Объясните разницу между разрешением и увеличением.

9.8. Антитела, связывающие определенные белки, являются важным инструментом локализации молекул в клетках. Чувствительность первичного антитела — антитела, взаимодействующего с молекулой-мишенью, — часто усиливают при помощи связывающихся с ним вторичных антител. В чем состоят достоинства и недостатки использования вторичных антител, несущих флуоресцентную метку, по сравнению с антителами, несущими связанные ферменты?

9.9. На **рис. Q9.3** показан набор модифицированных GFP, испускающих свет разных цветов. Почему, по-вашему мнению, один и тот же хромофор способен флуоресцировать при таких разных длинах волн?

9.10. Рассмотрите флуоресцентный детектор, разработанный для локализации в клетке активного фермента тирозинкиназы. Синий (голубой) флуоресцентный белок (CFP) и желтый флуоресцентный белок (YFP) сшиты с концами гибридного белкового домена. Гибридный белковый сегмент состоял из субстратного пептида, узнаваемого тирозинкиназой Abl, и фосфотирозин-связывающего домена (**рис. Q9.4**). Воздействие на домен CFP не приводит к испусканию домена YFP, если домены разделены. Однако, если CFP и YFP расположены близко, резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET) позволяет возбуждению CFP вызывать испускание YFP. FRET наблюдают экспериментально как увеличение отношения интенсивности флуоресценции при 526 нм и 476 нм (YFP/CFP), когда CFP возбуждается светом с длиной волны 434 нм.

Инкубация репортерного белка с тирозинкиназой Abl в присутствии ATP дает увеличение испускания YFP/CFP (**рис. Q9.4, б**). В отсутствие ATP или белка Abl FRET не наблюдают. FRET также подавляют добавлением тирозинфосфатазы

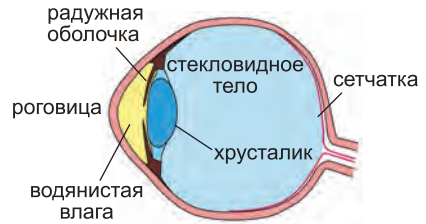


Рис. Q9.2. Схема глаза человека (**задача 9.5**).

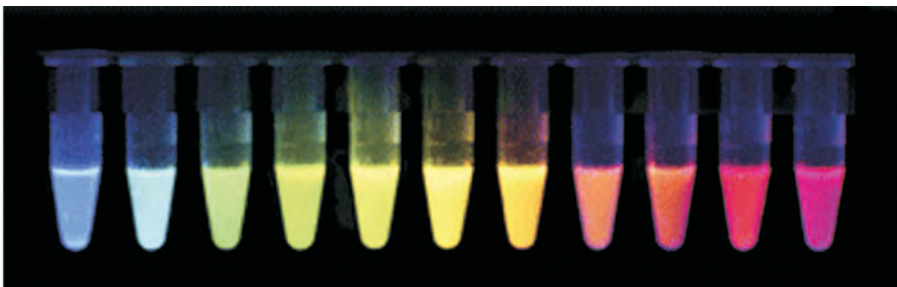


Рис. Q9.3. Спектр цветов, получаемых при помощи модифицированных GFP (**задача 9.9**). (Из R. F. Service, *Science* 306: 14576, 2004. С любезного разрешения издательства AAAS.)

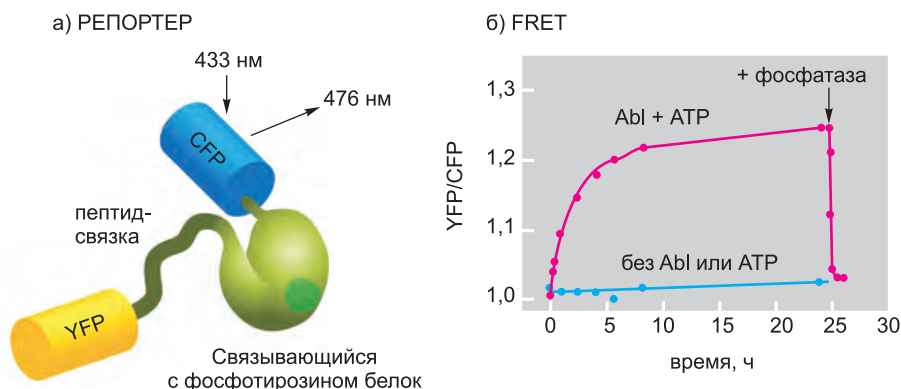


Рис. Q9.4 Флуоресцентный репортерный белок, разработанный для обнаружения тирозинкиназы (задача 9.10). (а) Доменная структура репортерного белка. Указаны четыре домена: CFP, YFP, субстратный пептид для тирозинкиназы и фосфотирозин-связывающий домен. (б) Результаты FRET. YFP/CFP нормировано на 1 в момент времени 0. Репортер инкубирован в присутствии (или в отсутствие) Abl и ATP в указанных временных промежутках. Стрелкой показано время добавления тирозинфосфатазы. (Из A. Y. Ting, K. H. Klain, R. M. Klemke and R. Y. Tsien, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98: 15003–15008, 2001. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

(рис. Q9.4, б). Опишите, насколько можете, как репортерный белок позволяет определить присутствие тирозинкиназы Abl.

9.11. На практике разрешающая способность современных электронных микроскопов составляет около 0,1 нм. Основной причиной такого предела является маленькая числовая апертура ($n \sin \theta$), которая ограничивается θ (половиной угловой длины лучей, собранных линзой объектива). Предполагая, что длина волны (λ) электрона равна 0,004 нм, а показатель преломления (n) равен 1,0, рассчитайте величину θ . Сравните полученное значение с $\theta=60^\circ$, характерным для световых микроскопов.

$$\text{разрешение} = \frac{0,61 \lambda}{n \sin \theta}$$

9.12. Сложно отличить впадины от выпуклостей, просто рассматривая рисунок теней. Рассмотрите **рис. Q9.5, а**, на котором показан набор оттененных кругов. На рисунке Q9.5а круги кажутся выпуклостями, но на самом деле при простом переворачивании картинки вверх ногами (рис. Q9.5, б) круги начинают казаться впадинами. Это классическая зрительная иллюзия. Точно такая же иллюзия наблюдается при напылении металла (см. электронные микрофотографии на рис. Q9.5). На одной из них кажется, что мембрана покрыта выступами, а на другой — множеством впадинок. Может ли микроскопист с уверенностью сказать, что один из взглядов правильный, или можно выбрать произвольно? Объясните свой ответ.

Список литературы

Общая

Celis J.E., Carter N., Simons K. et al. (eds.) (2005) *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, 3rd ed. San Diego: Academic Press. (Volume 3 of this four volume set)

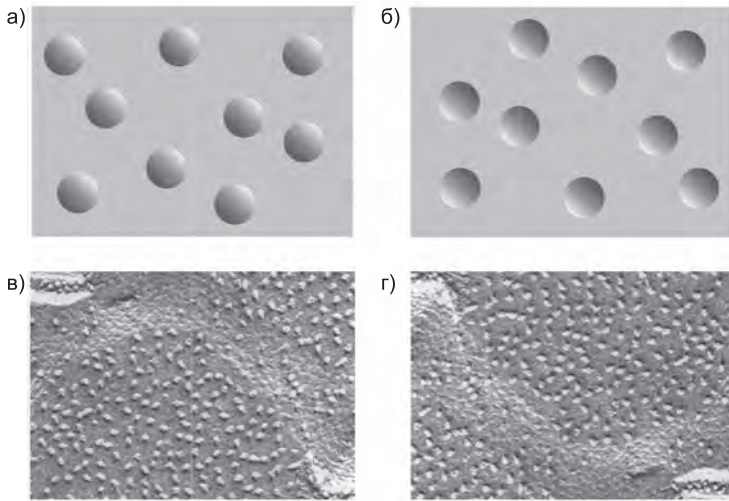


Рис. Q9.5. Выпуклости и впадины (задача 9.12). (а) Оттененные круги, кажущиеся выпуклостями. (б) Оттененные круги, кажущиеся впадинами. (в) и (г) Электронные микрофотографии, расположенные так, чтобы казалось, что мембрана покрыта выпуклостями и впадинами соответственно. (в и г, с любезного разрешения Andrew Staehelin.)

covers the practicalities of most of the current light and electron imaging methods that are used in cell biology, while volume 4 covers the transfer of molecules into cells.)

Pawley B. P. (ed.) (2006) *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 3rd ed. New York: Springer Science.

Разглядывание клеток в световом микроскопе

Adams M. C., Salmon W. C., Gupton S. L. et al. (2003) A high-speed multi-spectral spinning-disk confocal microscope system for fluorescent speckle microscopy of living cells. *Methods* 29: 29–v41.

Agard D. A., Hiraoka Y., Shaw P. & Sedat J. W. (1989) Fluorescence microscopy in three dimensions. In *Methods in Cell Biology*, vol. 30: *Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture*, part B (D. L. Taylor, Y.-L. Wang eds.). San Diego: Academic Press.

Centonze V. E. (2002) Introduction to multiphoton excitation imaging for the biological sciences. *Methods Cell Biol.* 70: 129–48.

Chalfie H., Tu Y., Euskirchen G. et al. (1994) Green fluorescent protein as a maker for gene expression. *Science* 263: 802–805.

Giepmans B. N., Adams S. R., Ellisman M. H. & Tsien R. Y. (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217–224.

Harlow E. & Lane D. (1988) *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Haugland R. P. (ed.) (1996) *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, 8th ed. Eugene, OR: Molecular Probes, Inc. (Available online at <http://www.probes.com/>)

Jaisway J. K. & Simon S. M. (2004) Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging. *Trends Cell Biol.* 14: 497–504.

Jares-Erijman E.A. & Jovin T.M. (2003) FRET imaging. *Nature Biotech.* 21: 1387–1395.

Lippincott-Shwartz J., Altan-Bonnet N. & Patterson G. (2003) Photobleaching and photoactivation; following protein dynamics in living cells. *Nature Cell Biol.* 5: S7–S14.

Minsky M. (1988) Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning* 10: 128–138.

Miyawaki A., Sawano A. & Kogure T. (2003) Lighting up cells: labeling proteins with fluorophores. *Nature Cell Biol.* 5: S1–S7.

Parton R.M. & Read N.D. (1999) Calcium and pH imaging in living cells. In *Light Microscopy In Biology, A Practical Approach*, 2nd ed. (Lacey AJ ed.) Oxford: Oxford University Press.

Sako Y. & Yanagida T. (2003) Single-molecule visualization in cell biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: SS1–SS5.

Sekar R.B. & Periasamy A. (2003) Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *J. Cell Biol.* 60: 629–633.

Shaner N.C., Steinbach P.A. & Tsien R.Y. (2005) A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2: 905–909.

Sheetz M.P. (ed.) (1997) Laser Tweezers in Cell Biology. *Methods Cell Biol.* 55.

Sluder G. & Wolf D.E. (2007) Video Microscopy 3rd ed. *Methods Cell Biol.* 81.

Stevens D.J. & Allan (2003) Light Microscopy Techniques for Live Cell Imaging. *Science* 300: 82–86.

Tsien R.Y. (2003) Imagining imaging's future. *Nature Rev. Mol. Cell Rev.* 4: SS16–SS21.

Weiss D.G., Maile W, Wick R.A. & Steffen W. (1999) Video microscopy. In *Light Microscopy in Biology: A Practical Approach*, 2nd ed. (A.J. Lacey ed) Oxford: Oxford University Press.

White J.G., Amos W.B. & Fordham M. (1987) An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* 105: 41–48.

Zernike F. (1955) How I discovered phase contrast. *Science* 121: 345–349.

Разглядывание клеток и молекул в электронном микроскопе

Allen T.D. & Goldberg M.W. (1993) High resolution SEM in cell biology. *Trends Cell Biol.* 3: 203–208.

Baumeister W. (2002) Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 12: 679–684.

Böttcher B., Wynne S.A. & Crowther R.A. (1997) Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature* 386: 88–91.

Dubochet J., Adrian M., Chang J.-J. et al. (1988) Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.* 21: 129–228.

Frank J. (2003) Electron microscopy of functional ribosome complexes. *Biopolymers* 68: 223–233.

Hayat M.A. (2000) Principles and Techniques of Electron Microscopy, 4th ed, Cambridge: Cambridge University Press.

Heuser J. (1981) Quick-freeze, deep-etch preparation of samples for 3D electron microscopy. *Trends Biochem. Sci.* 6: 64–68.

Lippincott-Schwartz J. & Patterson G.H. (2003) Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science* 300: 87–91.

McIntosh R., Nicastro D. & Mastronarde D. (2005). New views of cells in 3D: an introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol.* 15: 43–51.

McDonald K. L. & Auer M. (2006) High pressure freezing, cellular tomography, and structural cell biology. *Biotechniques* 41: 137–139.

Pease D.C. & Porter K.R. (1951) Electron microscopy and ultramicrotomy. *J. Cell Biol.* 91: 287s–292s.

Unwin P.N.T. & Henderson R. (1975) Molecular structure determination by electron microscopy of unstained crystal specimens. *J. Mol. Biol.* 94: 425–440.

ЧАСТЬ IV

ВНУТРЕННЯЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТКИ

Главы:

10. Структура мембраны

11. Мембранный транспорт малых молекул и электрические свойства мембраны

12. Внутриклеточные компартменты и сортировка белков

13. Внутриклеточный везикулярный транспорт

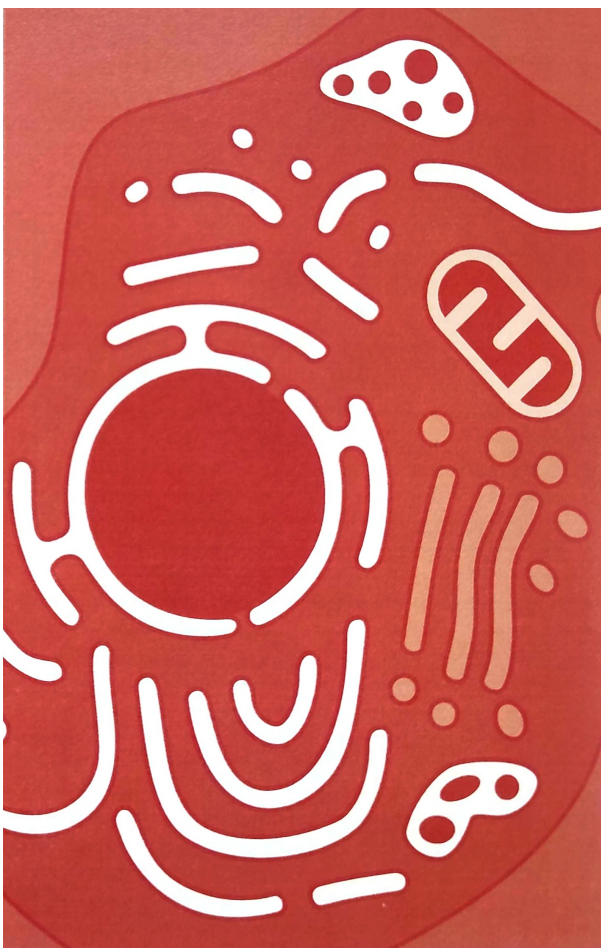
14. Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты

15. Механизмы межклеточной сигнализации

16. Цитоскелет

17. Клеточный цикл

18. Апоптоз



10

Структура мембраны

Клеточные мембраны необходимы для функционирования клеток. **Плазматическая мембрана** окружает клетку, определяет ее границы и поддерживает необходимые различия между цитозолем и внеклеточной средой. Внутри эукариотических клеток мембраны эндоплазматического ретикулума, аппарата Гольджи, митохондрий и других замкнутых мембранных органелл сохраняют характерные различия между содержимым каждой органеллы и цитозолем. Градиенты ионов через мембрану, создаваемые за счет работы специализированных мембранных белков, можно использовать для синтеза АТФ, они могут быть движущей силой трансмембранного переноса определенных растворенных веществ или, в случае нервных и мышечных клеток, создавать и передавать электрические сигналы. Во всех клетках плазматическая мембрана также содержит белки, которые работают в качестве сенсоров внешних сигналов, позволяя клетке изменять свое поведение в ответ на стимулы окружающей среды, включая сигналы от других клеток; эти белковые сенсоры, или *рецепторы*, передают через мембрану не молекулы, а информацию.

Несмотря на различные функции, все биологические мембраны обладают общей структурой: они представляют собой очень тонкую пленку липидов (жиров) и белков, удерживающихся вместе в основном за счет нековалентных взаимодействий (**рис. 10.1**). Клеточные мембраны — это динамические, жидкие структуры; большинство составляющих их молекул непрерывно движется в плоскости мембраны. Молекулы липидов организованы в непрерывный двойной слой толщиной около 5 нм. Этот *липидный бислой* является базовой жидкой структурой мембраны

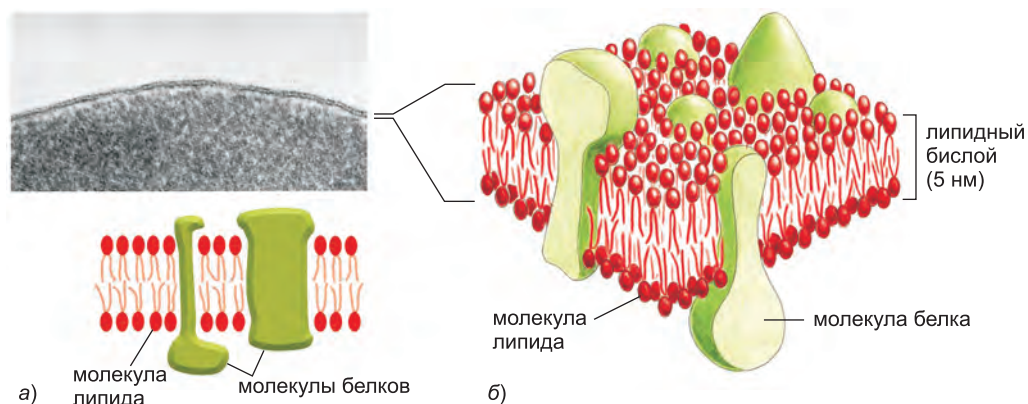


Рис. 10.1. Три взгляда на клеточную мембрану. (а) Электронная микрофотография среза плазматической мембраны (красного кровяного тельца человека). (б и в) На этих рисунках показаны двумерный и трехмерный виды клеточной мембраны и общее расположение ее липидных и белковых составляющих. (а, с любезного разрешения Daniel S. Friend.)

и служит относительно непроницаемым барьером для большинства растворимых в воде молекул. Белковые молекулы, пронизывающие липидный бислой (*трансмембранные белки*; см. рис. 10.1), опосредуют практически все остальные функции мембраны, например, транспорт через нее определенных молекул или катализ связанных с мембраной реакций типа синтеза АТР. В плазматической мембране некоторые трансмембранные белки функционируют в качестве структурных связей, соединяющих цитоскелет через липидный бислой либо с внеклеточным матриксом, либо с соседней клеткой, тогда как другие белки служат рецепторами для восприятия и преобразования химических сигналов окружающей среды. Как и следовало ожидать, чтобы клетка могла нормально функционировать и взаимодействовать со средой, требуется множество различных белков. По оценкам, мембранные белки составляют около 30% белков, кодируемых геномом животных клеток.

В этой главе мы рассмотрим структуру и организацию двух основных составляющих биологических мембран — липидов и белков. Несмотря на то что мы в основном будем говорить о плазматической мембране, большинство описанных принципов применимо и для различных внутренних мембран клеток. Функции клеточных мембран будут рассмотрены в следующих главах: роль мембран в синтезе АТР, например, обсуждается в главе 14; их участие в трансмембранном транспорте малых молекул — в главе 11; а роль в клеточной сигнализации и клеточной адгезии — в главах 15 и 19 соответственно. В главах 12 и 13 мы обсудим внутренние мембраны клетки и миграцию белков через них и между ними.

10.1. Липидный бислой

Липидный бислой — базовая структура всех клеточных мембран. Бислой легко увидеть в электронный микроскоп, и его структура полностью задана особыми свойствами липидных молекул, которые спонтанно упаковываются в бислой даже в простых искусственных условиях.

10.1.1. Основными липидами клеточных мембран являются фосфолипиды, сфинголипиды и стерин

Молекулы липидов составляют примерно 50 % массы большинства клеточных мембран животных, почти вся остальная масса — белки. На площади липидного бислоя 1×1 мкм расположено примерно 5×10^6 липидных молекул, что соответствует примерно 10^9 липидных молекул в плазматической мембране маленькой животной клетки. Все молекулы липидов в клеточных мембранах **амфифильны**, то есть они состоят из **гидрофильной** («любящей воду»), или *полярной*, части и **гидрофобной** («боящейся воды»), или *неполярной*, части.

Большого всего в мембране содержится **фосфолипидов**. Они состоят из полярной «головки» и двух гидрофобных *углеводородных «хвостов»*. В животных, растительных и бактериальных клетках «хвосты» — это обычно жирные кислоты, различающиеся по длине (они могут содержать от 14 до 24 атомов углерода). Один из «хвостов» обычно имеет одну или более двойную *цис*-связь (т. е. он *ненасыщен*), тогда как у другого «хвоста» двойных связей нет (т. е. он *насыщен*). Как показано на **рис. 10.2**, каждая двойная *цис*-связь создает небольшой изгиб (кинк) в «хвосте». Различия в длине и насыщенности жирнокислотных «хвостов» влияют на то, как фосфолипидные молекулы уложены в бислой и, следовательно, на текучесть мембраны, как мы увидим позже.

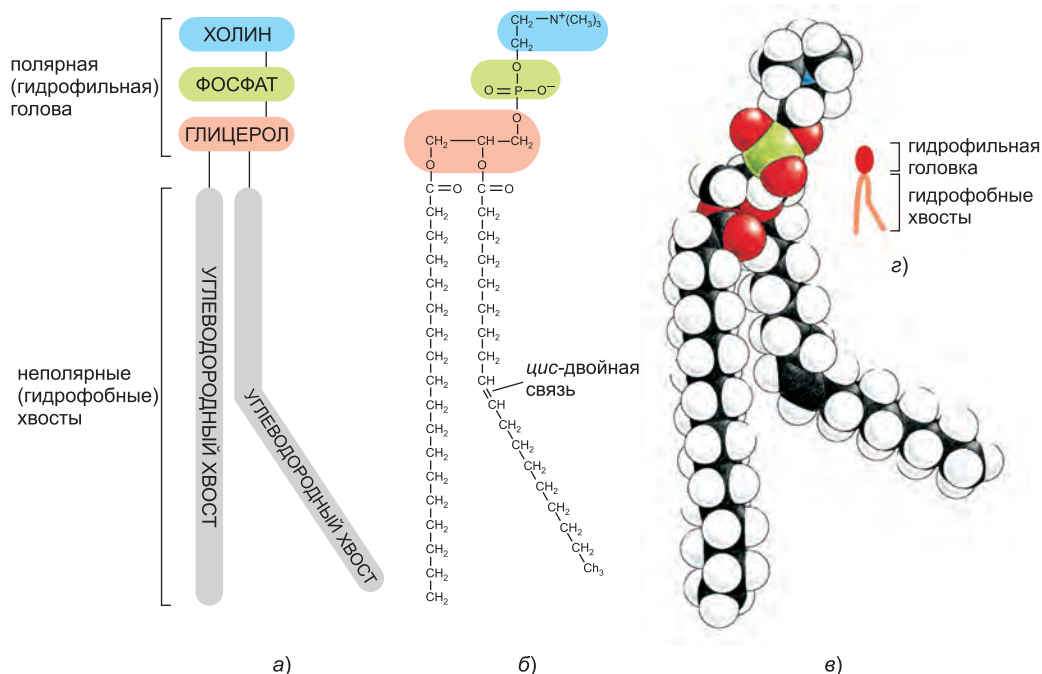


Рис. 10.2. Части молекулы фосфоглицерида. Здесь представлены (а) схема, (б) формула, (в) пространственная модель и (г) символ фосфатидилхолина. Изгиб (кинк), вызванный наличием двойной *цис*-связи, преувеличен для наглядности.

Основными фосфолипидами в большинстве клеточных мембран животных являются **фосфоглицериды**, имеющие в своей основе трехуглеродный *глицерин* (см. рис. 10.2). Два длинноцепочечных жирнокислотных «хвоста» через сложнуюэфирную связь соединены с соседними атомами углерода глицерина, а третий атом углерода связан с одним из нескольких различных типов головной группы. Варьируя жирные кислоты и головные группы, клетки синтезируют множество типов фосфоглицеридов. *Фосфатидилэтаноламин*, *фосфатидилсерин* и *фосфатидилхолин* — это основные фосфоглицериды клеточных мембран млекопитающих (рис. 10.3, а–в).

Другой важный фосфолипид, *сфингомиелин*, синтезируется из *сфингозина*, а не из глицерина (рис. 10.3, г–д). Сфингозин представляет собой длинную ацильную цепь с аминогруппой (NH₂) и двумя гидроксильными группами (ОН) на конце молекулы. В сфингомиелине жирнокислотный «хвост» связан с аминогруппой, а фосфохолиновая группа — с концевой гидроксильной группой. Вторая гидроксильная группа остается свободной и вносит вклад в полярные свойства соседней головной группы благодаря своей способности образовывать водородные связи с «головками» соседних липидов, молекулами воды или мембранными белками. Вместе фосфолипиды фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, фосфатидилсерин и сфингомиелин составляют больше половины массы липидов в большинстве клеточных мембран млекопитающих (см. таблицу 10.1).

Помимо фосфолипидов, в липидных бислоях многих клеточных мембран содержатся *холестерин* и *гликолипиды*. Эукариотические плазматические мембраны

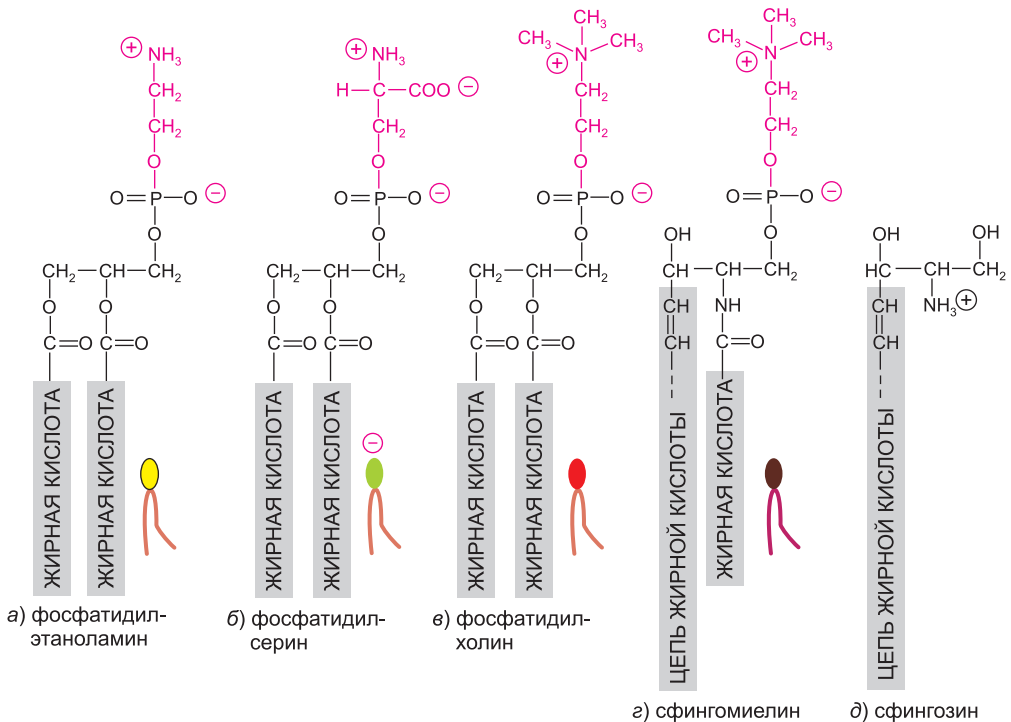


Рис. 10.3. Четыре основных фосфолипида плазматических мембран млекопитающих. Разные «головки» показаны разными цветами на символах. Липидные молекулы, изображенные на (а–в), являются фосфоглицеридами, синтезируемыми из глицерина. Молекула на (г) — это сфингомиелин, синтезируемый из сфингозина (д) и, следовательно, относящийся к сфинголипидам. Обратите внимание, что только фосфатидилсерин обладает отрицательным суммарным зарядом, роль которого мы обсудим ниже; остальные три фосфолипида электрически нейтральны при физиологическом значении pH и несут один положительный и один отрицательный заряды.

содержат особенно много **холестерина** (рис. 10.4) — до одной молекулы на каждую молекулу фосфолипида. Холестерин относится к стеринам. Он содержит жесткую циклическую структуру, с которой связаны единственная полярная гидроксильная группа и короткая неполярная углеводородная цепь. Молекулы холестерина ориентируются в бислой таким образом, чтобы их гидроксильная группа располагалась вблизи полярных «головок» соседних фосфолипидных молекул (рис. 10.5).

10.1.2. Фосфолипиды самопроизвольно образуют бислой

Форма и амфифильная природа фосфолипидных молекул заставляют их спонтанно формировать бислой в водном окружении. В главе 2 мы говорили, что гидрофильные молекулы легко растворяются в воде, потому что содержат заряженные или незаряженные полярные группы, которые способны образовывать энергетически выгодные электростатические или водородные связи с молекулами воды. С другой стороны, гидрофобные молекулы не растворяются в воде, поскольку почти все их атомы не заряжены или неполярны и, следовательно, не способны образовывать энергетически выгодные взаимодействия с молекулами воды. При помещении в воду они вынуждают прилегающие молекулы воды формировать похожие на

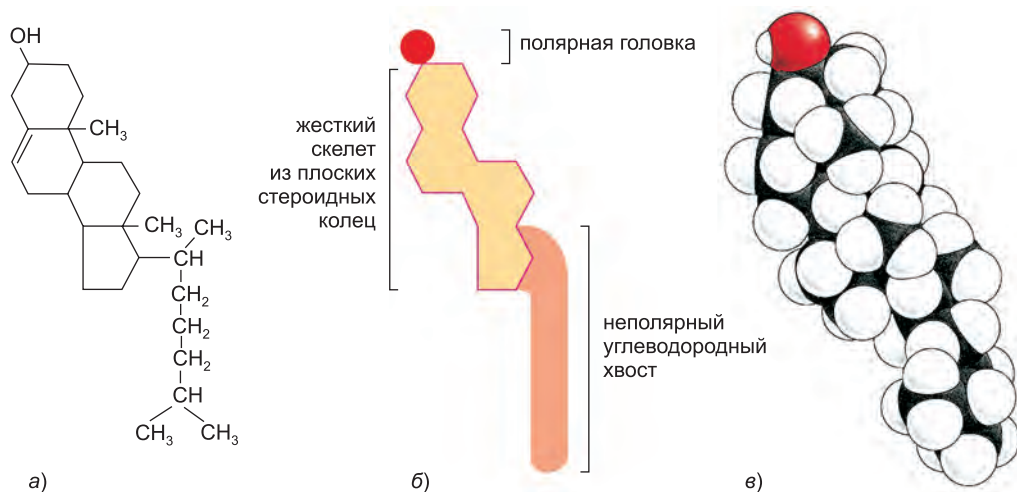


Рис. 10.4. Структура холестерина. Представлены (а) формула, (б) схема и (в) пространственная модель холестерина.

лед структуры, окружающие гидрофобную молекулу (рис. 10.6). Поскольку вода в таком состоянии более упорядочена, чем просто в растворе, образование таких структур увеличивает свободную энергию. Однако невыгодность этого процесса снижается, если гидрофобные молекулы (или гидрофобные части амфифильных молекул) группируются таким образом, чтобы взаимодействовать с наименьшим числом молекул воды.

Гидрофильные и гидрофобные области липидных молекул ведут себя точно так же. Таким образом, липидные молекулы самопроизвольно агрегируют для того, чтобы спрятать свои гидрофобные углеводородные «хвосты» внутрь и выставить гидрофильные «головки» наружу. В зависимости от формы они могут делать это двумя способами: либо формируя сферические *мицеллы*, в которых «хвосты» расположены внутри, либо образуя двухслойные пленки, или *бислои*, в которых гидрофобные «хвосты» расположены между гидрофильными «головками» (рис. 10.7).

Фосфолипидные молекулы обладают цилиндрической формой, поэтому в водном окружении они спонтанно формируют бислои. В таком наиболее энергетически выгодном состоянии гидрофильные «головки» на обеих поверхностях бислоя выставлены в воду, а гидрофобные «хвосты» скрыты от воды внутри. Те же силы, которые заставляют липиды образовывать бислои, ответственны за самовосстановление мембран. Маленький разрыв в бислое создает свободную границу с водой; поскольку это

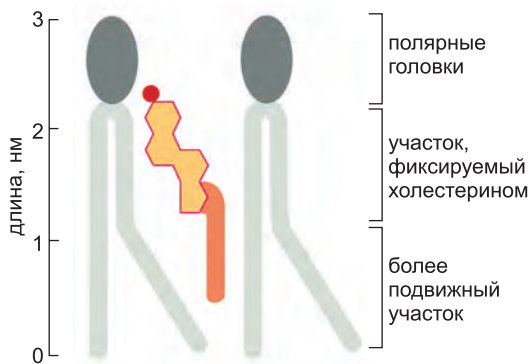


Рис. 10.5. Холестерин в липидном бислое. Схематическое изображение молекулы холестерина, взаимодействующей с двумя фосфолипидными молекулами в одном монослое липидного бислоя.

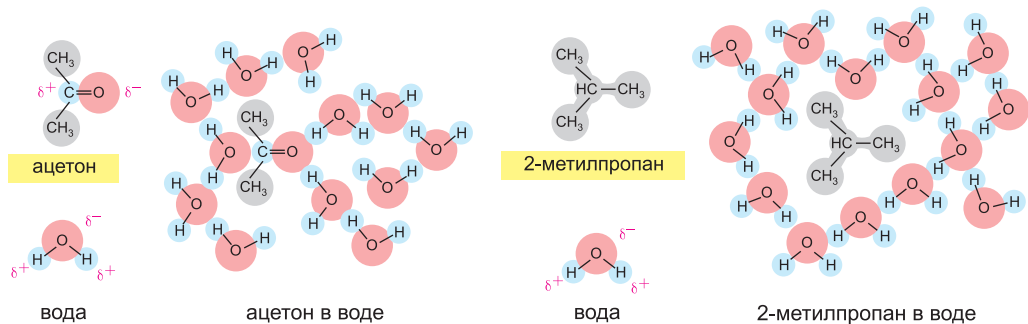


Рис. 10.6. Как гидрофильные и гидрофобные молекулы по-разному взаимодействуют с водой. (а) Поскольку ацетон полярен, он может образовывать энергетически выгодные электростатические связи с молекулами воды, которые также полярны. (б) Наоборот, 2-метилпропан полностью гидрофобен. Поскольку он не способен энергетически выгодно взаимодействовать с водой, он заставляет прилегающие молекулы воды формировать упорядоченные, похожие на лед структуры, что увеличивает свободную энергию. Таким образом, это соединение практически нерастворимо в воде. Символ δ^- обозначает парциальный отрицательный заряд, а δ^+ — парциальный положительный заряд. Полярные атомы показаны цветом, неполярные группы *серые*.

энергетически невыгодно, липиды стремятся реорганизоваться таким образом, чтобы убрать свободную границу. (При больших разрывах в эукариотических плазматических мембранах восстановление происходит путем слияния с мембраной внутриклеточных везикул.) Запрет свободных границ имеет важные последствия: единственным способом их избежать является замыкание бислоя самого на себя для формирования закрытого компартмента (**рис. 10.8**). Это удивительное поведение, лежащее в основе жизни клетки, напрямую следует из формы и амфифильной природы молекул фосфолипидов.

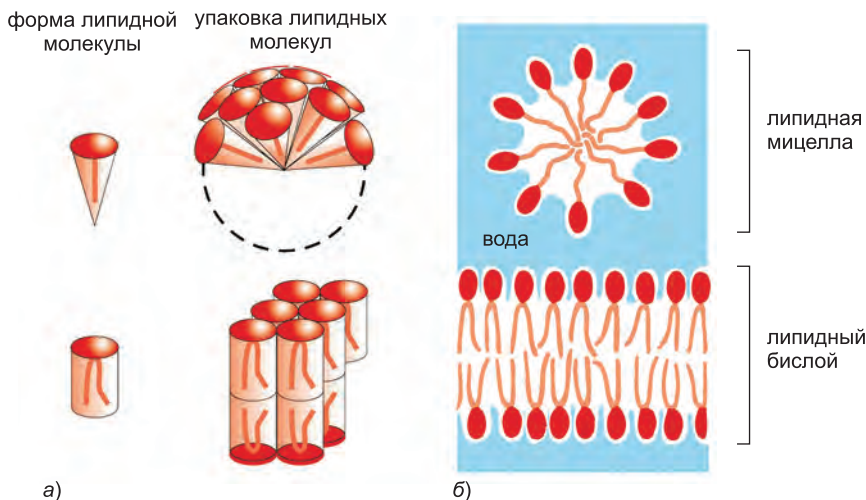


Рис. 10.7. Упаковка липидных молекул в водном окружении. (а) Конусообразные липидные молекулы (*вверху*) образуют мицеллы, тогда как цилиндрические фосфолипидные молекулы (*внизу*) образуют бислои. (б) Поперечные срезы липидной мицеллы и липидного бислоя. Липидные молекулы в воде в зависимости от своей формы самопроизвольно образуют одну из этих структур.

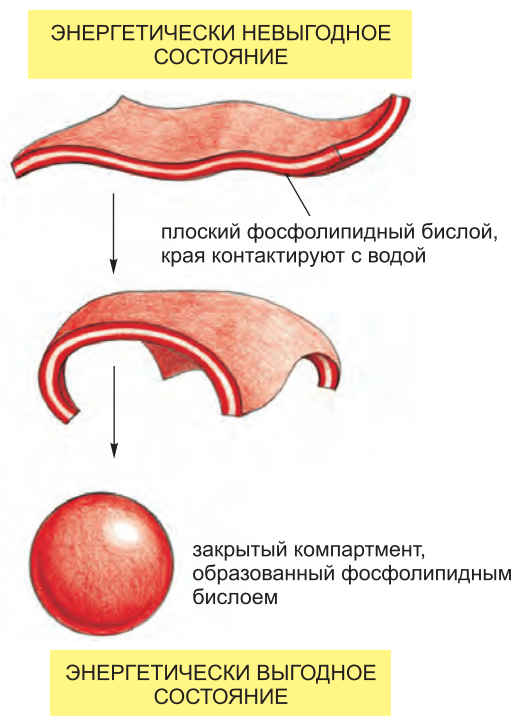
Рис. 10.8. Спонтанное замыкание фосфолипидного бислоя и формирование закрытого компартмента. Замкнутая структура устойчива, поскольку она не позволяет гидрофобным углеводородным «хвостам» взаимодействовать с водой, что энергетически невыгодно.

Липидный бислой также обладает другими свойствами, делающими его идеальной структурой для образования клеточных мембран. Одним из наиболее важных является его текучесть, которая необходима для многих функций мембраны.

10.1.3. Липидный бислой — это двумерная жидкость

Около 1970 г. исследователи впервые обнаружили, что отдельные липидные молекулы способны свободно диффундировать в пределах липидного бислоя. Сначала это показали на искусственных липидных бислоях. Два типа препаратов были очень полезны для этих исследований: (1) бислои в форме сферических везикул, называемых *липосомами*, диаметр которых изменяется от 25 нм до 1 мкм в зависимости от того, как их получать (рис. 10.9); и (2) плоские бислои, носящие название **черных мембран** и формирующиеся в отверстиях на границе между двумя сосудами с водой (рис. 10.10).

Для измерения движения отдельных липидных молекул и их компонентов применяют различные методы. Можно, например, получить липидную молекулу, к «головке» которой присоединена флуоресцентная молекула или маленькая частица золота, и наблюдать диффузию отдельных молекул в мембране. С другой стороны, можно модифицировать «головку» липида таким образом, чтобы она несла «спиновую метку», например нитроксильную группу ($>\text{N}-\text{O}$), содержащую неспаренный электрон, чей спин создает парамагнитный сигнал. Этот сигнал можно зарегистрировать при помощи спектрометра электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). (Принципы этого метода сходны с принципами ЯМР, описанного в главе 8.) Из спектра ЭПР можно определить траекторию движения и ориентацию спин-меченого липида в бислое. Такого рода исследования показали, что молекулы фосфолипидов в искусственных бислоях очень редко мигрируют из монослоя на одной стороне в монослой на другой. Этот процесс, известный как «флип-флоп переход», происходит для каждой отдельной молекулы реже, чем раз в месяц. Однако холестерин является исключением из этого правила и переходит из одного монослоя в другой очень быстро. С другой стороны, липидные молекулы легко меняются местами со своими соседями *в пределах* монослоя ($\sim 10^7$ раз в секунду). В результате происходит быстрая латеральная диффузия с коэффициентом диффузии (D), равным примерно $10^8 \text{ см}^2/\text{с}$. Это означает, что молекула липида



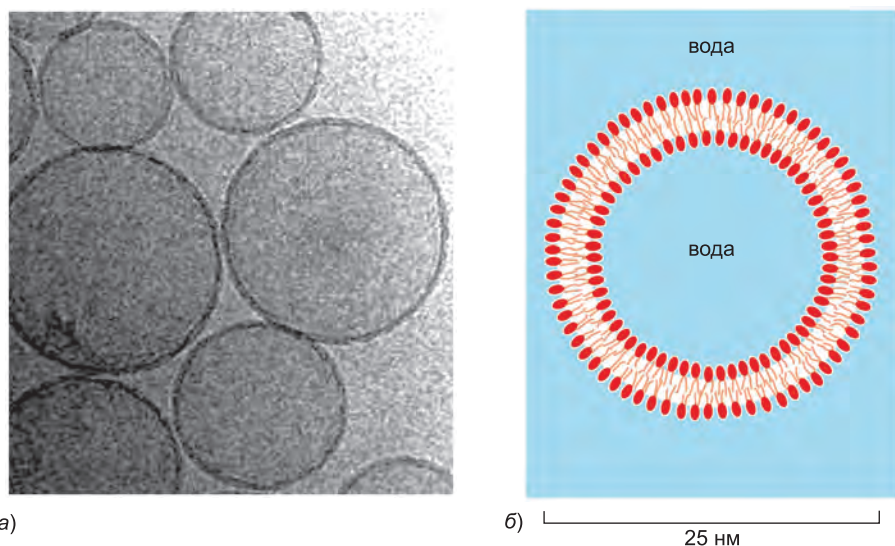


Рис. 10.9. Липосомы. (а) Электронная микрофотография нефиксированных, неокрашенных липидных везикул — липосом — в воде после быстрой заморозки при температуре жидкого азота. (б) Схема поперечного среза маленькой сферической липосомы. Липосомы широко используют в качестве модельных мембран в экспериментальных исследованиях. (а, из P. Frederik and W. Hubert, *Meth. Enzymol.* 391: 431, 2005. С любезного разрешения Elsevier.)

в среднем диффундирует на длину большой бактериальной клетки (~ 2 мкм) примерно за 1 секунду. Эти исследования также показали, что липидные молекулы очень быстро вращаются вдоль своей длинной оси и обладают гибкими углеводородными цепями. Компьютерное моделирование показывает, что липидные молекулы в мембранах очень неупорядочены и образуют в воде по обеим сторонам бислоя неравномерные поверхности из расположенных на разном расстоянии и по-разному ориентированных «головок» (рис. 10.11).

Сходные исследования движения меченых молекул липидов в изолированных биологических мембранах и живых клетках привели к таким же результатам, как

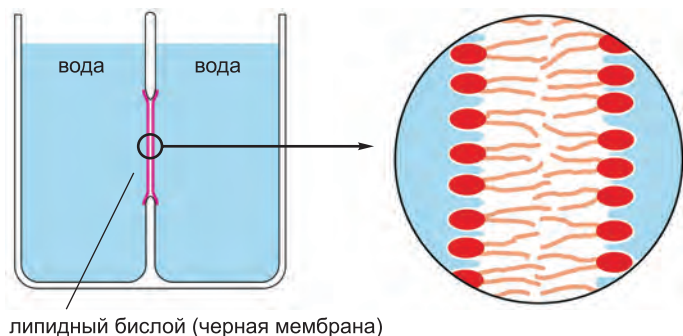


Рис. 10.10. Поперечный срез черной мембраны — искусственного липидного бислоя. Этот плоский бислой кажется черным, когда он формируется в маленьком отверстии в перегородке между двумя сосудами с водой. Черные мембраны используют для измерения проницаемости искусственных мембран.

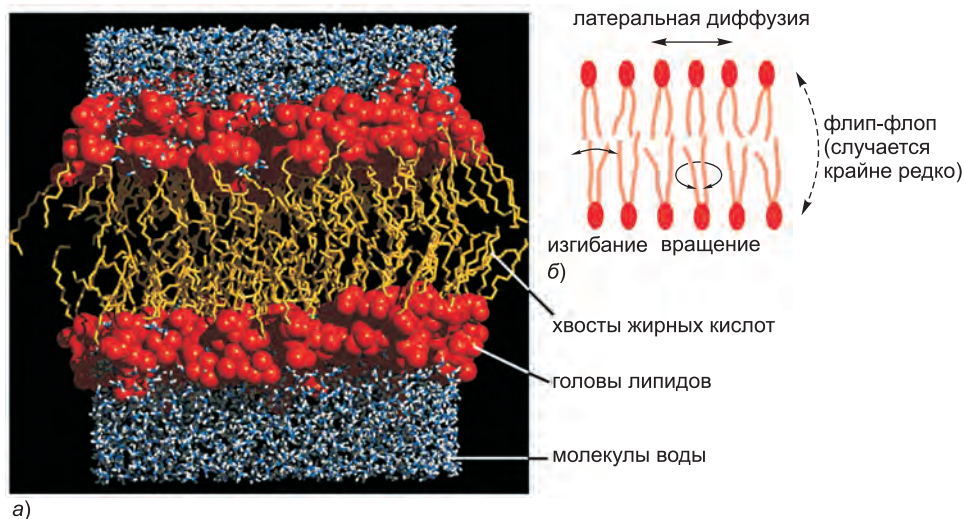


Рис. 10.11. Подвижность молекул фосфолипидов в искусственном липидном бислое. Компьютер рассчитал положение каждого атома в модели 100 молекул фосфатидилхолина через 300 пикосекунд молекулярной динамики. Благодаря этим теоретическим расчетам (которые в 1995 г. требовали недель загрузки процессора) построена модель липидного бислоя, учитывающая почти все измеряемые характеристики искусственных липидных бислоев, включая их толщину, число молекул липидов на площадь мембраны, глубину проникновения воды и неровность поверхности. Обратите внимание, что при достаточной длине «хвосты» в одном монослое могут взаимодействовать с «хвостами» в другом. (б) Различные движения молекулы липида в бислое. (а, основано на S. W. Chui et al., *Biophys. J.* 69: 1230–1245, 1995. С любезного разрешения Biophysical Society.)

и в случае искусственных бислоев. Они показали, что липидный компонент биологических мембран представляет собой двумерную жидкость, в которой составляющие ее молекулы свободно движутся в латеральном направлении. Как и в искусственных бислоях, молекулы липидов обычно остаются в одном монослое. Это ограничение создает проблемы для их синтеза. Фосфолипидные молекулы образуются только в одном монослое мембраны, в основном, в цитоплазматическом монослое мембраны эндоплазматического ретикулума. Если бы ни одна из синтезированных молекул не была способна достаточно быстро мигрировать в нецитоплазматический монослой, новый липидный бислой невозможно было бы синтезировать. Эта проблема решается особым классом трансмембранных ферментов, носящих название *транслокаторов фосфолипидов* и катализирующих быстрый флип-флоп переход фосфолипидов из одного монослоя в другой (см. в главу 12).

10.1.4. Текучесть липидных бислоев зависит от их состава

Текучесть клеточных мембран должна точно контролироваться. Эффективность определенных процессов мембранного транспорта и функционирования ферментов, например, снижается, когда вязкость бислоя искусственно увеличивают до значения, превышающего пороговую величину.

Текучесть липидного бислоя зависит от его состава и температуры, что было показано в экспериментах на искусственных бислоях. Искусственный бислой, состоящий из одного типа фосфолипидов, переходит из жидкого состояния в двумерное

жидкокристаллическое состояние (или гель) при характеристической температуре замерзания. Такое изменение состояния называется *фазовым переходом*, и температура, при котором он происходит, ниже (то есть мембрану становится сложнее заморозить), если липиды содержат короткие или ненасыщенные углеводородные цепи. Меньшая длина цепи мешает углеводородным «хвостам» взаимодействовать друг с другом как в пределах одного монослоя, так и в разных монослоях. Двойные *цис*-связи приводят к образованию кинков в углеводородных цепях, которые противодействуют плотной упаковке липидов, поэтому мембрана остается жидкой при более низких температурах (рис. 10.12). Бактерии, дрожжи и другие организмы, температура которых равна температуре окружающей среды, настроили жирнокислотный состав своих мембран таким образом, чтобы поддерживалась примерно постоянная текучесть. Например, если температура падает, клетки этих организмов синтезируют жирные кислоты с большим числом двойных *цис*-связей и таким образом избегают снижения текучести бислоя, которая в противном случае произошла бы после похолодания.

Холестерин регулирует свойства липидных бислоев. При смешивании с фосфолипидами он усиливает барьерные свойства липидного бислоя. Он встраивается в бислой таким образом, что его гидроксильная группа оказывается вблизи полярных «головок» фосфолипидов, а его жесткие плоские стероидные кольца взаимодействуют и частично иммобилизуют части углеводородных цепей, расположенные ближе всего к полярным «головкам» (см. рис. 10.5). Снижая подвижность первых нескольких CH_2 -групп углеводородных цепей молекул фосфолипидов, холестерин делает липидный бислой в этой области менее деформируемым и, следовательно, уменьшает проницаемость бислоя для малых растворимых в воде молекул. Несмотря на то что холестерин уплотняет упаковку липидов в бислой, он не делает мембраны сколько-нибудь менее текучими. При высоких концентрациях, свойственных большинству плазматических мембран эукариот, холестерин также препятствует сближению и кристаллизации углеводородных цепей.

В таблице 10.1 представлен липидный состав нескольких биологических мембран. Обратите внимание, что бактериальные плазматические мембраны часто состоят из одного основного типа фосфолипида и не содержат холестерина; их механическая устойчивость усиливается окружающей клетку клеточной стенкой (см. рис. 11.8). У архей липиды обычно содержат пренильные цепи длиной 20–25 углеводородных атомов, а не жирные кислоты. Пренильные и жирнокислотные цепи одинаково гидрофобны и гибки (см. рис. 10.20, e). Таким образом, липидные бислои могут быть составлены из молекул, обладающих сходными свойствами, но разной химической природой. Плазматические мембраны большинства эукариотических клеток более разнообразны, чем мембраны прокариот и архей. Они

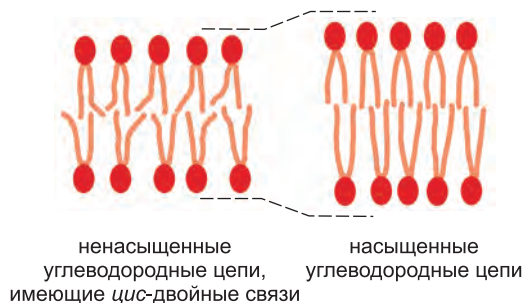


Рис. 10.12. Влияние двойных *цис*-связей на углеводородные цепи. Двойные связи мешают плотной упаковке цепей, что делает липидный бислой более устойчивым к замораживанию. Более того, поскольку углеводородные цепи ненасыщенных липидов расставлены сильнее, содержащие их липидные бислои тоньше, чем бислои, образованные исключительно из насыщенных жиров.

Таблица 10.1. Примерный липидный состав различных клеточных мембран

Липид	Процент от всех липидов по массе					
	Плазма- тическая мембрана клеток печени	Плазма- тическая мембрана красных клеток крови	Миелин	Мито- хондрия (внутренняя и внешняя мембраны)	Эндоплаз- матиче- ский рети- кулум	Бактерия <i>E. coli</i>
Холестерин	17	23	22	3	6	0
Фосфатидл- этаноламин	7	18	15	28	17	70
Фосфатидил- серин	4	7	9	2	5	Следовые количе- ства
Фосфатидил- холин	24	17	10	4	40	0
Сфингомие- лин	19	18	8	0	5	0
Гликолипиды	7	3	28	Следовые количества	Следовые количества	0
Другие ли- пиды	22	14	8	23	27	30

не только содержат большое количество холестерина, но и состоят из смеси различных фосфолипидов.

Масс-спектрометрический анализ мембранных липидов показал, что липидный состав типичной клеточной мембраны значительно сложнее, чем предполагали. Согласно этим исследованиям, мембраны состоят из 500–1 000 различных видов липидов. С одной стороны, такое разнообразие отражает различные комбинации головных групп, длины углеводородных «хвостов» и насыщенности основных классов липидов, но мембраны также содержат множество структурно очень непохожих минорных липидов, из которых по крайней мере часть выполняет очень важные функции. *Инозитольные фосфолипиды*, например, содержатся в очень малых количествах, но играют ключевую роль в мембранном транспорте и сигнализации клеток (эти процессы обсуждаются в главах 13 и 15 соответственно). Их локальный синтез и распад регулируются большим числом ферментов, которые как синтезируют маленькие внутриклеточные сигнальные молекулы, так и образуют липидные сайты докинга на мембранах, которые, как мы обсудим позже, связывают определенные белки цитозоля.

10.1.5. Несмотря на текучесть, липидные бислои способны образовывать домены разного состава

Поскольку липидный бислой представляет собой двумерную жидкость, можно предположить, что большинство типов молекул липидов распределены равномерно в монослой. Ван-дер-ваальсовы силы притяжения между соседними углеводородными «хвостами» недостаточно селективны для того, чтобы удерживать фосфолипидные молекулы вместе. Однако в определенных смесях липидов различные липиды могут временно сближаться, создавая динамическую мозаику доменов. В искусственных липидных бислоях, составленных из фосфатидилхолина, сфингомиелина

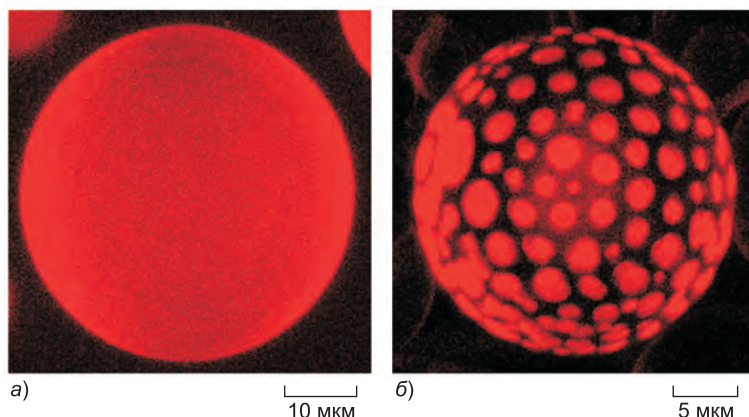


Рис. 10.13. Латеральное разделение фаз в искусственных липидных бислоях. (а) Гигантские липосомы, получаемые из 1:1 смеси фосфатидилхолина и сфингомиелина, образуют равномерные бислои, тогда как (б) липосомы, получаемые из 1:1:1 смеси фосфатидилхолина, сфингомиелина и холестерина, образуют бислои с двумя несмешивающимися фазами. Липосомы окрашены следовыми количествами флуоресцентного красителя, который проникает только в одну из фаз. Средний размер доменов, образующихся в таких гигантских искусственных липосомах, значительно больше, чем в биологических мембранах, где рафты могут иметь всего несколько нанометров в диаметре. (а, из N. Kahya et al., *J. Struct. Biol.* 147: 77–89, 2004. С любезного разрешения Elsevier; б, с любезного разрешения Petra Schwille.)

и холестерина, ван-дер-ваальсовы взаимодействия между длинными насыщенными углеводородными цепями молекул сфингомиелина могут быть достаточно сильными, чтобы соседние молекулы временно удерживались вместе (**рис. 10.13**).

Ученые долго спорили, могут ли молекулы липидов в плазматических мембранах животных клеток временно образовывать специализированные домены, носящие название **липидных рафтов** (англ. raft — плот). Определенные специализированные области плазматической мембраны, например *кавеолы*, участвующие в эндоцитозе (см. главу 13), обогащены сфинголипидами и холестерином. Считается, что специфические белки, собирающиеся в кавеолах, помогают стабилизировать эти рафты. Поскольку углеводородные цепи сфинголипидов длиннее и прямее, чем у других мембранных липидов, рафты толще, чем остальной бислой (см. рис. 10.12), и лучше удерживают определенные мембранные белки (**рис. 10.14**). Таким образом, латеральное разделение белков и липидов в рафтах, в принципе, должно быть взаимно стабилизирующим процессом. Липидные рафты могут способствовать организации мембранных белков, либо концентрируя их для транспорта в мембранных везикулах (см. главу 13), либо работая совместно в скоплениях белков, как бывает, например, когда они переводят внеклеточный сигнал во внутриклеточный (см. главу 15).

10.1.6. Жировые капли окружены монослоем фосфатидилхолина

Большинство клеток запасают избыток липидов в **жировых каплях**, откуда их можно извлечь для использования в качестве строительных блоков при синтезе мембран или в качестве источника пищи. Жировые клетки, которые также иногда называют адипоцитами, специализируются на запасании жиров (см. рис. 14.34). Они содержат большое число крупных жировых капель, из которых по необходимости можно освободить жирные кислоты и транспортировать их по кровяному

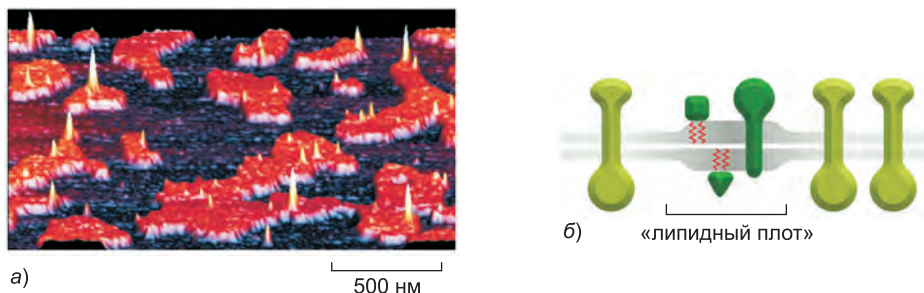


Рис. 10.14. Влияние липидных рафтов на искусственные липидные бислои. (а) Полученный при помощи атомно-силового микроскопии профиль поверхности искусственного бислоя, содержащего липидные рафты. Обратите внимание, что области рафтов, показанные *оранжевым*, толще, чем остальной бислои; как и на рисунке 10.13, рафты содержат в основном сфингомиелин и холестерин. Острые *желтые* пики — это молекулы белков, связанные с бислоем гликозилфосфатидилинозитольным (GPI) «якорем» (показанным на рисунке 10.19, пример б) и концентрирующиеся в области рафтов. (б) Считается, что благодаря своей большей толщине и липидному составу рафты способны концентрировать определенные мембранные белки (*темно-зеленые*). (а, из D. E. Saslowsky et al., *J. Biol. Chem.* 277: 26966–26970, 2002. С любезного разрешения American Society of Biochemistry and Molecular Biology.)

руслу в другие клетки. В жировых каплях хранятся нейтральные жиры, например триацилглицериды и сложные эфиры холестерина, которые синтезируются ферментами из жирных кислот и холестерина в мембране эндоплазматического ретикула. Поскольку эти липиды не несут гидрофильных «головок», они полностью гидрофобны и формируют трехмерные капли, а не бислои.

Жировые капли — это уникальные органеллы, потому что они окружены единственным монослоем фосфолипидов, содержащим большое количество белков. Некоторые из этих белков представляют собой ферменты, участвующие в метаболизме жиров, но функции большинства неизвестны. Если клетку подвергнуть действию высоких концентраций жирных кислот, жировые капли формируются очень быстро. Они образуются из отдельных областей мембраны эндоплазматического ретикула, где концентрируются многие ферменты метаболизма жиров. На **рис. 10.15** показана одна из моделей формирования жировых капель и окружающего их монослоя фосфолипидов и белков.

10.1.7. Асимметрия липидного бислоя необходима для его функционирования

Во многих мембранах монослой липидного бислоя значительно различаются по липидному составу. Например, в мембране красной клетки крови человека почти все фосфолипидные молекулы, содержащие в своей «головке» холин $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (фосфатидилхолин и сфингомиелин), расположены во внешнем монослое, тогда как почти все липиды, содержащие в головке терминальную простейшую аминогруппу (фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин), сконцентрированы во внутреннем монослое (**рис. 10.16**). Поскольку отрицательно заряженный фосфатидилсерин расположен во внутреннем монослое, между двумя половинами бислоя поддерживается значительная разница в заряде. В главе 12 мы обсудим, как связанные с мембраной транслокаторы фосфолипидов создают и поддерживают асимметрию липидного состава.

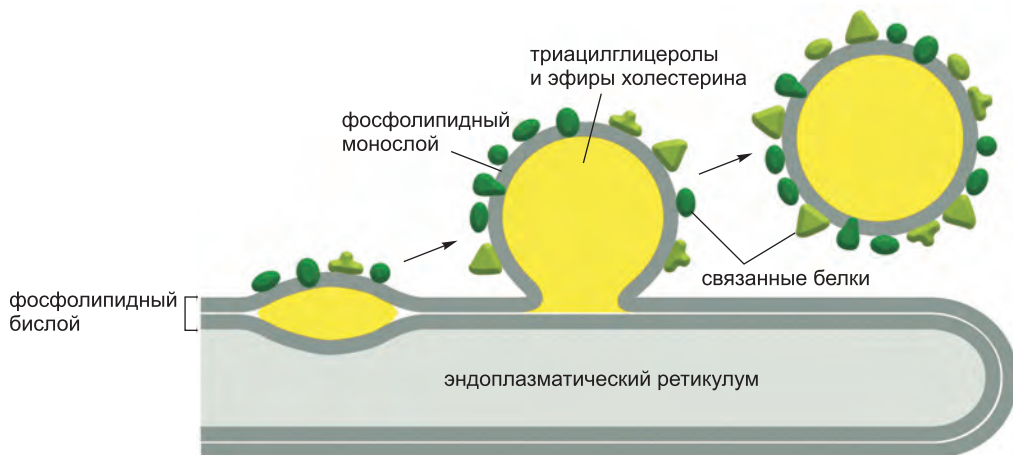


Рис. 10.15. Модель образования липидных капель. Нейтральные липиды расположены между мембранами эндоплазматического ретикулума. Они образуют трехмерную каплю, которая отпочковывается от эндоплазматического ретикулума и становится отдельной органеллой, окруженной единственным монослоем фосфолипидов и связанных с ними белков. (Адаптировано из S. Martin and R. G. Parton, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 373–378, 2006. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Липидная асимметрия функционально важна, особенно для трансформации внеклеточных сигналов во внутриклеточные (см. главу 15). Многие цитоплазматические белки связываются с определенными «головками» липидов в цитоплазматическом монослое липидного бислоя. Фермент *протеинкиназа C* (*Protein Kinase C*, *PKC*), например, активируется в ответ на различные внеклеточные сигналы. Она связывается с цитоплазматической поверхностью плазматической мембраны, где сконцентрирован отрицательно заряженный фосфатидилсерин, необходимый для ее активности.

В других случаях липидные «головки» сначала должны быть модифицированы для создания в определенном месте и в определенное время сайтов связывания белков. *Фосфатидилинозитол*, например, является одним из минорных липидов, концентрирующихся в цитоплазматическом монослое клеточных мембран. Различные липидкиназы могут добавлять фосфатную группу в определенные положения инозитольного кольца, создавая сайты связывания определенных цитоплазматических белков с мембраной. Одним из наиболее важных примеров таких липидкиназ



Рис. 10.16. Асимметричное распределение фосфолипидов и гликолипидов в липидном бислое красной клетки крови человека. Цвета «головок» фосфолипидов соответствуют рис. 10.3. Гликолипиды изображены с дополнительными шестиугольными полярными «головками» (голубые). Считают, что холестерин (не показан) распределен по монослоям примерно одинаково.

является *фосфоинозитид-3-киназа* (Phosphoinositide-3-kinase, *PI 3-киназа*), которая активируется в ответ на внеклеточные сигналы и способствует миграции определенных внутриклеточных сигнальных белков к цитоплазматической поверхности плазматической мембраны (рис. 10.17, а). Сходные липидкиназы фосфорилируют инозитольные фосфолипиды во внутриклеточных мембранах и таким образом способствуют миграции белков, управляющих мембранным транспортом.

Существует еще один способ трансформации внеклеточного сигнала во внутриклеточный с участием фосфолипидов. Плазматическая мембрана содержит различные *фосфолипазы*, которые активируются внеклеточными сигналами и расщепляют определенные фосфолипидные молекулы, создавая фрагменты этих молекул, действующие в качестве короткоживущих внутриклеточных медиаторов. *Фосфолипаза С*, например, расщепляет инозитольный фосфолипид в цитоплазматическом монослое плазматической мембраны с образованием двух фрагментов, один из которых остается в мембране и способствует активации протеинкиназы С, а другой выходит в цитозоль и вызывает высвобождение Ca^{2+} из эндоплазматического ретикула (рис. 10.17, б и в).

Животные используют фосфолипидную асимметрию плазматических мембран для того, чтобы отличать живые клетки от мертвых. Когда животная клетка претерпевает апоптоз (вид запрограммированной клеточной смерти, обсуждаемый в главе 18), фосфатидилсерин, который обычно содержится в цитоплазматическом монослое липидного бислоя плазматической мембраны, быстро переходит во внешний монослой. Фосфатидилсерин на внешней поверхности клетки сигнализирует соседним клеткам, например макрофагам, что эту клетку нужно фагоцитировать и переварить. Считается, что транслокация фосфатидилсерина в апоптотических клетках протекает по двум механизмам:

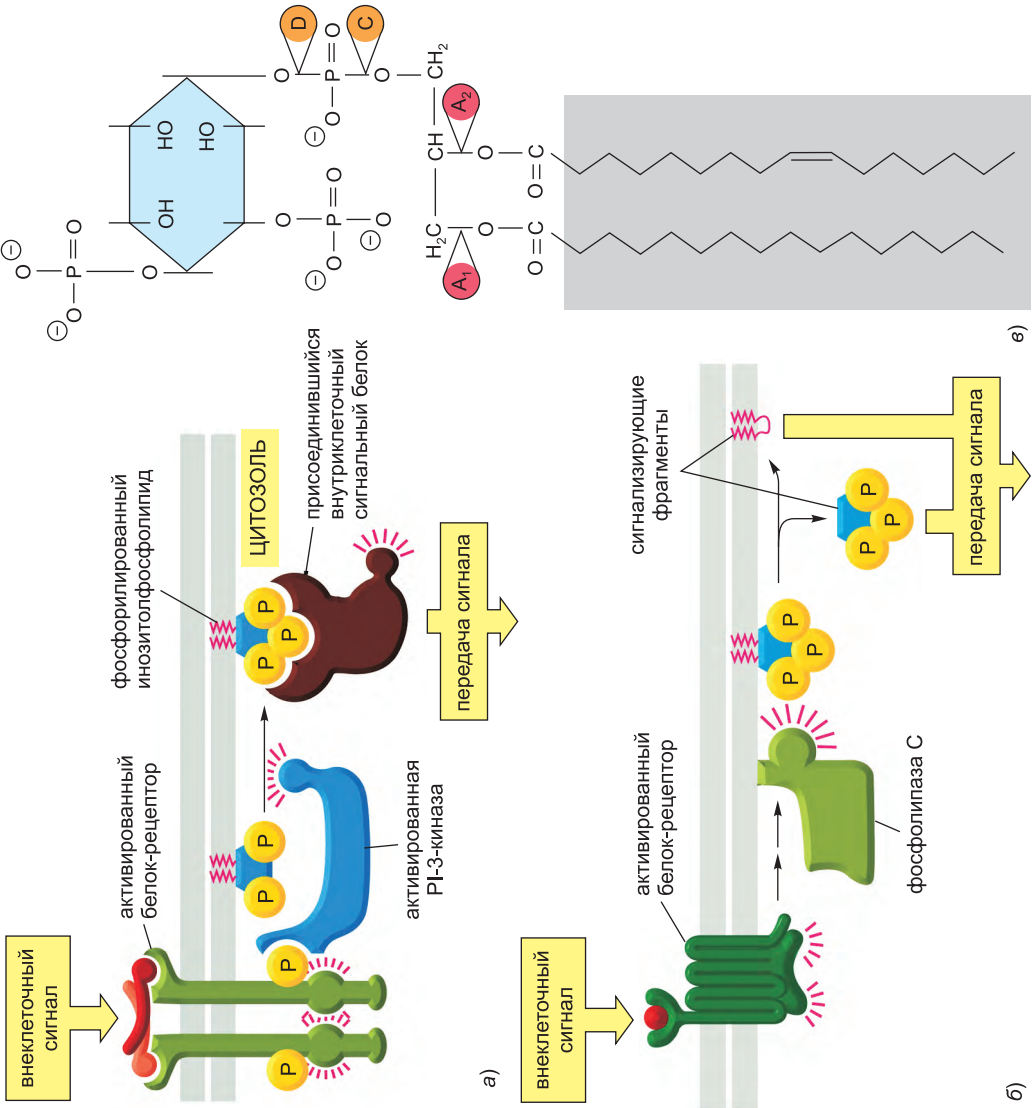
1. Транслокатор фосфолипидов, который в норме транспортирует этот липид из нецитоплазматического монослоя в цитоплазматический, инактивируется.
2. Активируется фермент скрамблаза (англ. scramblase), которая неспецифически переносит фосфолипиды в обоих направлениях из одного монослоя в другой.

10.1.8. Гликолипиды расположены на поверхности всех плазматических мембран

Содержащие сахара молекулы липидов — **гликолипиды** — в большом количестве имеются в нецитоплазматическом монослое липидного бислоя, и их распределение в мембране крайне асимметрично. В животных клетках они синтезируются из сфингозина, как и сфингомиелин. Эти интересные молекулы стремятся связаться друг с другом частично посредством водородных связей между их сахарами, частично за счет ван-дер-ваальсовых взаимодействий между их длинными и прямыми углеводородными цепями. Гликолипиды часто образуют липидные рафты. Причиной асимметричного распределения гликолипидов в бислое является добавление углеводных групп к липидным молекулам в люмене аппарата Гольджи. Таким образом, компартмент, в котором они синтезируются, топологически эквивалентен внешнему окружению клетки (см. главу 12). После доставки гликолипидов в плазматическую мембрану их углеводные группы располагаются на поверхности клетки (см. рис. 10.16), где они играют важную роль во взаимодействии клетки с ее окружением.

По-видимому, гликолипиды содержатся во всех плазматических мембранах животных клеток, где они составляют примерно 5 % всех липидных молекул внеш-

Рис. 10.17. Две сигнальные функции инозитольных фосфолипидов в цитоплазматическом моноослое плазматической мембраны. (а) Некоторые внеклеточные сигналы активируют PI 3-киназу, которая фосфорилирует инозитольные фосфолипиды, создавая сайты докинга для различных внутриклеточных сигнальных белков. (б) Некоторые внеклеточные сигналы активируют фосфолипазы, которые расщепляют инозитольные фосфолипиды с образованием двух фрагментов, способствующих передаче сигнала в клетку (см. также рис. 15.38). (в) С сайты расщепления фосфолипидов различными классами фосфолипаз. Показана структура фосфатидилинозитол-4,5-дифосфата. Фосфолипаза С действует в сигнальном пути, представленном на (б).



него монослоя. Они также встречаются в некоторых внутриклеточных мембранах. Наиболее сложные гликолипиды, **ганглиозиды**, содержат олигосахариды с одним или несколькими остатками сиаловой кислоты, за счет которой ганглиозиды приобретают отрицательный суммарный заряд (рис. 10.18). Больше всего ганглиозидов, которых на данный момент идентифицировано более 40 различных видов, содержится в плазматических мембранах нервных клеток, где они составляют 5–10% всей массы липидов; они также встречаются, но в значительно меньших количествах, и в других типах клеток.

На функции гликолипидов указывает их расположение. В плазматической мембране эпителиальных клеток, например, гликолипиды содержатся только на выставленной наружу апикальной поверхности, где они, по-видимому, помогают защищать мембрану от часто наблюдаемых там неблагоприятных условий (таких как низкий pH и высокие концентрации деструктивных ферментов). Заряженные гликолипиды, например ганглиозиды, могут быть важны за счет их электрических свойств: их присутствие изменяет электрическое поле мембраны и концентрации

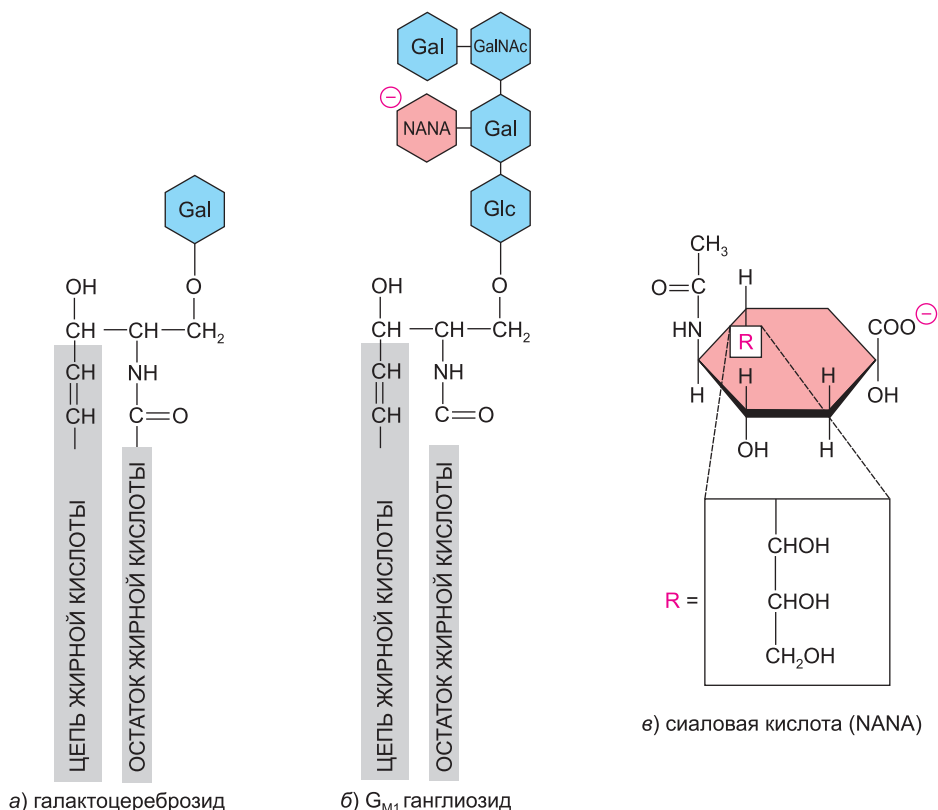


Рис. 10.18. Молекулы гликолипидов. (а) Галактоцереброзид называют *нейтральным гликолипидом*, потому что сахар, формирующий его «головку», не заряжен. (б) Ганглиозид всегда содержит один или несколько отрицательно заряженных остатков сиаловой кислоты (также называемой *N*-ацетилнейраминовой кислотой, *англ.* *N-acetylneuraminic acid*, NANA), структура которой изображена на (в). Тогда как у бактерий и растений почти все гликолипиды синтезируются из глицерина, как и большинство фосфолипидов, в животных клетках почти все гликолипиды в своей основе имеют сфингозин, как и сфингомиелин (см. рис. 10.3). Gal — галактоза, Glc — глюкоза, GalNAc — *N*-ацетилгалактозамин; эти три сахара не заряжены.

ионов, особенно Ca^{2+} , вблизи ее поверхности. Также предполагают, что гликолипиды участвуют в процессе клеточного узнавания, когда прикрепленные к мембране связывающие углеводы белки (*лектины*) связываются с углеводными группами как гликолипидов, так и гликопротеинов при адгезии клеток (см. главу 19). Однако, как ни удивительно, в мутантных мышах, лишенных всех сложных ганглиозидов, не наблюдают очевидных патологий, хотя самцы не способны нормально транспортировать тестостерон в яички и поэтому стерильны.

Вне зависимости от их нормальной функции, некоторые гликолипиды позволяют определенным бактериальным токсинам проникнуть в клетку. Ганглиозид G_{M1} (см. рис. 10.18), например, действует на поверхности клетки как рецептор бактериального токсина, вызывающего истощающую диарею при холере. Холерный токсин связывается с теми клетками (и проникает только в них), которые несут на своей поверхности G_{M1} , например с эпителиальными клетками желудочно-кишечного тракта. Его вход в клетку приводит к продолжительному увеличению концентрации внутриклеточного циклического АМР (см. главу 15), что, в свою очередь, вызывает выброс Na^+ и воды в кишечник.

Заключение

Биологические мембраны состоят из непрерывного двойного слоя липидных молекул, в который встроены белки. Этот липидный бислой обладает текучестью, отдельные липидные молекулы способны быстро диффундировать в пределах своего монослоя. Мембранные липидные молекулы амфифильны. При помещении в воду они самопроизвольно собираются в бислой, которые формируют замкнутые компартменты.

Клетки содержат 500–1000 различных видов липидов. Существуют три основных класса мембранных липидов: фосфолипиды, холестерин и гликолипиды. Насчитываются сотни более маленьких классов. Липидный состав внутреннего и внешнего монослоев различается, отражая различные функции двух поверхностей клеточной мембраны. Различные смеси липидов обнаружены в мембранах клеток различного типа, так же как и в различных мембранах отдельной эукариотической клетки. Инозитольные фосфолипиды — минорный класс фосфолипидов. Они располагаются в цитоплазматическом монослое липидного бислоя плазматической мембраны и играют важную роль в клеточной сигнализации. Во-первых, в ответ на внеклеточные сигналы специфические липидкиназы фосфорилируют «головки» этих липидов, создавая сайты докинга цитоплазматических сигнальных белков. Во-вторых, специфические фосфолипазы расщепляют определенные инозитольные фосфолипиды с образованием меньших сигнальных молекул.

10.2. Мембранные белки

Несмотря на то что липидный бислой служит структурной основой биологических мембран, мембранные белки выполняют большинство специфических функций мембран и, таким образом, придают каждому типу клеточной мембраны его специфические функциональные свойства. Соответственно, количество и типы белков в мембранах значительно меняются. В миелиновой мембране, которая в основном служит для электрической изоляции аксонов нервных клеток, белки составляют менее 25 % массы. Наоборот, в мембранах, участвующих в синтезе АТР

(внутренних мембранах митохондрий и хлоропластов), около 75% массы — это белки. Типичная плазматическая мембрана расположена где-то посередине, белки в ней составляют около половины массы. Поскольку молекулы липидов малы по сравнению с молекулами белков, в клеточных мембранах молекул липидов всегда значительно больше, чем белков — около 50 липидов на один белок в клеточных мембранах, по массе на 50 % состоящих из белков. Мембранные белки значительно различаются по структуре и тому, как они взаимодействуют с липидным бислоем, что отражает их разнообразные функции.

10.2.1. Мембранные белки могут связываться с липидным бислоем различными способами

На рис. 10.19 показаны различные способы связывания мембранных белков с мембраной. Многие белки простираются через бислой, часть их массы расположена с обеих сторон мембраны (рис. 10.19, примеры 1, 2 и 3). Как и их липидные соседи, **трансмембранные белки** амфифильны и обладают гидрофильными и гидрофобными участками. Их гидрофобные области находятся в мембране и взаимодействуют с гидрофобными «хвостами» липидных молекул внутри бислоя, где они изолированы от воды. Их гидрофильные участки взаимодействуют с водой по обеим сторонам мембраны. Ковалентная связь посредством жирнокислотной цепи, входящей в цитоплазматический монослой липидного бислоя, увеличивает гидрофобность некоторых трансмембранных белков (см. рис. 10.19, пример 1).

Другие мембранные белки располагаются исключительно в цитозоле и связаны с цитоплазматическим монослоем липидного бислоя либо посредством

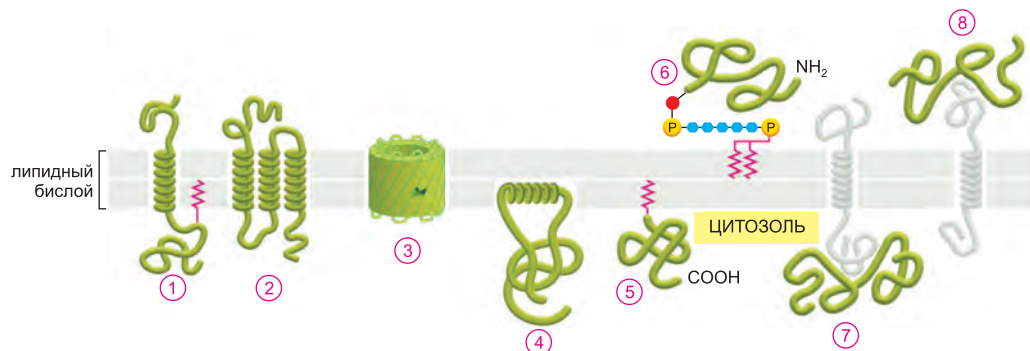


Рис. 10.19. Различные способы прикрепления мембранных белков к липидному бислою. Считают, что большинство трансмембранных белков простирается через мембрану в виде (1) единственной α -спирали, (2) нескольких α -спиралей или (3) свернутых β -структур (β -бочонка). Некоторые из этих «однопроходных» и «многопроходных» белков несут ковалентно связанную жирнокислотную цепь, входящую в цитоплазматический липидный монослой (1). Другие мембранные белки полностью располагаются только с одной стороны мембраны. (4) Некоторые из них заякорены на цитоплазматической поверхности амфифильной α -спиралью, которая проникает в цитоплазматический монослой своей гидрофобной стороной. (5) Другие белки взаимодействуют с бислоем только через ковалентно связанную липидную цепь — либо жирнокислотную, либо пренильную группу (см. рис. 10.20) — в цитоплазматическом монослое или (6) через олигосахаридный линкер (GPI-якорь), связанный с фосфатидилинозитолом в нецитоплазматическом монослое. (7, 8) Наконец, многие белки связаны с мембраной исключительно за счет нековалентных взаимодействий с другими мембранными белками. Синтез структуры на (5) проиллюстрирован на рис. 10.20, а формирование GPI-якоря, показанного на (6), — на рис. 12.56. Подробно процесс связывания белков с липидным бислоем обсуждается в главе 12.

амфифильной α -спирали на поверхности белка (см. рис. 10.19, пример 4), либо при помощи одной или нескольких ковалентно связанных липидных цепей (см. рис. 10.19, пример 5). Прочие белки полностью располагаются на внешней поверхности клетки, соединяясь с липидным бислоем только ковалентными связями (через специфические олигосахариды) с фосфатидилинозитолом во внешнем липидном монослое плазматической мембраны (рис. 10.19, пример 6).

Связанные с липидами белки в примере 5 на рис. 10.19 синтезируются в цитозоле как растворимые белки и затем заякориваются в мембране ковалентной связью с липидной группой. Однако белки в примере 6 синтезируются как трансмембранные однопроходные белки в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР). Пока они все еще находятся в ЭР, трансмембранный сегмент белка отрезается и добавляется **гликозилфосфатидилинозитольный** (glycosylphosphatidylinositol, **GPI**) **якорь**. В результате белок оказывается связанным с нецитоплазматической поверхностью мембраны исключительно через якорь (см. обсуждение в главе 12). Транспортные везикулы в конце концов доставляют белок в плазматическую мембрану (см. главу 13). Белки, связанные с плазматической мембраной через GPI-якорь, легко идентифицируют при помощи фермента, носящего название фосфатидилинозитол-специфическая фосфолипаза C. Этот фермент расщепляет связь белка с якорем и таким образом отделяет его от мембраны.

Некоторые мембранные белки совсем не проникают в гидрофобную часть липидного бислоя; они связываются с поверхностью мембраны посредством нековалентных взаимодействий с другими мембранными белками (рис. 10.19, примеры 7 и 8). Многие белки такого типа могут быть отделены от мембраны относительно мягкими методами выделения, например, обработкой растворами с очень высокой или низкой ионной силой или высоким pH, которые влияют на белок-белковые взаимодействия, но не нарушают бислой; такие белки называют **периферическими мембранными белками**. Трансмембранные белки и многие белки, соединенные с бислоем липидными группами или гидрофобными полипептидными участками, проникающими в гидрофобное ядро липидного бислоя, нельзя отделить такими методами. Эти белки называются **интегральными мембранными белками**.

10.2.2. Липидные якоря контролируют локализацию некоторых сигнальных белков в мембране

Способ прикрепления белка к липидному бислою отражает его функцию. Только трансмембранные белки способны функционировать по обеим сторонам мембраны и транспортировать молекулы через нее. Рецепторы на поверхности клетки, например, представляют собой трансмембранные белки, которые связывают сигнальные молекулы во внеклеточном пространстве и генерируют другие внутриклеточные сигналы на противоположной стороне плазматической мембраны. Для переноса маленьких гидрофильных молекул через мембрану мембранный транспортный белок должен предоставить молекулам путь, по которому они смогут преодолеть гидрофобный непроницаемый барьер липидного бислоя. Молекулярная архитектура многопроходных мембранных белков идеально для этого подходит, что мы обсудим в главе 11.

Белки, которые функционируют только на одной стороне липидного бислоя, с другой стороны часто связаны только с одним липидным монослоем или белковым доменом на соответствующей стороне. Например, некоторые внутриклеточные

сигнальные белки, принимающие участие в переводе внеклеточного сигнала во внутриклеточный, прикрепляются к цитоплазматической половине плазматической мембраны через одну или несколько ковалентно связанных липидных групп, которые могут представлять собой либо жирнокислотные цепи, либо *пренильные группы* (рис. 10.20). В некоторых случаях в процессе синтеза на рибосоме к N-концевой аминокислоте белка присоединяется миристиновая (тетрадекановая) кислота, насыщенная жирная кислота, состоящая из 14 атомов углерода. Все члены *Src-семейства* цитоплазматических белков тирозинкиназ (см. главу 15) несут миристиновую цепь. Однако связь с мембраной посредством единственного липидного якоря не является крепкой, и часто для более сильного закоривания белков в мембране добавляется вторая липидная группа. Для большинства *Src*-киназ второй липидной модификацией служит присоединение к боковой цепи цистеинового остатка белка пальмитиновой кислоты, насыщенного жирной кислоты, содержащей 16 углеродных атомов. Эта модификация происходит в ответ на внеклеточный сигнал и позволяет рекрутировать киназы к плазматической мембране. Когда сигнальный путь выключается, пальмитиновая кислота отщепляется, и киназы возвращаются в цитозоль. Другие внутриклеточные сигнальные белки, такие как *Ras*-семейство GTPаз (см. главу 15), используют комбинацию пренильной группы и пальмитиновой кислоты для присоединения белков к плазматической мембране.

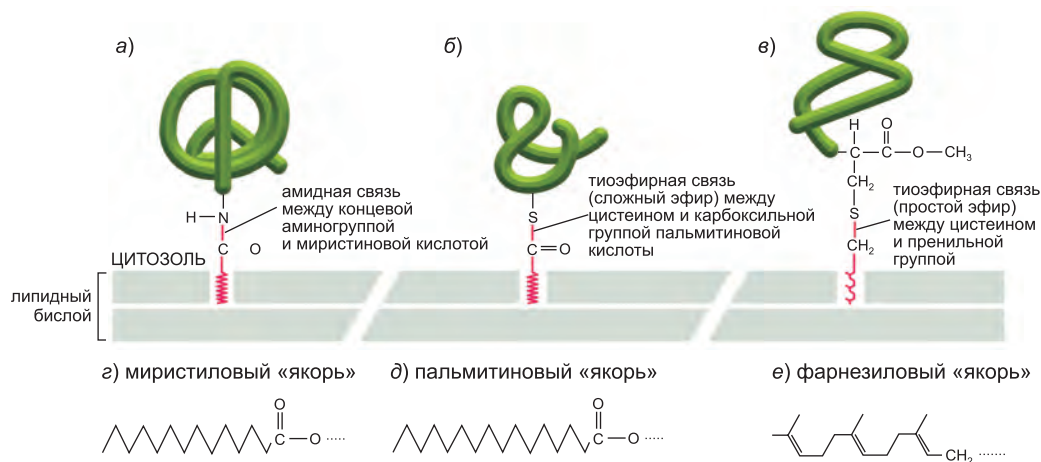


Рис. 10.20. Присоединение мембранных белков через жирнокислотную цепь или пренильную группу. Ковалентная связь посредством одного из этих двух типов липидов позволяет присоединить водорастворимые белки к мембране после их синтеза в цитозоле. (а) Жирнокислотная цепь (миристиновая кислота) присоединяется через амидную связь к N-концевому глицину. (б) Жирнокислотная цепь (пальмитиновая кислота) присоединяется посредством тиосложноэфирной связи к цистеину. (в) Пренильная группа (либо фарнезильная, либо более длинная геранил-геранильная группа) присоединяется через тиозэфирную связь к цистеиновому остатку, который сначала располагается на расстоянии четырех остатков от С-конца белка. После пренилирования три концевые аминокислоты отщепляются, и новый С-конец до ввода якоря в мембрану метилируется (не показано). Структуры липидных якорей показаны внизу: (г) миристиновый якорь (14-углеродная насыщенная жирная кислота), (д) пальмитиновый якорь (16-углеродная насыщенная жирная кислота) и (е) фарнезильный якорь (15-углеродная ненасыщенная углеводородная цепь).

10.2.3. В большинстве трансмембранных белков полипептидная цепь проходит через липидный бислой в α -спиральной конформации

Трансмембранный белок всегда однообразно ориентирован в мембране. Это отражает асимметрию его проникновения в липидный бислой ЭР в процессе биосинтеза (см. главу 12) и различные функции цитоплазматического и внеклеточного доменов. Эти домены разделены трансмембранными сегментами полипептидной цепи, контактирующими с гидрофобным окружением липидного бислоя и состоящими большей частью из аминокислот с неполярными боковыми цепями. Поскольку пептидные связи сами по себе полярны и вокруг отсутствует вода, все пептидные связи в бислое вынуждены образовывать водородные связи между собой. Наиболее эффективно образование водородных связей происходит, если полипептидная цепь упакована в регулярную α -спираль, пересекающую мембрану. Именно таким образом большинство прошивающих мембрану сегментов организуются в бислое (рис. 10.21).

В **однопроходных трансмембранных белках** полипептидные цепи пересекают мембрану только один раз (см. рис. 10.19, пример 1), тогда как в **многопроходных трансмембранных белках** полипептидная цепь прошивает мембрану несколько раз (см. рис. 10.19, пример 2). Альтернативным способом упаковки цепей, позволяющим пептидным связям образовывать водородные связи в мембране, является

формирование полипептидной цепью β -структуры, свернутой в закрытую «бочку» (так называемого β -бочонка; см. рис. 10.19, пример 3). Такой вид многопроходных трансмембранных структур характерен для *белков-поринов*, которые мы рассмотрим позже.

Быстрое развитие рентгеноструктурного анализа мембранных белков позволило нам расшифровать трехмерные структуры многих из них. Структуры подтверждают,

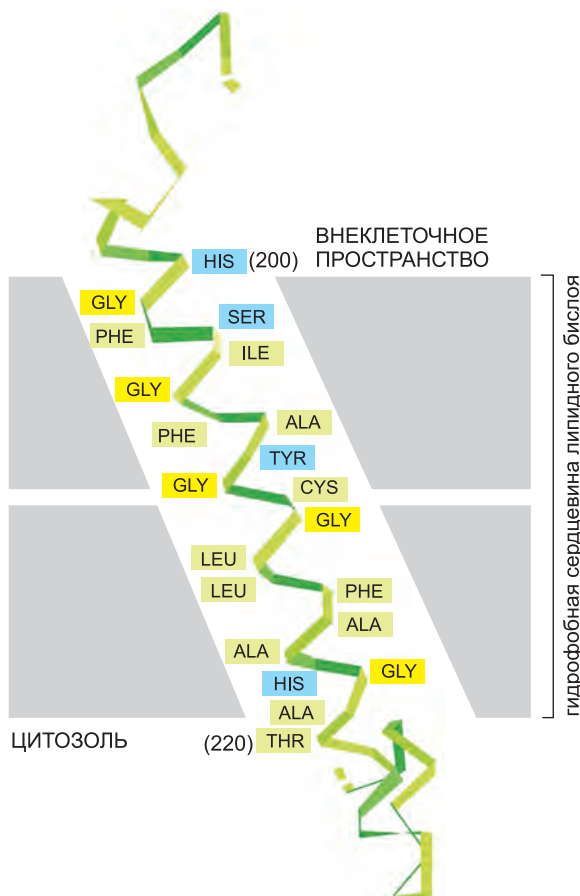


Рис. 10.21. Фрагмент трансмембранной полипептидной цепи, пересекающий липидный бислой в форме α -спирали. Показан только углеродный скелет полипептидной цепи, гидрофобные аминокислоты показаны зеленым и желтым. Приведенный здесь полипептидный фрагмент является частью бактериального фотосинтетического реакционного центра, изображенного на рис. 10.34. Структура была расшифрована при помощи рентгеновской дифракции. (Основано на данных из J. Deisenhofer et al., *Nature* 318: 618–624, 1985, и H. Michel et al. *EMBO J.* 5: 1149–1158, 1986. Все с любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

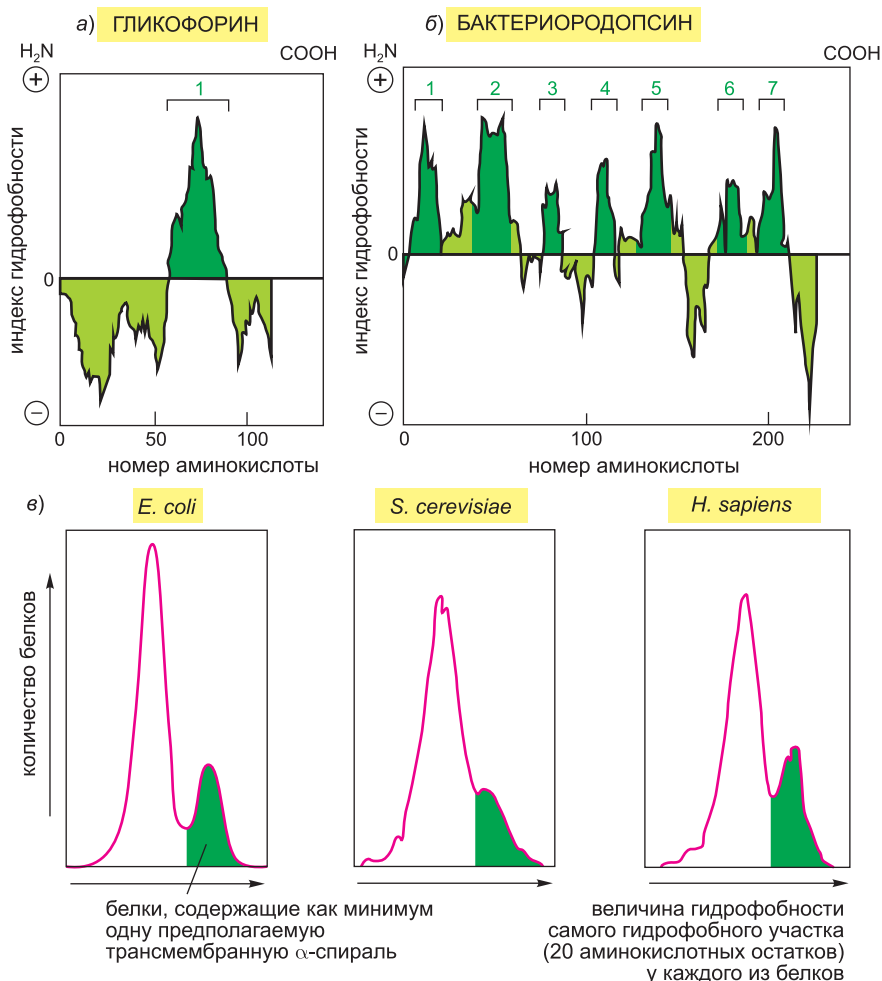
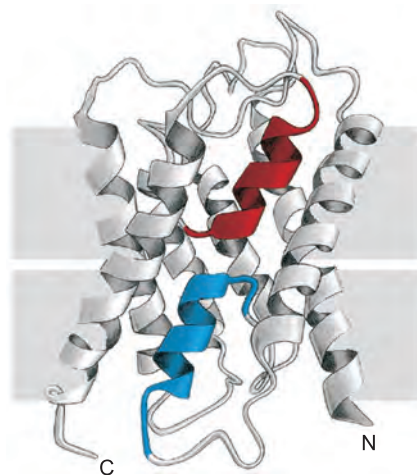


Рис. 10.22. Применение профилей гидрофобности для локализации потенциальных α -спиральных трансмембранных участков полипептидной цепи. Свободную энергию, необходимую для переноса последовательных сегментов полипептидной цепи из неполярного растворителя в воду, рассчитывают по аминокислотному составу каждого сегмента на основе данных, полученных для модельных соединений. Данный расчет производят для сегментов заданного размера (обычно около 10–20 аминокислот), начиная с каждой последующей аминокислоты в цепи. «Индекс гидрофобности» сегмента откладывается по оси Y как функция от его положения в цепи. Положительное значение указывает на то, что для переноса в воду требуется свободная энергия (т. е. сегмент гидрофобен), а значение присваивается в соответствии с величиной необходимой энергии. Пики индекса гидрофобности указывают положение гидрофобных сегментов в аминокислотной последовательности. (а и б) Показаны два примера мембранных белков, которые будут рассмотрены в данной главе ниже. Гликофорин (а) обладает единственной прошивающей мембрану α -спиралью и одним соответствующим ей пиком на профиле гидрофобности. Бактериородопсин (б) имеет семь трансмембранных α -спиралей и семь соответствующих им пиков на профиле гидрофобности. (в) Доля предсказанных мембранных белков, кодируемых генами *E. coli*, *S. cerevisiae* и человека. Зеленая область соответствует доле белков, содержащих по крайней мере одну предсказанную α -спираль. Для *E. coli* и *S. cerevisiae* приведены данные по всему геному; данные по человеку даны для части генома; в каждом случае площадь под кривой пропорциональна числу проанализированных генов. (а, адаптировано из D. Eisenberg, *Annu. Rev. Biochem.* 53: 595–624, 1984. С любезного разрешения издательства Annual Reviews; в, адаптировано из D. Boyd et al., *Protein Sci.* 7: 201–205, 1998. С любезного разрешения The Protein Society.)

что часто бывает возможно из аминокислотной последовательности белка предсказать, какие части полипептидной цепи располагаются за пределами бислоя. Участки, состоящие из 20–30 аминокислот с высоким уровнем гидрофобности, обладают достаточной длиной для того, чтобы пересечь бислой в форме α -спирали, и их часто можно идентифицировать при помощи *профиля гидрофобности* (рис. 10.22). Эти графики позволили показать, что около 20% белков организма являются трансмембранными, что указывает на их важную роль. Профили гидрофобности не позволяют идентифицировать прошивающие мембрану участки β -бочонка, поскольку для эффективного пересечения липидного бислоя в форме вытянутого β -тяжа достаточно 10 аминокислот или даже меньше. Более того, только каждый второй аминокислотный остаток в β -структуре гидрофобен.

Энергетическая необходимость максимально образовывать водородные связи в отсутствие воды означает, что входящая в бислой полипептидная цепь скорее всего прошьет его насквозь и только после этого изменит свое направление. Это объясняется тем, что искривление цепи требует нарушения регулярности водородных связей. Но многопроходные мембранные белки могут содержать области, упаковывающиеся в мембрану с какой-либо стороны и проникающие в пространство между трансмембранными α -спиралями без взаимодействия с гидрофобным центром липидного бислоя. Поскольку такие участки полипептидной цепи контактируют только с другими полипептидными участками, им нет необходимости максимизировать количество образованных водородных связей; таким образом, они могут иметь разнообразную вторичную структуру, включая спирали, распространяющиеся только на часть липидного бислоя (рис. 10.23). Такие области важны для функционирования некоторых мембранных белков, включая каналы для K^+ и воды; эти участки входят в состав стенок поры, прошивая мембрану и задавая субстратную специфичность каналов, как мы обсудим в главе 11. Эти области нельзя идентифицировать при помощи профилей гидрофобности, для этого используют рентгеновскую кристаллографию, электронную дифракцию (метод, сходный с рентгеновской дифракцией, но применяемый к двумерным решеткам белков) или ЯМР-исследования трехмерной структуры белков.

10.2.4. Трансмембранные α -спирали часто взаимодействуют друг с другом



Трансмембранные α -спирали многих однопорочных мембранных белков не участвуют в сворачивании белковых доменов с обеих сторон мембраны. В результате часто можно создать клетки, синтезирующие цитоплазматические или внеклеточные домены этих белков

Рис. 10.23. Две α -спирали в водном канале аквапорине, каждая из которых доходит только до середины липидного бислоя. В мембране белок образует тетрамер из таких четырех двуспиральных сегментов таким образом, что показанный здесь окрашенный участок окружен поверхностью белок-белковых взаимодействий. Механизм, по которому канал пропускает молекулы воды через липидный бислой, подробнее обсуждается в главе 11.

в форме водорастворимых белков. Этот подход оказался незаменимым для изучения структуры и функционирования этих доменов, особенно в случае трансмембранных рецепторных белков (обсуждаемых в главе 15). Однако даже в однопроходном белке, помимо закоривания белка в липидном бислое, трансмембранная α -спираль часто выполняет и другие функции. Многие однопроходные мембранные белки образуют гомодимеры, которые удерживаются вместе сильными и высокоспецифичными взаимодействиями между двумя трансмембранными α -спиралями. Последовательность гидрофобных аминокислот этих спиралей несет информацию, направляющую белок-белковые взаимодействия.

Точно так же трансмембранные α -спирали в многопроходных мембранных белках располагаются в конкретных положениях структуры свернутого белка, определяемых взаимодействиями между соседними спиралями. Эти взаимодействия имеют ключевое значение для структуры и функционирования многих каналов и транспортеров, переносящих молекулы через липидные бислои. Во многих случаях можно использовать протеазы для разрезания петель полипептидной цепи, соединяющих трансмембранные α -спирали с обеих сторон бислоя, при этом спирали продолжают удерживаться вместе и нормально функционировать. В некоторых случаях можно даже экспрессировать в живой клетке сконструированные гены, кодирующие отдельные части многопроходного белка, и увидеть, что они правильным образом собираются в мембране и образуют полностью функциональный трансмембранный белок (рис. 10.24). Это доказывает удивительную специфичность взаимодействия трансмембранных α -спиралей.

В многопроходных мембранных белках соседние трансмембранные спирали в третичной структуре белка защищают многие трансмембранные спирали от мембранных липидов. Почему же тогда эти защищенные спирали все равно состоят, по большей части из гидрофобных аминокислот? Ответ на этот вопрос можно получить, рассмотрев то, как многопроходные белки проникают в мембрану в процессе их биосинтеза. Как мы обсудим в главе 12, трансмембранные α -спирали вводятся в липидный бислой последовательно белками-транслокаторами. После того, как α -спираль покидает транслокатор, она временно оказывается окруженной липидами бислоя, для чего необходимо, чтобы она была гидрофобной. Только когда белок приобретает свою конечную структуру, образуются контакты между соседними спиралями, и белок-белковые контакты замещают некоторые из белок-липидных контактов (рис. 10.25).

10.2.5. Некоторые β -бочонки образуют крупные трансмембранные каналы

Многопроходные трансмембранные белки, трансмембранные сегменты которых упакованы в β -бочонок, а не α -спираль, имеют относительно жесткую структуру и легко кристаллизуются. Некоторые из них одними из первых расшифровали методами рентгеноструктурного анализа мембранных белковых структур. Число β -структур в β -бочонках сильно меняется в пределах от 8 до 22 (рис. 10.26).

Белки, обладающие структурой β -бочонка, в большом количестве содержатся во внешней мембране митохондрий, хлоропластов и многих бактерий. Некоторые из них представляют собой белки, формирующие поры и создающие заполненные водой каналы для прохождения определенных маленьких гидрофильных молекул через липидный бислой внешней мембраны бактерий. К ним относятся хорошо изученные порины (пример 3 на рис. 10.26). Пориновый бочонок образуется

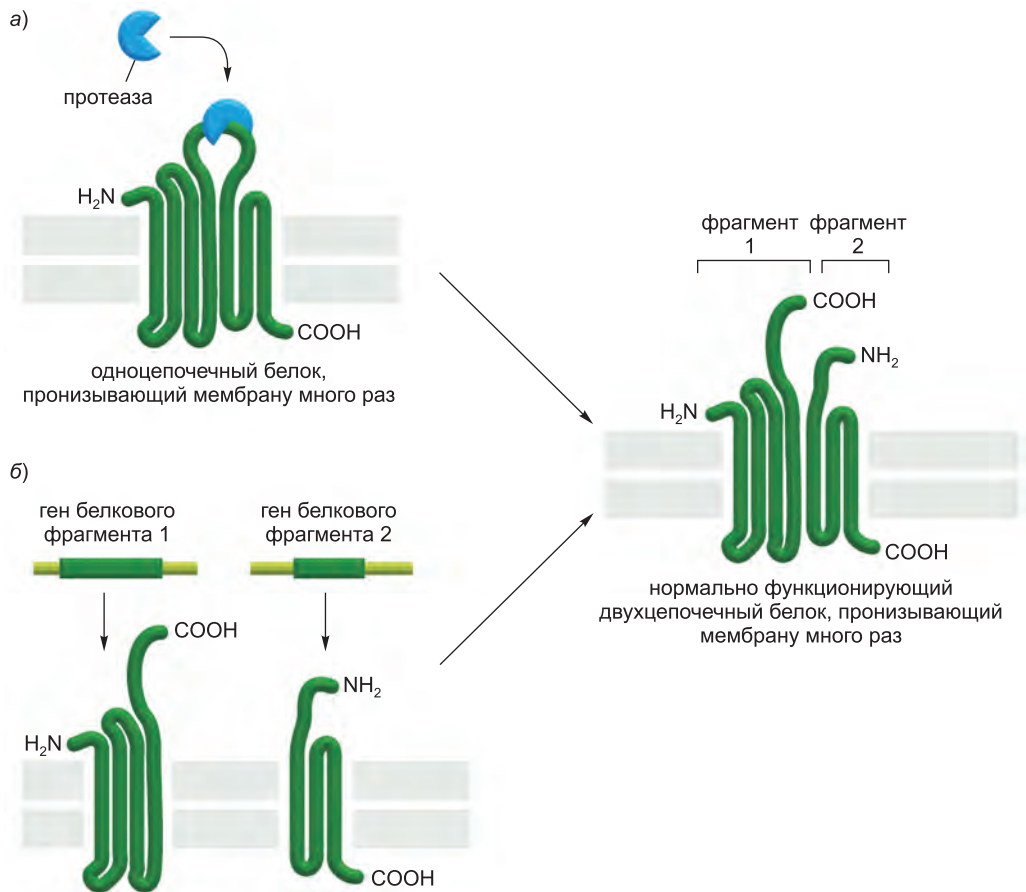


Рис. 10.24. Преобразование одноцепочечного многопроходного белка в двухцепочечный. (а) Протеолитическое расщепление одной петли для создания двух фрагментов, которые удерживаются вместе и нормально функционируют. (б) Экспрессия этих же двух фрагментов двумя разными генами приводит к формированию такого же нормально функционирующего белка.

из 16 антипараллельных β -тяжей, чего вполне достаточно для сворачивания в цилиндрическую структуру. Полярные боковые цепи аминокислот выстилают водный канал изнутри, тогда как неполярные боковые цепи выступают с внешней поверхности бочонка и взаимодействуют с гидрофобной сердцевинкой липидного бислоя. Петли полипептидной цепи часто выдаются в люмен канала, делая его более узким и, таким образом, позволяя только определенным растворенным веществам пройти через него. Некоторые порины очень селективны: *мальтопорин*, например, позволяет пересечь внешнюю мембрану *E. coli* только мальтозе и ее олигомерам.

Белок FerA является более сложным примером β -бочонкового транспортного белка (пример 4 на рисунке 10.26). Он транспортирует ионы железа через внешнюю мембрану бактерий. Он состоит из 22 β -структур, а внутреннее пространство бочонка почти полностью заполнено крупным глобулярным доменом, который, как предполагается, претерпевает значительные конформационные перестройки для переноса железа через мембрану.

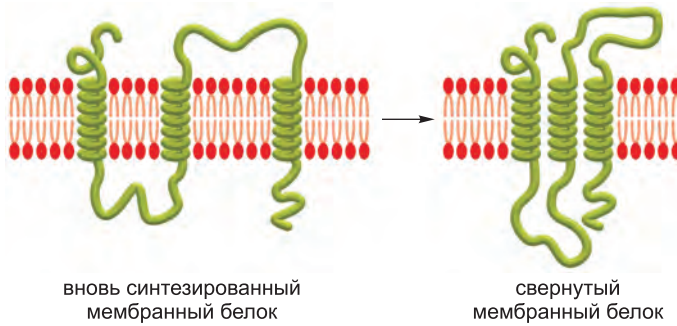


Рис. 10.25. Этапы фолдинга многопроходного трансмембранного белка. Когда синтезированные трансмембранные α -спирали проникают в липидный бислой, они оказываются в окружении липидных молекул. По мере сворачивания белка контакты между спиралью вытесняют некоторые из молекул липидов, окружающих спираль.

Не все β -бочонковые белки являются транспортными белками. Некоторые образуют маленькие бочонки, заполненные боковыми цепями аминокислот, простирающимися к центру структуры. Эти белки служат рецепторами или ферментами (примеры 1 и 2 на рис. 10.26), а бочонок работает в качестве жесткого якоря, удерживающего белок в мембране и ориентирующего его цитоплазматические петли, образующие сайты связывания специфических внутриклеточных молекул.

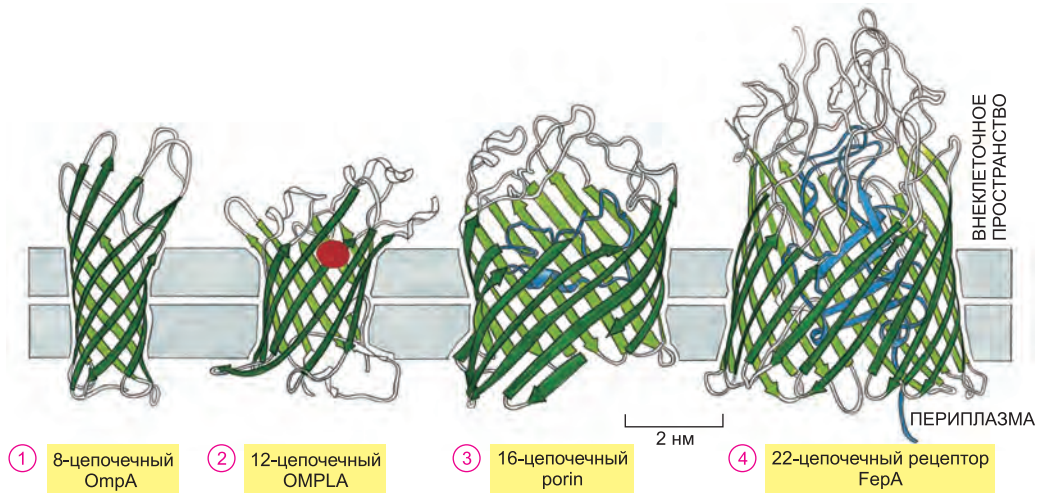


Рис. 10.26. β -бочонки, состоящие из разного числа β -структур. (1) Белок OmpA *E. coli* служит рецептором бактериального вируса. (2) Белок *E. coli* OMPLA представляет собой фермент (липазу), гидролизующую липидные молекулы. Аминокислоты, катализирующие ферментативную реакцию (показаны красным), выступают с внешней поверхности бочонка. (3) Порин из бактерии *Rhodobacter capsulatus* формирует во внешней мембране заполненную водой пору. Диаметр канала ограничен петлями (показаны голубым), выступающими в канал. (4) Белок *E. coli* FepA транспортирует ионы железа. Внутренность канала заполнена глобулярным белковым доменом (показан голубым), несущим сайт связывания железа (не показан). Предполагают, что этот домен для транспорта связанного железа изменяет свою конформацию, но точный молекулярный механизм этого процесса неизвестен.

Несмотря на то что β -бочоночные белки обладают множеством функций, они содержатся почти исключительно во внешних мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий. Большинство многопроходных трансмембранных белков в эукариотических клетках и бактериальной плазматической мембране состоят из трансмембранных α -спиралей. Спирали могут скользить относительно друг друга, что позволяет белку менять свою конформацию для открывания и закрывания ионных каналов, транспорта растворенных веществ или трансформации внеклеточного сигнала во внутриклеточный. В β -бочоночных белках, наоборот, водородные связи крепко удерживают β -структуры вместе, делая конформационные изменения стенки бочонка маловероятными.

10.2.6. Многие мембранные белки гликозилированы

Большинство трансмембранных белков животных клеток гликозилированы. Как и в случае гликолипидов, остатки сахаров добавляются к белкам в люмене ЭР и аппарата Гольджи (см. главы 12 и 13). По этой причине олигосахаридные цепи всегда расположены на внешней стороне мембраны. Другое важное различие между белками (или частями белков) на двух сторонах мембраны является следствием восстановительного окружения цитозоля. Это свойство снижает вероятность образования цистеинами дисульфидных (S—S) связей между белками и внутри них на цитоплазматической стороне мембраны. Эти связи образуются на внешней стороне,

где они способствуют стабилизации нативной структуры полипептидной цепи или ее связыванию с другими полипептидными цепями (рис. 10.27).

Поскольку большинство белков плазматической мембраны гликозилировано, углеводы покрывают поверхность эукариотических клеток. Эти углеводы представляют собой олигосахаридные цепи, ковалентно связанные с мембранными белками (гликопротеинами) и липидами (гликолипидами). Также встречаются полисахаридные цепи встроенных в мембрану молекул *протеогликанов*. Протеогликаны, состоящие из длинных полисахаридных цепей, ковалентно связанных с белко-

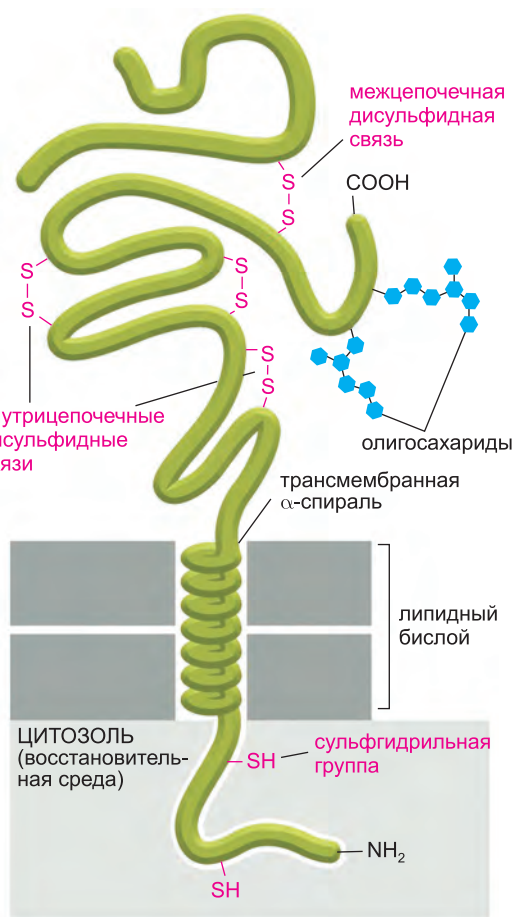


Рис. 10.27. Однопроходный мембранный белок. Обратите внимание на то, что полипептидная цепь проходит через бислой в виде правозакрученной α -спирали, а все олигосахаридные цепи и дисульфидные связи располагаются на внешней стороне мембраны. Сульфгидрильные группы в цитоплазматическом домене белка обычно не образуют дисульфидные связи, поскольку восстановительная среда цитозоля поддерживает эти группы в восстановленном ($-SH$) состоянии.

вой сердцевинной, обычно расположены снаружи клетки как часть внеклеточного матрикса (см. главу 19). Но у некоторых протеогликанов белковая сердцевина распространена за пределы липидного бислоя или соединена с бислоем гликозил-фосфатидилинозитольным (GPI) якорем.

Иногда для описания обогащенной углеводами области поверхности клетки используют термины клеточная оболочка или гликокаликс. Этот **углеводный слой**

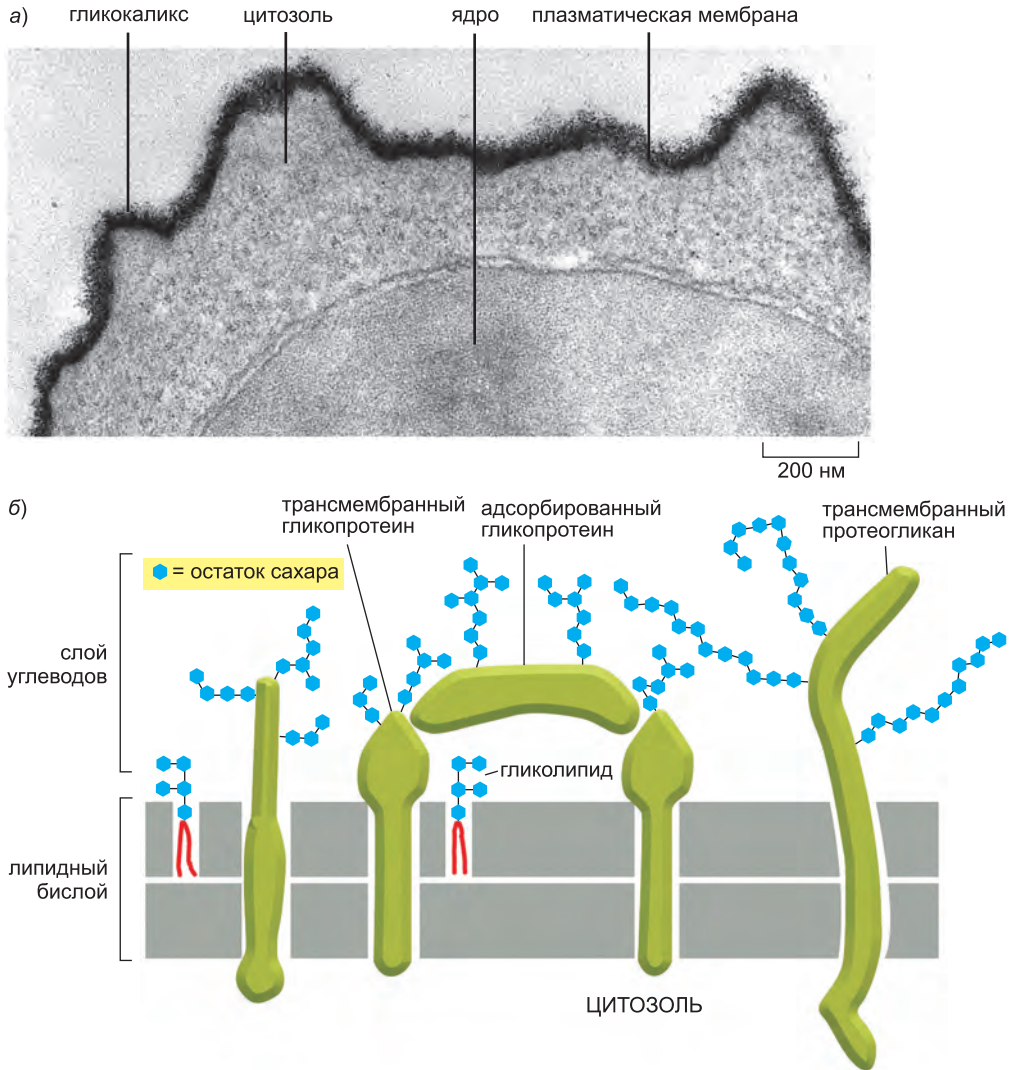


Рис. 10.28. Углеводный слой на поверхности клетки. (а) На данной электронной микрофотографии поверхности лимфоцита, окрашенного рутением красным, хорошо виден толстый обогащенный углеводами слой, окружающий клетку. (б) Углеводный слой состоит из олигосахаридных боковых цепей гликолипидов, интегральных мембранных гликопротеинов и полисахаридных цепей интегральных мембранных протеогликанов. Более того, адсорбированные гликопротеины и адсорбированные протеогликаны (не показаны) также вносят вклад в углеводный слой многих клеток. Обратите внимание на то, что все углеводы располагаются на нецитоплазматической стороне мембраны. (а, с любезного разрешения Audrey M. Glauert и G. M. W. Cook.)

можно визуализировать при помощи различных красителей, например рутения красного (**рис. 10.28, а**), или за счет его сродства к углевод-связывающим белкам **лектинам**, которые можно пометить флуоресцентным красителем или видимым маркером. Несмотря на то что большинство углеводных групп связано с внутренними молекулами плазматической мембраны, углеводный слой также содержит гликолипиды и протеогликаны, которые секретируются во внеклеточное пространство, а затем адсорбированы на клеточную поверхность (**рис. 10.28, б**). Многие из этих адсорбированных макромолекул являются компонентами внеклеточного матрикса, поэтому граница между плазматической мембраной и внеклеточным матриксом часто бывает довольно расплывчатой. Одной из многих функций углеводного слоя является защита клеток от механического и химического повреждения; он также не позволяет клеткам сблизиться, препятствуя нежелательным белок-белковым взаимодействиям.

Олигосахаридные боковые цепи гликопротеинов и гликолипидов значительно различаются по составу сахаров. Несмотря на то что они обычно содержат меньше 15-ти сахаров, они часто ветвятся, и сахара могут быть связаны между собой различными ковалентными связями, в отличие от аминокислот в полипептидной цепи, которые все соединяются между собой одинаковыми пептидными связями. Даже из трех сахаров можно получить сотни различных трисахаридов. За счет разнообразия и расположения на поверхности клетки олигосахариды идеально подходят для процессов клеточного узнавания. Как мы обсудим в главе 19, связанные с плазматической мембраной лектины, распознающие определенные олигосахариды на расположенных на поверхности клетки гликолипидах и гликопротеинах, участвуют во множестве процессов временной адгезии клеток, включая взаимодействие сперматозоида с яйцеклеткой, образование тромбов, рециркуляцию лимфоцитов и воспалительный ответ.

10.2.7. Мембранные белки можно солюбилизовать и очистить детергентами

В общем случае только агенты, нарушающие гидрофобные связи и разрушающие липидный бислой, способны солюбилизовать трансмембранные белки (и некоторые другие крепко связанные с мембраной белки). Наиболее полезными реагентами для биохимика являются **детергенты**, представляющие собой малые амфифильные молекулы различной структуры. Детергенты лучше растворяются в воде, чем липиды. Их полярные (гидрофильные) концы могут быть заряженными (ионными), как у *додecilсульфата натрия* (*ДСН*), или незаряженными (неионными), как у *октилглюкозида* и «Тритон» (**рис. 10.29, а**). В малых концентрациях детергенты в растворе представляют собой момеры, но когда их концентрация превышает пороговое значение, называемое *критической концентрацией мицеллообразования*, или *ККМ*, они агрегируют с образованием мицелл (**рис. 10.29, б–в**). Молекулы детергентов быстро переходят из мицелл в раствор и обратно, поэтому концентрация мономеров в растворе остается постоянной вне зависимости от того, сколько образовалось мицелл. ККМ и среднее число молекул детергента в мицелле являются индивидуальными характеристиками детергента, но они также зависят от температуры, pH и концентрации соли. Растворы детергентов, таким образом, являются сложными системами, и их трудно изучать.

При смешении с мембранами гидрофобные концы детергентов связываются с гидрофобными областями мембранных белков, где они замещают липидные мо-

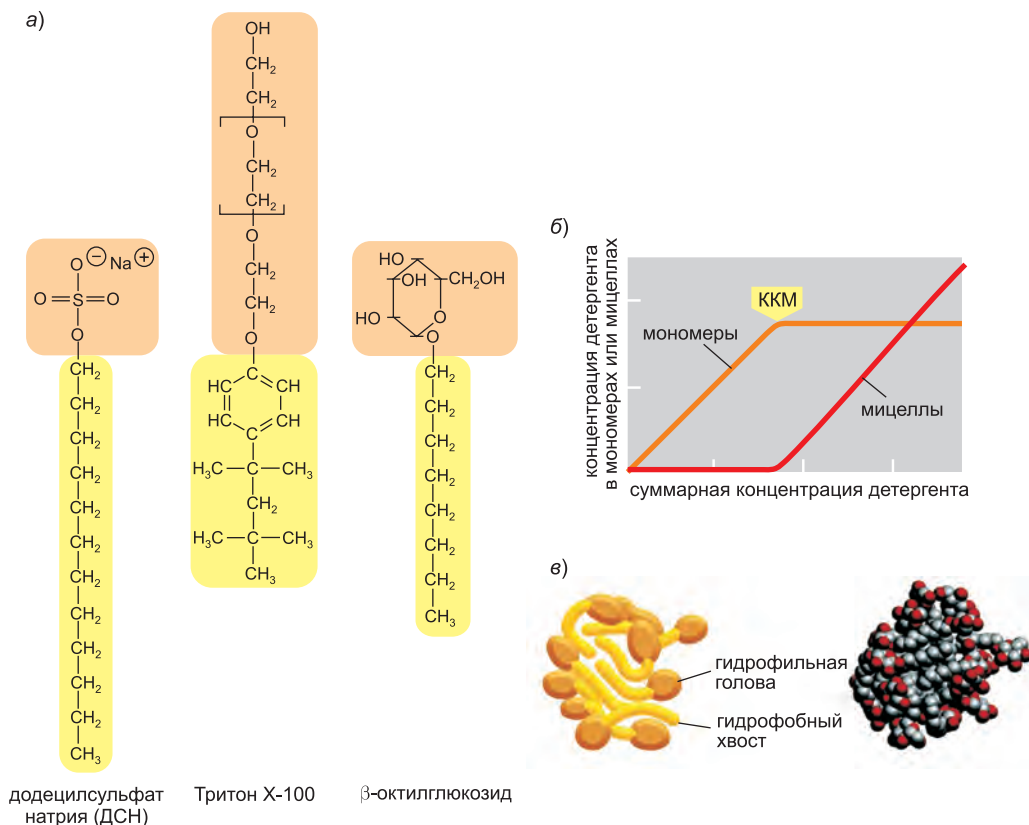


Рис. 10.29. Структура и функции мицелл детергентов. (а) Наиболее широко используют три детергента: анионный детергент додецилсульфат натрия (ДСН) и два неионных детергента β -октилглюкозид и «Тритон X-100». «Тритон X-100» представляет собой смесь соединений, в которых участок в квадратных скобках повторяется 9–10 раз. Гидрофобная часть детергентов показана желтым, гидрофильная — оранжевым. (б) При маленьких концентрациях молекулы детергентов присутствуют в растворе в виде мономеров. Как только их концентрация достигает критической концентрации мицеллообразования (ККМ), часть молекул детергента образует мицеллы. Обратите внимание, что концентрация мономеров детергента остается постоянной при концентрации, превышающей ККМ. (в) Поскольку молекулы детергента обладают как полярными, так и неполярными концами, они амфифильны; и поскольку они имеют форму конуса, они образуют мицеллы, а не бислои (см. рис. 10.7). Мицеллы детергентов имеют нерегулярную форму, и за счет ограничений упаковки гидрофобные «хвосты» частично экспонированы в воду. Пространственная модель показывает предсказанную методом молекулярной динамики структуру мицеллы, составленной из 20 молекул β -октилглюкозида. (б, адаптировано из G. Gunnarsson, B. Jönsson and H. Wennerström, *J. Phys. Chem.* 84: 3114–3121, 1980; в, из S. Bogusz, R. M. Venable and R. W. Pastor, *J. Phys. Chem. B.* 104: 5462–5470, 2000. С любезного разрешения American Chemical Society.)

лекулы. Поскольку противоположный конец молекул детергента полярен, такое связывание приводит к тому, что мембранные белки переходят в раствор в виде комплексов белок-детергент (рис. 10.30). Обычно, с белком остается связанным некоторое количество молекул липидов.

Сильные ионные детергенты, например ДСН, способны солюбилизовать даже самые гидрофобные мембранные белки. Это позволяет анализировать белки при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (описанного

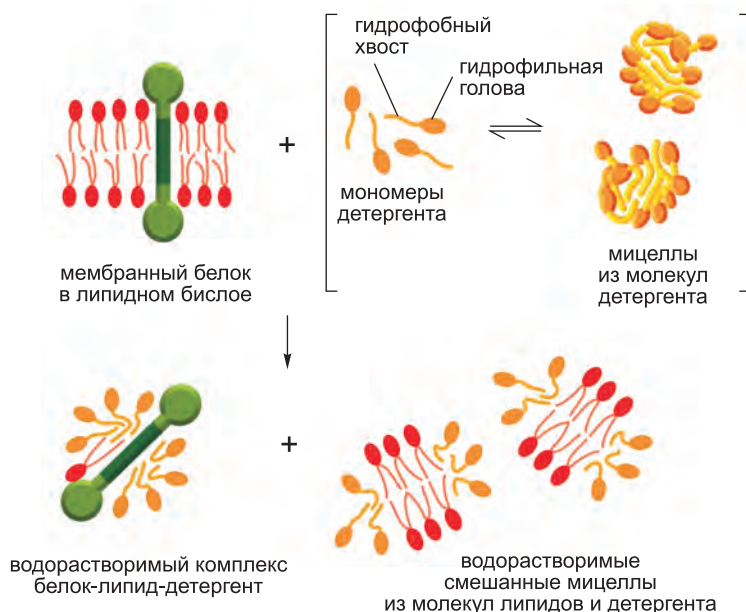


Рис. 10.30. Солюбилизация мембранных белков мягким неионным детергентом. Детергент нарушает липидный бислой и переводит белки в раствор в составе комплексов «белок-липид-детергент». Фосфолипиды мембраны также солюбилизируются детергентом.

в главе 8), метода, который совершил революцию в изучении мембранных белков. Такие сильные детергенты разворачивают (денатурируют) белки за счет связывания с их внутренним «гидрофобным ядром». В результате белки становятся неактивными, и их нельзя использовать для функциональных исследований. Однако белки можно легко разделить и очистить в их денатурированной ДСН форме. В некоторых случаях удаление детергента позволяет очищенному белку ренатурировать и восстановить свою функциональную активность.

Многие гидрофобные мембранные белки можно солюбилизовать и затем очистить в активном состоянии при помощи мягких детергентов. Эти детергенты покрывают гидрофобные области на погруженных в мембрану сегментах, которые становятся доступными после удаления липидов, но не разворачивают белок. Если концентрацию детергента в растворе солюбилизированной мембраны уменьшить (например, разбавив раствор), мембранные белки перестают быть растворимыми. В присутствии избытка молекул фосфолипидов в таком растворе мембранные белки встраиваются в самопроизвольно образующиеся маленькие липосомы. Таким образом, можно воссоздавать функционально активные системы мембранных белков из очищенных компонентов. Это позволяет анализировать функционирование мембранных транспортеров, ионных каналов, сигнальных рецепторов и так далее (**рис. 10.31**). Например, при помощи такой функциональной реконструкции была доказана гипотеза о том, что трансмембранная АТРаза использует градиенты H^+ в мембранах митохондрий, хлоропластов и бактерий для синтеза АТФ.

Детергенты также сыграли ключевую роль в очистке и кристаллизации мембранных белков. Развитие новых детергентов и систем экспрессии, позволяющих получать

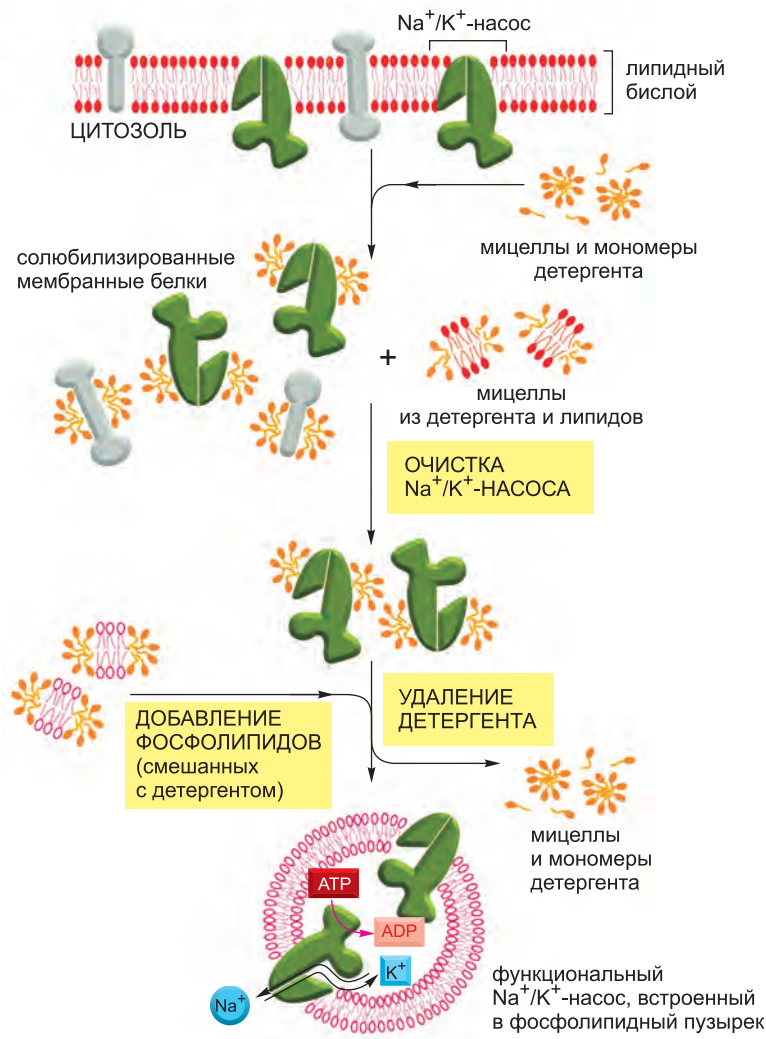


Рис. 10.31. Использование мягких неионных детергентов для солюбилизации, очистки и воссоздания функциональных систем мембранных белков. В данном примере показана очистка и встраивание в фосфолипидные везикулы молекул Na^+/K^+ -насоса. Na^+/K^+ -насос — это ионный насос, присутствующий в плазматических мембранах большинства животных клеток; он использует энергию гидролиза АТФ для выкачивания Na^+ из клетки и закачки K^+ в клетку, как описано в главе 11.

большие количества мембранных белков из клонов кДНК, привело к стремительному увеличению числа структур мембранных белков и белковых комплексов.

10.2.8. Бактериородопсин — это светозависимый протонный насос, пересекающий липидный бислой в форме семи α -спиралей

В главе 11 мы рассмотрим, как многопроходные трансмембранные белки опосредуют селективный транспорт малых гидрофобных молекул через клеточные мембраны. Но исчерпывающее понимание того, как мембранный транспортный белок работает,

требует точной информации о его трехмерной структуре в бислое. *Бактериородопсин* был первым мембранным транспортным белком, чью структуру удалось расшифровать. Он остается шаблоном для многих многопроходных мембранных белков со сходной структурой и, несомненно, заслуживает краткого отступления.

«Пурпурная мембрана» археи *Halobacterium salinarum* представляет собой специализированную «бляшку» на плазматической мембране, несущую единственный вид белковых молекул — **бактериородопсин** (рис. 10.32). Каждая молекула бактериородопсина содержит одну поглощающую свет группу, или хромофор (так называемый *ретиаль*), который придает белку пурпурную окраску. Ретиаль — это альдегидная форма витамина А, и он идентичен хромофору *родопсина* фоторецепторных клеток глаз позвоночных (см. главу 15). Ретиаль ковалентно связан с боковой цепью остатка лизина белка бактериородопсина. При активации единственным фотоном света, возбужденный хромофор меняет форму, что приводит к последовательности небольших конформационных изменений белка. В результате, один H^+ переносится из цитоплазмы во внешнюю среду (рис. 10.33). На ярком свете каждая молекула бактериородопсина способна выкачивать наружу несколько

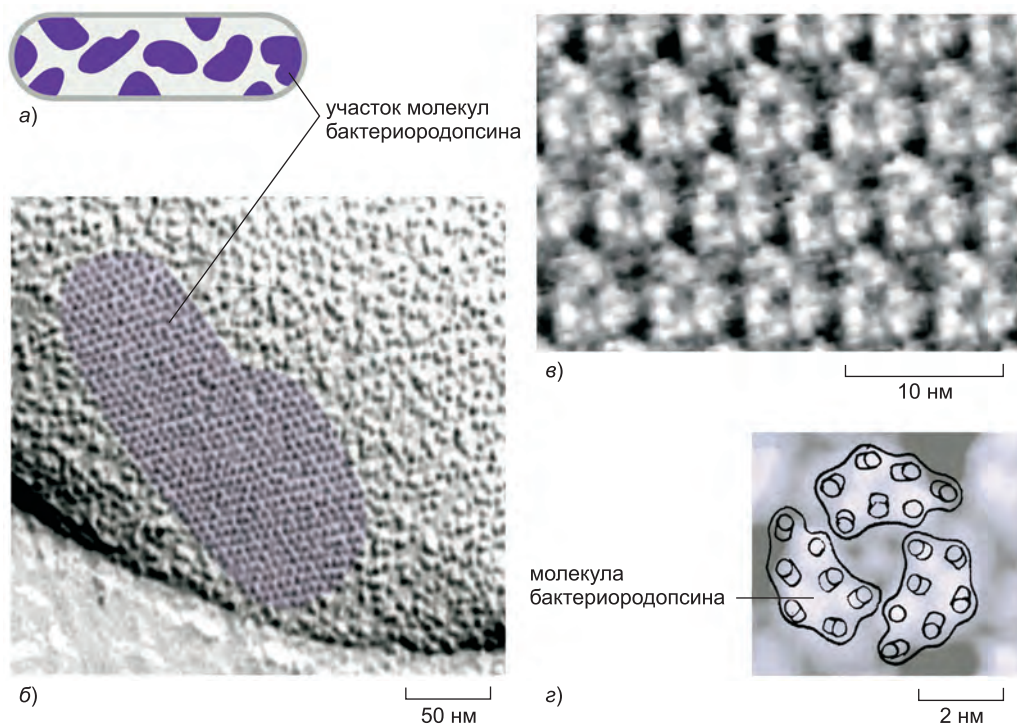


Рис. 10.32. Бляшки пурпурных мембран археи *Halobacterium salinarum*, содержащие бактериородопсин. (а) Эти археи обитают в соленых водоемах, доступных для солнечного света. В процессе эволюции они создали множество светозависимых белков, включая бактериородопсин, который представляет собой светозависимый протонный насос в плазматической мембране. (б) Молекулы бактериородопсина в бляшках пурпурных мембран плотно упакованы в двумерные кристаллы. (в) Изображение молекулярной поверхности, полученное при помощи атомно-силовой микроскопии. Этот метод позволяет увидеть отдельные молекулы бактериородопсина. (г) Схема примерного расположения трех мономеров бактериородопсина и их α -спиралей, наложенная на изображение на (б). (б–в, с любезного разрешения Dieter Oesterhelt.)

соден протонов в секунду. Светозависимый транспорт протонов создает градиент H^+ через плазматическую мембрану, за счет которого, в свою очередь, происходит синтез АТФ вторым белком в мембране плазматической клетки. Энергия, запасаемая в форме градиента H^+ , также используется в клетке для других энергозатратных процессов. Таким образом, бактериородопсин преобразует солнечную энергию в градиент протонов, который обеспечивает энергией клетку археи.

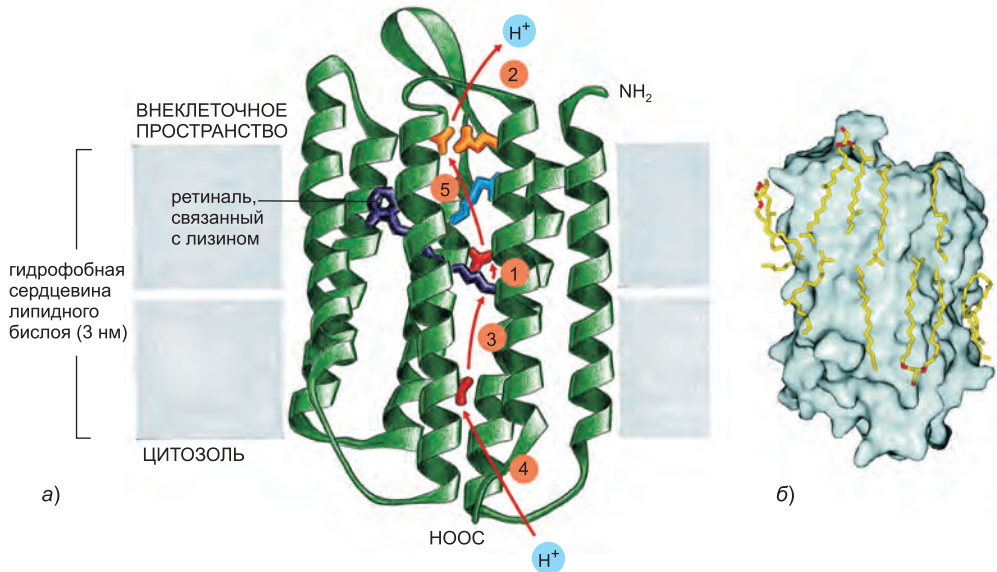


Рис. 10.33. Трехмерная структура молекулы бактериородопсина. (а) Полипептидная цепь семь раз пересекает липидный бислой в форме α -спиралей. Показаны положение хромофора ретиналя (фиолетовый) и возможный путь откачки протонов после активации светом. Первым и самым важным этапом является перенос H^+ с хромофора на боковую цепь аспарагиновой кислоты 85 (красная, расположена рядом с хромофором), который происходит после поглощения ретиналем фотона. Затем переносится другой H^+ в указанном числами порядке при помощи боковых цепей аминокислот, выстилающих путь через мембрану. Цикл завершается, и белок возвращается в исходное состояние. Цветовые обозначения: глутаминовая кислота (оранжевая), аспарагиновая кислота (красная), аргинин (синий). (б) Кристаллическая структура бактериородопсина высокого разрешения показала, что с определенными положениями на поверхности белка связано множество липидов (желтые с красными «головками»). (а, адаптировано из H. Luecke et al., *J. Mol. Biol.* 291: 899–911, 1999. С любезного разрешения издательства Academic Press.)

Многочисленные молекулы бактериородопсина в пурпурной мембране организованы в плоский двумерный кристалл. Такая регулярная упаковка позволила определить трехмерную структуру и ориентацию бактериородопсина в мембране с умеренным разрешением (3 Å) при помощи подхода, в основе которого лежат электронная микроскопия и дифракция электронов. Этот метод, известный как **электронная кристаллография**, аналогичен изучению трехмерных кристаллов растворимых белков посредством рентгеновской дифракции. Он позволил получить первые структурные данные о многих мембранных белках, которые слишком сложно кристаллизовать в растворе детергента. В случае бактериородопсина структура, полученная при помощи электронной кристаллографии, была впо-

следствии подтверждена и уточнена при помощи рентгеноструктурного анализа очень высокого разрешения. Каждая молекула бактериородопсина состоит из семи плотно упакованных α -спиралей (каждая из которых содержит около 25 аминокислот), пересекающих липидную мембрану под значительно отличающимися углами. После получения высокоупорядоченных кристаллов и их заморозки при очень низкой температуре также стало возможным определение структуры некоторых промежуточных конформаций, которые белок принимает в течение цикла переноса H^+ .

Бактериородопсин — член крупного суперсемейства мембранных белков со сходной структурой, но отличными функциями. Например, родопсин в палочках сетчатки позвоночных и многие рецепторные белки на поверхности клетки, связывающие внеклеточные сигнальные молекулы, также состоят из семи трансмембранных α -спиралей. Эти белки работают скорее как трансформаторы сигнала, а не транспортеры: они отвечают на внеклеточный сигнал путем активации внутри клетки GTP-связывающего белка (G-белка) и, соответственно, называются *рецепторами, сопряженными с G-белком* (G-Protein-Coupled Receptor, *GPCR*). Мы обсудим их в главе 15. Несмотря на то что структуры бактериородопсина и G-белков удивительно похожи, их аминокислотные последовательности совершенно различны. Это указывает на то, что они, по-видимому, принадлежат к двум эволюционно далеким ветвям одного древнего семейства белков.

Кристаллическая структура бактериородопсина высокого разрешения показала, что с определенными положениями на поверхности белка связано множество липидных молекул (рис. 10.33, б). Предполагают, что взаимодействия со специфическими липидами способствуют стабилизации многих мембранных белков, которые лучше функционируют и проще кристаллизуются, если некоторые из этих липидов остаются связанными в процессе обработки детергентом или если определенные липиды добавить обратно к белкам в растворе детергента. Специфичность таких липид-белковых взаимодействий помогает объяснить, почему эукариотические мембраны содержат такое разнообразие липидов, «головки» которых различаются по размеру, форме и заряду. Можно рассматривать мембранные липиды как двумерный растворитель для белков в мембране, точно так же как вода — трехмерный растворитель для белков в водном растворе. Некоторые мембранные белки способны функционировать только в присутствии специфических «головок» липидов, точно так же как многие ферменты в водных растворах требуют для своей работы определенных ионов.

10.2.9. Мембранные белки часто функционируют в составе крупных комплексов

Многие мембранные белки функционируют в составе многокомпонентных комплексов, некоторые из которых изучены при помощи рентгеноструктурного анализа. *Фотосинтетический реакционный центр* бактерий был первым закристаллизованным и проанализированным при помощи рентгеновской кристаллографии трансмембранным белковым комплексом. Результаты этого анализа очень важны для биологии мембран в целом, поскольку они впервые показали, как большое число полипептидов ассоциирует с мембраной и образует сложную белковую машину (рис. 10.34). В главе 14 мы обсудим, как такие фотосинтетические комплексы функционируют и улавливают энергию света для перекачки протонов через мембрану.

Многие мембранные белковые комплексы, участвующие в фотосинтезе, переносе протонов и электронном транспорте, имеют даже большие размеры, чем фотосинтетический реакционный центр. Например, огромный комплекс фотосистемы II цианобактерий содержит 19 белковых субъединиц и более 60-ти трансмембранных спиралей. Мембранные белки часто собираются в крупные комплексы не только для того, чтобы улавливать различные формы энергии, но и для трансформации внеклеточных сигналов во внутриклеточные (см. главу 15).

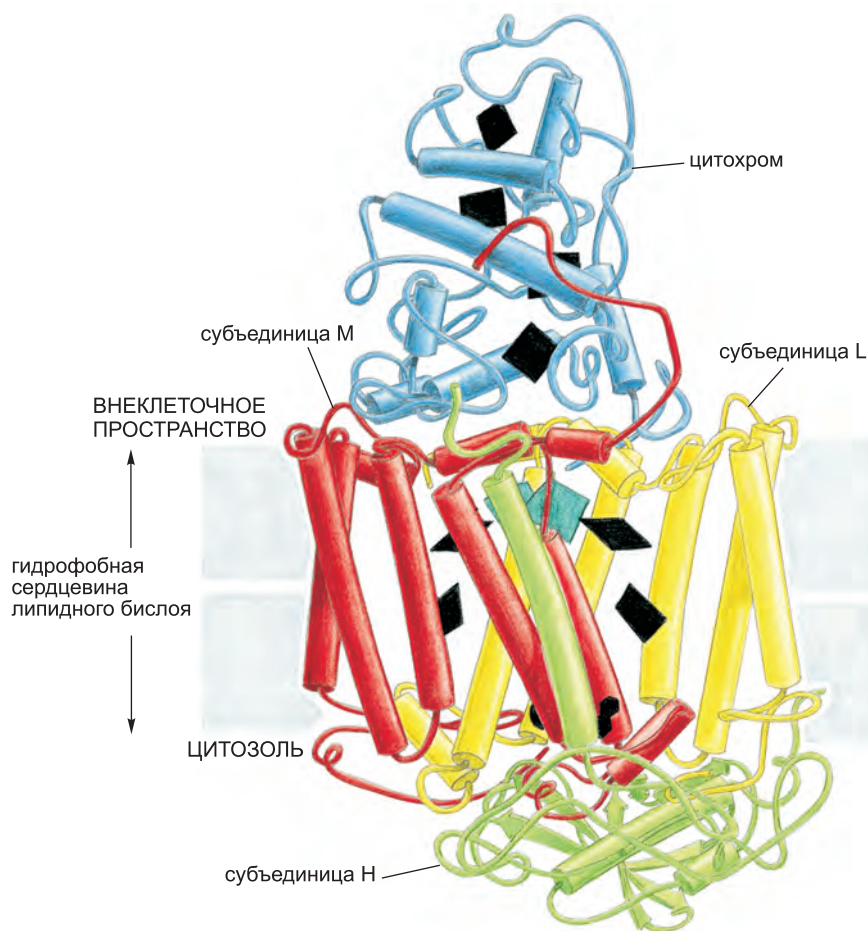


Рис. 10.34. Трехмерная структура фотосинтетического реакционного центра бактерии *Rhodospseudomonas viridis*. Структура расшифрована посредством рентгеновской дифракции кристаллов этого трансмембранного белкового комплекса. Комплекс состоит из четырех субъединиц L, M, H и цитохрома. Субъединицы L и M формируют ядро реакционного центра, каждая из них состоит из пяти α -спиралей, пересекающих липидный бислой. Черным показано расположение различных переносящих электрон коферментов. Обратите внимание, что коферменты расположены в пространстве между спиральями. «Специальная пара» молекул хлорофилла (см. главу 14) показана бирюзовым. (Адаптирован рис. J. Richardson, основанный на данных из J. Deisenhofer et al., *Nature* 318: 618–624, 1985. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

10.2.10. Многие мембранные белки диффундируют в плоскости мембраны

Как и большинство мембранных липидов, мембранные белки не переходят из одного монослоя в другой (флип-флоп), но вращаются вокруг оси, перпендикулярной плоскости бислоя (*вращательная диффузия*). Более того, многие мембранные белки способны латерально мигрировать в пределах мембраны (*латеральная диффузия*). В первом эксперименте, напрямую доказавшем, что некоторые белки плазматической мембраны обладают подвижностью в плоскости бислоя, клетки мыши искусственно слили с клетками человека для получения гибридных клеток (*гетерокарионов*). Чтобы различать белки плазматической мембраны человека и мыши, использовали два по-разному меченых антитела. Несмотря на то что сначала мышинные и человеческие белки оставались в пределах своих половинок новообразованного гетерокариона, примерно через полчаса два набора белков диффундировали и смешались по всей клеточной поверхности (**рис. 10.35**).

Скорость латеральной диффузии мембранных белков можно измерить при помощи метода *восстановления флуоресценции после фотоотбеливания (FRAP)*. Обычно, интересующий мембранный белок метят специфической флуоресцентной группой. Это можно сделать либо при помощи флуоресцентного лиганда, например, связывающего белок меченного флуорофором антитела, либо при помощи метода рекомбинантных ДНК, позволяющего экспрессировать белок, сшитый с зеленым флуоресцентным белком (GFP) (см. главу 9). Затем в маленькой области мембраны флуоресцентную группу отбеливают лазерным лучом и измеряют время, необходимое соседним, несущим неотбеленный лиганд или GFP мембранным белкам для того, чтобы диффундировать в отбеленную область (**рис. 10.36, а**). Это метод дополняет *потеря флуоресценции при фотоотбеливании (Fluorescence Loss in Photobleaching, FLIP)*. В этом подходе лазерный луч постоянно освещает маленький участок мембраны и отбеливает все флуоресцентные молекулы, которые в него диффундируют. Таким образом, постепенно окружающая мембрана лишается флуоресцентно меченых молекул (**рис. 10.36, б**). Измерения FRAP и FLIP позволяют рассчитать коэффициенты диффузии маркированных мембранных белков. Значения коэффициентов диффузии существенно изменяются для разных мембранных белков и разных клеток, поскольку взаимодействия с другими белками в разной степени замедляют диффузию белков. Измерения для белков, которые наименее подвержены этому процессу, показывают, что клеточные мембраны имеют вязкость, сопоставимую с вязкостью оливкового масла.

Одним из недостатков методов FRAP и FLIP является тот факт, что они позволяют наблюдать движение только крупных популяций молекул в относительно большой области мембраны; они не позволяют следить за отдельными белками. Например, если белок не мигрирует в отбеленную область, нельзя сказать, является ли молекула неподвижной или ее движение просто ограничено некоторой областью мембраны, например белками цитоскелета. *Метод отслеживания траекторий отдельных частиц (single-particle tracking)* позволяет преодолеть эту проблему путем мечения отдельных мембранных молекул связанными с флуоресцентными красителями антителами или мельчайшими частицами золота и наблюдения их движения в видеомикроскопе. При помощи отслеживания траектории отдельных частиц можно записать траекторию диффузии единственной молекулы мембранного белка во времени. Результаты, полученные всеми этими методами, показали, что

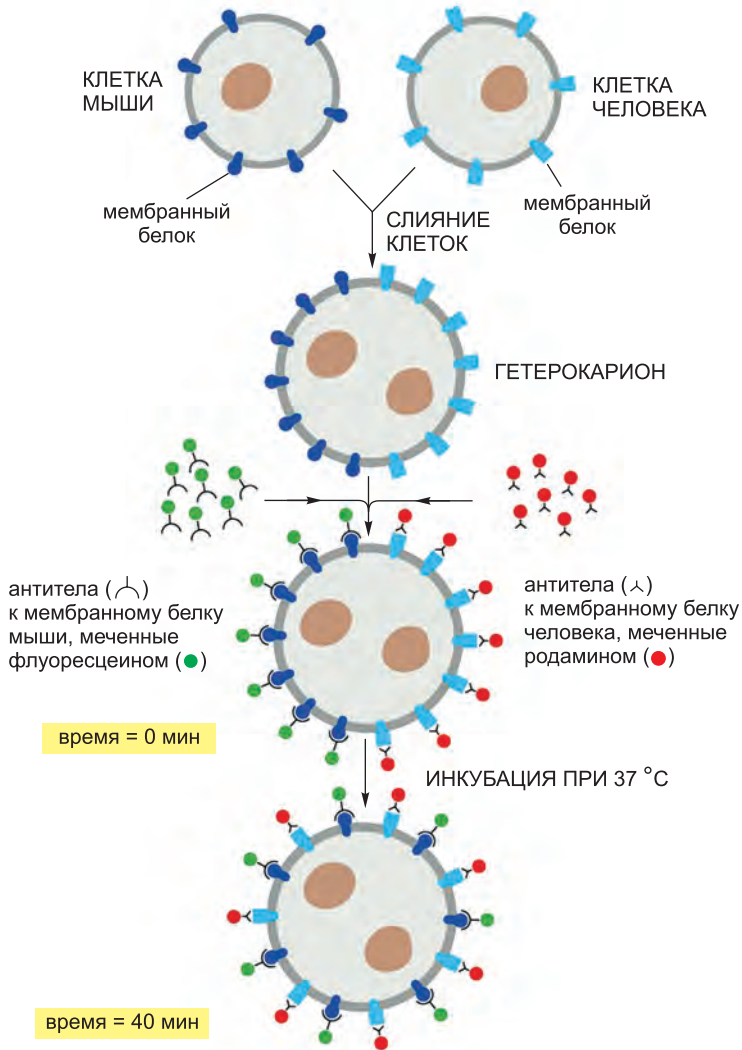


Рис. 10.35. Эксперимент, демонстрирующий диффузию белков в плазматической мембране гибридных (мышинных и человеческих) клеток. Сначала мышинные и человеческие белки содержатся в своих половинках новообразованной плазматической мембраны гетерокариона, но со временем они смешиваются. Два использованных для визуализации белков антитела различаются в флуоресцентном микроскопе, поскольку флуоресцеин имеет зеленый цвет, а родамин — красный. (Основано на L. D. Frye and M. Edidin, *J. Cell Sci.* 7: 319–335, 1970. С любезного разрешения The Company of Biologists.)

белки плазматической мембраны значительно различаются по своим диффузионным характеристикам, это мы обсудим ниже.

10.2.11. Белки и липиды могут придерживаться определенных доменов в пределах мембраны

Признание того факта, что биологические мембраны представляют собой двумерную жидкость, сыграло большую роль в понимании структуры и функций

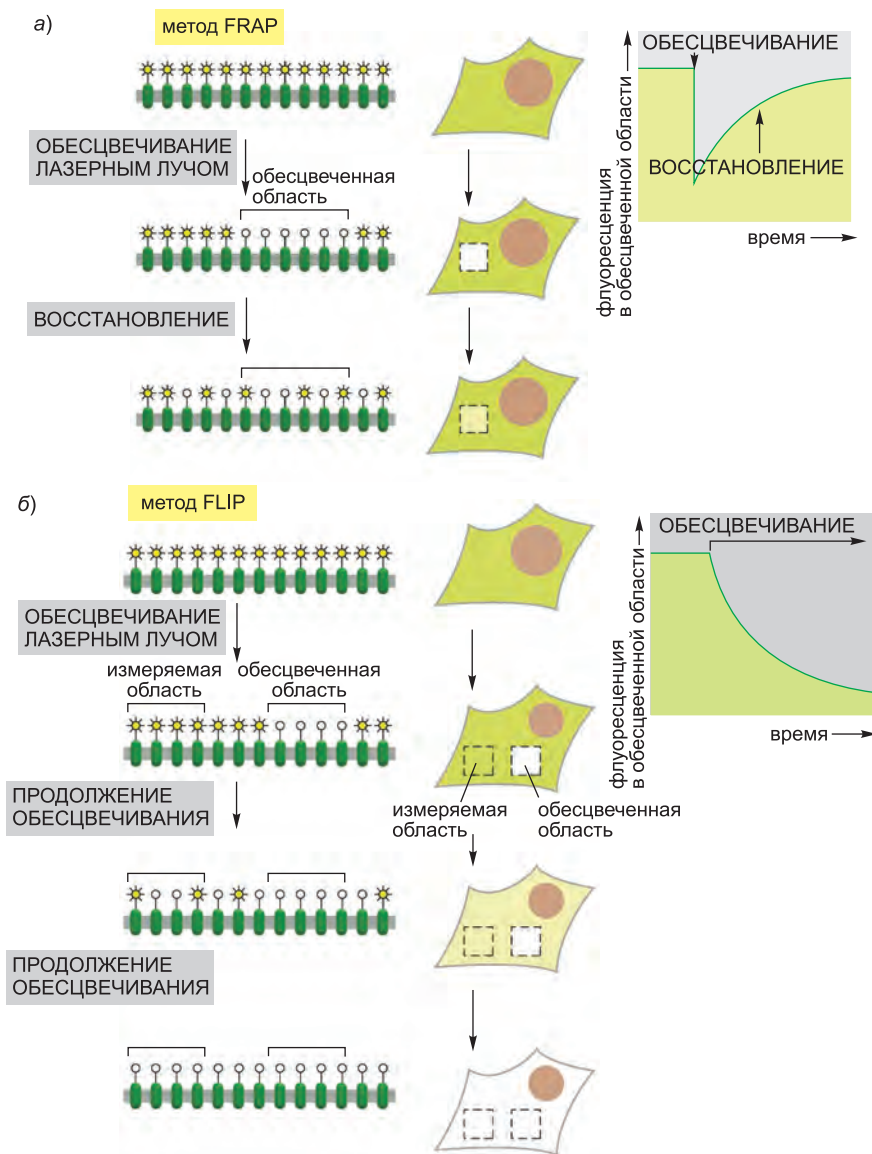


Рис. 10.36. Измерение скорости латеральной диффузии мембранного белка методами фотоотбеливания. Интересующий белок можно экспрессировать в составе химерного белка с зеленым флуоресцентным белком (GFP), который флуоресцирует сам по себе. (а) В методе FRAP в маленькой области лазерным лучом отбеливают флуоресцентные молекулы. Интенсивность флуоресценции восстанавливается, по мере того как обесцвеченные молекулы диффундируют из облученной области, а неотбеленные молекулы диффундируют в нее (здесь показан вид сверху и сбоку). Коэффициент диффузии рассчитывают из графика скорости восстановления: чем выше коэффициент диффузии мембранного белка, тем быстрее происходит восстановление. (б) В методе FLIP маленький участок мембраны постоянно освещается, а флуоресценция измеряется в другой области. Флуоресценция во второй области непрерывно снижается, по мере того как флуоресцентные молекулы ее покидают, а отбеленные молекулы в нее входят. В конце концов все флуоресцентные молекулы будут отбелены, при условии, что они подвижны и не закорены в цитоскелете или внеклеточном матриксе.

мембраны. Однако стало ясно, что представление мембраны как липидного моря, в котором свободно плавают все белки, было значительным упрощением. Многие клетки ограничивают движение мембранных белков пределами определенных областей в непрерывном липидном бислое. Мы уже обсуждали, как молекулы бактериородопсина в пурпурных мембранах *Halobacterium* собираются в крупные двумерные кристаллы, в которых отдельные молекулы практически неподвижны относительно друг друга (см. рис. 10.32); такого рода крупные агрегаты диффундируют очень медленно.

В эпителиальных клетках, выстилающих, например, желудочно-кишечный тракт или почечные каналы, определенные ферменты и транспортные белки плазматической мембраны содержатся только на апикальной поверхности клеток, тогда как другие — только на базальной и латеральной поверхностях (рис. 10.37). Такое асимметричное распределение мембранных белков часто необходимо для функционирования эпителия (см. обсуждение в главах 11 и 19). Липидный состав этих двух мембранных доменов также различается, следовательно, эпителиальные клетки способны ограничить диффузию между доменами не только молекул белков, но и липидов. Однако эксперименты с мечеными липидами показали, что такие ограничения действуют только на липиды во внешнем монослое мембраны. Барьеры, создаваемые особым типом межклеточных контактов (носящих название *плотных соединений*, или *запирающих зон*, см. главу 19), поддерживают разделение как белковых, так и липидных молекул. Очевидно, что мембранные белки, образующие эти межклеточные соединения, не могут латерально диффундировать во взаимодействующих мембранах.

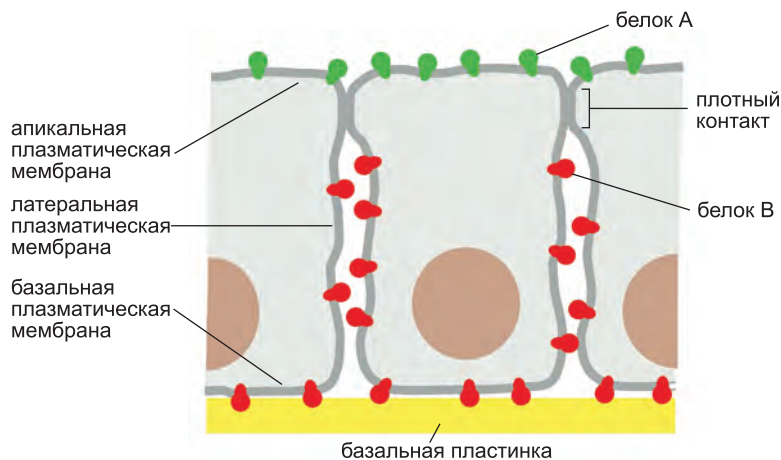


Рис. 10.37. Как движение мембранных молекул может быть ограничено пределами определенного домена. На данном изображении эпителиальной клетки белок А (на апикальной мембране) и белок В (на базальной мембране) способны латерально диффундировать в пределах своих доменов, но не могут проникать в другой домен. По крайней мере частично это можно объяснить наличием специализированных межклеточных контактов — плотных соединений. Липидные молекулы во внешнем (нецитоплазматическом) монослое плазматической мембраны также не могут диффундировать между доменами; однако липиды во внутреннем (цитоплазматическом) монослое могут (не показано). Базальная пластинка представляет собой тонкий слой межклеточного матрикса, отделяющий эпителиальные клетки от других тканей (см. главу 19).

Клетка может создать мембранный домен без привлечения межклеточных контактов. Сперматозоид млекопитающих, например, представляет собой единственную клетку, состоящую из нескольких структурно и функционально различающихся частей и покрытую непрерывной мембраной. При наблюдении сперматозоида при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии с набором антител, каждое из которых реагирует с определенной молекулой на поверхности, видно, что плазматическая мембрана состоит из по крайней мере трех различных доменов (рис. 10.38). Некоторые мембранные молекулы могут свободно диффундировать в пределах своего домена. Молекулярная природа «забора», не позволяющего молекулам покидать домен, неизвестна. Другие клетки также обладают сходными мембранными «заборами», которые ограничивают диффузию мембранных белков определенным доменом. Плазматическая мембрана нервных клеток, например, содержит домен, включающий в себя тело клетки и дендриты, и домен аксона. В данном случае предполагается,

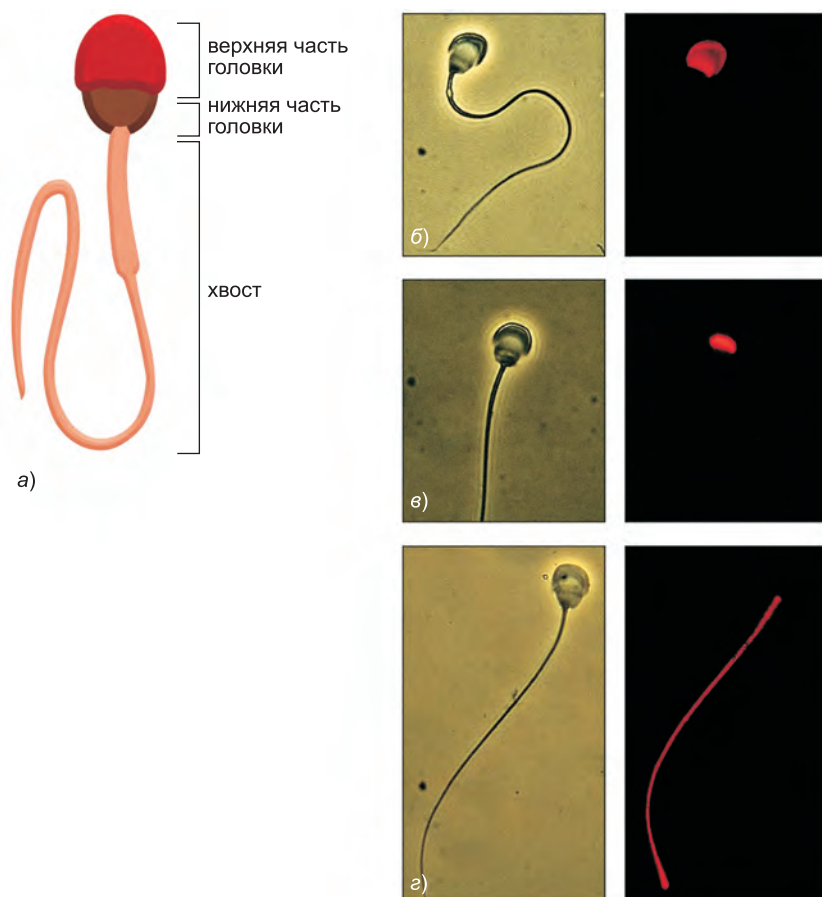


Рис. 10.38. Три домена в плазматической мембране сперматозоида морской свинки. (а) Схема сперматозоида морской свинки. На трех парах микрофотографий фазово-контрастные микрофотографии расположены *слева*, а иммунофлуоресцентное окрашивание поверхности той же клетки — *справа*. Различные моноклональные антитела, селективно связывают молекулы на (б) передней части головки, (в) задней части головки и (г) хвосте. (Микрофотографии приведены с любезного разрешения Selenia Carrol и Diana Myles.)

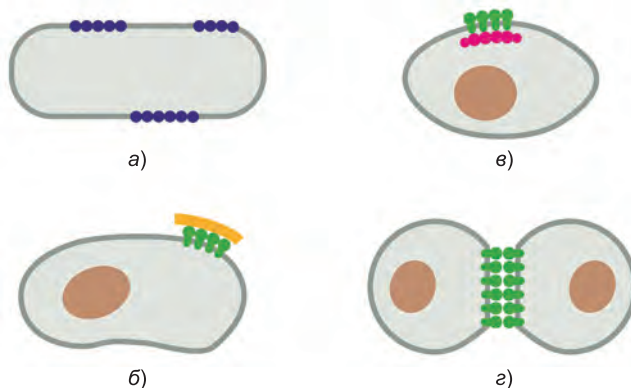


Рис. 10.39. Четыре способа ограничения латеральной подвижности определенных белков плазматической мембраны. (а) Белки могут самоорганизовываться в крупные агрегаты (как бактериородопсин в пурпурных мембранах *Halobacterium*); они могут фиксироваться за счет взаимодействий с ансамблями макромолекул (б) вне или (в) внутри клетки; или они могут взаимодействовать с белками на поверхности другой клетки.

что часть барьера формирует пояс актиновых филаментов, крепко связанный с плазматической мембраной в месте соединения тела клетки и аксона.

На **рис. 10.39** показаны четыре наиболее распространенных способа иммобилизации определенных мембранных белков посредством белок-белковых взаимодействий.

10.2.12. Цитоскелет кортикального слоя придает мембранам механическую прочность и ограничивает диффузию мембранных белков

Как показано на **рис. 10.39, б и в**, обычный способ ограничения латеральной подвижности определенных мембранных белков — прикрепление их к ансамблям макромолекул с обеих сторон мембраны. Например, характерная двояковогнутая форма красных клеток крови (**рис. 10.40**) объясняется взаимодействиями белков их плазматической мембраны с нижележащим *цитоскелетом*, который большей частью состоит из сети фибриллярного белка **спектрина**. Спектрин представляет собой длинный, тонкий, гибкий стержень длиной около 100 нм. Он является принципиальным компонентом цитоскелета эритроцитов и поддерживает структурную целостность и форму плазматической мембраны — единственной мембраны красной клетки, поскольку она не обладает ядром или другими органеллами. Спектриновый цитоскелет прикреплен к мембране различными мембранными белками. В результате формируется легко деформируемая сеть, покрывающая всю цитоплазматическую поверхность мембраны эритроцита (**рис. 10.41**). Спектриновый цитоскелет позволяет клетке выдерживать сжатие, которое испытывает ее мембрана при прохождении через узкие капилляры. Мыши и люди с генетическими нарушениями спектрина страдают анемией, и их эритроциты имеют сферическую форму (вместо двояковогнутой) и очень хрупки; тяжесть анемии зависит от уровня нарушения спектрина.

Аналогичная, но значительно более развитая и сложная сеть цитоскелета располагается под плазматической мембраной большинства клеток нашего тела. Эта сеть, составляющая кортикальный слой (или **кортекс**) цитоплазмы, обогащена актиновыми филаментами, которые разнообразными способами прикрепляются к плазматической мембране. Кортекс клеток, обладающих ядром, содержит струк-



Рис. 10.40. Микрофотография человеческих эритроцитов, полученная при помощи сканирующего электронного микроскопа. Клетки имеют двояковогнутую форму и лишены ядра и каких-либо других органелл. (С любезного разрешения Bernadette Chailley.)

турно гомологичные спектрину белки и другие компоненты цитоскелета красных кровяных телец. Мы обсудим кортикальный цитоскелет ядерных клеток и его взаимодействие с плазматической мембраной в главе 16.

Кортикальная сеть цитоскелета, лежащая под плазматической мембраной, ограничивает диффузию не только тех белков, которые напрямую с ней связаны. Поскольку *филаменты цитоскелета* часто располагаются очень близко к цитоплазматической поверхности мембраны, они способны создавать механические барьеры, мешающие свободной диффузии мембранных белков. Эти барьеры разделяют мембрану на маленькие домены, или *корралы* ([рис. 10.42](#)), которые могут быть как постоянными, как в сперматозоиде (см. [рис. 10.38](#)), так и временными. Барьеры можно обнаружить при высокоскоростном отслеживании траектории отдельных мембранных белков. Белки быстро диффундируют, но только в пределах корралей; однако иногда тепловое движение заставляет кортикальные филаменты временно отойти от мембраны, и белок может перейти в соседнюю корраль.

Насколько трансмембранный белок ограничен корралем, зависит от его взаимодействий с другими белками и от размера его цитоплазматического домена; белкам с крупным цитоплазматическим доменом будет сложнее преодолеть барьер. Например, когда рецептор на поверхности клетки связывается с внеклеточной сигнальной молекулой, на цитоплазматическом домене рецептора выстраиваются крупные белковые комплексы, что не позволяет рецептору покинуть его корраль. Считается, что образование корралей способствует концентрации активированных сигнальных комплексов, что увеличивает скорость и эффективность процессов сигнализации (см. главу 15).

Заключение

Хотя липидный бислой определяет базовую структуру биологических мембран, белки отвечают за большинство мембранных функций, включая специфическую рецепцию, ферментативную активность, транспорт молекул

и так далее. Многие мембранные белки проходят через липидный бислой. Некоторые из этих трансмембранных белков являются однопроводными — их полипептидная цепь пересекает бислой в виде одной α -спирали. Другие представляют собой многопроводные белки, у которых полипептидная цепь пересекает бислой несколько раз — либо в форме α -спиралей, либо как β -лист, свернутый в замкнутый бочонок. Все белки, участвующие в трансмембранном транспорте ионов и других малых водорастворимых молекул, являются многопроводными. Некоторые связанные с мембраной белки не пересекают бислой, вместо этого они связываются с поверхностью мембраны. Часть из них прикрепляется за счет нековалентных взаимодействий с трансмембранными белками, часть — за счет

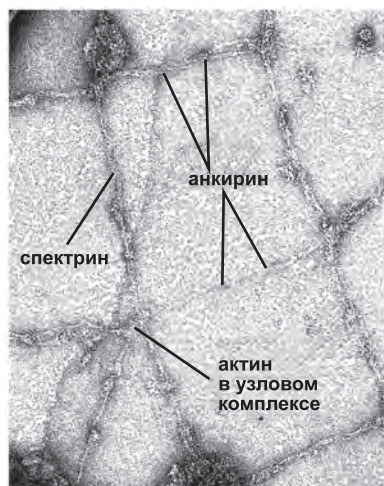
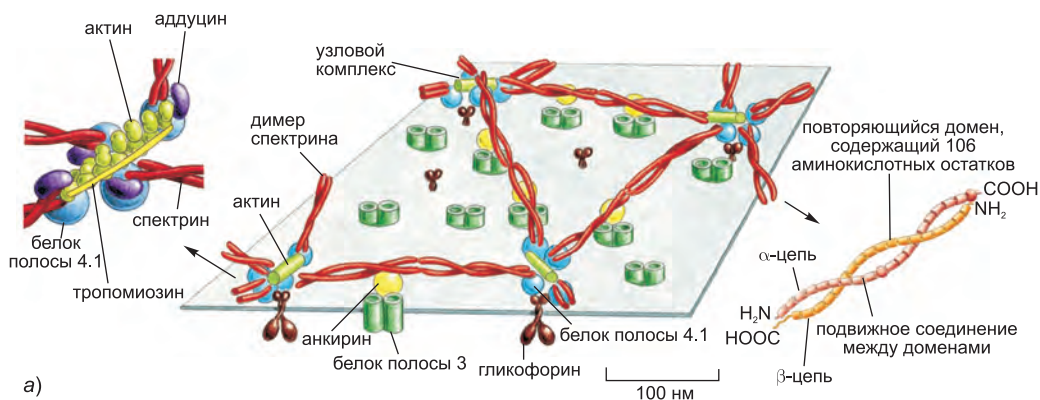


Рис. 10.41. Спектриновый цитоскелет на цитоплазматической стороне плазматической мембраны человеческих красных клеток крови. (а) Изображенная на схеме организация цитоскелета большей частью получена из исследований взаимодействия очищенных белков *in vitro*. Димеры спектрина (увеличенное изображение показано *справа*) связываются друг с другом в сеть посредством «узловых комплексов» (увеличенное изображение *слева*). Каждый гетеродимер спектрина состоит из двух антипараллельных, свободно переплетенных, гибких полипептидных цепей, обозначаемых α и β . Две цепи нековалентно связаны друг с другом в нескольких точках, включая концы молекулы. Цепи α и β состоят большей частью из повторяющихся доменов. Узловые комплексы собираются из коротких актиновых филаментов (содержащих 13 актиновых мономеров), *белка полосы 4.1*, *аддуцина* и молекулы *тропомииозина*, которая, по-видимому, определяет длину актинового филамента. Цитоскелет связан с мембраной двумя трансмембранными белками — многопроходным *белком полосы 3* и однопроходным *гликофорин*ом. Тетрамеры спектрина связаны с некоторыми белками полосы 3 посредством молекул *анкирина*, а с гли-

кофорином и белком полосы 3 (не показано) — через белки полосы 4.1. (б) Электронная микрофотография цитоскелета на цитоплазматической стороне клеточной мембраны красной клетки крови после фиксации и негативного окрашивания. Спектриновую сеть искусственно растянули для того, чтобы стали видны ее структурные характеристики. В нормальной клетке показанная область сети спектрин была бы значительно более плотной и занимала бы примерно одну десятую этой площади. (б, из Т. Byers and D. Branton, *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* 82: 6153–6157, 1985. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

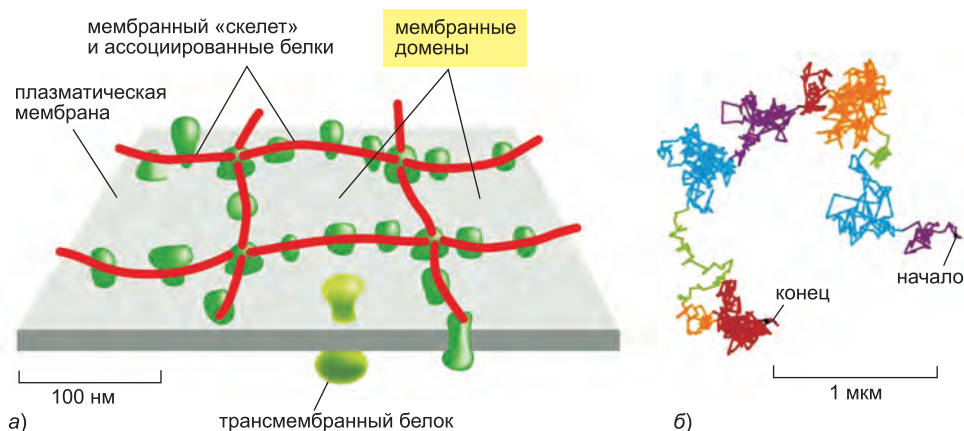


Рис. 10.42. Образование в мембране корралей кортикальными филаментами цитоскелета. (а) Предполагают, что таким образом цитоскелетные филаменты создают барьеры для диффузии, разделяющие мембрану на небольшие домены, или корралли. (б) Для слежения во времени за флуоресцентно мечеными белками использовали высокоскоростное отслеживание траекторий отдельных частиц. Траектория показывает, что мембранные белки диффундируют в пределах ограниченных мембранных доменов (показаны различными цветами траекторий) и очень редко проникают в соседние домены. (Адаптировано из A. Kusimi et al., *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 34: 351–378, 2005. С любезного разрешения Annual Reviews.).

ковалентно связанных липидных групп. В плазматической мембране всех эукариотических клеток большинство белков на поверхности клетки и некоторые молекулы липидов во внешнем липидном монослое несут ковалентно связанные олигосахаридные цепи. Как и молекулы липидов в бислое, многие мембранные белки способны быстро диффундировать в плоскости мембраны. Однако клетки способны обездвигивать определенные мембранные белки, а также ограничивать движение мембранных белков и липидных молекул пределами доменов в непрерывном липидном бислое.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

10.1. Несмотря на то что липидные молекулы свободно диффундируют в плоскости бислоя, они не могут совершать флип-флоп-переходы из одного монослоя в другой, если в мембране отсутствуют ферменты транслокаторы фосфолипидов.

10.2. Хотя все углеводы на внешней поверхности плазматической мембраны обращены наружу, все углеводы во внутренних мембранах обращены в цитозоль.

10.3. Несмотря на то что хорошо известны мембранные домены разного белкового состава, до сих пор не обнаружено мембранных доменов различного липидного состава.

Решите следующие задачи

10.4. Почему, когда липидный бислой разрывается, он не восстанавливает себя путем формирования «гемимицелльных» («полумицелльных») краев, как показано на **рис. Q10.1?**

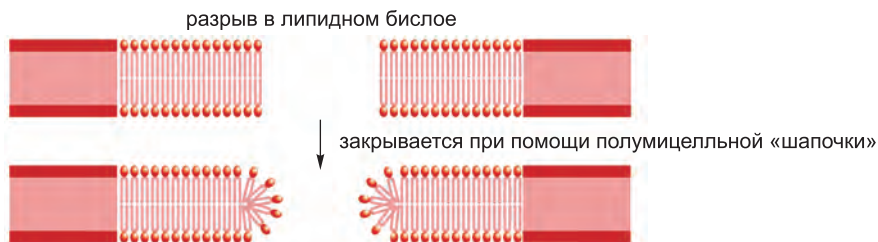


Рис. Q10.1. Разорванный липидный бислой, восстанавливающийся при помощи гипотетических «гемимицелльных» краев (задача 10.4).

10.5. Маргарин производится из растительного масла в химическом процессе. Как вы думаете, при этом происходит превращение насыщенных жирных кислот в ненасыщенные или наоборот? Объясните свой ответ.

10.6. Если липидный рафт обычно имеет диаметр 70 нм и каждая липидная молекула имеет диаметр 0,5 нм, сколько липидов будет содержаться в рафте, лишенном белков? При соотношении 50 молекул липидов на одну белковую молекулу (50% белка по массе) сколько белков будет в типичном рафте? (Потерей липидов рафтом при встраивании белка можно пренебречь.)

10.7. В классической статье исследовали поведение липидов в двух монослоях мембраны при помощи мечения отдельных молекул нитроксильными группами, которые представляют собой стабильные свободные радикалы (**рис. Q10.2**). Эти спин-меченые липиды могут быть зарегистрированы при помощи спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), метода, не повреждающего живые клетки. Спин-меченые липиды вводят в небольшие липидные везикулы, которые затем сливаются с клетками и переносят меченые липиды в плазматическую мембрану.

Два спин-меченых фосфолипидов, показанных на **рис. Q10.2**, ввели таким способом в интактную мембрану красной клетки крови человека. Чтобы определить, равномерно ли они распределились по двум монослоям бислоя, в среду добавили аскорбиновую кислоту (витамин С), которая представляет собой водорастворимый восстановительный агент и разрушает все нитроксильные радикалы на поверхности клетки. Сигнал ЭПР наблюдали во времени в присутствии и в отсутствие аскорбиновой кислоты, как показано на **рис. Q10.3, а и б**.

а. Пренебрегая разницей в уменьшении сигнала ЭПР, объясните, почему фосфолипид 1 (**рис. Q10.3, а**) быстрее реагирует с аскорбатом, чем фосфолипид 2 (**рис. Q10.3, б**). Обратите внимание, что фосфолипид 1 достигает плато примерно через 15 минут, а фосфолипид 2 — только через час.

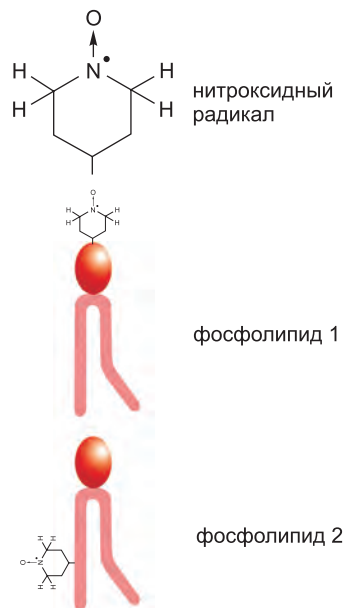


Рис. Q10.2. Структуры двух меченных нитроксилом липидов (задача 10.7). Нитроксильный радикал показан вверху, а место его прикрепления к фосфолипидам — внизу.

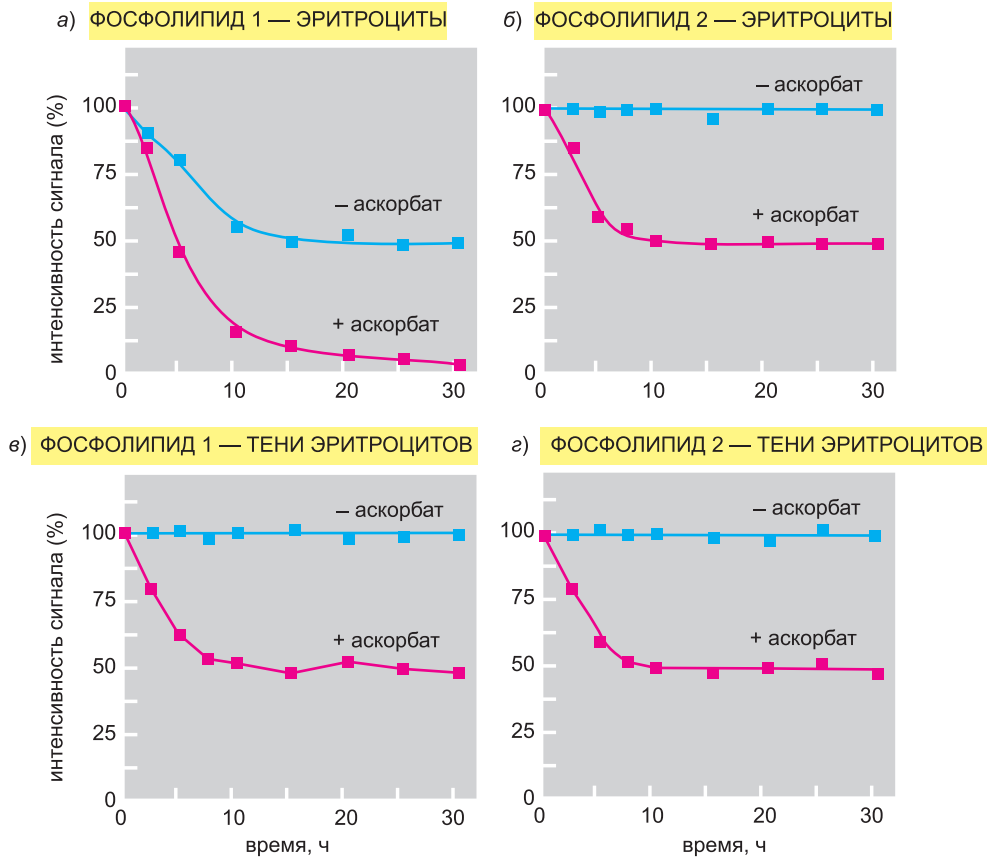


Рис. Q10.3. Уменьшение интенсивности сигнала ЭПР как функции от времени в интактных красных клетках крови и тенях эритроцитов в присутствии и в отсутствие аскорбата (задача 10.7). (а и б) Фосфолипиды 1 и 2 в интактных эритроцитах. (в и г) Фосфолипиды 1 и 2 в тенях эритроцитов.

б. Чтобы исследовать разницу в уменьшении сигнала ЭПР двух фосфолипидов, эксперименты продублировали на «тенях» эритроцитов, которые повторно замкнуты для проникновения аскорбата (рис. Q10.3, в и г). Замкнутые тени красных клеток крови лишены цитоплазмы, но их плазматическая мембрана не нарушена. В этих экспериментах уменьшение сигнала ЭПР для обоих фосфолипидов пренебрежимо мало в отсутствие аскорбата и достигало плато при 50 % в присутствии аскорбата. Как вы можете объяснить различия в уменьшении сигнала ЭПР в экспериментах с тенями эритроцитов (рис. Q10.3, в и г) и нормальными красными клетками крови (рис. Q10.3, а и б)?

в. Были ли фосфолипиды равномерно распределены по монослоям мембраны эритроцита?

10.8. Мономерные однопроводные трансмембранные белки пересекают мембрану в виде одной α -спирали, которая обладает в области бисюла характерными свойствами. Какая из приведенных ниже последовательностей из 20 аминокислот лучше всего подходит для формирования такого трансмембранного сегмента? Объясните свой выбор. (Смотри однобуквенные обозначения аминокислот в конце книги.)

А. I T L I Y F G V M A G V I G T I L L I S
 Б. I T P I Y F G P M A G V I G T P L L I S
 В. I T E I Y F G R M A G V I G T D L L I S

10.9. Вы изучаете связывание белков с цитоплазматической поверхностью культивированных клеток нейробластомы и придумали метод, который дает хороший выход вывернутых наизнанку везикул плазматической мембраны. К сожалению, ваш образец загрязнен различными количествами нормальных везикул. Что бы вы ни пробовали, вам не удастся избежать этой проблемы. Друг предлагает вам пропустить ваши везикулы через аффинную колонку, заполненную твердыми гранулами с лектином. В чем смысл предложения вашего друга?

10.10. Гликофорин, белок плазматической мембраны красных клеток крови, обычно существует в форме гетеродимера, мономеры которого удерживаются вместе исключительно за счет взаимодействий между трансмембранными доменами. Как известно, трансмембранные домены гидрофобны. Тогда чем объясняется высокая специфичность их связывания друг с другом?

Список литературы

Общая

Bretscher M.S. (1973) Membrane structure:some general principles. *Science* 181: 622–629.

Edidin M. (2003) Lipids on the frontiers century of cell-membrane bilayers. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 414–418.

Jacobson K. et al. (1995) Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* 268: 1441–1442.

Lipowsky R. & Sackmann E. (eds.) (1995) The structure and dynamics of membranes. Amsterdam: Elsevier.

Singer S.J. & Nicolson G.L. (1972) The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720–731.

Липидный бислой

Beyers E.M., Comfurius P. & Zwaal R.F. (1999) Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1439: 317–330.

Devaux P.F. (1993) Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 3: 489–494.

Dowhan W. (1997) Molecular basis for membrane phospholipid diversity:why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* 66: 199–232.

Hakomori Si. S.I. (2002) Inaugural Article:The glycosynapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 225–232.

Harder T. & Simons K. (1997) Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 9: 534–542.

Hazel J.R. (1995) Thermal adaptation in biological membranes:is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu. Rev. Physiol.* 57: 19–42.

Ichikawa S. & Hirabayashi Y. (1998) Glucosylceramide synthase and glycosphingolipid synthesis. *Trends Cell. Biol.* 8: 198–202.

Kornberg R.D. & McConnell H.M. (1971) Lateral diffusion of phospholipids in a vesicle membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 68: 2564–2568.

Mansilla M. C., Cybulski L. E. & de Mendoza D. (2004) Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. *J. Bacteriol.* 186: 6681–6688.

McConnell H. M. & Radhakrishnan A (2003) Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1610: 159–73.

Pomorski T. & Menon A. K. (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell Mol. Life Sci.* 63: 2908–2921.

Rothman J. E. & Lenard J. (1977) Membrane asymmetry. *Science* 195:743-53.

Simons K. & Vaz W. L. (2004) Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 33: 269–95.

Tanford C. (1980) The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes. New York: Wiley.

van Meer G. (2005) Cellular lipidomics. *EMBO J.* 24: 3159–3165.

Белки мембран

Bennett V. & Baines A. J. (2001) Spectrin and ankyrin-based pathways: metazoan inventions for integrating cells into tissues. *Physiol. Rev.* 81: 1353–1392.

Bijlmakers M. J. & Marsh M. (2003) The on-off story of protein palmitoylation. *Trends Cell Biol.* 13: 32–42.

Branden C. & Tooze J. (1999) Introduction to Protein Structure, 2nd ed. New York: Garland Science.

Bretscher M. S. & Raff M. C. (1975) Mammalian plasma membranes. *Nature* 258: 43–49.

Buchanan S. K. (1999) Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 455–461.

Chen Y., Lagerholm B. C. & Jacobson K. (2006) Methods to measure the lateral diffusion of membrane lipids and proteins. *Methods* 39: 147–153.

Curranb A. R. & Engelman D. M. (2003) Sequence motifs, polar interaction and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 412.

Deisenhofer J. & Michel H. (1991) Structures of bacterial photosynthetic reaction centers. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 1–23.

Drickamer K. & Taylor M. E. (1993) Biology of animal lectins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9: 237–64.

Drickamer K. & Taylor M. E. (1998) Evolving views of protein glycosylation. *Trends Biochem. Sci.* 23: 321–324.

Frye L. D. & Edidin M. (1970) The rapid intermixing of cell surface antigens after formation of mouse-human heterokaryons. *J. Cell Sci.* 7: 319–33

Helenius A. and Simons K. (1975) Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* 415: 29–79.

Henderson R. & Unwin P. N. (1975) Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* 257: 28–32.

Kyte J. & Doolittle R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol Biol.* 157: 105–132.

le Maire M., Champeil P. et al. (2000) Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1508: 86–111.

Lee A. G. (2003) Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochim. Biophys. Acta.* 1612: 1–40.

Marchesi V. T., Furthmayr H. et al. (1976) The red cell membrane. *Annu. Rev. Biochem.* 45: 667–698.

Nakada C., Ritchie K. & Kusumi A. (2003) Accumulation of anchored proteins forms membrane diffusion barriers during neuronal polarization. *Nat. Cell Biol.* 5: 626–632.

Oesterhelt D. (1998) The structure and mechanism of the family of retinal proteins from halophilic archaea. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8: 489–500.

Reig N. & van der Goot F.G. (2006) About lipids and toxins. *FEBS Lett.* 580: 5572–5579.

Reithmeier R.A.F. (1993) The erythrocyte anion transporter (band 3) *Curr. Opin. Cell Biol.* 7: 707–714.

Rodgers W. & Glaser M. (1993) Distributions of proteins and lipids in the erythrocyte membrane. *Biochemistry* 32: 12591–12598.

Sharon N. & Lis H. (2004) History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14: 53R–62R.

Sheetz M.P. (2001) Cell control by membrane-cytoskeleton adhesion. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 392–396.

Silvius J.R. (1992) Solubilization and functional reconstitution of biomembrane components. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21: 323–348.

Steck T.L. (1974) The organization of proteins in the human red blood cell membrane. A review. *J. Cell Biol.* 62: 1–19.

Subramaniam S. (1999) The structure of bacteriorhodopsin: an emerging consensus. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9: 462–468.

Viel A. & Branton D. (1996) Spectrin: on the path from structure to function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 49–55.

Wallin E. & von Heijne G. (1998) Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms. *Protein Sci.* 7: 1029–1038.

White S.H. & Wimley W.C. (1999) Membrane protein folding and stability: physical principles. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28: 319–365.

11

Мембранный транспорт малых молекул и электрические свойства мембраны

Поскольку липидный бислой клеточных мембран внутри гидрофобен, он не пропускает большинство полярных молекул. Барьерная функция позволяет клетке поддерживать оптимальные концентрации растворенных в цитозоле веществ, отличающиеся от концентраций во внеклеточной жидкости и в каждом из внутриклеточных мембранных компартментов. Однако, для того чтобы этот барьер приносил пользу, клетки должны уметь переносить определенные водорастворимые молекулы и ионы через мембрану. Это необходимо для поглощения питательных веществ, выделения продуктов метаболизма и регуляции внутриклеточных концентраций ионов. Клетки используют специализированные трансмембранные белки для транспорта неорганических ионов и малых водорастворимых органических молекул через липидный бислой. Клетки также способны переносить через свои мембраны макромолекулы и даже крупные частицы, но механизмы этих процессов в большинстве случаев отличаются от транспорта малых молекул, и мы обсудим их в главах 12 и 13. Важность мембранного транспорта отражается в том, что в большинстве организмов транспортные белки кодируются большим числом генов. Транспортные белки составляют до 15–30% мембранных белков клетки. Некоторые специализированные клетки млекопитающих используют до двух третей всей своей поглощенной метаболической энергии на поддержание процессов мембранного транспорта.

Мы начнем эту главу с описания некоторых общих принципов того, как малые водорастворимые молекулы преодолевают клеточные мембраны. Затем мы по очереди рассмотрим два основных класса мембранных белков, которые опосредуют транспорт молекул через липидный бислой. К ним относятся *транспортёры*, которые обладают подвижными частями для транспорта специфических молекул через бислой, и *каналы*, которые формируют узкую гидрофильную пору, способствующую пассивному трансмембранному движению молекул, в основном маленьких неорганических ионов. Транспортёры могут быть сопряжены с источником энергии, позволяющим им катализировать активный транспорт. Объединение селективной пассивной проницаемости и активного транспорта приводит к значительным различиям между составами цитозоля, внеклеточной среды ([таблица 1.11](#)) и жидкости в замкнутых мембранных органеллах. Создавая различия концентраций ионов через липидный бислой, клеточные мембраны запасают потенциальную энергию в форме электрохимических градиентов, за счет которых протекают различные транспортные процессы, передаются электрические

Таблица 11.1. Сравнение концентраций ионов внутри и снаружи типичной клетки млекопитающих

Компонент	Внутриклеточная концентрация мМ	Внеклеточная концентрация мМ
Катионы		
Na ⁺	5–15	145
K ⁺	140	5
Mg ²⁺	0,5	1–5
Ca ²⁺	10 ⁴	1–2
H ⁺	7 × 10 ⁵ (10 ^{7,2} М или pH = 7,2)	4 × 10 ⁵ (10 ^{7,4} М или pH = 7,4)
Анионы*		
Cl ⁻	5–15	110

*Клетка должна содержать равное количество положительных и отрицательных зарядов (т.е. быть электронейтральной). Таким образом, в дополнение к Cl клетка содержит множество других, не перечисленных в этой таблице анионов; на самом деле большинство составляющих клетку соединений заряжены отрицательно (HCO₃⁻, PO₄³⁻, белки, нуклеиновые кислоты, метаболиты, несущие фосфатные и карбоксильные группы, и т.д.). Здесь приведены концентрации свободных ионов Ca²⁺ и Mg²⁺. В клетках в общей сложности около 20 мМ Mg²⁺ и 1–2 мМ Ca²⁺, но большинство этих ионов связаны с белками и другими соединениями и, в случае кальция, запасены в различных органеллах.

сигналы в возбудимых клетках и (в митохондриях, хлоропластах и бактериях) синтезируется большая часть АТФ. Наше обсуждение будет в основном посвящено транспорту через плазматическую мембрану, но сходные принципы действуют во всех остальных мембранах эукариотических клеток, о чем мы поговорим в последующих главах.

В последней части этой главы мы по большей части сконцентрируемся на функциях ионных каналов в нейронах (нервных клетках). В этих клетках белки каналов функционируют на высочайшем уровне эффективности, позволяя сетям нейронов решать все удивительные задачи человеческого мозга.

11.1. Принципы мембранного транспорта

Мы начнем этот раздел с описания проницаемости искусственных, не содержащих белки липидных бислоев. Затем мы введем несколько терминов, используемых для описания различных форм мембранного транспорта, и рассмотрим некоторые подходы, применяемые для характеристики белков и процессов.

11.1.1. Лишенные белков липидные бислои непроницаемы для ионов

При достаточном количестве времени, практически любая молекула пройдет через свободный от белков липидный бислой по градиенту концентрации. Однако скорость диффузии значительно изменяется и зависит частично от размера молекулы, но в основном от относительной растворимости в масле. Чем более гидрофобна, или неполярна, молекула, тем быстрее она будет диффундировать через липидный бислой. Маленькие неполярные молекулы, например O₂ и CO₂, легко растворяются в липидных бислоях и, следовательно, быстро через них диффундируют. Маленькие незаряженные полярные молекулы, такие как вода или мочевины, также диффундируют через бислой, но значительно медленнее (рис. 11.1). С другой стороны, липидные слои практически непроницаемы для заряженных молекул

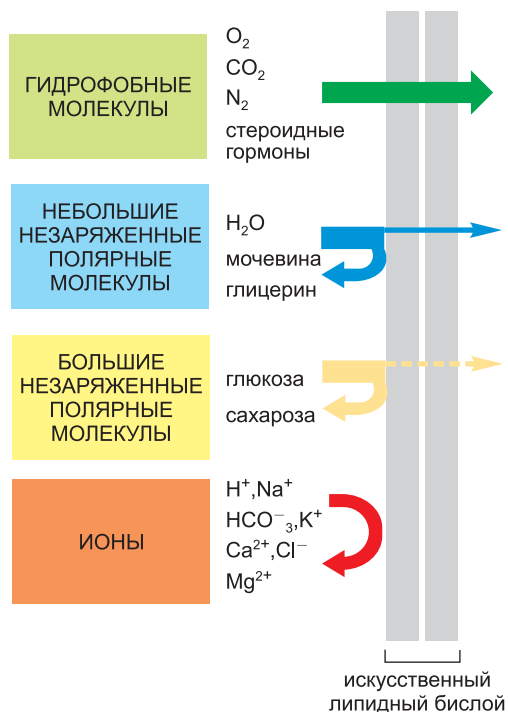


Рис. 11.1. Относительная проницаемость искусственного липидного бислоя для различных классов молекул. Чем меньше молекула и, что важнее, чем слабее она связывается с водой, тем быстрее она диффундирует через липидный бислой.

(ионов), вне зависимости от их размера: заряд и высокий уровень гидратации таких молекул не позволяет им проникнуть в углеводородную фазу бислоя. Таким образом, синтетические липидные бислои в 10^9 раз более проницаемы для воды, чем для таких маленьких ионов, как Na^+ или K^+ (рис. 11.2).

11.1.2. Существует два основных класса мембранных транспортных белков: транспортеры и каналы

Как и искусственные, клеточные мембраны проницаемы для диффузии воды и неполярных молекул. Однако они также должны пропускать различные полярные молекулы, такие как ионы, сахара, аминокислоты, нуклеотиды и разнообразные клеточные метаболиты, которые пересекают искусственные липидные бислои очень медленно. Специальные **мембранные транспортные белки** переносят такие растворенные вещества через клеточные мембраны. Эти белки обладают разной формой и встречаются во всех типах биологических мембран. Каждый белок транспортирует специфический класс молекул (например, ионов, сахаров или аминокислот) или зачастую только определенный вид молекул данного класса. Проведенные в 50-х гг. XX века исследования позволили обнаружить бактерии с мутацией одного гена, не способные транспортировать через плазматическую мембрану сахара. Так показана специфичность мембран-

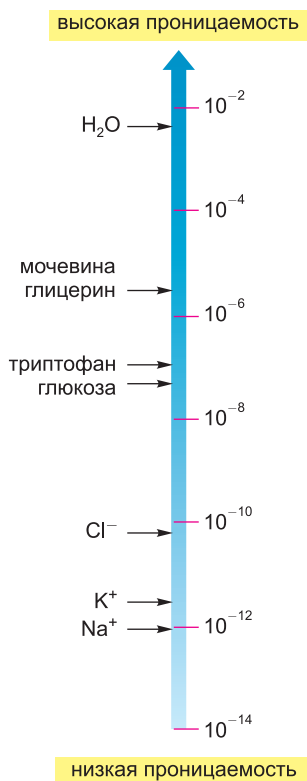


Рис. 11.2. Коэффициенты проницаемости для прохождения различных молекул через искусственный липидный бислой. Скорость потока растворенного вещества через бислой прямо пропорциональна разности его концентраций с двух сторон мембраны. Умножение этой разности концентраций (в моль/ см^3) на коэффициент проницаемости (в см/с) дает поток растворенного вещества в молях в секунду на квадратный сантиметр бислоя. Например, разность концентраций триптофана, равная 10^4 моль/ см^3 ($10^4/10^3$ л = 0,1 М), даст поток 10^4 моль/ $\text{см}^3 \times 10^7$ см/с = 10^{11} моль/с через 1 см^2 бислоя, или 6×10^4 молекул/с на 1 $\mu\text{м}^2$ бислоя.

ных транспортных белков. Мы знаем, что люди со сходными мутациями страдают от различных наследственных заболеваний, которые нарушают транспорт определенных растворенных веществ в почках, пищеварительном тракте или других типах клеток. Например, у людей, страдающих наследственным заболеванием *цистинурией*, отсутствует транспорт определенных аминокислот (включая цистин, димер цистеина, связанный дисульфидным мостиком) из мочи или пищеварительного тракта в кровь; происходящее в результате накопление цистина в моче приводит к образованию в почках цистиновых камней.

Все подробно исследованные мембранные транспортные белки были многопроходными, т.е. их полипептидная цепь пересекает липидный бислой несколько раз. Создавая непрерывную белковую пору через мембрану, эти белки позволяют определенным гидрофильным растворенным веществам преодолевать мембрану без прямого контакта с гидрофобной средой липидного бислоя.

Два основных класса мембранных транспортных белков — транспортеры и каналы (рис. 11.3). **Транспортеры** (которые также называют *переносчиками*, или *пермеазами*) связывают определенное растворенное вещество и претерпевают серию конформационных перестроек, позволяющих связанной молекуле пройти через мембрану. **Каналы**, с другой стороны, гораздо слабее взаимодействуют с растворенным веществом. Они формируют в липидном бислое заполненные водой поры; когда они открыты, определенные растворенные вещества (обычно неорганические ионы соответствующего заряда и размера) свободно проходят через них и, следовательно, пересекают мембрану. Неудивительно, что транспорт через каналы происходит значительно быстрее, чем транспорт, опосредованный транспортерами.

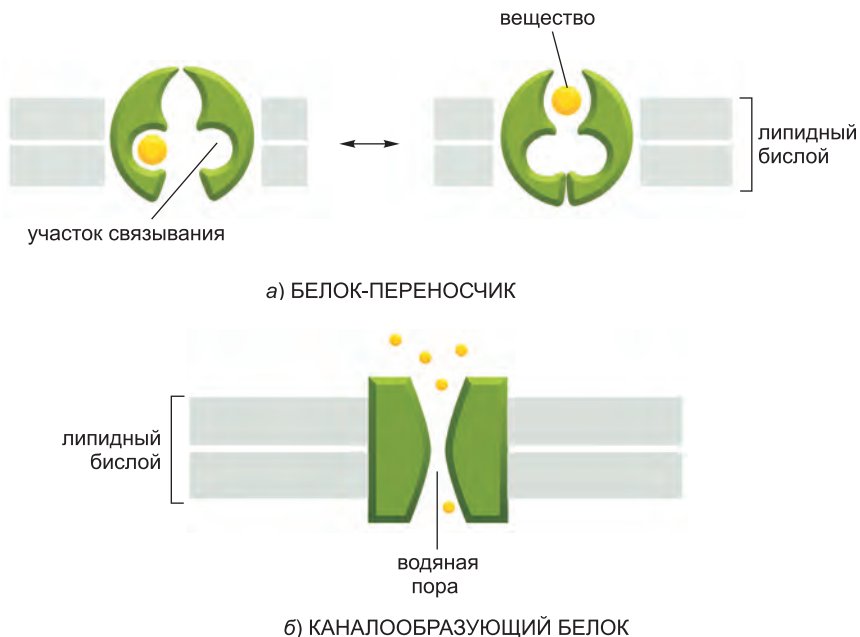


Рис. 11.3. Транспортеры и каналы. (а) Транспортер меняет свою конформацию таким образом, чтобы сайт связывания растворенного вещества попеременно располагался сначала на одной стороне бислоя, а затем на другой. (б) Белок-канал, напротив, образует в липидном бислое заполненную водой пору, через которую могут диффундировать определенные вещества.

Несмотря на то что вода способна диффундировать через искусственные липидные бислои, все клетки содержат специфические канальные белки (так называемые *водные каналы*, или *аквапорины*), которые значительно увеличивают проницаемость мембран для воды, как мы обсудим позже.

11.1.3. Транспортёры, сопряженные с источником энергии, осуществляют активный транспорт

Все каналы и многие транспортёры позволяют молекулам пересекать мембрану только пассивно («по градиенту концентрации»). Этот процесс называется **пассивным транспортом**, или **облегченной диффузией**. В случае транспорта единственной незаряженной молекулы разница ее концентраций с двух сторон мембраны — *градиент концентрации* — определяет направление диффузии и является ее движущей силой (рис. 11.4, а).

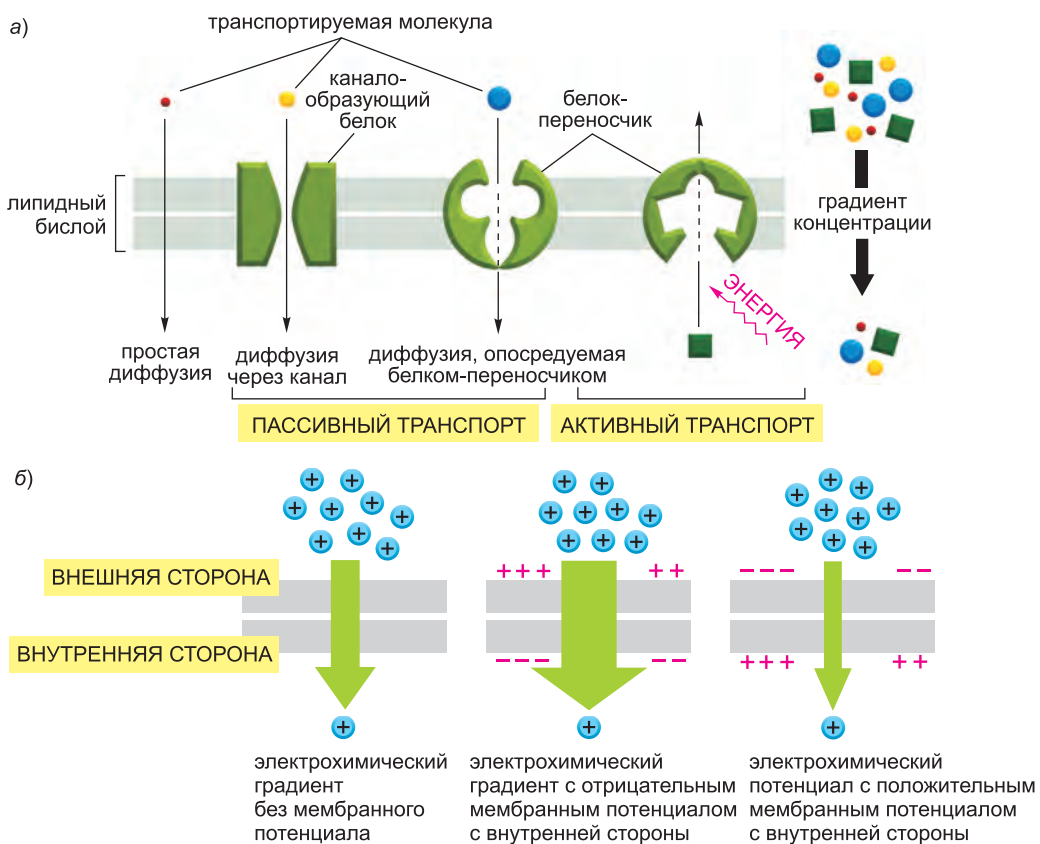


Рис. 11.4. Сравнение активного и пассивного транспорта. (а) Пассивный транспорт по электрохимическому градиенту происходит самопроизвольно посредством простой диффузии через липидный бислой или облегченной диффузии через каналы или пассивные транспортёры. С другой стороны, активный транспорт требует метаболической энергии и всегда опосредуется транспортёрами, которые используют эту энергию для перекачки растворенного вещества против его электрохимического градиента. (б) Электрохимический градиент включает в себя мембранный потенциал и концентрационный градиент; они могут работать в одну сторону, увеличивая движущую силу переноса иона через мембрану (*в центре*), или могут работать друг против друга (*справа*).

Однако если растворенное вещество несет некоторый суммарный заряд, на его транспорт влияет как концентрационный градиент, так и разность электрических потенциалов с двух сторон мембраны, так называемый *мембранный потенциал*. Концентрационный градиент и электрический градиент создают суммарную движущую силу, **электрохимический градиент**, для каждого заряженного растворенного вещества (рис. 11.4, б). Более подробно электрохимические градиенты обсуждаются в главе 14. На самом деле почти все плазматические мембраны обладают разностью электрических потенциалов (градиентом потенциала); внутренняя сторона мембраны обычно заряжена отрицательно по отношению к внешней. Эта разность потенциалов способствует входу положительно заряженных ионов в клетку, но мешает входу отрицательно заряженных ионов.

Клеткам также необходимы транспортные белки, которые могут активно перекачивать определенные растворенные вещества через мембрану против их электрохимических градиентов; этот процесс, известный как **активный транспорт**, опосредуется транспортерами, которые также называют *насосами*. При активном транспорте активность переносчика является направленной, поскольку она сопряжена с источником метаболической энергии, например гидролизом АТР или ионным градиентом, которые мы обсудим позже. Таким образом, трансмембранный перенос малых молекул, опосредуемый транспортерами, может быть как активным, так и пассивным, тогда как транспорт через каналы всегда пассивен.

Заключение

Липидные бислои практически непроницаемы для большинства полярных молекул. Для транспорта малых водорастворимых молекул в плазматическую мембрану или замкнутые мембранные компартменты клеточные мембраны содержат различные мембранные транспортные белки, каждый из которых отвечает за перенос определенного растворенного вещества или класса веществ. Существует два класса мембранных транспортных белков — переносчики и каналы. Оба класса формируют непрерывные белковые проходы через липидный бислой. Если трансмембранное движение, опосредованное транспортерами, может быть как активным, так и пассивным, то поток растворенных веществ через каналы всегда пассивен.

11.2. Транспортеры и активный мембранный транспорт

Процесс переноса транспортером растворенной молекулы через липидный бислой похож на фермент-субстратную реакцию, и во многом транспортеры ведут себя как ферменты. Однако, в отличие от обычных фермент-субстратных реакций, переносчики не модифицируют транспортируемое вещество, доставляя его на другую сторону мембраны в неизменном виде.

Каждый тип транспортеров несет один или несколько сайтов связывания растворенного вещества (субстрата). Для переноса вещества через липидный бислой они претерпевают серию обратимых конформационных перестроек, в результате которых сайт связывания, располагавшийся с одной стороны мембраны, оказывается с другой. На **рис. 11.5** представлена схематичная модель работы транспортера. Когда транспортер насыщен (т.е. когда все сайты связывания заняты), скорость транспорта максимальна. Эта скорость, обозначаемая V_{\max} (V — velocity, скорость), является характеристикой транспортера. V_{\max} показывает, с какой скоростью

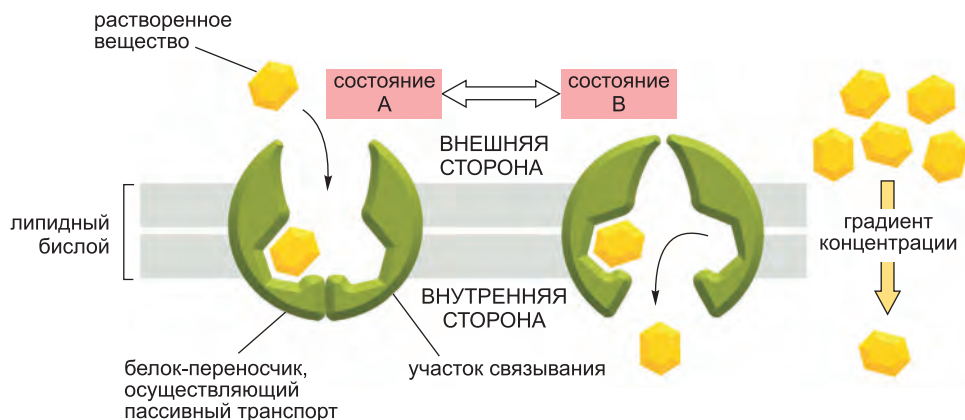


Рис. 11.5. Модель конформационной перестройки транспортера, приводящей к пассивному переносу растворенного вещества. Показанный переносчик может существовать в двух конформациях: в состоянии А сайты связывания растворенного вещества расположены на внешней поверхности бислоя; в состоянии В те же сайты оказываются с другой стороны бислоя. Переход между двумя конформациями может происходить случайно. Он обратим и не зависит от того, занят ли сайт связывания. Таким образом, если концентрация растворенного вещества выше с внешней стороны бислоя, с транспортером в состоянии А связывается больше молекул, чем в состоянии В, и, следовательно, суммарный транспорт будет происходить по градиенту концентрации (или, если растворенное вещество представляет собой ион, по электрохимическому градиенту).

переносчик может переходить из одного конформационного состояния в другое. Более того, каждый транспортер обладает характерным сродством к переносимому веществу, которое описывается константой реакции K_m , равной концентрации вещества при которой скорость транспорта равна половине максимального значения (рис. 11.6). Как и у всех ферментов, связывание растворенного вещества может быть специфически заблокировано либо конкурентными ингибиторами (которые борются за тот же сайт связывания и могут быть транспортированы), либо неконкурентными (аллостерическими) ингибиторами (которые связываются с другими участками переносчика и специфически изменяют его структуру).

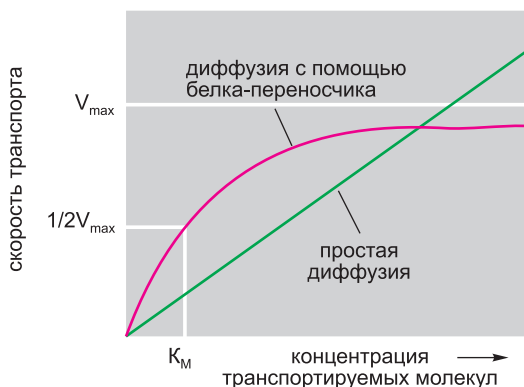


Рис. 11.6. Кинетика простой диффузии и опосредованной транспортером диффузии. Скорость простой диффузии всегда пропорциональна концентрации растворенного вещества, а скорость опосредованной переносчиком диффузии (облегченной диффузии) достигает максимума V_{max} при насыщении транспортера. Концентрация растворенного вещества, при которой скорость транспорта равна половине максимального значения, описывает константу связывания транспортера с веществом, аналогичную K_m фермента и субстрата. График справедлив для переносчика, транспортирующего единственное вещество; кинетика сопряженного транспорта двух и более веществ имеет более сложный характер.

Ниже мы обсудим, что необходима незначительная модификация представленной на рис. 11.5 модели, чтобы связать транспортер с источником энергии и заставить его перекачивать растворенное вещество против электрохимического градиента. Существует три основных пути активного транспорта в клетке (рис. 11.7):

1. *Сопряженные переносчики* объединяют транспорт одного растворенного вещества против градиента с транспортом другого по градиенту.

2. *АТФ-зависимые насосы*, используют энергию гидролиза АТФ для переноса молекул против градиента.

3. *Светозависимые насосы*, которые встречаются в основном у бактерий и архей, сопрягают транспорт против градиента с энергией света, как бактериородопсин (см. главу 10).

Сравнение аминокислотных последовательностей во многих случаях показало значительное сходство молекулярного устройства транспортеров, опосредующих активный транспорт, и пассивных переносчиков. Например, некоторые бактериальные переносчики, использующие для активного поглощения сахаров энергию, запасенную в градиенте H^+ через плазматическую мембрану, структурно похожи на переносчики, опосредующие пассивный транспорт глюкозы в большинстве животных клеток. Это указывает на эволюционное родство между различными транспортерами. Учитывая значение малых метаболитов и сахаров для обеспечения клетки энергией, неудивительно, что суперсемейство транспортеров является древним.

Мы начнем наше обсуждение активного транспорта с рассмотрения переносчиков, движущей силой работы которых являются ионные градиенты. Эти белки играют ключевую роль в транспорте малых метаболитов через мембраны всех клеток. Затем мы обсудим насосы, сопряженные с гидролизом АТФ, включая Na^+ -насос, присутствующий в плазматических мембранах почти всех клеток.

11.2.1. Движущей силой активного транспорта могут служить градиенты ионов

Некоторые транспортеры просто способствуют движению единственного растворенного вещества с одной стороны мембраны на другую со скоростью, определяемой их V_{max} и K_m ; такие переносчики называются **унипортерами**. Другие функционируют как *сопряженные транспортеры*, в которых перенос одного вещества

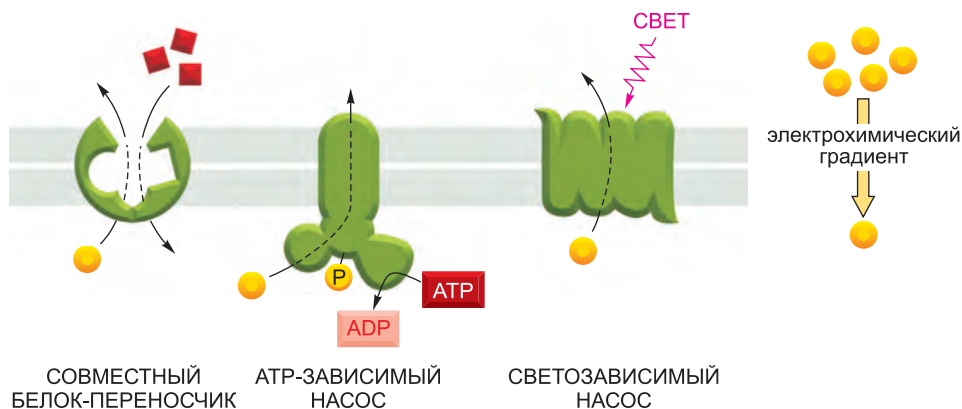


Рис. 11.7. Три способа обеспечения активного транспорта энергией. Активно транспортируемые молекулы показаны желтым, а источник энергии — красным.

строго зависит от переноса другого. Сопряженный транспорт представляет собой либо одновременный перенос второго вещества в том же направлении, осуществляемый **симпортами** (также называемыми *котранспортерами*), или перенос второго вещества в противоположном направлении, осуществляемый **антипортами** (также называемыми *обменниками*) (рис. 11.8).

Сопряжение переноса двух растворенных веществ позволяет сопряженным переносчикам использовать энергию электрохимического градиента одного из веществ, обычно иона, для переноса второго вещества. Таким образом, свободная энергия, высвобождаемая при движении неорганического иона по его электрохимическому градиенту, служит движущей силой для перекачки веществ против их электрохимического градиента. Принцип работает в обоих направлениях; некоторые сопряженные транспортеры работают как симпорты, другие — как антипорты. В плазматической мембране животных клеток Na^+ обычно служит котранспортным ионом, электрохимический градиент которого создает значительную движущую силу для активного транспорта второй молекулы. Вошедший в клетку в процессе активного транспорта Na^+ затем откачивается наружу АТФ-зависимым Na^+ -насосом плазматической мембраны (мы обсудим его ниже), который косвенно способствует транспорту, поддерживая градиент Na^+ . (По этой причине считается, что ион-зависимые переносчики осуществляют *вторичный активный транспорт*, тогда как АТФ-зависимые переносчики осуществляют *первичный активный транспорт*.)

Эпителиальные клетки кишечника и почек, например, содержат разнообразные симпорты, работа которых поддерживается мембранным градиентом Na^+ . Каждый Na^+ -зависимый симпорт специфичен по отношению к переносу в клетку определенной маленькой группы родственных сахаров или аминокислот. Растворенное вещество и Na^+ связываются с различными сайтами на транспортере. Поскольку Na^+ стремится проникнуть в клетку по электрохимическому градиенту, сахар или аминокислота до некоторой степени «затаскиваются» вместе с ним. Чем больше электрохимический градиент Na^+ , тем больше скорость входа второго вещества, и, наоборот, если концентрация Na^+ во внеклеточной жидкости падает, транспорт растворенного вещества снижается (рис. 11.9).

В бактериях и дрожжах, как и во многих окруженных мембраной органеллах животных клеток, большинство систем активного транспорта, зависящих от ионного

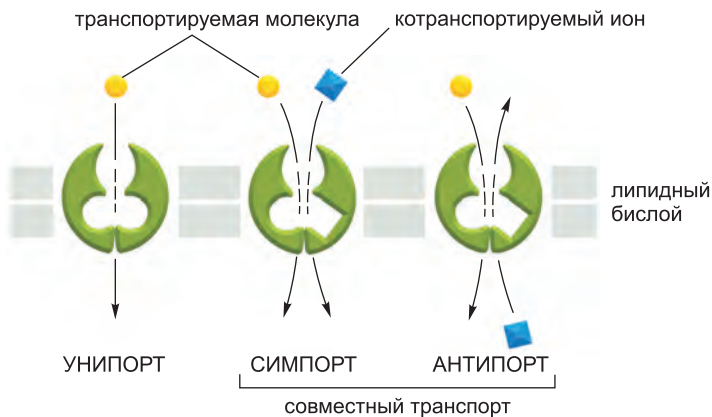


Рис. 11.8. Три типа сопряженного транспорта. На данной схеме показаны транспортеры, работающие как унипорт, симпорт и антипорт.

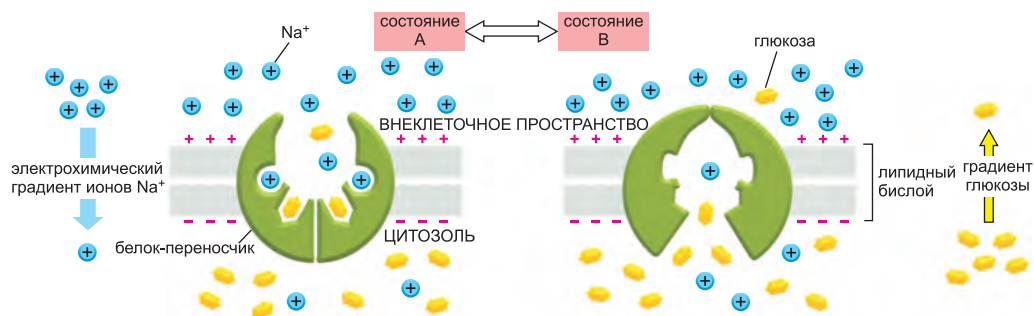


Рис. 11.9. Один из способов активного транспорта глюкозы за счет градиента Na^+ . Как и в модели, показанной на рисунке 11.5, транспортер колеблется между двумя альтернативными состояниями, А и В. В состоянии А белок открывается во внеклеточное пространство; в состоянии В он открывается в цитозоль. Связывание Na^+ и глюкозы кооперативно, т.е. связывание любого из лигандов вызывает конформационные перестройки белка, увеличивающие его сродство ко второму лиганду. Поскольку концентрация Na^+ во внеклеточном пространстве значительно больше, чем в цитозоле, глюкоза с большей вероятностью будет связываться с транспортером в состоянии А. Таким образом, Na^+ и глюкоза входят в клетку (посредством перехода $\text{A} \rightarrow \text{B}$) значительно чаще, чем выходят из нее (посредством перехода $\text{B} \rightarrow \text{A}$). В результате суммарный транспорт Na^+ и глюкозы будет направлен в клетку. Обратите внимание, что связывание кооперативно, и если одно из веществ отсутствует, другое не сможет связаться с транспортером. Таким образом, переносчик претерпевает конформационное переключение между двумя состояниями только тогда, когда с ним либо связаны оба вещества, либо ни одного.

градиента, использует градиент H^+ , а не Na^+ . Это отражается в преобладании в их мембранах H^+ -насосов и практически полном отсутствии Na^+ -насосов. Электрохимический градиент H^+ служит движущей силой активного транспорта многих сахаров и аминокислот через плазматическую мембрану и внутрь бактериальной клетки. Одним из наиболее изученных H^+ -зависимых симпортов является **лактозопермеаза**, которая переносит лактозу через плазматическую мембрану *E. coli*. Структурные и биофизические исследования пермеазы, наравне с глубоким анализом мутантных форм белка, привели к созданию подробной модели работы этого симпорта. Во время его транспортного цикла некоторые спирали совершают скользящие движения, заставляющие их наклоняться. Эти движения приводят к открыванию и закрыванию щели между спиралями, в которой расположены сайты связывания лактозы и H^+ , сначала на одной стороне мембраны, а затем — на другой (**рис. 11.10**).

11.2.2. Транспортеры плазматической мембраны регулируют pH цитоплазмы

Большинство белков требуют для своей оптимальной работы определенного pH. Лизосомальные ферменты, например, наиболее эффективны при низком pH (~5) лизосом, тогда как цитоплазматические ферменты лучше всего функционируют при нейтральном pH (~7,2) цитозоля. Таким образом, регуляция клеткой pH ее внутренних компартментов необходима для ее нормальной жизнедеятельности.

Большинство клеток несут в своей плазматической мембране один или несколько типов Na^+ -зависимых антипортов, которые помогают поддерживать pH цитоплазмы, равным 7,2. Эти транспортеры используют запасенную в градиенте Na^+ энергию для откачки избыточных H^+ , которые либо просачиваются внутрь клетки, либо синтезируются в реакциях образования кислот. Существует два механизма: либо

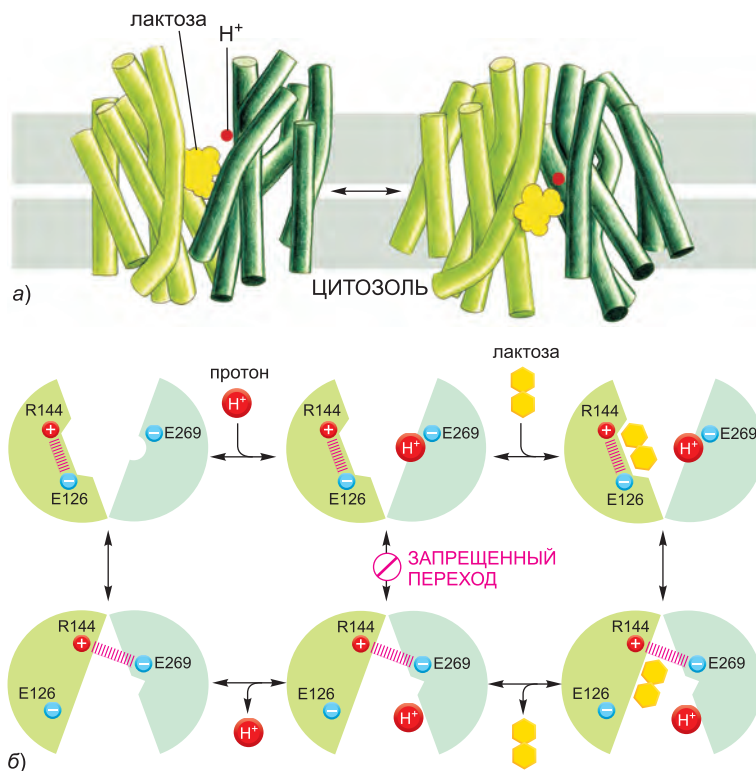


Рис. 11.10. Молекулярный механизм бактериальной лактозопермеазы, основанный на ее структуре. (а) 12 трансмембранных спиралей пермеазы объединяются в два блока, обозначенные разными оттенками зеленого. Для наглядности петли, соединяющие спирали по обеим сторонам мембраны, не показаны. В процессе транспорта спирали скользят и наклоняются в мембране, открывая сайты связывания дисахарида лактозы (желтая) и H^+ на одну из сторон мембраны. (б) В одном конформационном состоянии сайты связывания H^+ и лактозы доступны из внеклеточного пространства (верхний ряд), в другом они обращены в цитозоль (нижний ряд). Присоединение растворенных веществ с внеклеточной стороны предпочтительнее, поскольку аргинин R144 образует связь с глутаминовой кислотой E126, что делает E269 свободной для принятия H^+ . Более того, сайт связывания лактозы частично нарушается за счет перестройки спиралей. Поскольку переход между двумя протонированными состояниями (в центре) запрещен, H^+ может транспортироваться только совместно с лактозой. Таким образом, электрохимический градиент H^+ служит движущей силой импорта лактозы. (Адаптировано из J. Abramson et al., *Science* 301: 610–615, 2003. С любезного разрешения издательства AAAS.)

H^+ напрямую транспортируется наружу, либо в клетку переносится HCO_3^- для нейтрализации H^+ в цитозоле (в соответствии с реакцией $HCO_3^- + H^+ \rightarrow H_2O + CO_2$). Одним из антипортов, использующих первый механизм, является Na^+/H^+ -обменник, который сопрягает поток в клетку Na^+ с оттоком из нее H^+ . Одновременно оба эти механизма используются в Na^+ -зависимом Cl^-/HCO_3^- -обменнике, который сопрягает ток Na^+ и HCO_3^- в клетку с оттоком из нее Cl^- и H^+ (т.е. $NaHCO_3$ входит в клетку, а HCl выходит из нее). Na^+ -зависимый Cl^-/HCO_3^- -обменник вдвое эффективнее Na^+/H^+ -обменника: на каждый входящий в клетку Na^+ один H^+ он откачивает наружу, а второй нейтрализует. Если доступен HCO_3^- , как обычно и бывает, этот антипорт является наиболее важным транспортером, регулирующим

цитоплазматический pH. Внутриклеточный pH регулирует оба обменника; когда pH в цитозоле падает, оба обменника усиливают свою активность.

Na^+ -независимый Cl/HCO_3 -обменник действует на цитоплазматический pH противоположным образом. Как и в случае Na^+ -зависимых переносчиков, Na^+ -независимый Cl/HCO_3 -обменник регулируется pH, но его активность увеличивается, если цитозоль становится более щелочным. Движение HCO_3 в данном случае обычно направлено во внеклеточное пространство, по электрохимическому градиенту, что приводит к уменьшению pH цитозоля. Na^+ -независимый Cl/HCO_3 -обменник в мембране эритроцитов (так называемый белок полосы 3 — см. рис. 10.41) способствует быстрому высвобождению CO_2 (в форме HCO_3) при прохождении клеток через капилляры легких.

Внутриклеточный pH регулируется не только этими сопряженными транспортерами: АТР-зависимые H^+ -насосы также используются для контролирования pH многих внутриклеточных компартментов. Как мы обсудим в главе 13, H^+ -насосы поддерживают низкий pH лизосом, эндосом и секреторных пузырьков. Эти H^+ -насосы используют энергию гидролиза АТР для накачки H^+ из цитозоля в эти органеллы.

11.2.3. Асимметричное распределение транспортеров в эпителиальных клетках лежит в основе трансцеллюлярного транспорта растворенных веществ

В клетках эпителия транспортеры плазматической мембраны распределены неоднородно и, таким образом, вносят вклад в **трансцеллюлярный транспорт** поглощенных веществ. Это происходит, например, в клетках, всасывающих питательные вещества в кишечнике. За счет работы транспортеров в этих клетках растворенные вещества переносятся через слой эпителиальных клеток во внеклеточную жидкость, а оттуда в кровь. Как показано на [рис. 11.11](#), связанные с Na^+ симпорты, расположенные на апикальном (всасывающем) домене плазматической мембраны, активно транспортируют питательные вещества в клетку, создавая значительные концентрационные градиенты этих веществ через плазматическую мембрану. Na^+ -независимые транспортные белки в базальном и латеральном (базолатеральном) домене позволяют питательным веществам пассивно покидать клетку по их концентрационным градиентам.

Площадь плазматической мембраны многих эпителиальных клеток увеличивается за счет образования тысяч микроворсинок, которые представляют собой тонкие, похожие на пальцы выросты апикальной поверхности клетки. Такие микроворсинки позволяют увеличить общую площадь всасывания в 25 раз, усиливая таким образом транспортную способность мембраны.

Как мы видели, ионные градиенты играют ключевую роль в обеспечении энергией многих транспортных процессов клетки. Дальше мы обсудим ионные насосы, использующие для создания и поддержания этих градиентов энергию гидролиза АТР.

11.2.4. Существует три класса АТР-зависимых насосов

АТР-зависимые насосы часто называют *транспортными АТРазами*, поскольку они гидролизуют АТР до ADP и используют высвобождаемую энергию для перекачки ионов или других растворенных веществ через мембрану. Существует три

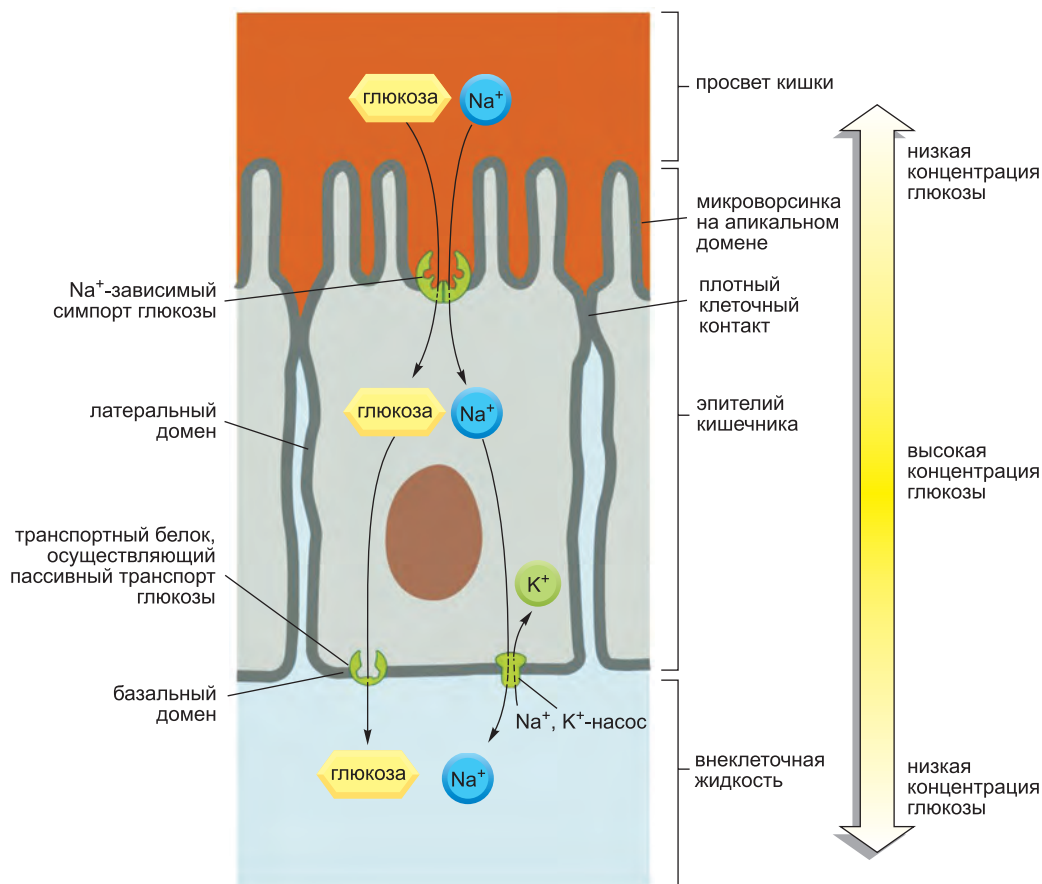


Рис. 11.11. Трансцеллюлярный транспорт. Трансцеллюлярный транспорт глюкозы через эпителиальную клетку зависит от неоднородного распределения транспортеров в плазматической мембране клетки. Показанный здесь процесс приводит к транспорту глюкозы из просвета кишечника во внеклеточную жидкость (откуда она переходит в кровь). Глюкоза закачивается в клетку через апикальный домен мембраны Na^+ -зависимым симпортом глюкозы. Глюкоза выходит из клетки (по градиенту концентрации) путем пассивного движения через другой транспортер глюкозы в базальном и латеральном мембранных доменах. Градиент Na^+ , обеспечивающий энергией симпорт глюкозы, создается Na^+ -насосом, расположенным в базальном и латеральном доменах плазматической мембраны. Этот Na^+ -насос поддерживает низкую концентрацию Na^+ внутри клетки. Соседние клетки связаны между собой плотными местами соединения, которые играют в приведенном процессе транспорта двойную роль. Во-первых, они не позволяют растворенным веществам проходить через эпителий между клетками, поддерживая градиент концентрации глюкозы поперек слоя клеток. Во-вторых, они служат в качестве барьеров для диффузии в пределах плазматической мембраны, что помогает различным транспортерам оставаться в соответствующих мембранных доменах (см. рис. 10.37).

класса АТФ-зависимых насосов (рис. 11.12), и представители каждого из них присутствуют во всех прокариотических и эукариотических клетках.

1. **Насосы Р-типа** представляют собой структурно и функционально родственные многопроходные белки. Они называются насосами Р-типа, потому что во время транспортного цикла они фосфорилируют себя. Этот класс включает в себя многие

ионные насосы, отвечающие за создание и поддержание градиентов Na^+ , K^+ , H^+ и Ca^{2+} через мембрану.

2. **Насосы F-типа** представляют собой роторные белки, состоящие из нескольких различных субъединиц. Они структурно отличаются от АТРаз Р-типа и располагаются в плазматической мембране бактерий, внутренней мембране митохондрий и тилакоидной мембране хлоропластов. Их часто называют *АТР-синтазами*, поскольку в норме они работают в обратном направлении: вместо того чтобы использовать гидролиз АТР для транспорта H^+ , они используют градиент H^+ через мембрану для синтеза АТР из АДФ и фосфата. Градиент H^+ создается либо в процессе транспорта электронов при окислительном фосфорилировании (в аэробных бактериях и митохондриях), либо в процессе фотосинтеза (в хлоропластах), либо за счет работы светозависимого H^+ -насоса (бактериородопсина) в *Halobacterium*. Мы подробно обсудим эти белки в главе 14.

Семейство АТРаз *V-типа* структурно родственно АТРамам F-типа. Эти белки в норме качают H^+ , а не синтезируют АТР. Они переносят H^+ в такие органеллы, как лизосомы, синаптические пузырьки и растительные вакуоли для закисления внутренней среды этих компартментов (см. рис. 13.36).

3. **АВС-переносчики** в основном транспортируют через клеточные мембраны малые молекулы. Этим они отличаются от АТРаз Р-, F- и V-типа, которые специализируются на ионах.

До конца данного раздела мы будем рассматривать насосы Р-типа и АВС-переносчики.

11.2.5. Ca^{2+} -насос является наиболее изученной АТРазой Р-типа

Эукариотические клетки поддерживают очень низкую концентрацию свободного Ca^{2+} в цитозоле ($\sim 10^{-7}$ М), тогда как во внеклеточной среде концентрация Ca^{2+} значительно выше ($\sim 10^{-3}$ М). Даже небольшое количество входящего кальция значительно увеличивает концентрацию свободного Ca^{2+} в цитозоле, и поток Ca^{2+} по градиенту концентрации в ответ на внеклеточные сигналы является одним из способов быстрой передачи этих сигналов через плазматическую мембрану (см. главу 15). Таким образом, для клетки важно поддерживать крутой градиент

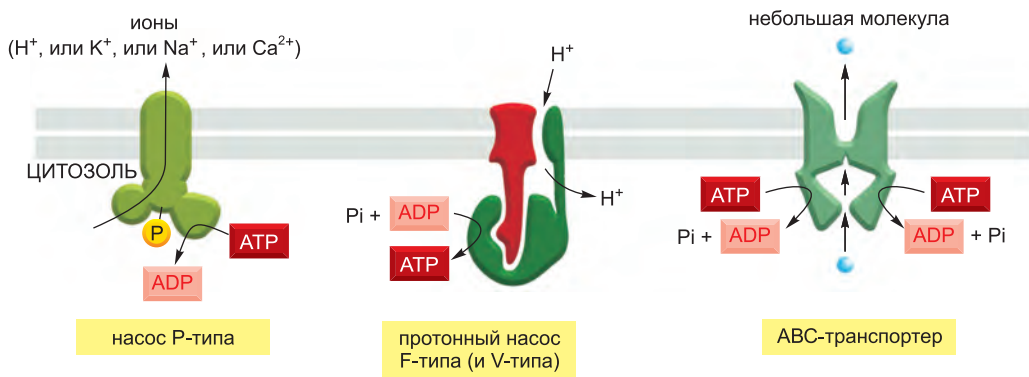


Рис. 11.12. Три типа АТР-зависимых насосов. Здесь схематично показаны различия молекулярного устройства насосов. Как и ферменты, насосы могут работать в обратном направлении: когда электрохимические градиенты растворенных веществ меняют направление, и отношение АТФ/АДФ мало, они могут синтезировать АТФ из АДФ, как показано для АТРАЗы F-типа, которая в норме работает в этом режиме.

Ca^{2+} через плазматическую мембрану. Транспортёры Ca^{2+} , активно откачивающие Ca^{2+} из клетки, помогают поддерживать такой градиент. Одним из них является Ca^{2+} -АТРаза Р-типа; другим — антипорт (так называемый $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -обменник), движущей силой работы которого служит электрохимический мембранный градиент Na^+ (см. рис. 15.41).

Наиболее изученная транспортная АТРаза Р-типа — **Ca^{2+} -насос**, или **Ca^{2+} -АТРаза, саркоплазматического ретикулума (СР)** клеток скелетных мышц. СР — это специализированный вид эндоплазматического ретикулума, формирующий сеть полых мешочков в цитоплазме мышечных клеток и служащий для внутриклеточного хранения Ca^{2+} . Когда потенциал действия деполяризует плазматическую мембрану мышечной клетки, Ca^{2+} высвобождается из СР в цитозоль через Ca^{2+} -каналы, что приводит к сокращению мышцы (см. главу 16). Ca^{2+} -насос, который составляет около 90% мембранного белка СР, возвращает кальций из цитозоля обратно в СР. Эндоплазматический ретикулум немышечных клеток несет сходный Ca^{2+} -насос, но в меньших количествах.

Трёхмерная структура Ca^{2+} -насоса СР расшифрована при помощи рентгеноструктурного анализа. Эта структура и анализ родственного H^+ -насоса грибов позволили получить первое представление о всех транспортных АТРазах Р-типа, которые, как предполагают, обладают сходной структурой. Они содержат 10 трансмембранных α -спиралей, три из которых образуют центральный канал, пересекающий липидный бислой. В нефосфорилированном состоянии две спирали нарушаются и формируют с цитоплазматической стороны мембраны щель, связывающую два иона Ca^{2+} . Связывание АТР с сайтом связывания на той же стороне мембраны и последующий перенос терминальной фосфатной группы АТР на аспарагиновую кислоту прилегающего домена приводит к значительной перестройке трансмембранных спиралей. Перестройка нарушает сайт связывания Ca^{2+} , и ионы высвобождаются на противоположной стороне мембраны в люмен СР (рис. 11.13). Характеристическим свойством всех насосов Р-типа является тот факт, что они фосфорилируют сами себя в процессе переноса ионов.

11.2.6. Na^+/K^+ -насос Р-типа плазматической мембраны создает градиент Na^+ через плазматическую мембрану

Обычно, концентрация K^+ внутри клетки в 10–30 раз больше, чем снаружи; обратное справедливо для Na^+ (см. таблицу 11.1, стр. 652). **Na^+/K^+ -насос**, или **Na^+ -насос**, присутствует в плазматической мембране практически всех клеток животных и поддерживает эту разницу концентраций. Насос работает как АТР-зависимый антипорт, активно откачивающий Na^+ из клетки против электрохимического градиента и закачивающий K^+ в клетку (рис. 11.14). Поскольку насос гидролизует АТР для транспорта Na^+ наружу и K^+ внутрь, его также называют **Na^+/K^+ -АТРазой**. Насос относится к семейству АТРаз Р-типа и очень похож на Ca^{2+} -насос (рис. 11.15).

Ранее мы упомянули, что градиент Na^+ , создаваемый Na^+/K^+ -насосом, служит движущей силой транспорта большинства питательных веществ в животные клетки, а также играет ключевую роль в регуляции цитоплазматического рН. Типичная животная клетка тратит почти треть своей энергии на поддержание работы этого насоса. Насос потребляет еще больше энергии в электрически активных нервных клетках, которые, как мы увидим ниже, в процессе передачи нервных импульсов поглощают небольшое количество Na^+ и теряют немного K^+ .

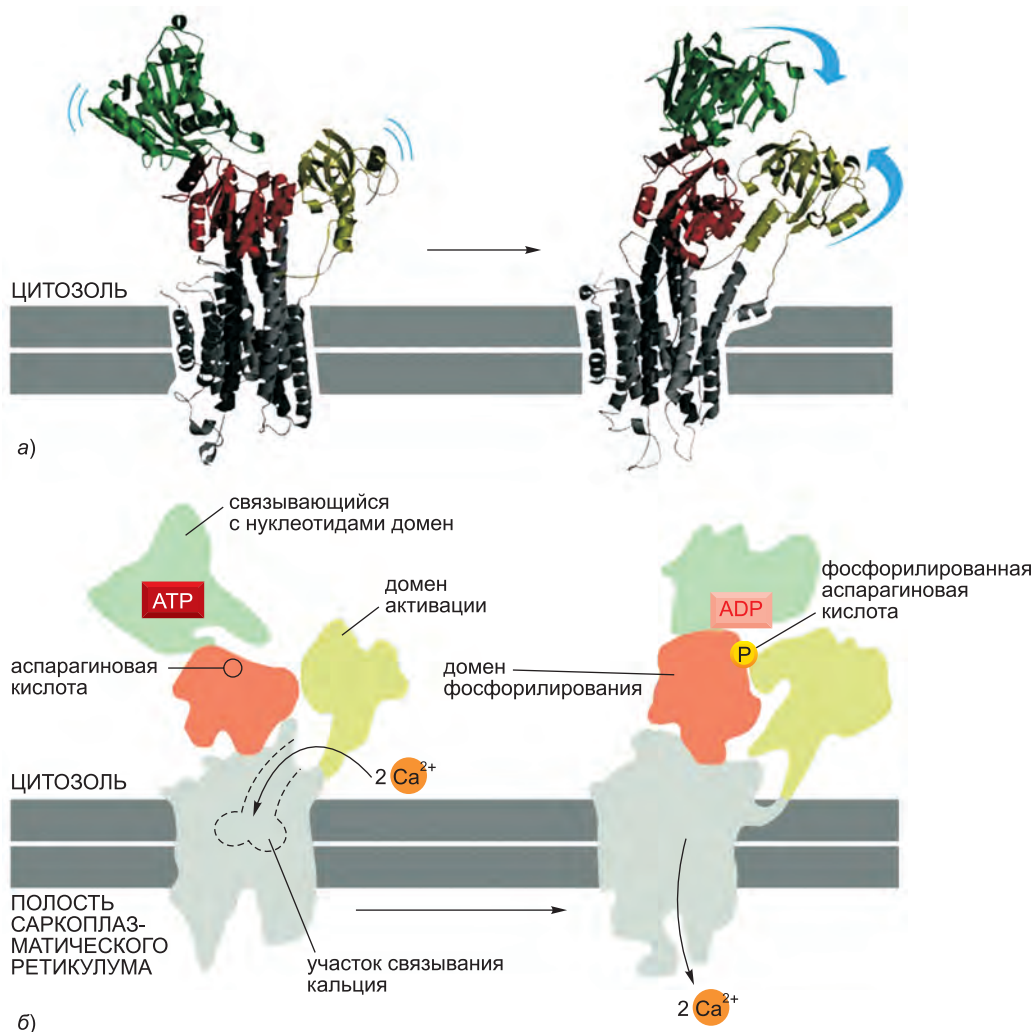


Рис. 11.13. Модель переноса Ca^{2+} -насосом саркоплазматического ретикулума. (а) Структуры нефосфорилированного, связанного с Ca^{2+} состояния (слева) и фосфорилированного, свободного от Ca^{2+} состояния (справа), расшифрованные методом рентгеноструктурного анализа. (б) Модель показывает, как связывание и гидролиз АТФ вызывают значительные конформационные изменения, приводящие к сближению нуклеотид-связывающего сайта и домена фосфорилирования. Предполагают, что эта перестройка приводит к повороту активаторного домена на 90° , что вызывает смещение трансмембранных спиралей, нарушающее Ca^{2+} -связывающую щель. В результате Ca^{2+} входит в люмен саркоплазматического ретикулума. (Адаптировано из С. Toyoshima et al., *Nature* 405: 647–655, 2000. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Как и любой фермент, Na^+/K^+ -насос может работать в обратном направлении, в данном случае для синтеза АТФ. Когда градиенты Na^+ и K^+ искусственно повышали до уровня, когда запасенная в них энергия становилась больше, чем химическая энергия гидролиза АТФ, эти ионы начинали мигрировать по своему электрохимическому градиенту, и Na^+/K^+ -насос начинал синтезировать АТФ из АДФ

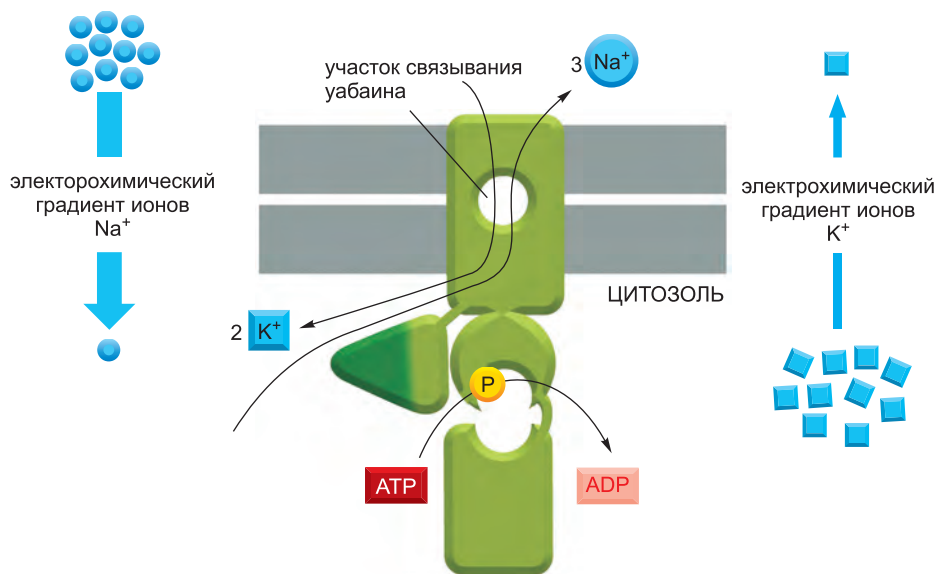


Рис. 11.14. Na^+/K^+ -насос. Этот транспортер активно откачивает Na^+ из клетки и закачивает в клетку K^+ против их электрохимических градиентов. На каждую гидролизованную внутри клетки молекулу АТФ из клетки выкачиваются три иона Na^+ и закачиваются два иона K^+ . Специфический ингибитор убаин и K^+ конкурируют за один сайт связывания на внеклеточной стороне насоса.

и фосфата. Таким образом, фосфорилированная форма насоса (шаг 2 на рисунке 11.15) может релаксировать либо путем переноса своего фосфата на ADP (шаг 2—шаг 1), либо путем изменения своей конформации (шаг 2—шаг 3). Как будет использовано суммарное изменение свободной энергии (для синтеза АТФ или для откачки Na^+ из клетки), зависит от относительных концентраций АТФ, ADP и фосфата и электрохимических градиентов Na^+ и K^+ .

Поскольку Na^+/K^+ -насос на два закачанных внутрь клетки положительно заряженных иона откачивает наружу три, он является *электрогенным*. Он создает суммарный электрический ток через мембрану и, следовательно, электрический потенциал. При этом клетка внутри заряжена отрицательно относительно внешней среды. Однако такое электрогенное действие насоса редко вносит более чем 10%-й вклад в мембранный потенциал. Остальные 90%, как мы обсудим ниже, зависят от Na^+/K^+ -насоса только косвенно.

С другой стороны, Na^+/K^+ -насос напрямую участвует в регуляции концентраций растворенных веществ внутри клетки и, следовательно, играет роль в контроле **осмолярности** (или *тоничности*) цитозоля. Все клетки в плазматической мембране содержат специализированные канальные белки, называемые *акватринами* (подробно описанными на **стр. 673(1158)**) и служащими для ускорения потока воды через мембрану. Таким образом, вода движется в клетку или из нее по градиенту концентрации; этот процесс называется *осмосом*. Как объясняется в **приложении 11.1**, клетка содержит высокие концентрации растворенных веществ, включая многочисленные отрицательно заряженные органические молекулы (так называемые *фиксированные анионы*) и сопутствующие им катионы, необходимые для уравнивания зарядов. За счет этого создается большой осмотический гради-

ВНЕКЛЕТОЧНОЕ ПРОСТРАНСТВО

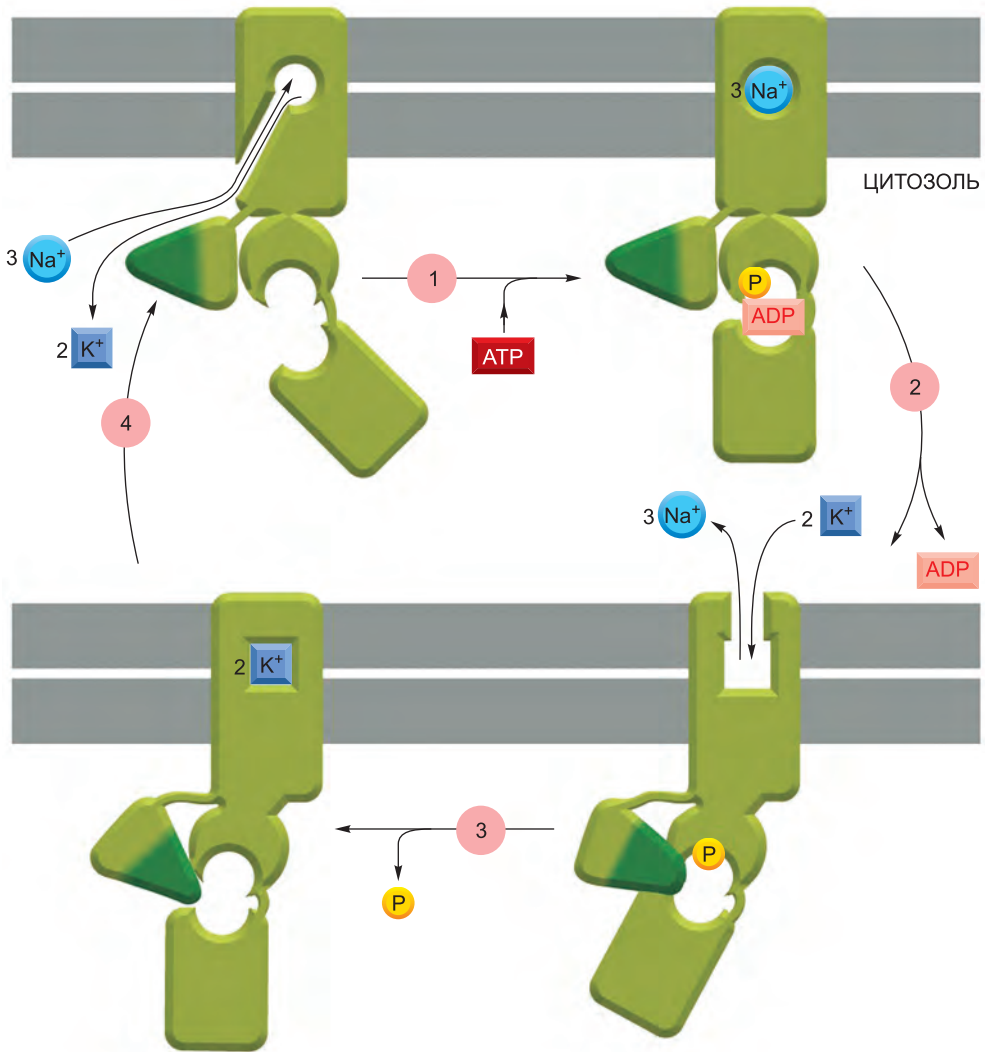


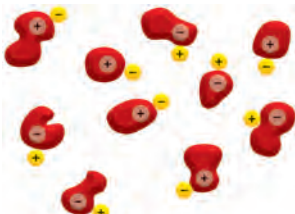
Рис. 11.15. Модель рабочего цикла Na^+/K^+ -насоса. (1) Связывание внутриклеточного Na^+ и последующее фосфорилирование за счет ATP на цитоплазматической стороне насоса вызывает конформационную перестройку насоса, благодаря которой (2) Na^+ переносится через мембрану и высвобождается снаружи клетки. (3) Затем связывание K^+ на внеклеточной поверхности и последующее дефосфорилирование насоса возвращает белок в его исходную конформацию, что (4) приводит к переносу K^+ через мембрану и его высвобождению в цитозоль. Конформационные перестройки аналогичны переходам $\text{A} \leftrightarrow \text{B}$, показанным на рис. 11.5, за исключением того, что здесь Na^+ -зависимое фосфорилирование и K^+ -зависимое дефосфорилирование белка вызывают упорядоченные изменения конформации, позволяющие белку совершать полезную работу. Для простоты на рисунке показаны сайты связывания одного иона Na^+ и одного иона K^+ , однако реальный насос несет три сайта связывания Na^+ и два – K^+ .

ент, стремящийся «притянуть» в клетку воду. Животные клетки противодействуют этому явлению путем создания противоположного осмотического градиента за счет высокой концентрации неорганических ионов, в основном Na^+ и Cl^- , во внеклеточ-

ИСТОЧНИКИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОЙ ОСМОЛЯРНОСТИ



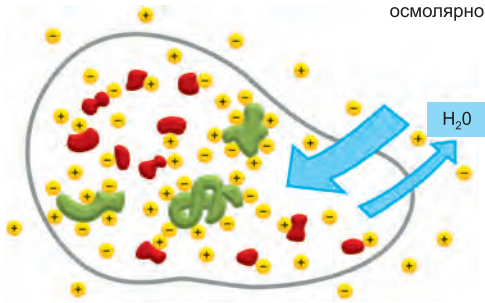
1 Несмотря на крупные размеры, сами по себе макромолекулы вносят очень небольшой вклад в осмотическую клетку, поскольку каждая из них считается одной молекулой и их относительно мало по сравнению с числом малых молекул в клетке. Однако большинство биологических молекул несут большие заряды и притягивают много неорганических ионов противоположного знака. За счет большой концентрации эти **противоионы** вносят значительный вклад во внутриклеточную осмотическую.



2 За счет активного транспорта и метаболических процессов клетка содержит высокую концентрацию малых органических молекул, для которых плазматическая мембрана непроницаема. К этим молекулам относятся сахара, аминокислоты и нуклеотиды. Поскольку большинство этих метаболитов заряжено, они также притягивают противоионы. Малые метаболиты и их противоионы вносят большой вклад во внутриклеточную осмотическую.



3 Осмотическая внеклеточной жидкости создается в основном маленькими неорганическими ионами. Они медленно движутся через плазматическую мембрану в клетку. Если их не откачивать и если в клетке нет других молекул, взаимодействующих с ними и влияющих на их распределение, в конце концов ионы придут в равновесие — их концентрации внутри и снаружи клетки выровняются. Однако присутствие в клетке заряженных метаболитов и макромолекул, притягивающих эти ионы, приводит к **эффекту Доннана**: общая концентрация неорганических ионов (и, следовательно, их вклад в осмотическую) становится в равновесии больше внутри клетки, чем снаружи.



ПРОБЛЕМА

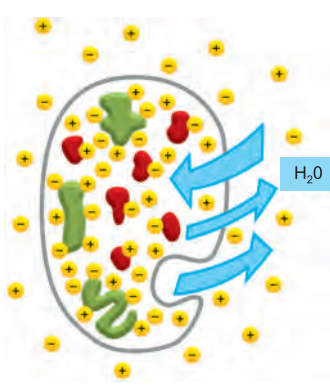
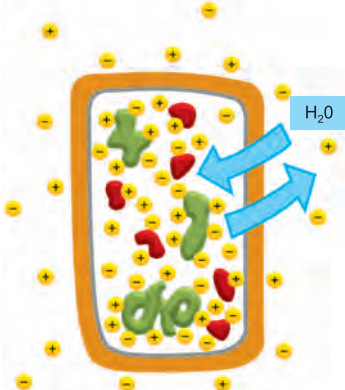
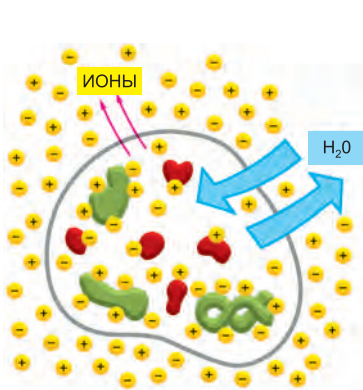
Перечисленные выше факторы приводят к тому, что если клетка ничего не делает для регуляции своей осмотической, концентрация растворенных веществ внутри клетки будет выше, чем снаружи. В результате концентрация воды снаружи будет больше, чем внутри. Эта разница заставит воду непрерывно идти через плазматическую мембрану в клетку за счет **осмоса**.

РЕШЕНИЕ

Клетки животных и бактерий регулируют свою внутриклеточную осмотическую путем активного откачивания неорганических ионов, например Na^+ . В результате концентрация неорганических ионов в цитоплазме меньше, чем во внеклеточной жидкости, что компенсирует избыток органических веществ в клетке.

Клетки растений не набухают благодаря жесткой клеточной стенке, и поэтому они способны выдерживать разницу осмотической внутри и снаружи клетки: создается внутреннее тургорное давление, которое в равновесии заставляет выходить из клетки столько же воды, сколько в нее вошло.

Многие простейшие не набухают в воде, несмотря на разность осмотической внутри и снаружи клетки, за счет периодического выталкивания воды из специальных сократительных вакуолей.



ной жидкости. Na^+/K^+ -насос помогает поддерживать осмотическое равновесие, откачивая Na^+ , просочившийся в клетку по электрохимическому градиенту. Cl^- не проходит в клетку благодаря мембранному потенциалу.

В случае красных кровяных клеток человека, у которых отсутствует ядро и другие органеллы, а плазматическая мембрана обладает высокой проницаемостью для воды, осмотическое движение воды может значительно влиять на объем клеток, и Na^+/K^+ -насос играет важную роль в поддержании допустимого объема эритроцитов. Если эти клетки поместить в *гипотонический раствор* (т. е. раствор с низкой концентрацией растворенных веществ и, следовательно, высокой концентрацией воды), вода начинает идти в клетки, в результате чего они набухают и разрываются (происходит лизис); и, наоборот, если клетки поместить в *гипертонический раствор*, они сжимаются (рис. 11.16). Роль Na^+/K^+ -насоса в регуляции объема эритроцитов установлена после обработки клеток ингибитором Na^+/K^+ -насоса *уабаином*, которая приводила к набуханию и разрыву клеток. Однако в большинстве животных клеток осмос и Na^+/K^+ -насос играют небольшую роль в регуляции клеточного объема, поскольку большая часть цитоплазмы находится в гелеподобном состоянии и сопротивляется значительным изменениям ее объема в ответ на изменения осмолярности.

Клетки других животных справляются с осмотическими проблемами разными способами. Клетки растений и многих бактерий не могут разорваться благодаря окружающей их плазматическую мембрану полужесткой клеточной стенке. У амёб осмотически проникающая в клетки избыточная вода заключается в сократительные вакуоли, которые периодически опорожняются во внешнюю среду (смотри приложение 11.1). Бактерии также обладают механизмами быстрого выведения ионов и в некоторых случаях даже макромолекул под воздействием осмотического шока.

11.2.7. АВС-переносчики составляют самое большое семейство мембранных транспортных белков

Последним типом белков-переносчиков является семейство **АВС-транспортёров**, названных таким образом потому, что каждый белок несет два высококонсервативных АТР-связывающих домена или АТР-связывающих «кассеты» (АТР-Вinding “Сassette”) (рис. 11.17). Связывание АТР приводит к димеризации двух АТР-связывающих доменов, а гидролиз АТР — к их диссоциации. Предполагается, что эти структурные



Рис. 11.16. Ответ красных клеток крови человека на изменение осмолярности внеклеточной жидкости. Клетки набухают или сжимаются при движении воды в клетку или из нее по градиенту концентрации.

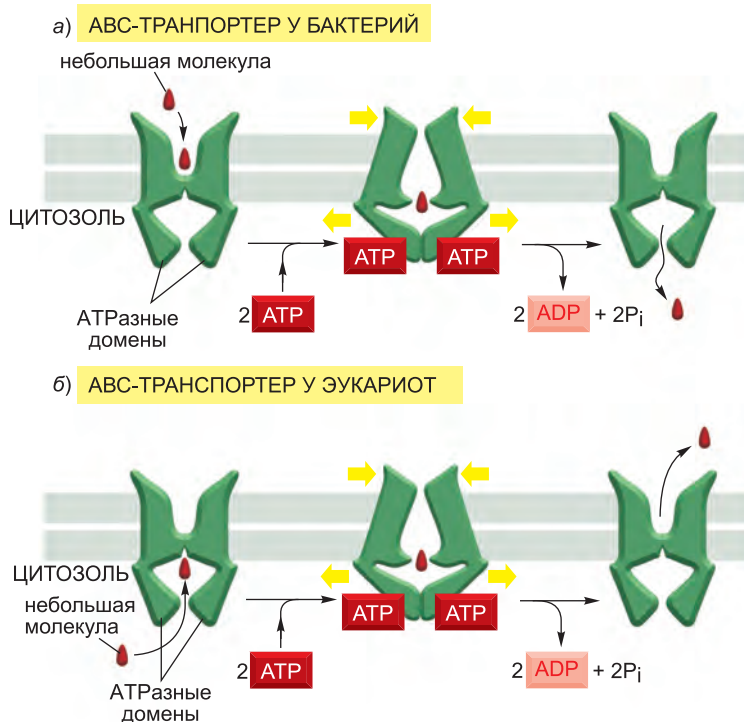


Рис. 11.17. Типичные АВС-транспортёры прокариот (а) и эукариот (б). Транспортёры состоят из нескольких доменов: обычно, из двух гидрофобных доменов, каждый из которых состоит из шести трансмембранных сегментов, формирующих путь переноса и определяющих субстратную специфичность, и двух АТФ-связывающих доменов (также называемых АТФ-связывающими кассетами), выступающих в цитозоль. В некоторых случаях обе половины транспортёра образованы одним полипептидом, тогда как в других случаях они состоят из двух и более полипептидов, упакованных в сходную структуру (см. рис. 10.24). В отсутствие связанного АТФ сайт связывания транспортёра располагается либо с внеклеточной стороны (у прокариот), либо с внутриклеточной стороны (у эукариот или прокариот). Связывание АТФ вызывает конформационные перестройки, в результате которых субстрат-связывающий «карман» переходит на другую сторону; гидролиз АТФ и последующая диссоциация АДФ возвращают транспортёр в его исходную конформацию. Большинство АВС-переносчиков работает в обоих направлениях. В бактериях обнаружены как импортирующие, так и экспортирующие АВС-транспортёры, но у эукариот почти все АВС-переносчики экспортируют вещества из цитозоля либо во внеклеточное пространство, либо в замкнутые мембранные компартменты, например ЭР или митохондрии.

изменения цитоплазматических доменов передаются на трансмембранные сегменты. В результате происходят дальнейшие конформационные перестройки, за счет которых сайты связывания субстрата становятся доступными сначала на одной стороне мембраны, а затем на другой. Таким образом, АВС-переносчики используют связывание и гидролиз АТФ для транспорта малых молекул через бислой.

АВС-транспортёры составляют самое большое семейство мембранных транспортных белков. Они имеют огромное медицинское значение. Первым был охарактеризован бактериальный белок этого семейства. Мы уже упоминали, что плазматическая мембрана всех бактерий содержит транспортёры, использующие градиент H^+ через мембрану для переноса различных питательных веществ в клетку.

Бактерии также обладают транспортными АТРазами, которые импортируют определенные малые молекулы за счет гидролиза АТФ. В таких бактериях, как *E. coli*, обладающих двойными мембранами (рис. 11.18), транспортные АТРазы расположены во внутренней мембране, и для захвата питательных веществ и их доставки к транспортерам они используют вспомогательные механизмы (рис. 11.19).

В *E. coli* 78 генов (5 % всех генов бактерий!) кодируют АВС-транспортеры. У животных это число еще больше. Несмотря на то что, как предполагается, каждый транспортер специфичен к определенной молекуле или классу молекул, разнообразие субстратов, транспортируемых этим суперсемейством, очень велико и включает в себя неорганические ионы, аминокислоты, моно- и полисахариды, пептиды и даже белки. Если бактериальные АВС-транспортеры используются как для импорта, так и для экспорта, у эукариот они, по-видимому, специализируются на экспорте.

В самом деле, первые идентифицированные эукариотические АВС-транспортеры обнаружили благодаря их способности откачивать гидрофобные лекарства из цитоплазмы. Одним из таких транспортеров является **белок множественной лекарственной устойчивости (MDR)**. Сверхэкспрессия этого белка в раковых клетках человека может привести к тому, что клетки станут устойчивыми одновременно ко множеству неродственных цитотоксичных лекарств, широко применяемых в химиотерапии рака. Лечение любым из этих препаратов может привести к селективному выживанию и разрастанию раковых клеток, которые экспрессируют больше транспортера MDR. Эти клетки очень эффективно откачивают лекарства из клетки и, следовательно, относительно устойчивы к токсическим эффектам противораковых препаратов. Таким образом, отбор раковых клеток, обладающих устойчивостью

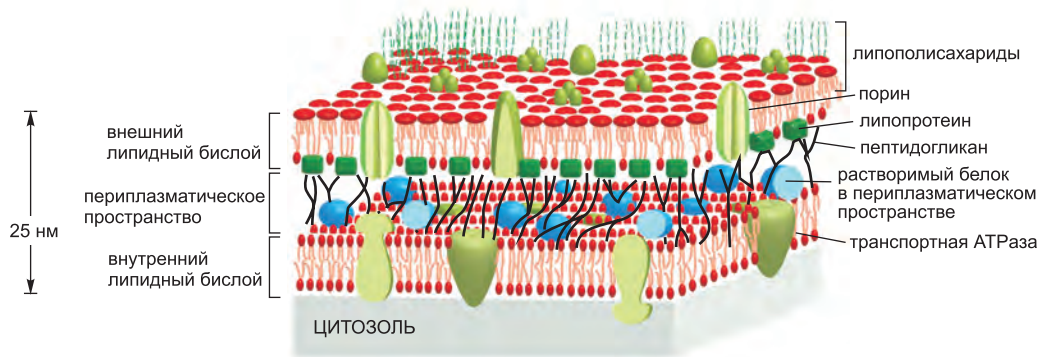


Рис. 11.18. Участок двойной мембраны бактерии *E. coli*. Внутренняя мембрана — это плазматическая мембрана клетки. Между внутренней и внешней липидными мембранами располагается пористый жесткий пептидогликановый слой, состоящий из белков и полисахаридов, — бактериальная клеточная стенка. Он соединен с липопотеиновыми молекулами во внешней мембране и заполняет *периплазматическое пространство* (показана только небольшая часть пептидогликанового слоя). Это пространство также содержит множество молекул растворимых белков. Пунктирными линиями (показаны зеленым) наверху рисунка обозначены полисахаридные цепи особых липополисахаридных молекул, формирующих наружный монослой внешней мембраны; для наглядности показано только несколько таких цепей. Бактерии с двойными мембранами называются *грамотрицательными*, поскольку они обесцвечиваются после промывки при окрашивании по Граму темно-синим красителем. Бактерии с одной мембраной (но более толстой клеточной стенкой), например стафилококки и стрептококки, после промывки остаются синими и поэтому называются *грамположительными*; их внутренняя мембрана аналогична внутренней (плазматической) мембране грамотрицательных бактерий.

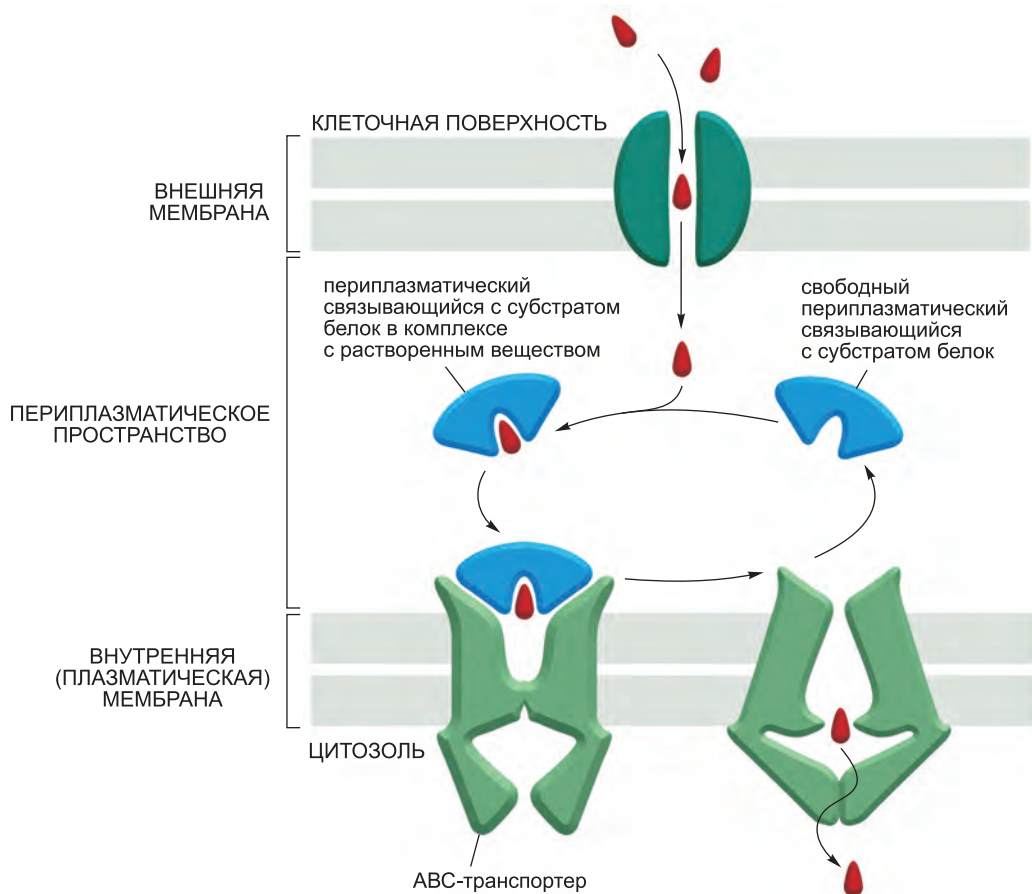


Рис. 11.19. Вспомогательные транспортные системы, связанные с транспортными АТРазами у бактерий с двойными мембранами. Растворенное вещество диффундирует через каналаобразующие белки (порины) во внешней мембране и связывается с периплазматическим субстрат-связывающим белком, который претерпевает конформационные перестройки, позволяющие ему связаться с ABC-транспортёром в плазматической мембране. Затем ABC-транспортёр связывает растворенное вещество и активно переносит его через плазматическую мембрану в реакции, сопряженной с гидролизом АТФ. Пептидогликан опущен для наглядности; его пористая структура позволяет субстрат-связывающим белкам и водорастворимым веществам двигаться посредством простой диффузии.

к одному лекарству, может привести к устойчивости к широкому спектру противораковых препаратов. Некоторые исследования показали, что до 40 % раковых состояний человека развивают множественную устойчивость, создавая серьезные препятствия в борьбе против этого заболевания.

Сходное и в равной степени губительное явление связано с простейшим *Plasmodium falciparum*, вызывающим малярию. Более 200 миллионов людей на планете заражены этим паразитом, который до сих пор остается распространенной причиной смерти, ежегодно убивая миллион человек. Развитие устойчивости к противомалярийному лекарству *хлорохину* затрудняет контроль малярии. У устойчивых *P. falciparum* появилось несколько копий гена, кодирующего ABC-транспортёр хлорохина.

В большинстве клеток позвоночных АВС-переносчик в мембране эндоплазматического ретикулума (ЭР) активно транспортирует разнообразные пептиды из цитозоля в люмен ЭР. Эти пептиды являются продуктом деградации белков в протеосомах (см. главу 6). Они переносятся из ЭР к поверхности клетки, где проверяются цитотоксичными Т-лимфоцитами. Если оказывается, что пептиды принадлежат вирусам или другим микроорганизмам, скрывающимся в цитозоле инфицированной клетки, Т-лимфоциты убивают эту клетку (см. главу 25).

Еще одним членом семейства АВС-транспортёров является белок *трансмембранный регулятор муковисцидоза* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductive Regulator, CFTR), который открыли при изучении распространенного генетического заболевания *муковисцидоза* (кистозного фиброза). Это заболевание вызывается мутацией гена, кодирующего CFTR, который функционирует в качестве Cl-канала в плазматической мембране эпителиальных клеток. CFTR регулирует концентрации ионов во внеклеточной жидкости, особенно в легких. Один из 27 представителей евразеидной расы несет ген, кодирующий мутантную форму этого белка; у одного из 2900 обе копии гена мутированы и, следовательно, развивается заболевание. В отличие от других АВС-транспортёров, в этом случае связывание и гидролиз АТФ не служат движущей силой процесса транспорта. Вместо этого они контролируют открывание и закрывание Cl-канала, по которому пассивно движется Cl по электрохимическому градиенту. Таким образом, АВС-белки могут функционировать и как транспортёры, и как каналы.

Заключение

Транспортёры связывают определенные растворенные вещества и переносят их через липидный бислой благодаря конформационным перестройкам, за счет которых сайт связывания вещества оказывается попеременно то на одной стороне мембраны, то на другой. Некоторые транспортёры просто переносят растворенное вещество по его электрохимическому градиенту, тогда как другие способны работать в качестве насосов и переносить вещество против градиента, используя для этого энергию гидролиза АТФ, градиент другого вещества (например, Na^+ или H^+) или свет для совершения последовательных конформационных перестроек. Транспортёры составляют небольшое число белковых семейств. Каждое семейство содержит белки со сходной аминокислотной последовательностью, работающие по сходному механизму и которые, предположительно, эволюционировали от общего белка-предка. Семейство транспортных АТФаз Р-типа, в которое входят Ca^{2+} - и Na^+/K^+ -насосы, является важным примером; каждая из этих АТФаз в течение рабочего цикла последовательно фосфорилирует и дефосфорилирует саму себя. Суперсемейство АВС-транспортёров является самым большим семейством мембранных транспортных белков и имеет важное медицинское значение. Оно включает в себя белки, ответственные за муковисцидоз, а также лекарственную устойчивость раковых клеток и вызывающих малярию паразитов.

11.3. Ионные каналы и электрические свойства мембран

В отличие от белков-переносчиков, каналные белки образуют в мембранах гидрофильные поры. Представители одного из классов каналных белков, присутствующие в практически всех животных клетках, формируют *щелевые контакты*

между соседними клетками; обе плазматические мембраны вносят равный вклад в образование канала, соединяющего цитоплазмы клеток. Эти каналы обсуждаются в главе 19, и здесь мы их рассматривать не будем. Щелевые контакты и *порины*, каналообразующие белки внешней мембраны бактерий, митохондрий и хлоропластов (см. главу 10), обладают относительно широкими и доступными порами, что было бы смертельно для клетки, если бы они напрямую соединяли цитозоль с внеклеточным пространством. В самом деле, многие бактериальные токсины именно так убивают другие клетки (см. главу 24).

С другой стороны, большинство канальных белков плазматической мембраны животных и растительных клеток, соединяющих цитозоль со внешней средой клетки, по необходимости обладают узкими, высокоселективными порами, которые могут быстро открываться и закрываться. Поскольку эти белки специфически связаны с транспортом неорганических ионов, их называют **ионными каналами**. Ионные каналы более эффективно транспортируют молекулы, чем белки-переносчики. Через открытый канал за одну секунду может пройти 100 миллионов ионов — это в 10^5 раз больше, чем скорость самого быстрого из известных белков-переносчиков. Однако каналы не могут быть сопряжены с каким-либо источником энергии, что необходимо для активного транспорта. Поэтому они опосредуют только пассивный (по градиенту) транспорт. Таким образом, функция ионных каналов состоит в том, чтобы позволить неорганическим ионам — Na^+ , K^+ , Ca^{2+} или Cl^- — быстро диффундировать через липидный бислой по их электрохимическому градиенту. Как мы увидим, способность регулировать ионные потоки через эти каналы лежит в основе многих клеточных функций. Нервные клетки (нейроны) особенно эффективно используют ионные каналы, и мы рассмотрим, какую роль различные каналы играют в получении, проведении и передаче сигналов.

11.3.1. Ионные каналы ион-селективны и флуктуируют между открытым и закрытым состояниями

Ионные каналы обладают двумя важными свойствами, отличающими их от простых заполненных водой пор. Во-первых, они обладают *ионной селективностью*, пропуская одни ионы, но не позволяя проходить другим. Это указывает на то, что их поры должны быть местами достаточно узкими, чтобы проходящие ионы входили в плотный контакт со стенками канала. Это необходимо для того, чтобы канал пропускал только ионы подходящего размера и заряда. Чтобы пройти, часто одной цепочкой, самую узкую часть канала, так называемый *селективный фильтр*, ионы должны лишиться почти всех связанных с ними молекул воды (**рис. 11.20**); это ограничивает скорость их транспорта. Таким образом, при увеличении концентрации ионов поток ионов через канал пропорционально увеличивается до тех пор, пока не достигает некоего максимального уровня (насыщения).

Вторым важным отличием ионных каналов от простых заполненных водой пор является то, что ионные каналы открыты не всегда. У них есть так называемые «ворота», которые позволяют им открываться на короткий промежуток времени и затем снова закрываться (**рис. 11.21**). Более того, при продолжительной (химической или электрической) стимуляции большинство каналов переходят в закрытое «невосприимчивое», или «инактивированное», состояние, в результате чего они перестают открываться до тех пор, пока стимул не прекращается, это мы обсудим позже. Основными типами стимулов, которые вызывают открывание ионных каналов,

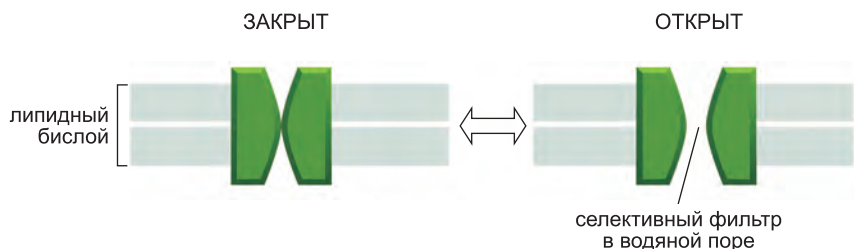


Рис. 11.20. Типичный ионный канал, флуктуирующий между открытым и закрытым состояниями. Показанный здесь в поперечном срезе каналный белок образует в липидном бислое гидрофильную пору только в «открытой» конформации. Предполагают, что стенки поры выстланы полярными группами, а боковые цепи гидрофобных аминокислот взаимодействуют с липидным бислоем (не показано). На одном из участков (в селективном фильтре) пора сужается до атомных размеров, что в значительной степени определяет селективность фильтра.

являются изменение трансмембранной разности потенциалов (*потенциал-зависимые каналы*), механическое давление (*механо-чувствительные каналы*) и связывание лиганда (*лиганд-зависимые каналы*). В качестве лиганда может выступать либо внеклеточный медиатор, а именно нейромедиатор (*медиатор-зависимые каналы*), либо внутриклеточный медиатор, например ион (*ион-зависимые каналы*) или нуклеотид (*нуклеотид-зависимые каналы*). Более того, активность многих каналов регулируется фосфорилированием и дефосфорилированием белка; этот тип регуляции каналов и нуклеотид-зависимые каналы рассмотрены в главе 15.

На данный момент описано более 100 типов ионных каналов, и до сих пор находят новые, каждый из которых характеризуется ионом, который он пропускает, механизмом регуляции и концентрацией и локализацией в клетке. Ионные каналы

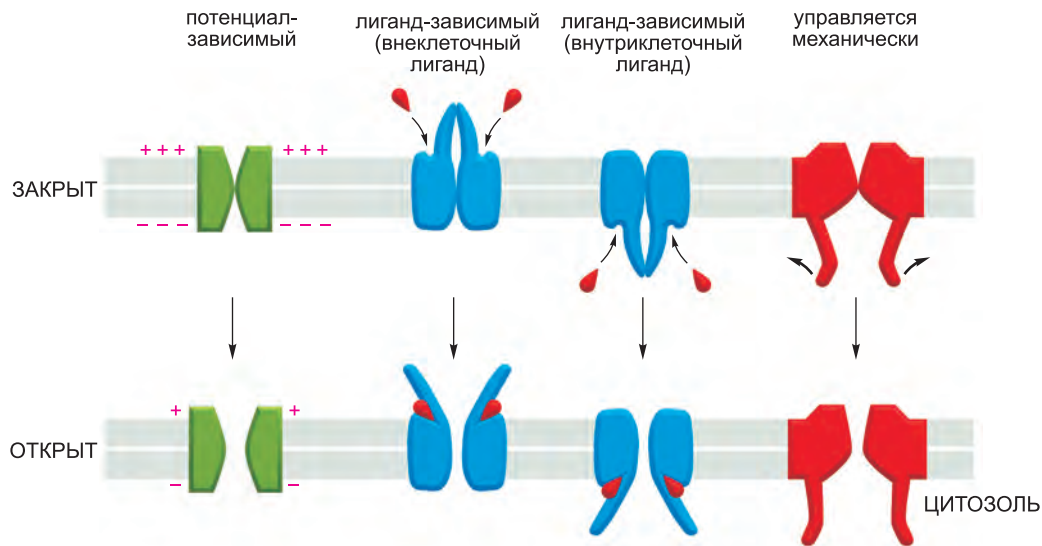


Рис. 11.21. Ворота ионных каналов. Показаны разные виды стимулов, открывающих ионные каналы. У механо-чувствительных каналов часто есть цитоплазматические ответвления, связывающие канал с цитоскелетом (не показано).

отвечают за электрическую возбудимость мышечных клеток, и они опосредуют большинство видов электрических сигналов в нервной системе. Отдельный нейрон может в норме нести 10 и более типов ионных каналов, располагающихся в различных доменах его плазматической мембраны. Но ионные каналы свойственны не только электрически возбудимым клеткам. Они присутствуют во всех животных клетках и встречаются в растительных клетках и микроорганизмах: например, они участвуют в процессе закрывания листьев мимозы и позволяют одноклеточному *Paramecium* менять направление движения после столкновения.

Возможно, наиболее распространенными ионными каналами являются каналы, проницаемые в основном для K^+ . Они располагаются в плазматической мембране практически всех животных клеток. Важный подвид K^+ -каналов открывается даже в не стимулируемой или «покоящейся» клетке, и поэтому эти каналы иногда называют **каналами утечки K^+** . Несмотря на то что этот термин, в зависимости от типа клетки, применяется ко многим различным K^+ -каналам, те выполняют одинаковую функцию. Делая плазматическую мембрану более проницаемой для K^+ , чем для других ионов, они играют ключевую роль в поддержании мембранного потенциала.

11.3.2. Мембранный потенциал животных клеток зависит в основном от каналов утечки K^+ и градиента K^+ через плазматическую мембрану

Мембранный потенциал возникает, когда заряды на двух сторонах мембраны не равны за счет небольшого избытка положительных ионов относительно отрицательных с одной стороны и небольшого дефицита с другой. Такая разница зарядов может возникать в результате работы электрогенных насосов (см. **стр. 662**) или за счет пассивной диффузии ионов. Как мы обсудим в главе 14, электрогенные H^+ -насосы во внутренней мембране митохондрий создают большую часть мембранного потенциала через эту мембрану. Электрогенные насосы также генерируют большую часть электрического потенциала плазматической мембраны растений и грибов. Однако в типичных животных клетках основной вклад в электрический потенциал плазматической мембраны вносит пассивное движение ионов.

Как описано выше, Na^+/K^+ -насос способствует поддержанию осмотического равновесия через клеточную мембрану животных клеток за счет уменьшения концентрации внутриклеточного Na^+ . Поскольку Na^+ внутри клетки мало, других катионов должно быть много для уравнивания зарядов фиксированных анионов клетки — отрицательно заряженных органических молекул, всегда присутствующих в клетке. Эту роль, в основном, выполняет K^+ , который активно закачивается внутрь клетки Na^+/K^+ -насосом и также может свободно проникать в клетку и выходить из нее через **каналы утечки**, расположенные в плазматической мембране. Благодаря этим каналам K^+ находится почти в равновесии, когда электрическая сила, создаваемая избыточными притягивающими K^+ в клетку отрицательными зарядами, компенсируется утечкой K^+ по его концентрационному градиенту. Мембранный потенциал является проявлением этой электрической силы, и мы можем рассчитать его равновесное значение из наклона градиента концентрации K^+ . Следующие рассуждения проясняют это утверждение.

Предположим, что исходно градиент напряжения через мембрану отсутствует (мембранный потенциал равен нулю), но концентрация K^+ велика внутри клетки и мала снаружи. K^+ будет стремиться покинуть клетку через каналы утечки за счет

градиента концентрации. K^+ начинает двигаться из клетки, и каждый ион оставляет неуравновешенный отрицательный заряд, что создает электрическое поле, или мембранный потенциал, который будет препятствовать дальнейшему выходу K^+ . Суммарный ток K^+ прекращается, когда мембранный потенциал достигает значения, при котором электрическая сила, действующая на K^+ , точно уравнивается влиянием концентрационного градиента, т. е. когда электрохимический градиент K^+ становится равным нулю. Несмотря на то что ионы Cl также находятся в равновесии, мембранный потенциал не позволяет большинству из них войти в клетку, поскольку они заряжены отрицательно.

Условие равновесия, при котором суммарный ток ионов через плазматическую мембрану отсутствует, определяет **потенциал покоя мембраны** такой идеализированной клетки. Простая, но очень важная формула — **уравнение Нернста** — количественно описывает условие равновесия и, как объяснено в **приложении 11.2**, позволяет рассчитать теоретический потенциал покоя мембраны при известных концентрациях ионов внутри и снаружи клетки. Однако поскольку плазматическая мембрана реальной клетки проницаема не только для K^+ и Cl , реальный потенциал покоя обычно немного отличается от предсказанного уравнением Нернста для ионов K^+ и Cl .

11.3.3. Потенциал покоя медленно убывает после остановки Na^+/K^+ -насоса

Для установления мембранного потенциала через плазматическую мембрану должно двигаться небольшое число ионов. Таким образом, можно считать, что мембранный потенциал возникает благодаря движению зарядов, практически не влияющему на *концентрации* ионов. В результате с двух сторон мембраны разница в числе положительных и отрицательных зарядов невелика (**рис. 11.22**). Более того, перенос ионов происходит очень быстро, обычно за миллисекунды или быстрее.

Рассмотрим изменение мембранного потенциала реальной клетки после внезапной инактивации Na^+/K^+ -насоса. Сразу происходит небольшое падение мембранного потенциала, поскольку насос электрогенен и в активном состоянии напрямую вносит небольшой вклад в мембранный потенциал, откачивая три иона Na^+ и закачивая два иона K^+ . Однако отключение насоса не влияет на большую составляющую потенциала покоя, создаваемую механизмом равновесия K^+ , описанным выше. Эта составляющая мембранного потенциала сохраняется до тех пор, пока концентрация Na^+ внутри клетки остается низкой, а концентрация K^+ — высокой, как правило, в течение многих минут. Но плазматическая мембрана в той или иной степени проницаема для всех малых ионов, включая Na^+ . Следовательно, без Na^+/K^+ -насоса создаваемые им ионные градиенты в конце концов исчезнут, и мембранный потенциал, наращенный за счет диффузии через каналы утечки K^+ , также упадет. При входе Na^+ нарушается осмотическое равновесие, и вода начинает проникать в клетку (см. приложение 11.1, **стр. 664**). В результате клетка через какое-то время приходит к новому состоянию покоя, при котором ионы Na^+ , K^+ и Cl находятся в равновесии с обеих сторон мембраны. Мембранный потенциал в этом состоянии значительно ниже, чем у нормальной клетки с активным Na^+/K^+ -насосом.

Потенциал покоя животной клетки изменяется от -20 мВ до -120 мВ в зависимости от организма и типа клетки. Несмотря на то что градиент K^+ всегда вносит

УРАВНЕНИЕ НЕРНСТА И ИОННЫЕ ТОКИ

Направление тока любого иона через мембранный каналый белок задает **электрохимический градиент** этого иона. Этот градиент складывается из двух эффектов: градиента напряжения и концентрационного градиента иона через мембрану. Когда эти два явления уравновешивают друг друга, электрохимический градиент иона равен нулю, и **суммарный** ток иона через канал отсутствует. Градиент напряжения (мембранный потенциал), при котором достигается это равновесие, называется **равновесным потенциалом** иона. Его можно рассчитать из **уравнения Нернста**, которое мы выведем ниже.

Уравнение Нернста имеет следующий вид:

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i},$$

где

V = равновесный потенциал в вольтах (внутренний потенциал минус внешний потенциал),

C_o and C_i = внешняя (outside) и внутренняя (inside) концентрации иона соответственно,

R = газовая постоянная ($2 \text{ ккал} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{К}^{-1}$),

T = абсолютная температура (К),

F = константа Фарадея ($2,3 \cdot 10^4 \text{ ккал} \cdot \text{В}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1}$),

z = валентность (заряд) иона,

\ln = логарифм с основанием e .

Уравнение Нернста выводится следующим образом:

молекула в растворе (растворенное вещество) движется из области высокой концентрации в область низкой концентрации просто за счет случайного движения молекул, что приводит к равновесию. Вследствие этого, движение по градиенту концентрации сопровождается выигрышем в свободной энергии ($\Delta G < 0$), тогда как движение против концентрационного градиента приводит к невыгодному изменению свободной энергии ($\Delta G > 0$). (Понятие свободной энергии водится в главе 2 и обсуждается в контексте окислительно-восстановительных реакций в приложении 14.1, **стр. ???**.)

Выигрыв в свободной энергии на моль растворенного вещества, перенесенного через плазматическую мембрану ($\Delta G_{\text{конц}}$), равен $-RT \ln C_o/C_i$.

Если растворенное вещество представляет собой ион, то перенос его через мембрану, чья внутренняя сторона относительно внешней обладает напряжением V , приведет к дополнительному изменению свободной энергии (на моль перенесенного вещества): $\Delta G_{\text{напр}} = zFV$.

В момент, когда градиенты напряжения и концентрации выравниваются:

$$\Delta G_{\text{конц}} + \Delta G_{\text{напр}} = 0,$$

распределение ионов с обеих сторон мембраны находится в равновесии.

Таким образом,

$$zFV - RT \ln \frac{C_o}{C_i} = 0$$

и, следовательно,

$$V = \frac{RT}{zF} \ln \frac{C_o}{C_i}$$

или, пересчитывая натуральный логарифм в десятичный,

$$V = 2,3 \frac{RT}{zF} \log_{10} \frac{C_o}{C_i}.$$

Для одновалентного иона

$$2,3 \frac{RT}{F} = 58 \text{ мВ при } 20^\circ\text{C} \text{ и } 61,5 \text{ мВ при } 37^\circ\text{C}.$$

Таким образом, для такого иона при 37°C

$$V = +61,5 \text{ мВ при } C_o/C_i = 10,$$

тогда как

$$V = 0 \text{ при } C_o/C_i = 1.$$

Например, равновесный потенциал по K^+ (V_K) равен

$$61,5 \log_{10} ([\text{K}^+]_o / [\text{K}^+]_i) \text{ милливольт}$$

$$(-89 \text{ мВ для типичной клетки, где } [\text{K}^+]_o = 5 \text{ mM} \text{ и } [\text{K}^+]_i = 140 \text{ mM}).$$

При V_K суммарный ток K^+ через мембрану отсутствует.

Точно так же, когда мембранный потенциал равен

$$61,5 \log_{10} ([\text{Na}^+]_o / [\text{Na}^+]_i),$$

равновесному потенциалу Na^+ (V_{Na}),

суммарный ток Na^+ равен нулю.

Для любого заданного мембранного потенциала V_M суммарная сила, заставляющая определенный тип ионов выходить из клетки, пропорциональна разности V_M и равновесного потенциала иона. Следовательно,

$$\text{для } \text{K}^+: V_M - V_K$$

$$\text{и для } \text{Na}^+: V_M - V_{\text{Na}}.$$

Число ионов, формирующих заряженный слой вблизи мембраны, мало по сравнению с общим числом этих ионов в клетке. Например, движения 6 000 ионов Na^+ через 1 $\mu\text{м}^2$ мембраны будет достаточно для изменения мембранного потенциала примерно на 100 мВ.

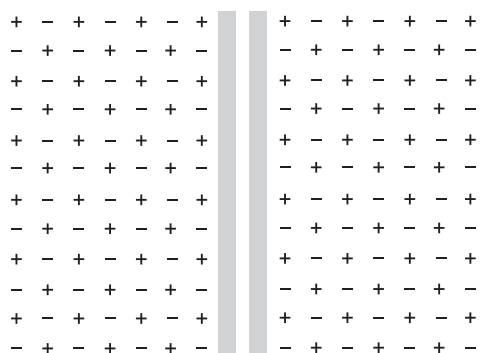
Поскольку в типичной клетке около $3 \cdot 10^7$ ионов Na^+ (1 $\mu\text{м}^3$ объема цитоплазмы), такое движение зарядов окажет пренебрежимо малое влияние на концентрационные градиенты ионов через мембрану.

значительный вклад в этот потенциал, градиенты других ионов (и нарушающее равновесие влияние других ионных насосов) также играют большую роль: чем больше проницаемость мембраны для данного иона, тем сильнее мембранный потенциал стремится к равновесному значению для этого иона. Следовательно, изменения проницаемости мембраны по отношению к ионам могут вызвать значительные изменения мембранного потенциала. Это один из ключевых принципов, связывающий электрическую возбудимость клеток с активностью ионных каналов.

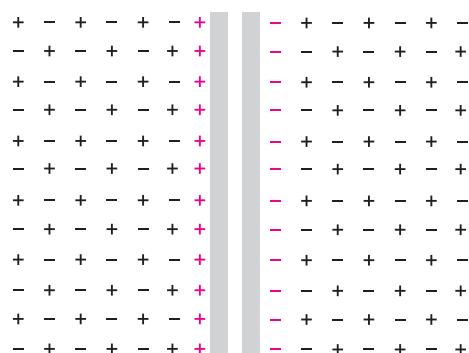
Чтобы понять, как ионные каналы отбирают свои ионы и как они открываются и закрываются, нам нужно знать их атомную структуру. Первым кристаллизованным и изученным методом рентгеновской дифракции ионным каналом был бактериальный канал K^+ . Информация о его структуре совершила переворот в нашем понимании ионных каналов.

11.3.4. Трехмерная структура бактериального K^+ -канала показывает, как ионный канал может функционировать

Ученые удивлялись способности ионных каналов совмещать ионную селективность и высокую проводимость. Каналы утечки K^+ , например, проводят K^+ в 10000 раз лучше, чем Na^+ , причем оба иона представляют собой ровные сферы и имеют сходный диаметр (0,133 и 0,095 нм соответственно). Единственная аминокислотная замена в поре животного K^+ -канала может привести к потере ионной селективности и гибели клетки. Нормальную селективность по K^+ нельзя объяснить размерами поры, поскольку Na^+ меньше, чем K^+ . Более того, высокая скорость



точное равенство зарядов на обеих сторонах мембраны; мембранный потенциал = 0



несколько положительно заряженных ионов (красные) пересекли мембрану справа налево, оставив с другой стороны отрицательно заряженные противоions (красные); при этом мембранный потенциал отличен от нуля

Рис. 11.22. Ионные основы мембранного потенциала. Небольшой поток ионов несет значительный заряд, способный привести к большим изменениям мембранного потенциала. Ионы, создающие мембранный потенциал, лежат в тонком (< 1 нм) поверхностном слое вблизи мембраны. Они удерживаются там за счет электростатического притяжения к своим противоположно заряженным аналогам (противоионам), расположенным с другой стороны мембраны. В случае типичной клетки перенесенный с одной стороны мембраны на другую 1 микрокулон заряда (6×10^{12} одновалентных ионов) на квадратный сантиметр поверхности изменяет мембранный потенциал примерно на 1 В. Это означает, например, что в случае сферической клетки диаметром 10 мкм для изменения на 100 мВ ее мембранного потенциала из клетки должно выйти лишь около 1/100 000 всех ионов K^+ цитозоля.

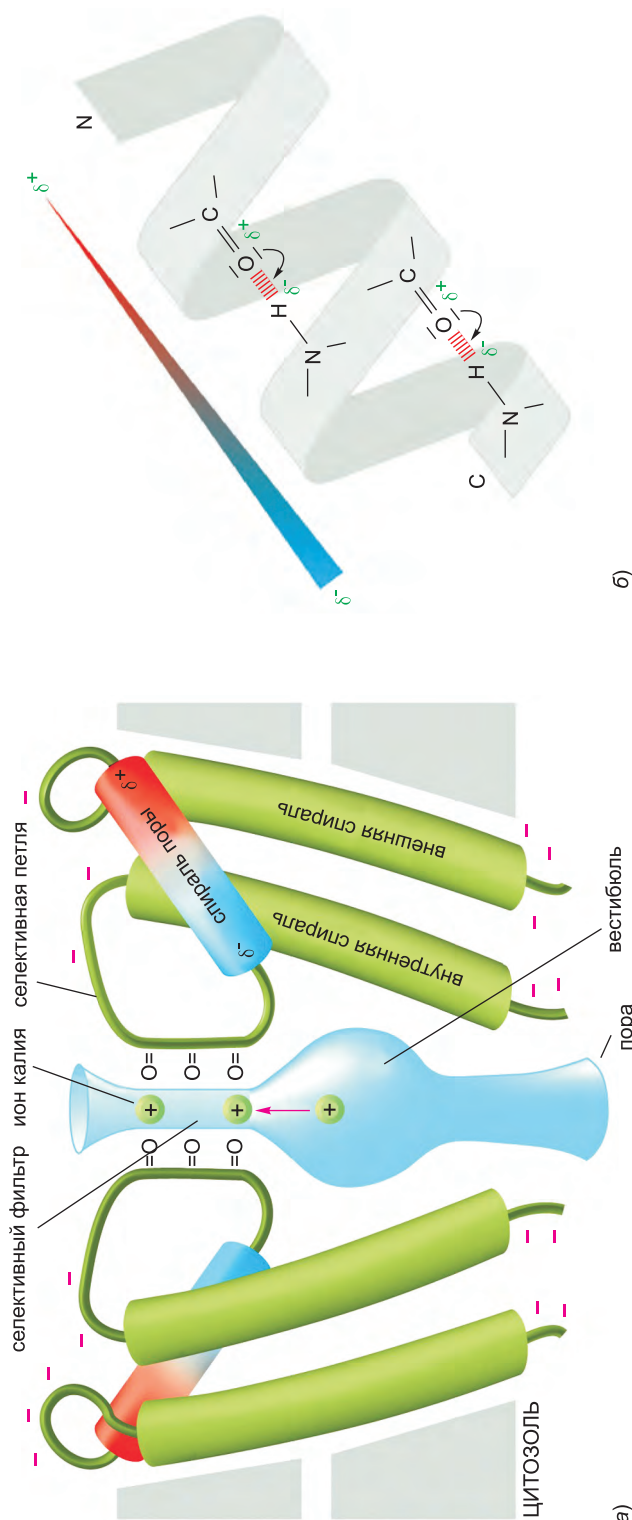


Рис. 11.23. Структура бактериального K^+ -канала. (а) Показаны две трансмембранные α -спирали двух из четырех одинаковых субъединиц. С цитоплазматической стороны пора открывает проход в центр мембраны. Он ускоряет транспорт, позволяя ионам K^+ оставаться гидратированными, несмотря на то что они уже прошли половину мембраны. Узкий селективный фильтр связывает вестибуль со внешней средой. Карбонильные кислороды выстилают стенки селективного фильтра и образуют временные сайты связывания для дегидратированных ионов K^+ . Положение ионов K^+ в поре определено путем вымачивания кристаллов канального белка в растворе, содержащем ионы рубидия, которые обладают большей электронной плотностью, но по размеру лишь немного превышают ионы K^+ ; положение ионов можно рассчитать по различиям в дифракционных картинах, полученных с ионами K^+ и ионами рубидия в канале. Два иона K^+ занимают сайты в селективном фильтре, тогда как третий K^+ располагается в центре вестибуля, где он стабилизируется электростатическими взаимодействиями с более отрицательно заряженными концами поровых спиралей. Концы четырех поровых спиралей (из которых показаны только две) направляются точно в центр вестибуля, таким образом управляя ионы K^+ в селективный фильтр. Вблизи входа и выхода канала сосредоточены отрицательно заряженные аминокислоты (обозначенные красными знаками минус). (б) Благодаря полярности водородных связей (красные), соединяющих соседние витки α -спирали, каждая α -спираль обладает электрическим диполем вдоль своей оси с более отрицательно заряженным С-концом (δ^-) и более положительно заряженным N-концом (δ^+). (а, адаптировано из D. A. Doyle et al., *Science* 280: 69–77, 1998. С любезного разрешения издательства AAAS.)

проводимости несовместима с наличием у канала селективных сайтов связывания K^+ с высоким сродством, потому что связывание ионов K^+ с такими сайтами значительно замедлило бы их перенос.

Тайну разгадали, когда с помощью рентгеноструктурного анализа расшифровали структуру *бактериального K^+ -канала*. Канал состоит из четырех одинаковых трансмембранных субъединиц, которые вместе образуют пору в мембране (**рис. 11.23**). Отрицательно заряженные аминокислоты, расположенные на цитоплазматическом отверстии поры, притягивают катионы и отталкивают анионы, что делает канал катион-селективным. Две α -спирали каждой субъединицы наклонены, и все вместе они образуют конус, широкий конец которого располагается на внешней поверхности клетки, откуда ионы K^+ покидают канал. Полипептидная цепь, соединяющая две трансмембранные спирали, образует короткую α -спираль (*поровую спираль*) и петлю, которая выступает в широкую часть конуса и образует **селективный фильтр**. Селективные петли четырех субъединиц формируют короткую, жесткую, узкую пору, выстланную карбонильными атомами кислорода их полипептидных скелетов. Поскольку селективные петли всех известных K^+ -каналов имеют сходные аминокислотные последовательности, можно предположить, что они образуют близкие структуры. На кристаллической структуре видны два последовательно расположенных иона K^+ на расстоянии 0,8 нм один от другого. Предполагается, что взаимное отталкивание этих ионов способствует их проталкиванию через пору во внеклеточную жидкость.

Структура селективного фильтра объясняет ионную селективность канала. Ион K^+ , для того чтобы войти в фильтр, должен лишиться почти всех связанных с ним молекул воды. Вместо них в поре он взаимодействует с карбонильными кислородами, выстилающими фильтр; кислорода располагаются таким образом, чтобы как можно эффективнее разместить ион K^+ . Ион Na^+ , с другой стороны, не может войти в фильтр, поскольку карбонильные кислорода расположены слишком далеко от более маленького Na^+ , чтобы компенсировать энергетические затраты, связанные с потерей воды при входе в канал (**рис. 11.24**).

Структурные исследования K^+ -каналов и других каналов также дали некоторую информацию о том, как каналы могут открываться и закрываться. Эти воротные механизмы, по-видимому, включают в себя движение спиралей в мембране, приводящее к блокированию (в закрытом состоянии) и освобождению (в открытом состоянии) пути движения иона. В зависимости от типа канала, спирали «ворот» могут наклоняться, вращаться или изгибаться. Структура закрытого K^+ -канала указывает на то, что за счет наклона внутренних спиралей пора на цитоплазматическом конце сокращается как диафрагма (**рис. 11.25**). Объемные гидрофобные боковые цепи аминокислот блокируют остающееся небольшое отверстие, препятствуя проникновению ионов.

Большинство ионных каналов состоит из нескольких одинаковых субъединиц, каждая из которых вносит вклад в общую центральную пору. Однако недавно расшифрованная структура Cl-канала показала, что некоторые ионные каналы строятся совсем по-другому. Несмотря на то что этот белок является димером, состоящим из двух одинаковых субъединиц, каждая из субъединиц обладает собственной порой, через которую движутся ионы Cl. В центре мембраны боковые цепи аминокислот образуют селективный фильтр, который концептуально сходен с фильтром K^+ -канала. Но, в отличие от последнего, здесь вклад вносят аминокислотные остатки различных частей белка, и их расположение лишено симметрии (**рис. 11.26**).

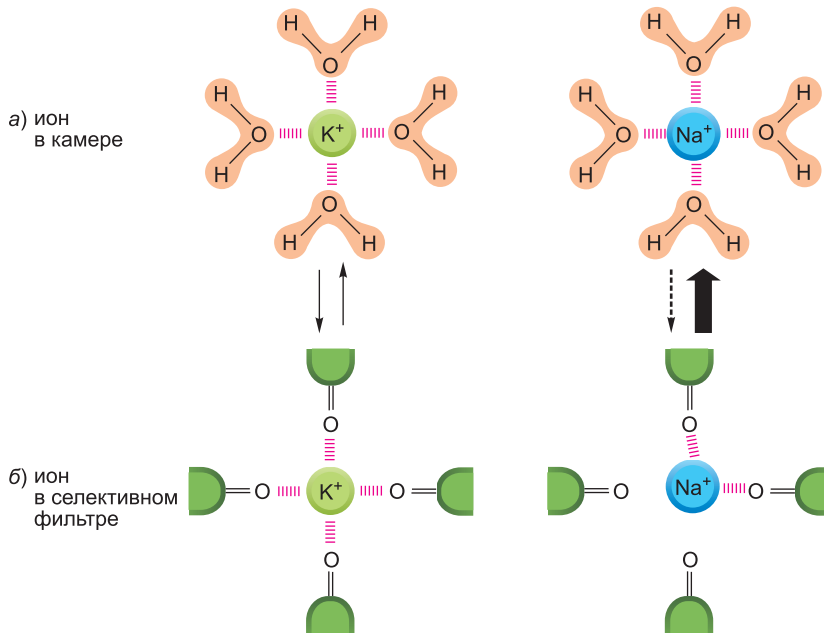


Рис. 11.24. Калиевая специфичность селективного фильтра K^+ -канала. На рисунке в поперечном срезе показаны ионы K^+ и Na^+ (а) в вестибуле и (б) в селективном фильтре поры. В вестибуле ионы гидратированы. В селективном фильтре они теряют свою воду, и карбонильные кислороды принимают дегидратированный ион K^+ . Дегидратация иона K^+ требует энергии, которая точно возмещается за счет взаимодействия иона с карбонильными кислородами, служащими заменой молекулам воды. Поскольку ион Na^+ слишком мал для того, чтобы взаимодействовать с кислородами, он может войти в селективный фильтр, только затратив большое количество энергии. Таким образом, фильтр отбирает ионы K^+ с высокой специфичностью. (Адаптировано из D.A. Doyle et al., *Science* 280: 69–77, 1998. С любезного разрешения издательства AAAS.)

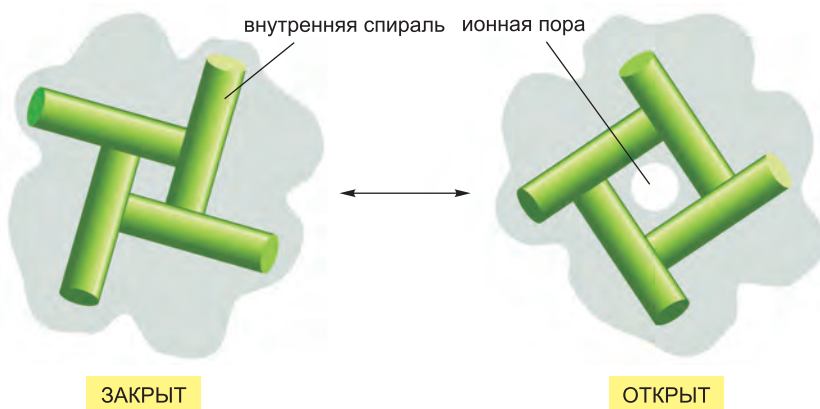


Рис. 11.25. Модель воротного механизма бактериального K^+ -канала. Показан поперечный срез канала. Для принятия закрытой конформации четыре внутренние трансмембранные спирали, образующие пору на цитоплазматической стороне селективного фильтра (см. рис. 11.23), меняют свое положение и закрывают цитоплазматический вход в канал. (Адаптировано из E. Perozo et al., *Science* 285: 73–78, 1999. С любезного разрешения издательства AAAS.)

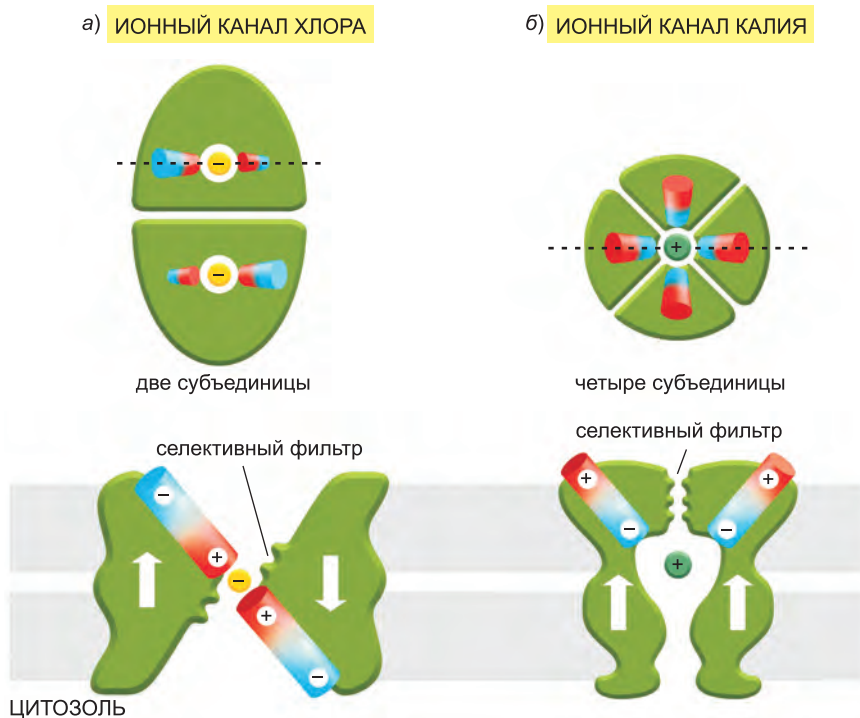


Рис. 11.26. Сравнение архитектуры каналов Cl^- и K^+ . (а) Cl^- -канал представляет собой «двуканальный» димер, состоящий из двух одинаковых субъединиц, каждая из которых содержит свою собственную проводящую ионную пору. Вверху схематически показана внеклеточная поверхность канала и две одинаковые проводящие ионные поры. Внизу показан продольный срез одной субъединицы. (Черная пунктирная линия на верхнем рисунке показывает плоскость среза.) Субъединица представляет собой единственную полипептидную цепь, состоящую из двух участков, которые, несмотря на свою идентичность, пересекают мембрану в противоположных направлениях (белые стрелки). Каждый участок подключен к одной поровой спирали, ориентированной таким образом, что ее положительно заряженный конец направлен в сторону центрально расположенного селективного фильтра. Оба элемента, селективный фильтр и спиральные диполи, вносят вклад в селективность канала по отношению к отрицательно заряженным ионам Cl^- . (б) С другой стороны, K^+ -канал представляет собой тетрамер, состоящий из четырех одинаковых субъединиц, каждая из которых вносит вклад в центрально расположенную пору. Все четыре субъединицы одинаково ориентированы в мембране (белые стрелки). Отрицательно заряженные концы четырех поровых спиралей (по одной от каждой субъединицы) направлены в вестибуль и стабилизируют там положительный ион K^+ (также см. рис. 11.23). (Нижние рисунки на а и б адаптированы из R. Dutzler et al., *Nature* 415: 287–294, 2002. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

11.3.5. Аквапорины проницаемы для воды, но непроницаемы для ионов

Ранее мы упоминали, что прокариотические и эукариотические клетки в плазматической мембране содержат **водные каналы**, или **аквапорины**, позволяющие воде пересекать мембрану. Аквапоринов особенно много в клетках, которым необходимо быстро транспортировать воду, например в эпителиальных клетках и клетках почек.

Аквапорины решают обратную стоящей перед ионными каналами задачу. Для того чтобы не нарушать ионные градиенты через мембрану, они должны быстро пропускать молекулы воды, но полностью блокировать прохождение ионов. Кристаллическая структура аквапоринов позволила понять, как они достигают такой удивительной селективности. В каналах располагается узкая пора, позволяющая молекулам воды пересекать мембрану друг за другом вдоль цепочки карбонильных кислородов, выстилающих одну сторону поры (рис. 11.27, а и б). Другую сторону поры выстилают гидрофобные аминокислоты. Пора слишком узка для входа гидратированных ионов, а на дегидратацию потребовалось бы слишком много энергии,

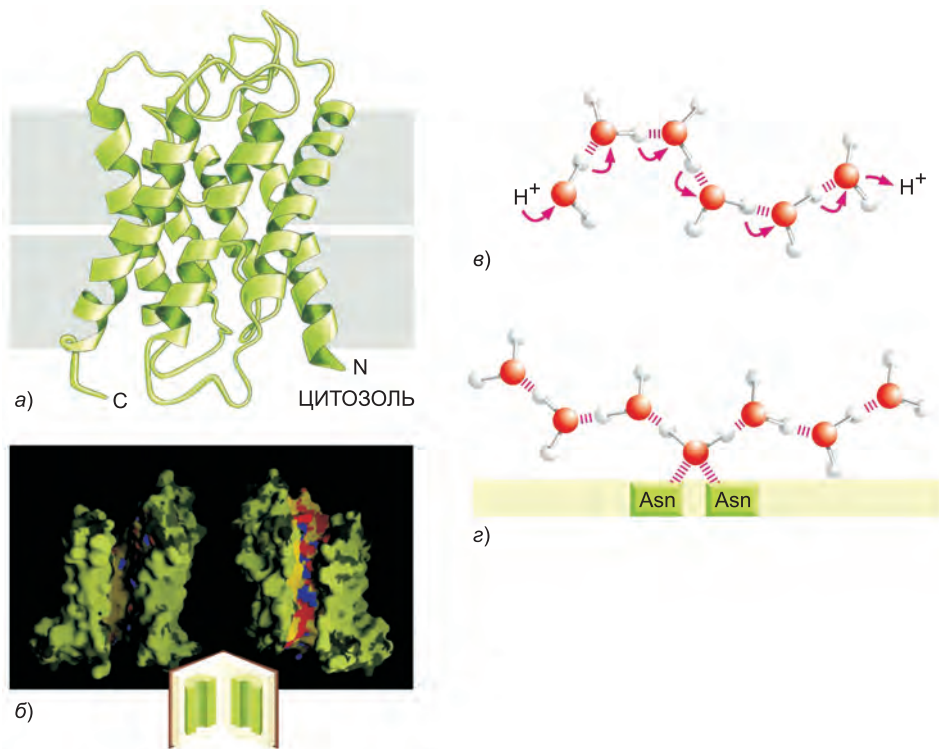


Рис. 11.27. Структура аквапоринов. (а) Ленточная диаграмма мономера аквапорина. В мембране аквапорины объединяются в тетрамеры, каждый мономер которых имеет пору в центре (не показано). (б) Пространственная модель мономера разрезанного и открытого как книга аквапорина. Видна внутренняя пора. Гидрофильные аминокислоты, выстилающие пору, окрашены красным и синим, гидрофобные — желтым. Аминокислоты, не участвующие в образовании поры, показаны зеленым. Обратите внимание, что одна сторона поры состоит преимущественно из гидрофильных аминокислот, образующих короткоживущие водородные связи с молекулами воды; эти связи способствуют ориентации и выстраиванию в один ряд транспортируемых через мембрану молекул воды. С другой стороны, сторона поры, лишенная таких аминокислот, создает гидрофобный желоб, не допускающий образования водородных связей. (в и г) Модель, объясняющая, почему аквапорины непроницаемы для H^+ . (в) В воде H^+ очень быстро диффундирует, переходя с одной молекулы воды на другую. (г) Два стратегически расположенных в центре каждой аквапориновой поры аспарагина способствуют замедлению движения центральной молекулы воды таким образом, что обе валентности ее кислорода становятся занятыми. В результате H^+ не способен к ней присоединиться. (а и б, адаптировано из R. M. Stroud et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.* 13: 424–431, 2003. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

поскольку гидрофобная стенка поры не может взаимодействовать с дегидратированным ионом и компенсировать потерю воды. Такое строение канала объясняет, почему аквапорины не проводят ионы K^+ , Na^+ , Ca^{2+} или Cl^- . Чтобы понять, почему эти каналы также непроницаемы для H^+ , вспомним, что большинство протонов в клетке присутствуют в форме H_3O^+ . Они очень быстро диффундируют через воду, используя молекулярный эстафетный механизм, требующий разрушения и создания водородных связей между соседними молекулами воды (рис. 11.27, в). У аквапоринов есть два стратегически расположенных аспарагина, которые связываются с атомом кислорода центральной молекулы воды в проходящей через пору цепочке водных молекул. Поскольку обе валентности этого кислорода недоступны для образования водородных связей, центральная молекула воды не может участвовать в протонной эстафете, и, таким образом, пора непроницаема для H^+ (рис. 11.27, в и г).

Некоторые сходные с аквапориными бактериальные водные каналы также проводят глицерин и малые сахара, которые взаимодействуют со сходным образом расположенными в стенке поры карбонильными кислородами. Такие временные контакты, возникающие между растворенными веществами и стенками поры, делают транспорт высокоспецифичным, почти не влияя при этом на скорость прохождения молекул. Каждый отдельный аквапориновый канал пропускает примерно 10^9 молекул воды в секунду.

Наиболее эффективно каналы используют нейроны. Прежде чем обсуждать, как они это делают, кратко опишем строение типичного нейрона.

11.3.6. В основе функционирования нейронов лежит их вытянутая форма

Фундаментальной задачей **нейрона**, или **нервной клетки**, является получение, проведение и передача сигналов. Для выполнения этих функций нейроны часто имеют очень большую длину. Длина единственного нейрона человека, тянущегося, например, от спинного мозга до мышцы стопы, может составлять 1 метр. Каждый нейрон состоит из тела (содержащего ядро) и нескольких отходящих от него отростков. Обычно, один длинный аксон передает сигналы от тела нейрона к удаленным клеткам-мишеням, а несколько более коротких дендритов выходят из тела клетки как антенны, увеличивая площадь поверхности для получения сигналов от аксонов других нейронов (рис. 11.28). Тело клетки само по себе также принимает сигналы. Типичный аксон на своем дальнем конце разветвляется, передавая сигнал одновременно на множество клеток-мишеней. Дендриты также могут сильно ветвиться, в некоторых случаях настолько, что способны принимать до 100 000 входящих сигналов на единственный нейрон.

Несмотря на то что разные классы нейронов передают разные по важности сигналы, форма сигнала всегда одна и та же — это изменение электрического потенциала плазматической мембраны нейрона. Сигнал распространяется за счет возникающего в одной части клетки электрического возмущения, охватывающего другие части. Однако если нейрон не будет затрачивать энергию на распространение возмущения, оно со временем ослабнет. На коротких расстояниях такое затухание не имеет большого значения; в самом деле, многие небольшие нейроны передают сигналы пассивно, без усиления. Но для передачи на большие расстояния пассивное распространение не работает. Таким образом, более крупные нейроны используют активный механизм сигнализации, который можно назвать их наиболее удивительным свойством. Электрический стимул, превышающий некоторую пороговую

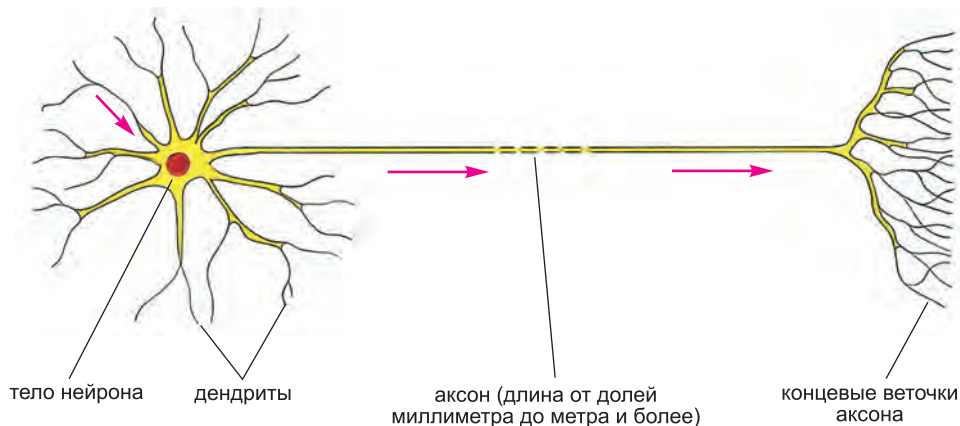


Рис. 11.28. Типичный нейрон позвоночных. Стрелками показано направление распространения сигнала. Единственный аксон проводит сигналы от тела клетки, тогда как многочисленные дендриты (и тело нейрона) принимают сигналы от аксонов других нейронов. Нервные окончания располагаются на дендритах или теле клетки других нейронов или на клетках других типов, например мышечных клетках или клетках желез.

амплитуду, запускает взрыв электрической активности, быстро распространяющийся вдоль плазматической мембраны нейрона. Он автоматически поддерживается механизмами усиления. Такая бегущая волна электрического возбуждения, известная как **потенциал действия**, или *нервный импульс*, может передавать сигнал без затухания от одного конца нейрона на другой со скоростью до 100 метров в секунду и даже быстрее. Потенциалы действия напрямую вытекают из свойств потенциал-зависимых катионных каналов, которые мы сейчас рассмотрим.

11.3.7. Потенциал-зависимые катионные каналы генерируют потенциал действия в электрически возбудимых клетках

Плазматическая мембрана всех электрически возбудимых клеток — не только нейронов, но и эндокринных и мышечных клеток и яйцеклеток, — содержит **потенциал-зависимые катионные каналы**, отвечающие за генерацию потенциала действия. Потенциал действия начинается с *деполяризации* плазматической мембраны, когда мембранный потенциал становится внутри менее отрицательным. (Позже мы увидим, как нейромедиаторы вызывают деполяризацию.) В нервных клетках и клетках скелетных мышц стимул, вызывающий достаточную деполяризацию, быстро приводит к открыванию **потенциал-зависимых Na^+ -каналов**, что позволяет небольшому количеству Na^+ войти в клетку по его электрохимическому градиенту. Входящий ток положительных зарядов еще сильнее деполяризует мембрану, что приводит к дальнейшему открыванию Na^+ -каналов, еще больше Na^+ входит в клетку и происходит дальнейшая деполяризация. Этот самоусиливающийся процесс (пример *положительной обратной связи*, обсуждаемой в главе 15) продолжается до тех пор, пока, за долю миллисекунды, величина электрического потенциала на ограниченном участке мембраны не меняется со значения покоя, равного примерно -70 мВ, до равновесного значения по Na^+ , равного примерно $+50$ мВ (см. приложение 11.2, **стр. 670**). В момент, когда суммарная электрическая сила переноса Na^+ почти равна нулю, если бы открытая конформация Na^+ -каналов была

стабильной, клетка могла бы перейти в новое состояние покоя, в котором все ее Na^+ -каналы были бы постоянно открыты. Два дополняющих друг друга механизма защищают клетку от такого постоянного электрического спазма: инактивация Na^+ -каналов и открывание потенциал-зависимых K^+ -каналов.

У Na^+ -каналов есть механизм автоматической инактивации, приводящий к быстрому закрыванию каналов, даже если мембрана остается деполяризованной. Na^+ -каналы остаются в *инактивированном* состоянии и не могут заново открыться до тех пор, пока мембранный потенциал не вернется к своему исходному отрицательному значению. Весь цикл от начального стимула до возвращения в исходное состояние покоя протекает за миллисекунды и меньше. Таким образом, Na^+ -каналы могут находиться в трех состояниях: закрытом, открытом и инактивированном. На **рис. 11.29** показано, как переходы между этими состояниями влияют на возникновение и затухание потенциала действия.

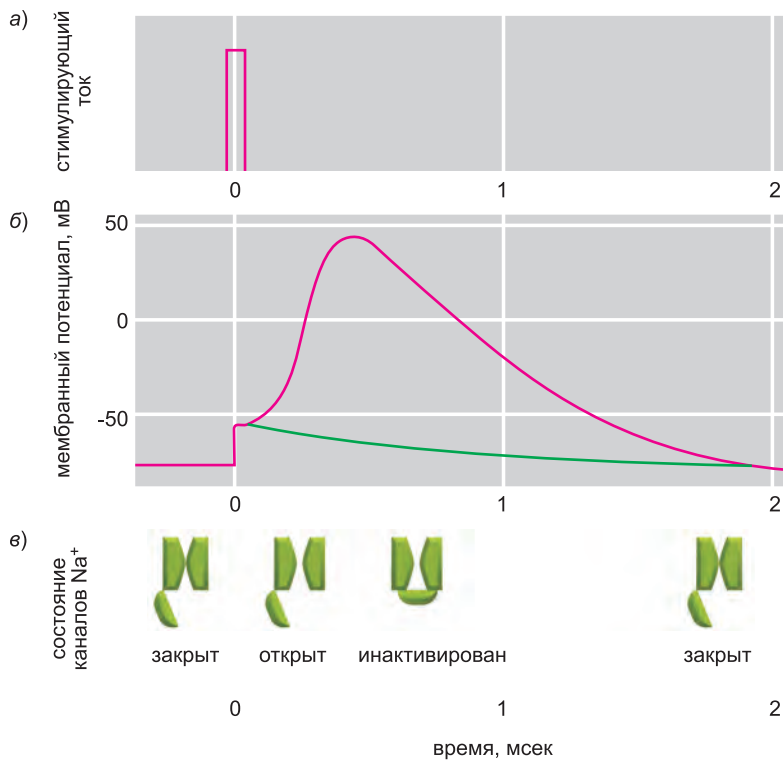


Рис. 11.29. Потенциал действия. (а) Потенциал действия инициируется коротким импульсом электрического тока, который (б) частично деполяризует мембрану, как показано на графике зависимости мембранного потенциала от времени. Зеленая кривая показывает, как мембранный потенциал вернулся бы к своему значению покоя после исходного деполяризующего стимула, если бы в мембране не было потенциал-зависимых Na^+ -каналов. Такое относительно медленное уменьшение мембранного потенциала до его исходного значения -70 мВ в отсутствие Na^+ -каналов происходит за счет выхода K^+ из клетки через потенциал-зависимые K^+ -каналы, которые открываются в ответ на деполяризацию мембраны и восстанавливают равновесный потенциал по K^+ . Красная кривая показывает потенциал действия, вызванный открыванием и последующей инактивацией Na^+ -каналов, состояние которых изображено на (в). Мембрана не способна генерировать новый потенциал действия, пока Na^+ -каналы не вернутся в закрытую конформацию; до тех пор мембрана не восприимчива по отношению к стимуляции.

Описание потенциала действия применимо только к небольшому участку плазматической мембраны. Однако самоусиливающейся деполяризации участка достаточно, для того чтобы деполяризовать соседние области мембраны, которые затем проходят через такой же цикл. Таким образом, потенциал действия распространяется как волна от исходной точки деполяризации по всей плазматической мембране, как показано на **рис. 11.30**.

С **потенциал-зависимыми K^+ -каналами** в большинстве нервных клеток связан второй механизм быстрого снижения потенциала активированной плазматической мембраны до его исходного отрицательного значения, при котором возможна передача второго импульса. Эти каналы открываются в ответ на деполяризацию мембраны почти так же, как Na^+ -каналы, но с более медленной кинетикой; поэтому их называют *медленными K^+ -каналами*. Как только K^+ -каналы переходят в открытое состояние, выходящий поток K^+ быстро компенсирует временный входящий поток Na^+ , и мембранный потенциал быстро приближается к равновесному потенциалу по K^+ , хотя инактивация Na^+ -каналов может еще не закончиться.

Как и Na^+ -каналы, потенциал-зависимые K^+ -каналы автоматически инактивируются. Исследования мутантных потенциал-зависимых K^+ -каналов показали, что для быстрой инактивации необходимы 20 аминокислотных остатков N-конца канального белка: изменение этого участка влияет на инактивацию канала, а его удаление полностью ее блокирует. Удивительно, но, если цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны подвергнуть действию искусственного пептида, соответствующего отсутствующему N-концу, инактивация восстанавливается. Эти наблюдения указывают на то, что N-конец каждого K^+ -канала работает как «шарик на нитке», закрывающий и цитоплазматический конец поры вскоре после ее открытия, и инактивирующий канал (**рис. 11.31**). Предполагается, что сходный механизм действует при быстрой инактивации потенциал-зависимых Na^+ -каналов (которые мы обсудим позже), хотя там в этом участвует другой участок белка.

Электрохимический механизм потенциала действия был впервые сформулирован после знаменитой серии экспериментов, проведенной в 40–50-х гг. XX века. Поскольку на тот момент методов изучения электрических явлений в маленьких клетках еще не существовало, эксперименты проводили на гигантском нейроне кальмара. Несмотря на технический прогресс, логика оригинального анализа до сих пор служит моделью для современных работ. В **приложении 11.3** описаны некоторые аспекты оригинальных экспериментов.

11.3.8. Миелинизация увеличивает скорость и эффективность распространения потенциала действия по нервным клеткам

У многих позвоночных **миелиновые оболочки** служат изоляцией аксонов. Она значительно увеличивает скорость проведения потенциала действия аксоном. Важность миелинизации ясно показывает заболевание *рассеянный склероз*, при котором иммунная система разрушает миелиновые оболочки в некоторых областях центральной нервной системы; в нарушенных участках проведение нервных импульсов значительно замедляется, что часто приводит к сокрушительным неврологическим последствиям.

Миелин синтезируют специальные поддерживающие клетки, носящие название **глиальных клеток**. **Шванновские (Schwann) клетки** образуют миелиновые оболочки аксонов периферических нервов, а **олигодендроциты** — в центральной

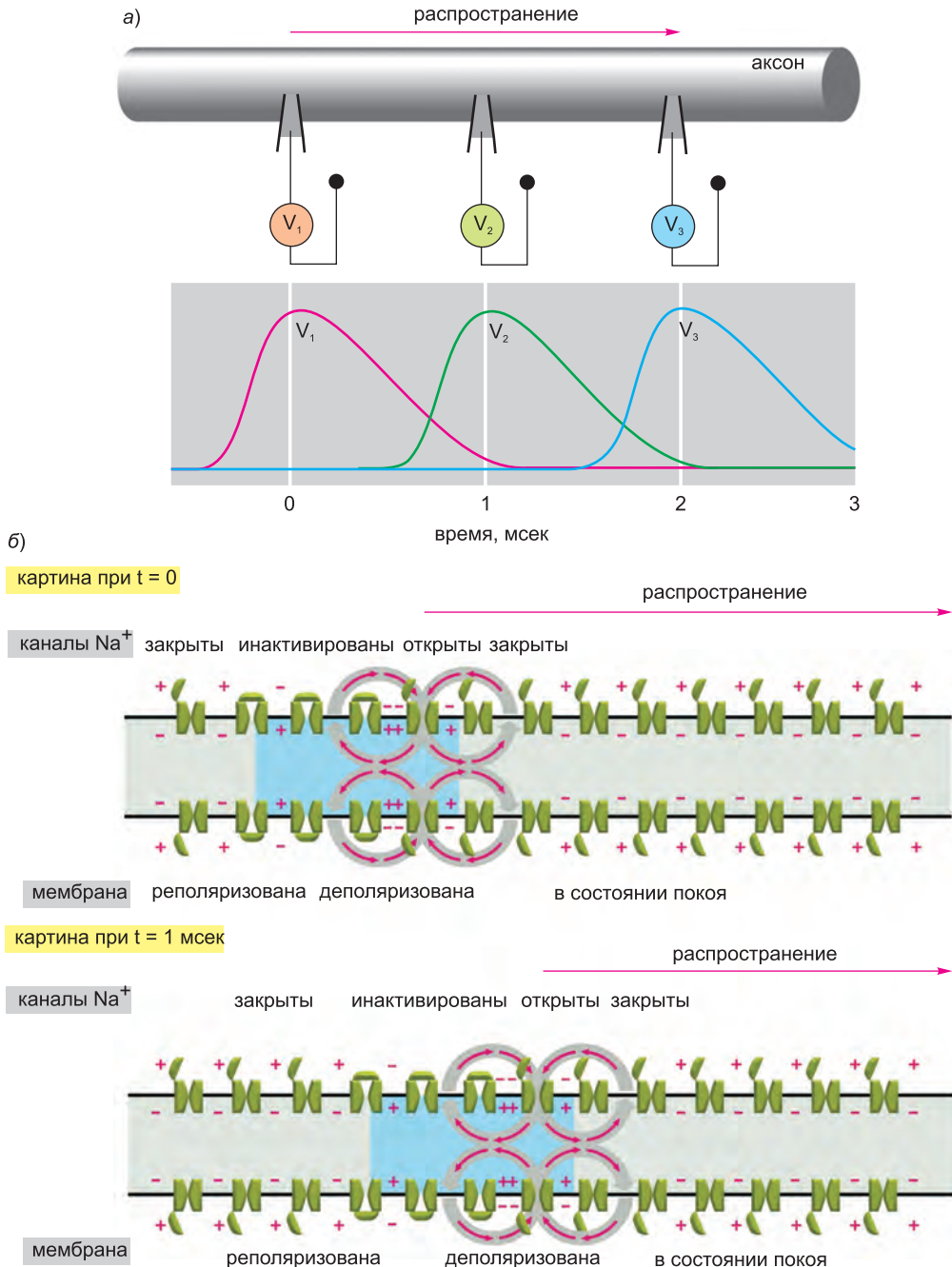
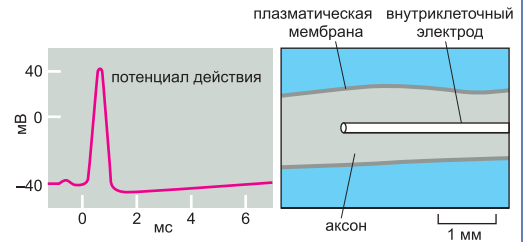


Рис. 11.30. Распространение потенциала действия вдоль аксона. (а) Внутриклеточные электроды, расположенные на равных интервалах вдоль аксона, записывают напряжение. (б) Изменение Na^+ -каналов и ток (оранжевые стрелки) вызывают распространяющееся возмущение мембранного потенциала. Область аксона с деполаризованной мембраной показана голубым. Обратите внимание, что потенциал действия может двигаться только от точки деполаризации, поскольку инактивация Na^+ -каналов препятствует его распространению в обратном направлении.

1. Запись потенциалов действия при помощи внутриклеточных электродов

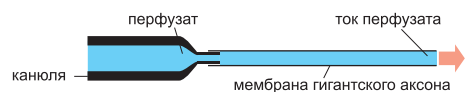
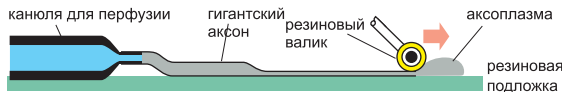
Диаметр гигантского аксона кальмара составляет примерно 0,5–1 мм, а длина — несколько сантиметров. По оси аксона можно вставить электрод, представляющий собой заполненный проводящим раствором длинный стеклянный капилляр. Его кончик должен лежать глубоко в цитоплазме. Таким образом можно измерить разницу потенциалов между аксоном кальмара и внешней средой, то есть мембранный потенциал, по мере прохождения потенциала действия мимо электрода. Потенциал действия инициируется коротким электрическим стимулом, прикладываемым к концу аксона. К какому — неважно, поскольку возбуждение может распространяться в любом направлении; амплитуда стимула также не имеет значения, она должна лишь превышать некоторое пороговое значение; потенциал действия работает по принципу «все или ничего».

2. Потенциалы действия зависят только от плазматической мембраны нейрона и градиентов Na^+ и K^+ через нее

Больше всего снаружи и внутри аксона содержится ионов Na^+ , K^+ и Cl^- . Как и в других клетках, Na^+/K^+ -насос поддерживает 9-кратное преобладание ионов Na^+ внутри аксона по сравнению с внешней средой, тогда как концентрация K^+ примерно в 20 раз выше снаружи, чем внутри. Какие ионы важны для потенциала действия?

Размеры и жесткость гигантского аксона кальмара позволяют удалить из него, как зубную пасту из тюбика, гелеподобную цитоплазму и заполнить его чистыми искусственными раство-

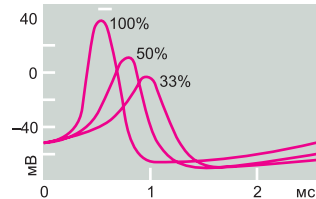
рами Na^+ , K^+ и Cl^- или SO_4^{2-} . Удивительно, но только тогда, когда концентрации Na^+ и K^+ внутри и снаружи аксона близки к естественным значениям, аксон проводит потенциал действия в нормальном виде. Таким образом, важной частью электрической сигнализации клетки должна быть плазматическая мембрана; важными ионами — Na^+ и K^+ , а достаточным источником энергии для распространения потенциала действия должны служить концентрационные градиенты этих ионов через мембрану, поскольку все остальные источники метаболической энергии были, предположительно, удалены во время перфузии.

3. В покое мембрана проницаема в основном для K^+ ; во время потенциала действия она становится временно проницаема для Na^+

В покое мембранный потенциал близок к равновесному значению по K^+ . Когда концентрация K^+ снаружи изменяется, потенциал покоя немного изменяется в соответствии с уравнением Нернста для K^+ (см. приложение 11.2). Таким образом, в покое мембрана, в основном, проницаема для K^+ : каналы утечки K^+ являются основным способом для ионов пройти через мембрану.

Если варьировать внешнюю концентрацию Na^+ , потенциал покоя не меняется. Однако высота пика потенциала действия несколько изменяется в соответствии с уравнением Нернста для Na^+ . Во время потенциала действия, таким образом, мембрана в основном проницаема для Na^+ : Na^+ -каналы открыты. После потенциала действия мембранный потенциал возвращается к отрицательному значению, зависящему от концентрации K^+ ,

причем он становится даже ближе к равновесному потенциалу по K^+ , чем потенциал покоя: мембрана почти полностью потеряла проницаемость для Na^+ и стала более проницаема для K^+ , чем раньше. То есть Na^+ -каналы закрылись и открылись дополнительные K^+ -каналы.



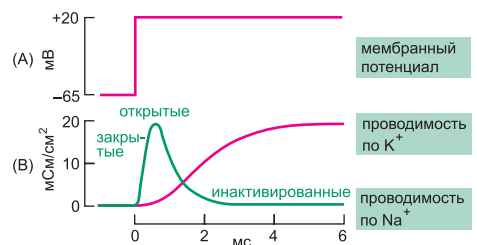
Форма потенциала действия, когда во внешней среде поддерживается 100 %, 50 % и 33 % нормальной концентрации Na^+ .

4. Метод фиксации напряжения показывает, как мембранный потенциал регулирует открывание и закрывание ионных каналов

Мембранный потенциал может поддерживаться на постоянном уровне («фиксация напряжения») по всему аксону путем пропускания соответствующего тока по неизолированному металлическому проводу, вставленному вдоль оси аксона. При этом нужно наблюдать за мембранным потенциалом при помощи второго внутриклеточного электрода. Когда потенциал мембраны переключают из состояния покоя в состояние деполяризации (а), Na^+ -каналы быстро открываются и проницаемость для Na^+ становится больше, чем для K^+ . Затем они опять спонтанно закрываются, несмотря на то что мембранный потенциал фиксирован и не меняется. K^+ -каналы также открываются, но с задержкой, и проницаемость для K^+ растет, пока проницаемость для Na^+ падает (б). Если теперь очень быстро повторить эксперимент, вернув мембрану на короткий промежуток времени в состояние покоя и затем быстро ее деполяризовав, ответ будет другим: длительная деполяризация привела к тому, что Na^+ -каналы перешли в инактивированное состояние, и вторая деполяризация не способна вызвать такой же ответ, как первая. Восстановление после такого состояния требует относи-

тельно продолжительного времени — около 10 миллисекунд — в состоянии реполяризации (покоя) мембранного потенциала.

В нормальном аксоне без фиксации напряжения вход Na^+ через открытые Na^+ -каналы создает пик потенциала действия; инактивация Na^+ -каналов и открывание K^+ -каналов быстро возвращают мембрану к потенциалу покоя.



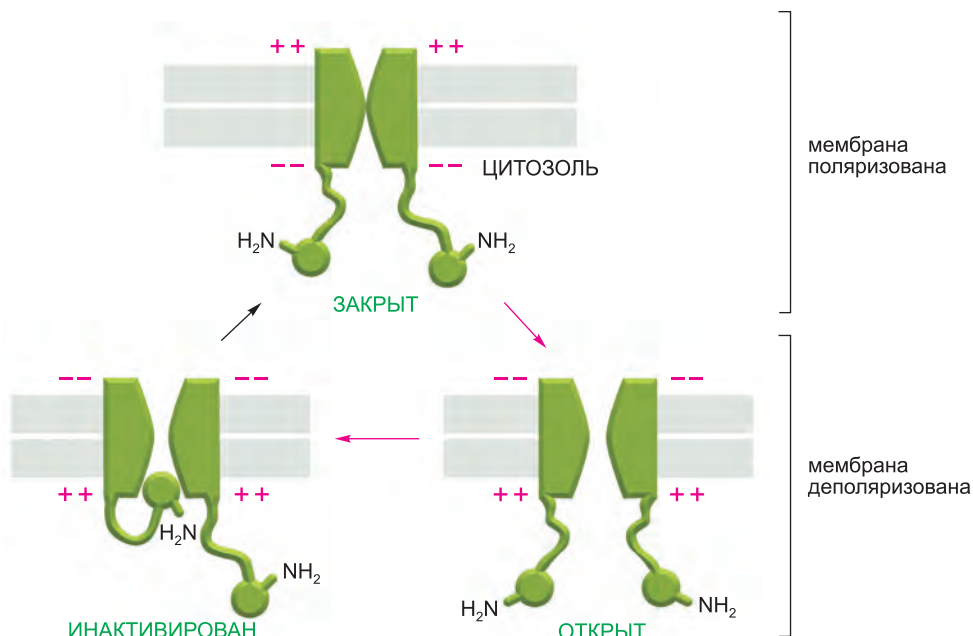


Рис. 11.31. Модель «шарика на нитке» быстрой инактивации потенциал-зависимых K^+ -каналов.

Когда мембрана деполяризуется, канал открывается и начинает проводить ионы. Если деполяризация сохраняется, открытый канал принимает неактивную конформацию, в которой пора закрыта 20 аминокислотами N-конца, образующими «шарик» на участке несвернутой полипептидной цепи — «нитки». Для наглядности показаны только два шарика; на самом деле их четыре, по одному от каждой субъединицы. Предполагается, что сходный механизм инактивирует Na^+ -каналы, но там участвует другой участок полипептидной цепи. Внутренние силы стабилизируют каждое состояние по отношению к небольшим возмущениям, но достаточно сильное столкновение с другой молекулой может заставить канал перейти из одного состояния в другое. Состояние с наименьшей энергией зависит от мембранного потенциала, потому что различные конформации отличаются распределением зарядов. Когда мембрана находится в покое (высокополяризована), закрытая конформация имеет наименьшую свободную энергию и, следовательно, стабильна; когда мембрана деполяризована, энергия открытой конформации ниже, поэтому вероятность открытия канала велика. Но свободная энергия *инактивированной* конформации еще меньше, поэтому после случайным образом изменяющегося времени пребывания в открытом состоянии канал инактивируется. Таким образом, открытая конформация соответствует метастабильному состоянию и существует лишь временно. *Красными стрелками* показана последовательность событий после внезапной деполяризации; *черной стрелкой* показано возвращение в исходную конформацию, соответствующую состоянию с наименьшей энергией после реполяризации мембраны.

нервной системе. Эти глиальные клетки плотной спиралью наматывают слой за слоем свою плазматическую мембрану на аксон (рис. 11.32, а и б), изолируя аксональную мембрану таким образом, что через нее почти не происходит утечки тока. Миелиновые оболочки через равные промежутки прерываются *перехватами Ранвье*, в которых сосредоточены почти все Na^+ -каналы аксона (см. рис. 11.32, в). Поскольку не покрытые миелином участки аксональной мембраны обладают отличными кабельными свойствами (другими словами, они электрически ведут себя как высокотехнологичный подводный телеграфный кабель), деполяризация мембраны в одном перехвате почти немедленно пассивно переходит на другой перехват. Таким образом, потенциал действия распространяется по аксону, перепрыгивая

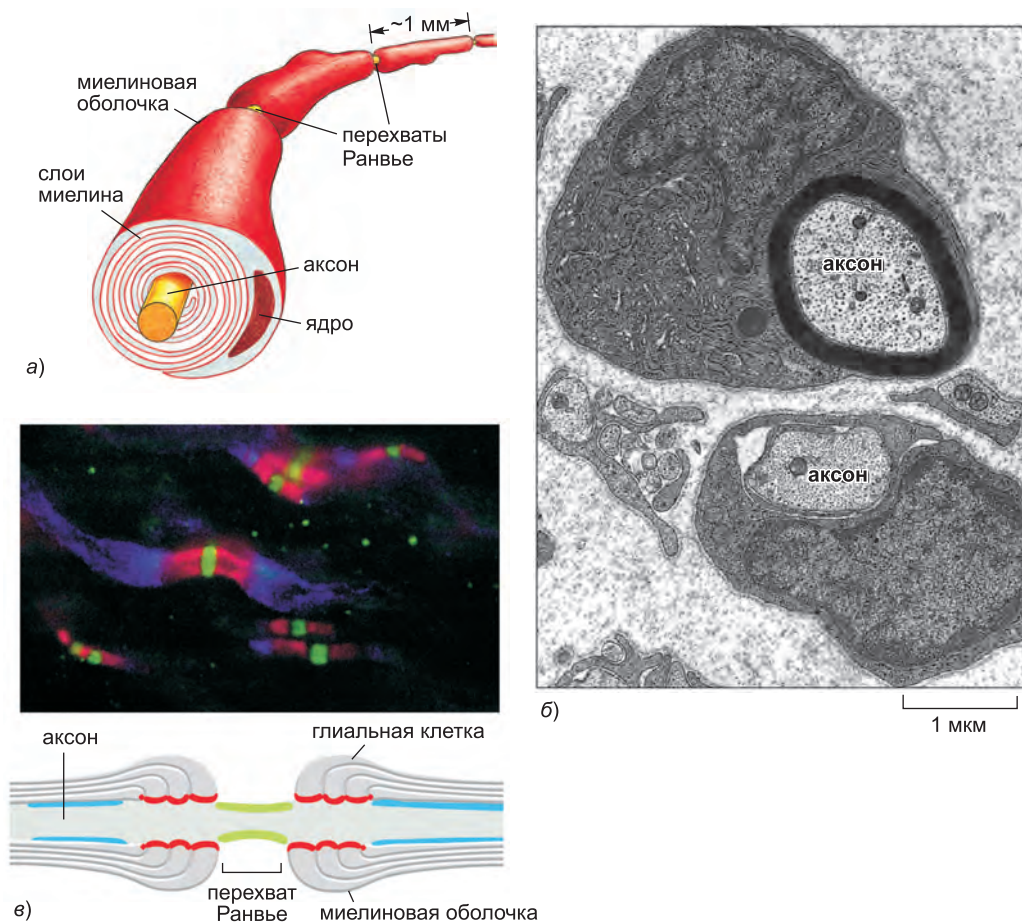


Рис. 11.32. Миелинизация. (а) Миелинизированный аксон периферического нерва. Каждая шванновская клетка обматывает свою плазматическую мембрану вокруг аксона, образуя участок миелиновой оболочки длиной около 1 мм. Укладка мембранных слоев миелина на этом рисунке для наглядности показана менее компактной, чем она есть в реальности (см. часть б). (б) Электронная микрофотография среза нерва ноги молодой крысы. Видны две шванновские клетки: одна внизу только начинает миелинизировать свой аксон; клетка над ней уже почти сформировала зрелую миелиновую оболочку. (в) Флуоресцентная микрофотография и схема отдельных миелинизированных аксонов нерва. Окрашивание антителами позволило обнаружить три различных белка. Потенциал-зависимые Na^+ -каналы (окрашенные *зеленым*) сконцентрированы в аксональной мембране в перехватах Ранвье. Внеклеточный белок (носящий название *Caspr*, окрашен *красным*) отмечает конец каждой миелиновой оболочки. *Caspr* концентрируется в областях контакта, где плазматическая мембрана глиальных клеток плотно примыкает к аксону, создавая электрический запор. Потенциал-зависимые K^+ -каналы (окрашенные *синим*) расположены в плазматической мембране аксонов вблизи перехватов. (б, из Cedric S. Reine, в *Myelin* [P. Morell, ред.]. New-York: Plenum, 1976; в, из M. N. Rasband and P. Shrager, *J. Physiol.* 525: 63–73, 2000. С любезного разрешения издательства Blackwell Publishing.)

от перехвата к перехвату. Этот процесс называется *сальтаторным (скачущим) проведением*. Такой тип проведения имеет два значительных преимущества: потенциал действия распространяется быстрее, и сохраняется метаболическая энергия,

поскольку активное возбуждение ограничивается маленькими участками аксональной плазматической мембраны в перехватах Ранвье.

11.3.9. Пэтч-кламп указывает на то, что отдельные каналы открываются по принципу «все или ничего»

Плазматическая мембрана нейронов и клеток скелетных мышц содержит тысячи потенциал-зависимых Na^+ -каналов. Ток через мембрану представляет собой сумму токов через все эти каналы. При помощи внутриклеточного микроэлектрода можно зарегистрировать этот совокупный ток, как показано на рис. 11.30. Однако, как ни удивительно, можно измерить и ток через отдельные каналы. Метод **пэтч-кламп (метод локальной фиксации потенциала)**, разработанный в 70–80-х гг., совершил переворот в изучении ионных каналов. Он позволил исследовать транспорт через единственную молекулу канального белка на маленьком участке мембраны на кончике микропипетки (рис. 11.33). При помощи этого простого, но эффективного метода можно изучать свойства ионных каналов всех типов клеток. Такие работы привели к открытию того, что даже клетки, не обладающие электрической возбудимостью, обычно несут в своей плазматической мембране множество разнообразных ионных каналов. Многие из этих клеток, например клетки дрожжей, слишком малы для того, чтобы применять к ним традиционный электрофизиологический метод натягивания на внутриклеточный электрод.

Пэтч-кламп показал, что отдельные потенциал-зависимые Na^+ -каналы открываются по принципу «все или ничего». Канал открывается и закрывается случайным образом, но когда он открыт, его проводимость всегда одна и та же — около 1000 ионов в миллисекунду. Таким образом, совокупный ток через мембрану всей клетки показывает не *уровень* открытия отдельного типичного канала, а *общее число* открытых каналов в мембране в данный момент времени (рис. 11.34).

Простые физические принципы позволяют нам понять зависимость от потенциала. Электрический потенциал внутренней среды нейрона или мышечной клетки в покое примерно на 50–100 мВ более отрицателен, чем потенциал окружения. Хотя такая разница потенциалов может показаться маленькой, она существует на мембране толщиной всего около 5 нм, что дает градиент напряжения порядка 100 000 В/см. Таким образом, белки в мембране подвергаются действию очень большого электрического поля, которое может значительно повлиять на их конформацию. Эти белки, как и все остальные, несут множество заряженных групп и полярные связи между различными атомами. Это означает, что электрическое поле накладывает силы на молекулярную структуру. Для многих мембранных белков эффект изменений в электрическом поле мембраны, скорее всего, будет незначительным, но потенциал-зависимые ионные каналы способны принимать конформации, стабильность которых зависит от величины поля. Потенциал-зависимые Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -каналы, например, несут в одном из своих трансмембранных сегментов характерные положительно заряженные аминокислоты, отвечающие на деполяризацию движением наружу, что, в свою очередь, приводит к конформационным перестройкам, открывающим канал. Каждая конформация может «переключиться» в другую при достаточном толчке со стороны случайных тепловых движений окружения. Изменения мембранного потенциала влияют именно на относительную стабильность закрытых, открытых и инактивированных конформаций под действием переключения (см. подпись к рис. 11.31).

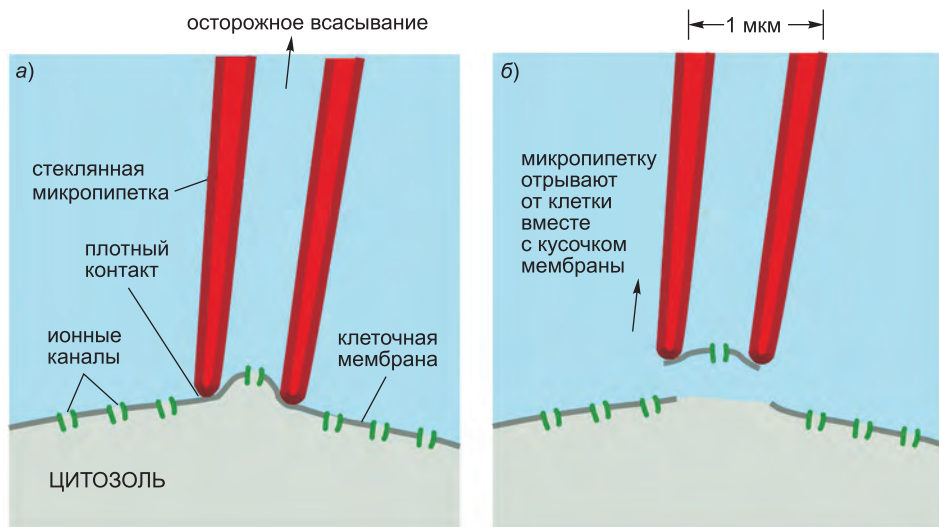


Рис. 11.33. Метод пэтч-кламп. Благодаря очень плотному контакту между микропипеткой и мембраной, ток может войти в микропипетку или покинуть ее только за счет прохождения через канал в пэтче (patch – участок) мембраны, зажатом на кончике. Термин *кламп* (clamp – зажим) используют потому, что для поддержания, или «зажимания», мембранного потенциала определенной величины при измерении ионного тока через отдельные каналы применяют электронный прибор. Ток через эти каналы может быть измерен, когда пэтч все еще сообщается с остальной мембраной, как на (а), или отделен, как на (б). Преимущество отделенного пэтча состоит в том, что в этом случае проще изменять состав раствора по обеим сторонам мембраны и изучать влияние различных растворенных веществ на поведение канала. Отделенный пэтч также можно получить в обратной ориентации, т. е. так, чтобы цитоплазматическая поверхность мембраны находилась внутри пипетки.

11.3.10. Потенциал-зависимые катионные каналы эволюционно и структурно родственны

Na^+ -каналы — не единственные потенциал-зависимые каналы, способные генерировать потенциал действия. Потенциалы действия в некоторых мышцах, яйцеклетках и клетках желез, например, зависят от *потенциал-зависимых* Ca^{2+} -каналов, а не от Na^+ -каналов.

В пределах этих трех классов обнаружено удивительное структурное и функциональное разнообразие, создаваемое как множественными генами, так и альтернативным сплайсингом транскриптов РНК одного гена. Однако аминокислотные последовательности известных потенциал-зависимых Na^+ -, K^+ - и Ca^{2+} -каналов очень схожи. Это указывает на то, что они все принадлежат крупному суперсемейству эволюционно и структурно родственных белков и построены по одному принципу. Тогда как одноклеточные дрожжи *S. cerevisiae* содержат единственный ген, кодирующий потенциал-зависимый K^+ -канал, геном червя *C. elegans* содержит 68 генов, кодирующих разные, но родственные K^+ -каналы. Эта сложность говорит о том, что даже простая нервная система, состоящая из 302 нейронов, использует большое число различных ионных каналов для генерации ответа.

Люди, наследующие мутантные гены, кодирующие различные ионные каналные белки, могут страдать от разнообразных заболеваний нервной системы, мышц и сердца, в зависимости от того, в каких клетках в норме функционирует белок,

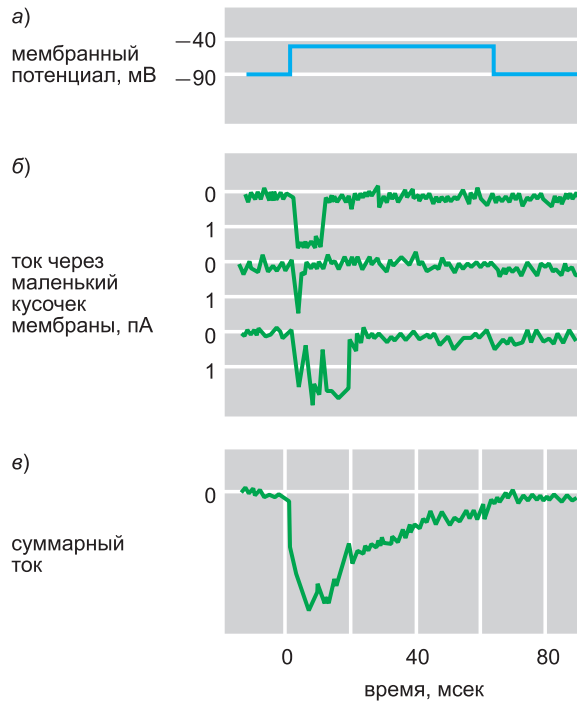


Рис. 11.34. Пэтч-кламп измерения отдельного потенциал-зависимого Na^+ -канала. Маленький участок мембраны мышечной клетки крысиного эмбриона отделили, как на рис. 11.33. (а) Мембрану деполяризовали путем быстрого изменения потенциала. (б) Три записи токов, полученные в трех экспериментах на одном участке мембраны. Каждая значительная «ступенька» потенциала соответствует открыванию и закрыванию единственного канала. Сравнение трех измерений показывает, что, если продолжительность открывания и закрывания канала сильно изменяется, ток в открытом канале всегда почти постоянен. Небольшие флуктуации в измерении тока являются большей частью результатом электрического шума в детекторе. Ток измеряется в пикоамперах (пА). Для удобства электрический потенциал снаружи клетки считается равным нулю. (в) Измеряют сумму токов в 144 повторениях одного эксперимента. Сравнение (б) и (в) показывает, что временная зависимость совокупного тока отражает вероятность того, что каждый отдельный канал находится в открытом состоянии. Эта вероятность со временем уменьшается, по мере того как каналы в деполяризованной мембране переходят в инактивированную конформацию. (Данные из J. Patlak and R. Horn, *J. Gen. Physiol.* 79: 333–351, 1982. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

кодируемый мутантным геном. Например, мутации в генах потенциал-зависимых Na^+ -каналов в клетках скелетных мышц могут вызывать *миотонию*, заболевание, при котором после произвольного сокращения мышц расслабление происходит с задержкой, что вызывает болезненные мышечные спазмы. В некоторых случаях это происходит потому, что патологические каналы не способны нормально инактивироваться; в результате Na^+ продолжает входить в клетку после окончания потенциала действия и происходят повторная деполяризация и сокращение мышц. Точно так же мутации, затрагивающие Na^+ - или K^+ -каналы мозга, могут приводить к *эпилепсии*, при которой избыточные синхронные сигналы крупных групп нейронов вызывают эпилептические припадки (судороги, или конвульсии).

11.3.11. Медиатор-зависимые ионные каналы в химических синапсах переводят химические сигналы в электрические

Нервные сигналы передаются от клетки к клетке в специализированных контактах, известных как **синапсы**. Обычный механизм передачи является непрямым. Клетки электрически изолированы друг от друга, т.е. *пресинаптическая клетка* отделена от *постсинаптической клетки* узкой *синаптической щелью*. Изменение электрического потенциала в пресинаптической клетке запускает высвобождение небольших сигнальных молекул, известных как **нейромедиаторы**, которые хранятся в замкнутых мембранных синаптических пузырьках и высвобождаются путем экзоцитоза. Нейромедиатор быстро диффундирует через синаптическую щель и вызывает электрические изменения в постсинаптической клетке, связываясь с *медиатор-зависимыми ионными каналами* (рис. 11.35) и открывая их. После секреции нейромедиатора он быстро удаляется: его либо уничтожают специализированные ферменты синаптической щели, либо он захватывается выделившим его нервом или глиальными клетками. Обратный захват опосредуется различными Na^+ -зависимыми транспортерами нейромедиаторов; так, нейромедиаторы перерабатываются, что позволяет клеткам справляться с высокими скоростями их высвобождения. Быстрое удаление обеспечивает пространственную и временную точность сигнализации в синапсе. Оно уменьшает шансы того, что нейромедиатор повлияет на соседние клетки. Синаптическая щель должна быть свободна от нейромедиатора до следующего выброса, чтобы временная последовательность повторного быстрого сигнального события могла быть точно передана в постсинаптическую клетку. Как мы увидим, сигнализация посредством таких *химических синапсов* является более гибкой и адаптивной, чем прямое электрическое сопряжение через щелевые контакты в *электрических синапсах* (обсуждаемых в главе 19), которые также используются нейронами, но в меньших масштабах.

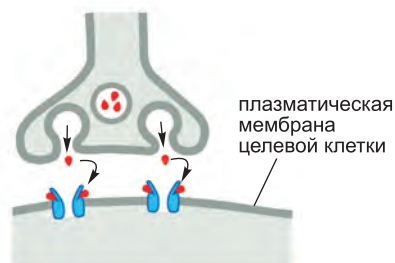
Медиатор-зависимые ионные каналы специализируются на быстром переводе внеклеточных химических сигналов в электрические сигналы в химических синапсах. Каналы концентрируются в плазматической мембране постсинаптической клетки в области синапса и открываются в ответ на связывание молекул нейромедиатора, создавая краткое изменение проницаемости мембраны (см. рис. 11.35, *а*). В отличие от потенциал-зависимых каналов, ответственных за потенциалы действия, медиатор-зависимые каналы относительно нечувствительны к мембранному потенциалу и поэтому сами по себе не способны генерировать самоусиливающееся возбуждение. Вместо этого, они создают локальные изменения проницаемости и, следовательно, мембранного потенциала, которые зависят от количества нейромедиатора, высвобожденного в синапсе, и времени его нахождения там. Потенциал действия в этом участке может быть запущен только тогда, когда локальный мембранный потенциал достаточно деполяризуется для открытия соответствующего числа близлежащих потенциал-зависимых катионных каналов, присутствующих в той же мембране-мишени.

11.3.12. Химические синапсы могут быть возбуждающими или тормозными

Медиатор-зависимые ионные каналы отличаются друг от друга по нескольким важным признакам. Во-первых, будучи рецепторами, они обладают высокоселективными сайтами связывания нейромедиаторов, высвобождаемых из пресинаптиче-

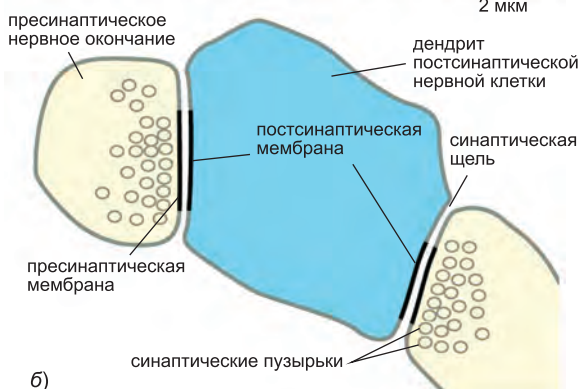
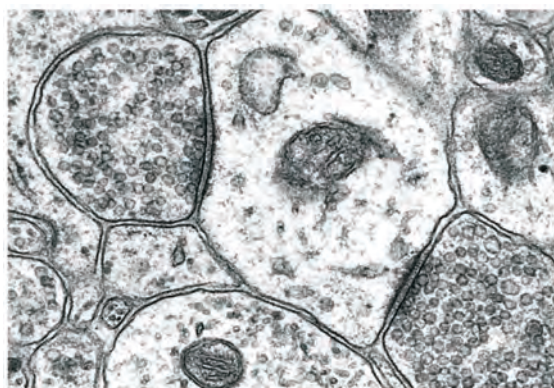


ХИМИЧЕСКИЙ СИНАПС В ПОКОЕ



ХИМИЧЕСКИЙ СИНАПС ПРИ АКТИВАЦИИ

а)



б)

Рис. 11.35. Химический синапс. (а) Когда потенциал действия достигает нервного окончания в пресинаптической клетке, он вызывает высвобождение нейромедиатора. Молекулы нейромедиатора хранятся в синаптических пузырьках и высвобождаются во внешнюю среду клетки при сливании пузырьков с плазматической мембраной нервного окончания. Выделенный нейромедиатор в синапсе связывается с медиатор-зависимыми ионными каналами плазматической мембраны постсинаптической клетки-мишени и открывает их. Вызванные этим ионные токи изменяют мембранный потенциал клетки-мишени, передавая таким образом сигнал от возбужденного нерва. (б) Электронная микрофотография тонкого среза двух нервных синапсов на дендрите постсинаптической клетки. (б, с любезного разрешения Cedric Raine.)

ского нервного окончания. Во-вторых, как каналы, они селективны по отношению к пропускаемым через плазматическую мембрану ионам; это определяет природу постсинаптического ответа. **Возбуждающие нейромедиаторы** открывают катионные каналы, что приводит к входу Na^+ , деполяризующего постсинаптическую мембрану в сторону порогового потенциала генерации потенциала действия. **Тормозные нейромедиаторы**, с другой стороны, открывают либо Cl^- -каналы, либо K^+ -каналы, и это подавляет сигнализацию за счет того, что возбуждающим воздействием становится сложнее деполяризовать постсинаптическую мембрану. Многие нейромедиаторы могут быть как возбуждающими, так и тормозными в зависимости от того, где они высвобождаются, с какими рецепторами связываются и от окружающих ионных условий. *Ацетилхолин*, например, может как возбуждать, так и тормозить в зависимости от типа ацетилхолинового рецептора, с которым он связался. Однако

обычно ацетилхолин, *глутаминовая кислота* и *серотонин* служат возбуждающими нейромедиаторами, а *γ-аминомасляная кислота* (ГАМК, GABA) и *глицин* — тормозящими. Глутамат, например, опосредует большинство возбуждающих сигналов в мозге позвоночных.

Мы уже обсудили, как открывание катионных каналов деполяризует мембрану. Следующие рассуждения помогут понять влияние открывания Cl-каналов. Концентрация Cl снаружи клетки много выше, чем внутри (см. таблицу 11.1, **стр. 1160**), но мембранный потенциал противодействует входу хлора. В самом деле, у многих нейронов равновесный потенциал по Cl близок к потенциалу покоя или даже более отрицателен. Поэтому открывание Cl-каналов забуферивает мембранный потенциал; при деполяризации мембраны более отрицательно заряженные ионы Cl входят в клетку и противодействуют деполяризации. Таким образом, при открывании Cl-каналов деполяризация мембраны и, следовательно, возбуждение клетки требует больших усилий. Открывание K⁺-каналов приводит к такому же эффекту. Влияние токсинов, блокирующих работу этих каналов, показало значение тормозящих нейромедиаторов: стрихнин, например, за счет связывания с рецепторами глицина и блокирования его тормозящего действия вызывает мышечные спазмы, судороги и смерть.

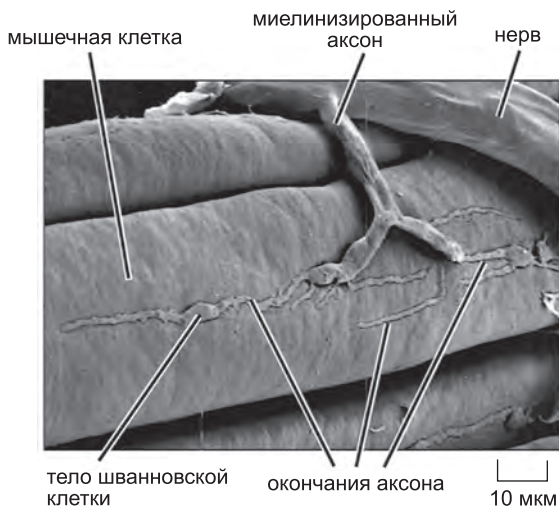
Однако не вся химическая сигнализация в нервной системе действует посредством медиатор-зависимых ионных каналов. Многие сигнальные молекулы, секретируемые нервными окончаниями, включая разнообразные нейропептиды, связываются с рецепторами, только косвенно регулирующими ионные каналы. Мы подробно обсудим эти так называемые *сопряженные с G-белками рецепторы* и *сопряженные с ферментами рецепторы* в главе 15. Если сигнализация, опосредованная возбуждающими и тормозящими нейромедиаторами, связывающимися с медиатор-зависимыми ионными каналами, простая и быстрая, то сигнализация лигандами, связывающимися с рецепторами, сопряженными с G-белками или ферментами, происходит медленнее и является более сложной, а ее последствия сохраняются дольше.

11.3.13. Ацетилхолиновые рецепторы в нервно-мышечных соединениях представляют собой медиатор-зависимые катионные каналы

Наиболее изученным примером медиатор-зависимых ионных каналов является *ацетилхолиновый рецептор* клеток скелетных мышц. Этот канал временно открывается ацетилхолином нервного окончания в **нервно-мышечных соединениях** — специализированных химических синапсах между двигательным нейроном и клеткой скелетной мышцы (**рис. 11.36**). Этот синапс активно изучали, потому что он легко доступен для электрофизиологических исследований, в отличие от синапсов центральной нервной системы.

Ацетилхолиновый рецептор занимает особое место в истории ионных каналов. Это первый очищенный ионный канал, для него первого расшифровали аминокислотную последовательность, его первым полностью реконструировали в искусственных липидных бислоях и для него первого записали электрический сигнал отдельного открытого ионного канала. Его ген также первым клонировали и секвенировали и его трехмерную структуру также расшифровали, хотя и со скромным разрешением. Было по крайней мере две причины быстрого прогресса в очистке и описании этого рецептора. Во-первых, богатый источник ацетилхолиновых рецепторов расположен в электрических органах электрических рыб и скатов (эти органы пред-

Рис. 11.36. Электронная микрофотография нервно-мышечного соединения, полученная сканирующим электронным микроскопом с маленьким увеличением. Показано окончание аксона на клетке скелетной мышцы. (Из J. Desaki and Y. Uehara, J. Neurocytol. 10: 101–110, 1981. С любезного разрешения издательства Kluwer academic Publishers.)



ставляют собой модифицированные мышцы, приспособленные для удара добычи током). Во-вторых, определенные нейротоксины (например, α -бунгаротоксин) в яде некоторых змей с высоким сродством ($K_a = 10^9$ литров/моль) и специфичностью связываются с рецептором,

и, следовательно, их можно использовать в аффинной хроматографии для очистки белка. Флуоресцентный или радиоактивно меченый α -бунгаротоксин также можно использовать для локализации и подсчета ацетилхолиновых рецепторов. Так, исследователи показали, что рецепторы плотно упакованы в плазматической мембране мышечных клеток в нервно-мышечных соединениях (около 20 тысяч таких рецепторов на $\mu\text{м}^2$). В других местах той же мембраны их значительно меньше.

Ацетилхолиновый рецептор скелетных мышц состоит из пяти трансмембранных полипептидов, двух одного типа и трех разных типов, кодирующихся четырьмя разными генами. Последовательности этих генов очень схожи, что свидетельствует о том, что они эволюционировали от одного предкового гена. Каждый из двух одинаковых полипептидов пентамера вносит вклад в один из двух сайтов связывания ацетилхолина, расположенных между соседними субъединицами. Когда две молекулы ацетилхолина связываются с пентамерным комплексом, происходит его конформационная перестройка: образующие пору спирали поворачиваются и нарушают кольцо гидрофобных аминокислот, блокирующих ионный ток в закрытом состоянии. При связанном лиганде канал все равно переключается из открытого состояния в закрытое, но теперь вероятность его нахождения в открытом состоянии составляет 90 %. Это продолжается до тех пор, пока специальный фермент (*ацетилхолинэстераза*), расположенный в нервно-мышечном соединении, не снижает концентрацию ацетилхолина до приемлемого уровня. После того как рецептор освобождается от связанного нейромедиатора, он возвращается в состояние покоя. Если ацетилхолин в результате избыточной нервной стимуляции присутствует продолжительное время, канал инактивируется (рис. 11.37).

Общая форма и вероятное расположение субъединиц ацетилхолинового рецептора определены при помощи электронной микроскопии (рис. 11.38). Пять субъединиц собраны в кольцо, образуя заполненный водой трансмембранный канал — узкую пору через липидный бислой, — на обоих концах расширяющуюся в проходы. Кластеры отрицательно заряженных аминокислот на обоих концах поры способствуют исключению отрицательно заряженных ионов и прохождению положительно заряженных ионов, диаметр которых меньше 0,65 нм. Нормальный транспорт состоит из Na^+ и K^+ и некоторого количества Ca^{2+} . Таким образом, в от-

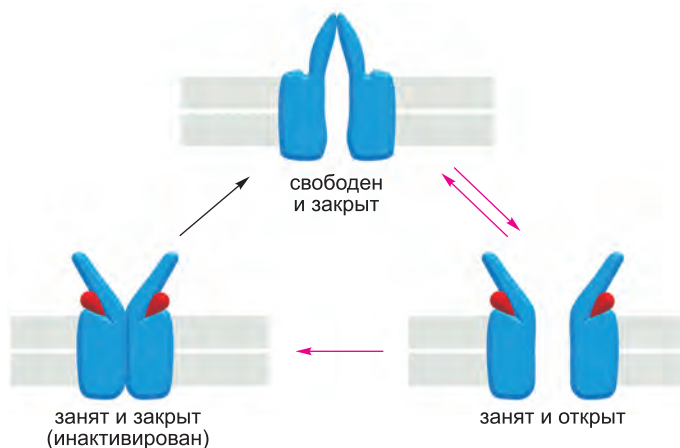


Рис. 11.37. Три конформации ацетилхолинового рецептора. Связывание двух молекул ацетилхолина открывает медиатор-зависимый ионный канал. Затем, пока ацетилхолин не гидролизуется, поддерживается высокая вероятность нахождения рецептора в открытом состоянии. При постоянном присутствии ацетилхолина, однако, канал инактивируется (теряет чувствительность). В норме ацетилхолин быстро гидролизуется, и канал закрывается примерно через 1 миллисекунду, задолго до значительной потери чувствительности, которая в присутствии ацетилхолина происходит примерно через 20 миллисекунд.

личие от потенциал-зависимых катионных каналов, например, рассмотренных ранее K^+ -каналов, здесь селективность по отношению к катионам мала. Относительный вклад различных катионов в ток через канал зависит в основном от их концентраций и электрохимических движущих сил. Когда мембранный потенциал клетки скелетной мышцы равен потенциалу покоя, суммарная движущая сила для K^+ равна нулю, так как градиент напряжения почти полностью уравнивает концентрационный градиент K^+ через мембрану (см. приложение 11.2, **стр. 670**). С другой стороны, для Na^+ градиенты напряжения и концентрации будут работать в одном направлении — в направлении входа иона в клетку. (То же самое справедливо для Ca^{2+} , но внеклеточная концентрация Ca^{2+} настолько меньше, чем Na^+ , что Ca^{2+} дает лишь небольшой вклад в общий входящий поток.) Таким образом, открывание ацетилхолиновых рецепторных каналов приводит к большому суммарному току Na^+ в клетку (максимальная скорость составляет около 30 тысяч ионов на один канал в миллисекунду). Этот входящий поток вызывает деполяризацию мембраны, сигнализирующую мышце о сокращении, что мы обсудим ниже.

11.3.14. Медиатор-зависимые ионные каналы являются важными мишенями психотропных лекарств

Ионные каналы, открывающиеся в ответ на нейромедиаторы ацетилхолин, серотонин, ГАМК и глицин, состоят из структурно сходных субъединиц. По-видимому, трансмембранные поры этих каналов также организованы похожим образом, хотя они и различаются по специфичности связывания нейромедиаторов и ионной селективности. Эти каналы состоят из гомологичных полипептидных субъединиц, которые, судя по всему, упаковываются в пентамер, сходный с ацетилхолиновым рецептором. Глутамат-зависимые ионные каналы содержат другое семейство субъединиц, и считается, что они образуют тетрамеры, напоминающие K^+ -каналы (см. ниже).

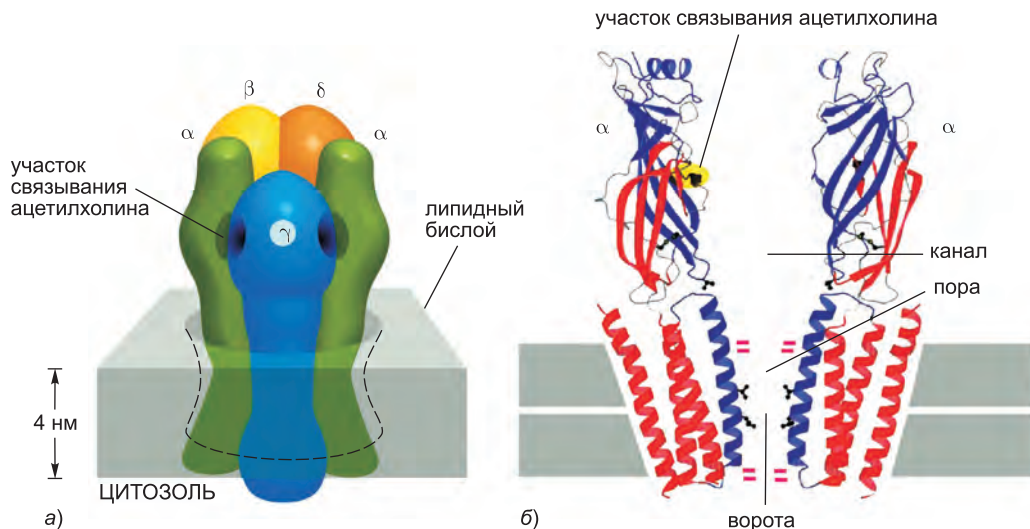


Рис. 11.38. Модель структуры ацетилхолинового рецептора. (а) Пять гомологичных субъединиц (α , α , β , γ , δ) образуют трансмембранную водную пору. Пора окружена кольцом из пяти трансмембранных α -спиралей, по одной от каждой субъединицы. Предполагается, что в закрытой конформации вход в пору преграждается гидрофобными боковыми цепями пяти лейцинов от пяти α -спиралей, которые образуют ворота вблизи середины липидного бислоя. Отрицательно заряженные боковые цепи на концах поры обеспечивают прохождение через канал только положительно заряженных ионов. (б) Обе α -субъединицы участвуют в образовании сайта связывания ацетилхолина, расположенного между соседними субъединицами; когда ацетилхолин связывается с обоими сайтами, канал претерпевает конформационные перестройки, и ворота открываются, возможно, за счет поворота наружу спиралей с загромождающими лейцинами. На рисунке структуры (справа) части канала, движущиеся в ответ на связывание АцХ и открывающие канал, показаны *синим*. (Адаптировано из N. Unwin, *Cell* 72 [Suppl.]: 31–41, 1993. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Для каждого класса медиатор-зависимых каналов существуют альтернативные формы каждого типа субъединиц, либо кодируемые разными генами, либо образующиеся в результате альтернативного сплайсинга РНК одного генного продукта. Субъединицы собираются в разных комбинациях, что приводит к набору разнообразных подтипов каналов с различным сродством к лиганду, разной проводимостью канала, отличающимися скоростями открывания и закрывания и различной чувствительностью к лекарствам и токсинам. Например, в нейронах позвоночных ацетилхолин-зависимые ионные каналы отличаются от каналов мышечных клеток, поскольку они обычно образуются из двух субъединиц одного типа и трех — другого. Но существует по крайней мере девять генов, кодирующих различные версии первого типа субъединиц и не меньше трех — второго. Дальнейшее разнообразие создается альтернативным сплайсингом РНК. Подгруппы ацетилхолин-чувствительных нейронов, выполняющие разные функции в мозге, экспрессируют различные комбинации этих субъединиц. В принципе, это уже само по себе позволяет разрабатывать лекарства, направленные на строго определенные узкие группы нейронов или синапсов и воздействующие, таким образом, на конкретные функции мозга. На практике в этом направлении уже достигнуты некоторые результаты.

В самом деле, медиатор-зависимые ионные каналы уже продолжительное время являются важными мишенями лекарств. Хирург, например, может на время операции расслабить мышцы пациента путем блокировки ацетилхолиновых рецепторов клеток скелетных мышц веществом *кураре*, лекарством, получаемым из растения, которое исходно использовалось южноамериканскими индейцами для изготовления отравленных стрел. Большинство лекарств, применяемых для лечения бессонницы, тревожности, депрессии и шизофрении, воздействует на химические синапсы и многие из них связывают медиатор-зависимые ионные каналы. Например, такие барбитураты и транквилизаторы, как Валиум и Либриум, связывают рецепторы ГАМК, усиливая ее тормозящее действие. Их действие заключается в том, что они позволяют более низким концентрациям нейромедиатора открывать Cl^- -каналы. На новую молекулярную биологию ионных каналов, открывающую их разнообразие и структурные свойства, возлагается надежда по созданию нового поколения психотропных лекарств, которое будет действовать еще более селективно для избавления миллионов людей от душевных заболеваний.

Помимо ионных каналов, другие компоненты аппарата синаптической сигнализации являются потенциальными мишенями для психотропных лекарств. Как отмечено выше, после высвобождения в синаптическую щель многие нейромедиаторы удаляются за счет механизмов обратного захвата, опосредуемых Na^+ -зависимыми транспортерами. Ингибирование таких переносчиков увеличивает продолжительность действия медиатора и, таким образом, усиливает синаптическую передачу. Многие антидепрессанты, включая, например, Прозак, ингибируют обратный захват серотонина; другие ингибируют обратный захват как серотонина, так и норадреналина.

Ионные каналы являются фундаментальными молекулярными компонентами, из которых строятся нейронные механизмы для сигнализации и анализа информации. Чтобы дать представление о сложности функций этих механизмов, мы рассмотрим несколько примеров того, как группы ионных каналов слаженно работают в синаптическом контакте между электрически возбудимыми клетками.

11.3.15. Нервно-мышечная передача сигнала включает в себя последовательную активацию пяти различных наборов ионных каналов

Следующий процесс, во время которого нервный импульс вызывает сокращение мышечной клетки, иллюстрирует значение ионных каналов в электрически возбудимых клетках. Такой, казалось бы, простой ответ требует последовательной активации по крайней мере пяти различных наборов ионных каналов в течение нескольких миллисекунд (рис. 11.39).

1. Процесс начинается с того, что нервный импульс достигает нервного окончания и деполяризует его плазматическую мембрану. Деполяризация быстро открывает потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы этой мембраны. Поскольку концентрация Ca^{2+} снаружи более чем в 1000 раз превышает концентрацию свободного Ca^{2+} внутри клетки, Ca^{2+} входит в нервное окончание. Увеличение концентрации Ca^{2+} в цитозоле нервного окончания запускает локальное высвобождение ацетилхолина в синаптическую щель.

2. Высвобожденный ацетилхолин связывается с ацетилхолиновыми рецепторами плазматической мембраны мышечной клетки и временно открывает связанные с рецепторами катионные каналы. Последующий вход Na^+ вызывает локальную деполяризацию мембраны.

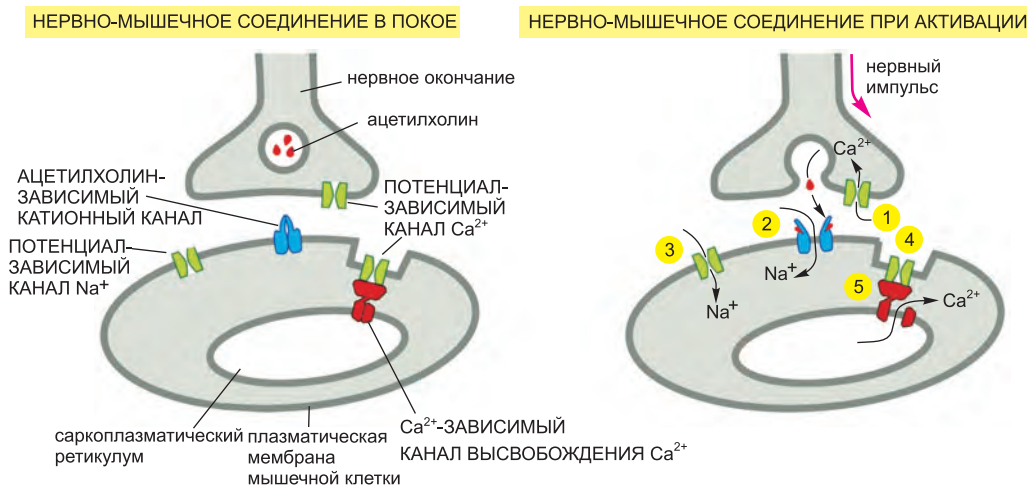


Рис. 11.39. Система ионных каналов в нервно-мышечном окончании. Эти ионные каналы необходимы для стимуляции мышечного сокращения нервным импульсом. Каналы пронумерованы в порядке их активации, как описано в тексте.

3. Локальная деполяризация плазматической мембраны мышечной клетки открывает в этой мембране потенциал-зависимые Na^+ -каналы, что приводит к дальнейшему входу Na^+ и еще большей деполяризации. Это, в свою очередь, открывает соседние потенциал-зависимые Na^+ -каналы и вызывает спонтанно распространяющуюся деполяризацию (потенциал действия), которая охватывает всю плазматическую мембрану (см. рис. 11.30).

4. Общая деполяризация плазматической мембраны мышечной клетки активирует потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы в определенных областях (Т-трубочках, рассматриваемых в главе 16) этой мембраны.

5. Это, в свою очередь, вызывает временное открывание Ca^{2+} -зависимых *каналов высвобождения* Ca^{2+} в прилегающем участке мембраны саркоплазматического ретикулума (СР). В результате хранящийся в СР кальций выходит в цитозоль. Мембраны Т-трубочек и СР смыкаются, что приводит к объединению двух типов кальциевых каналов в специализированную структуру (см. рис. 16.77). Именно внезапное увеличение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} вызывает сокращение миофибрилл в мышечных клетках.

Активация мышечного сокращения двигательным нейроном является сложным процессом, но, как мы сейчас увидим, взаимодействие ионных каналов, необходимое для интеграции нейроном большого количества входящих сигналов в синапсах и вычисления соответствующего выходного сигнала, еще сложнее.

11.3.16. Отдельные нейроны — это сложные вычислительные приборы

В центральной нервной системе единственный нейрон может принимать сигналы от тысяч других нейронов и, в свою очередь, образовывать синапсы с тысячами других клеток. Например, на среднестатистическом двигательном нейроне спинного мозга несколько тысяч нервных окончаний создают синапсы; его тело

клетки и дендриты почти полностью ими покрыты (рис. 11.40). Некоторые из этих синапсов передают сигналы от головного мозга в спинной; другие несут сенсорную информацию от мышц или кожи. Двигательный нейрон должен объединять сигналы от всех этих источников и отвечать на них, либо посылая потенциалы действия по аксону, либо оставаясь в покое.

Одни синапсы нейрона возбуждают его, другие — тормозят. Нейромедиатор, высвобожденный в возбуждающем синапсе, вызывает небольшую деполяризацию постсинаптической мембраны, носящую название *возбуждающего постсинаптического потенциала (excitatory PSP, EPSP)*, тогда как нейромедиатор, высвобожденный в тормозящем синапсе, обычно вызывает небольшую гиперполяризацию, носящую название *тормозного постсинаптического потенциала (inhibitory PSP, IPSP)*. Мембрана дендритов и тела клетки большинства нейронов содержит относительно небольшое количество потенциал-зависимых Na^+ -каналов, и отдельного EPSP обычно недостаточно для запуска потенциала действия. Вместо этого, каждый входящий сигнал отражается в локальном PSP определенной величины, который уменьшается с расстоянием от синапса. Если в одну область дендритного дерева одновременно приходят сигналы от нескольких синапсов, общий PSP будет приблизительно равен сумме отдельных PSP, причем IPSP будут вносить отрицательный вклад в общее изменение потенциала. PSP от каждого участка пассивно распространяются и сливаются в теле клетки. При дальнедействующей передаче общая величина PSP переводится, или *кодируется*, в частоту генерации потен-

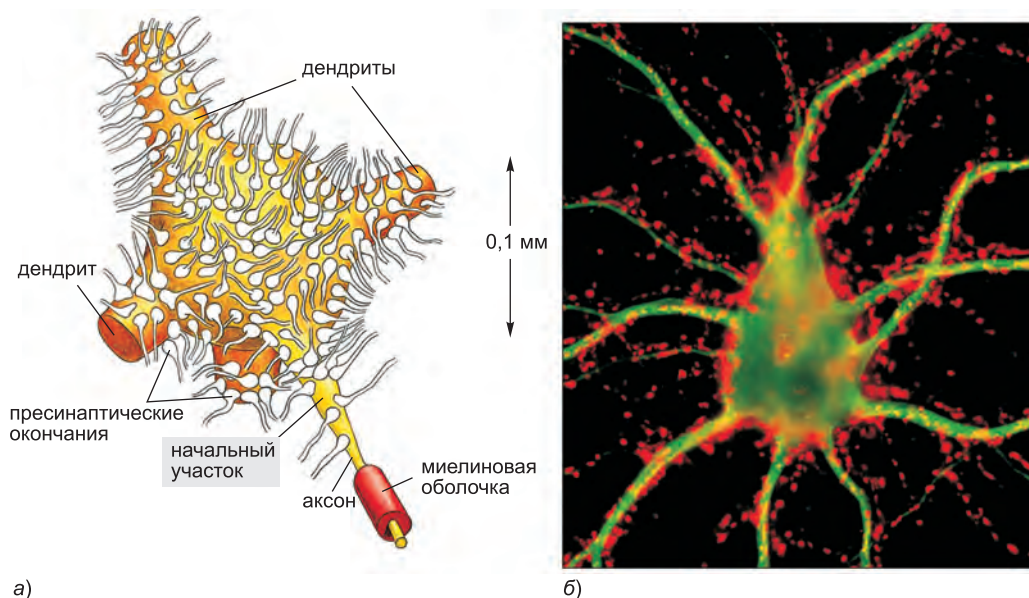


Рис. 11.40. Тело двигательного нейрона спинного мозга. (а) На клеточном теле и дендрите располагаются тысячи синапсов нервных окончаний. Они доставляют сигналы от других частей организма и регулируют генерацию потенциалов действия вдоль единственного аксона этой крупной клетки. (б) Микрофотография тела и дендритов нервной клетки, окрашенной флуоресцентным антителом, узнающим белок цитоскелета (зеленый). Тысячи окончаний аксонов (красные) от других нервных клеток (не показаны) образуют синапсы на теле клетки и дендритах; они окрашены флуоресцентным антителом, узнающим белок синаптических пузырьков. (б, с любезного разрешения Olaf Mundigl и Pietro de Camilli.)

циалов действия (рис. 11.41). Такая кодировка достигается за счет специального набора ионных каналов, в большом количестве присутствующих в прилегающем к телу клетки основанию аксона, области, известной как *начальный сегмент*, или *аксонный холмик* (см. рис. 11.40).

11.3.17. Обработка информации нейроном требует по крайней мере трех типов K^+ -каналов

Мы видели, что интенсивность стимуляции нейрона перекодируется в далеко-действующую передачу через частоту генерируемых нейроном потенциалов действия: чем сильнее стимуляция, тем выше частота потенциалов действия. Потенциалы действия запускаются в **аксонном холмике**, уникальной области каждого нейрона, обогащенной потенциал-зависимыми Na^+ -каналами. Но для выполнения своей функции кодирования мембрана аксонного холмика также содержит по крайней мере четыре других класса ионных каналов — три селективных по K^+ и один селективный по Ca^{2+} . Три вида K^+ -каналов обладают различными свойствами; мы будем называть их *медленными*, *быстрыми* и *Ca^{2+} -зависимыми калиевыми каналами*.

Чтобы понять, зачем необходимо несколько видов каналов, сначала рассмотрим, что случилось бы, если бы единственными потенциал-зависимыми ионными каналами в нервной клетке были Na^+ -каналы. Если синаптическая стимуляция находится ниже определенного порогового уровня, то вызываемой ею деполаризации мембраны аксонного холмика будет недостаточно для запуска потенциала действия. При постепенном увеличении стимуляции порог будет преодолен, откроются Na^+ -каналы и произойдет генерация потенциала действия. Потенциал действия будет терминирован, как обычно, инактивацией Na^+ -каналов. До того как сможет быть послан следующий потенциал действия, эти каналы должны восстановиться после инактивации. Но для этого потребуются возвращение мембранного потенциала кочень отрицательному значению, чего не произойдет при продолжительном сильном деполаризирующем стимуле (от PSP). Таким образом, необходим дополнительный

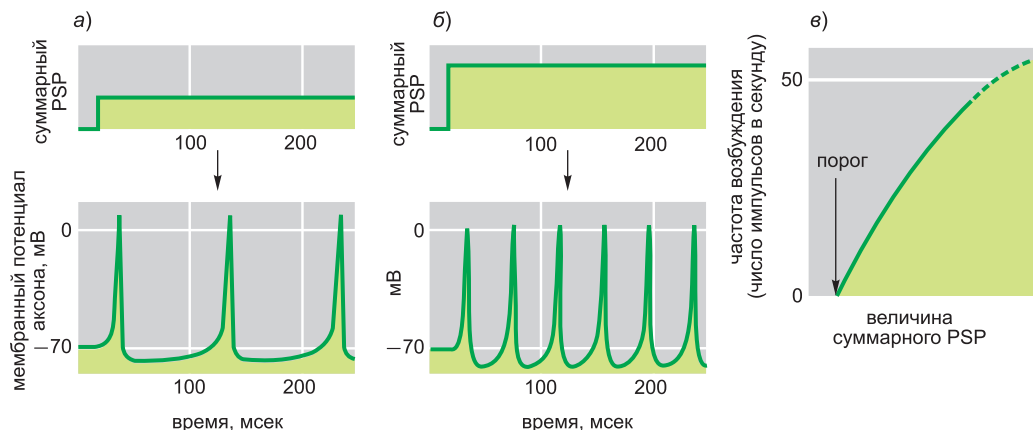


Рис. 11.41. Величина суммарного постсинаптического потенциала (PSP) отражается в частоте генерации потенциалов действия. Когда последовательные потенциалы действия достигают одного синапса, каждый создаваемый ими PSP суммируется с предыдущим, что приводит к большему общему PSP. Сравнение (а) и (б) показывает, как увеличивается частота генерации потенциала действия аксоном при увеличении суммарного PSP. На (в) показано общее соотношение.

тип каналов, который смог бы реполяризовать мембрану после каждого потенциала действия и подготовить ее для дальнейшей генерации импульсов.

Как мы видели раньше, при распространении потенциала действия эту функцию выполняют **медленные K^+ -каналы** (см. **стр. 677(1164)**). Они потенциал-зависимы, но благодаря своей более медленной кинетике открываются только во время фазы реполяризации потенциала действия, когда Na^+ -каналы неактивны. Их открывание приводит к выходу K^+ из клетки, что возвращает мембрану к равновесному потенциалу по K^+ , который настолько отрицателен, что Na^+ -каналы быстро восстанавливаются из инактивированного состояния. Реполяризация мембраны также закрывает медленные K^+ -каналы. Аксонный холмик возвращается в исходное состояние, и деполяризующий стимул от синапсов может запустить новый потенциал действия. Таким образом, постоянная стимуляция дендритов и тела клетки приводит к повторной генерации потенциала действия.

Однако только повторной генерации потенциала действия недостаточно. Частота генерации должна соответствовать интенсивности стимуляции, и простая система Na^+ -каналов и медленных K^+ -каналов недостаточна для решения этой задачи. Ниже определенного уровня постоянной стимуляции клетка совсем не будет генерировать сигналы; выше этого порога она будет отрывисто «выстреливать» с относительно большой скоростью. **Быстрые K^+ -каналы** решают эту проблему. Они тоже являются потенциал-зависимыми и открываются, когда мембрана деполяризуется. Они обладают специфической чувствительностью к потенциалу и кинетикой инактивации, которая направлена на уменьшение частоты потенциалов действия при стимуляции, незначительно превышающей порог генерации импульса. Таким образом, они убирают несоответствие в соотношении между скоростью генерации потенциалов действия и интенсивностью стимуляции. В результате частота импульсов в широких пределах пропорциональна силе деполяризующего стимула (см. рис. 11.41, в).

Процесс кодировки обычно модулируется еще двумя типами ионных каналов аксонного холмика, а именно потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами и Ca^{2+} -зависимыми K^+ -каналами. Их совместное действие направлено на снижение ответа клетки на неизменную продолжительную стимуляцию; этот процесс называется **адаптацией**. Эти Ca^{2+} -каналы сходны с Ca^{2+} -каналами, опосредующими высвобождение нейромедиатора из пресинаптического окончания аксона; они открываются при генерации потенциала действия, временно позволяя Ca^{2+} входить в аксонный холмик.

Ca^{2+} -зависимые K^+ -каналы структурно и функционально отличаются от всех описанных ранее типов каналов. Они открываются в ответ на увеличение концентрации Ca^{2+} на цитоплазматической поверхности мембраны нервной клетки. Предположим, что мы продолжительное время налагаем сильный деполяризующий стимул, запуская длинную цепочку потенциалов действия. Каждый потенциал действия вызывает краткий вход в клетку Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. В результате внутриклеточная концентрация Ca^{2+} постепенно растет и в определенный момент времени достигает уровня, достаточного для открывания Ca^{2+} -зависимых K^+ -каналов. Увеличение проницаемости по K^+ приводит к тому, что мембрану становится сложнее деполяризовать, и в результате увеличивается задержка между последовательными потенциалами действия. Таким образом, нейрон, находящийся под действием продолжительной стимуляции, постепенно становится менее чувствительным к постоянному стимулу.

Такого рода адаптация, которая также может происходить посредством других механизмов, позволяет нейрону и всей нервной системе тонко реагировать на из-

менения даже при высоком фоновом уровне постоянной стимуляции. Это одна из стратегий, которая помогает нам, например, чувствовать легкое прикосновение к плечу и при этом игнорировать постоянное давление нашей одежды. Мы более подробно обсудим адаптацию как общее свойство процессов клеточной сигнализации в главе 15.

Другие нейроны производят другие вычисления, реагируя на синаптические стимулы мириадами способов. Это отражает различное сочетание представителей разнообразных семейств ионных каналов в их мембранах. В человеческом геноме содержится несколько сотен генов, кодирующих ионные каналы, и из них 150 кодируют только потенциал-зависимые каналы. Дальнейшее усложнение происходит за счет альтернативного сплайсинга РНК и сборки каналов из различных комбинаций отличающихся друг от друга субъединиц. Множественность ионных каналов позволяет существовать различным типам нейронов, электрическое поведение которых специфически настроено на выполнение определенной функции.

Одно из наиболее важных свойств нервной системы — ее способность учиться и запоминать, которая в значительной степени зависит от долговременных изменений в определенных синапсах. Мы закончим эту главу рассмотрением удивительного типа ионных каналов, который, по-видимому, играет особую роль в некоторых формах обучения и памяти. Он располагается во многих синапсах центральной нервной системы и управляется как потенциалом, так и возбуждающим нейромедиатором глутаматом. Он также является мишенью психотропного наркотика фециклидина, или «ангельской пыли».

11.3.18. Долговременная потенция гиппокампа млекопитающих зависит от входа Ca^{2+} через NMDA-рецепторы

Практически все животные способны к обучению, но млекопитающие обучаются удивительно хорошо (или нам нравится так думать). В мозге млекопитающих область, носящая название гиппокампа, играет особую роль в обучении. Когда она разрушается с обеих сторон мозга, теряется способность формировать новые воспоминания, хотя приобретенные ранее воспоминания сохраняются. Соответственно, у некоторых синапсов в гиппокампе при постоянном использовании наблюдаются выраженные функциональные изменения: если отдельный потенциал действия пресинаптической клетки не оставляет следов, то их короткая последовательность вызывает **долговременную потенцию** (Long-term Potentiation, **LTP**). При долговременной потенции последующие единичные потенциалы действия пресинаптической клетки вызывают усиленный ответ постсинаптической клетки. Такой эффект может сохраняться часами, днями или неделями, в зависимости от числа и интенсивности цепочек импульсов. Только активированные синапсы обладают долговременной потенцией; синапсы на той же постсинаптической клетке, которые остались в покое, не изменяются. Однако, когда клетка подвергается воздействию повторяющейся стимуляции через один набор синапсов, если хотя бы один потенциал действия попадет на *другой* синапс на поверхности нейрона, этот синапс также испытает LTP, хотя в другое время отдельный потенциал действия не оставил бы следа.

Основополагающим правилом в таких синапсах служит следующее: *долговременную потенцию наблюдают тогда, когда пресинаптическая клетка «выстреливает» (один раз или больше) в момент времени, когда постсинап-*

тическая мембрана сильно деполяризована (благодаря недавней продолжительной стимуляции или любым другим образом). Это правило отражает поведение определенного класса ионных каналов постсинаптической мембраны. Глутаминовая кислота служит основным возбуждающим нейромедиатором центральной нервной системы млекопитающих, и глутамат-зависимые ионные каналы являются наиболее распространенными медиатор-зависимыми каналами головного мозга. В гиппокампе, как и везде, большая часть деполяризующего тока, ответственного за ВПСП, опосредуется глутамат-зависимыми ионными каналами, носящими название **AMPA-рецепторов**. Они работают так же, как и другие каналы. Но ток обладает дополнительным и более интересным компонентом, который опосредуется другим подклассом глутамат-зависимых ионных каналов — **NMDA-рецепторами**, названными так потому, что они селективно активируются искусственным аналогом глутамата N-метил-D-аспаратом. NMDA-рецепторы регулируются двумя факторами, открываясь только при одновременном выполнении двух условий: с рецептором должен быть связан глутамат и мембрана должна быть сильно деполяризована. Второе условие необходимо для высвобождения Mg^{2+} , который в норме блокирует покоящийся канал. Это означает, что NMDA-рецепторы активируются только тогда, когда AMPA-рецепторы активированы и деполяризуют мембрану. NMDA-рецепторы необходимы для долговременной потенциации. Когда они селективно блокированы специфическим ингибитором, или если у трансгенных животных их ген нокаутирован, долговременная потенциация не наблюдается, даже если простая синаптическая передача сохраняется. Такие животные ущербны по способности к обучению, но в других аспектах они ведут себя практически нормально.

Как NMDA-рецепторы вызывают такой удивительный эффект? Ответ состоит в том, что эти каналы в открытом состоянии высоко проницаемы для Ca^{2+} , который служит внутриклеточным медиатором в постсинаптической клетке, запуская каскад изменений, приводящих к долговременной потенциации. Таким образом, долговременная потенциация не происходит, когда концентрация свободного Ca^{2+} в постсинаптической клетке искусственно поддерживается на низком уровне путем инъекции в нее хелатора Ca^{2+} ЭДТА. И наоборот, долговременную потенциацию можно искусственно вызвать, увеличив внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} . Еще одним долговременным изменением, увеличивающим чувствительность постсинаптической клетки к глутамату, является ввод в плазматическую мембрану новых AMPA-рецепторов (**рис. 11.42**). Также показано, что изменения могут произойти и в пресинаптической клетке, заставив ее при последовательной активации высвобождать больше глутамата, чем в норме.

Если бы синапсы постоянно были в состоянии долговременной потенциации, то они быстро бы достигли насыщения и не смогли бы служить в качестве устройства хранения информации. В самом деле, синапсам также свойственна **долговременная депрессия** (Long-term Depression, **LTD**), которая, как ни удивительно, также требует активации NMDA-рецепторов и увеличения концентрации Ca^{2+} . Как Ca^{2+} вызывает противоположные эффекты в одном и том же синапсе? Оказывается, такая двунаправленная регуляция синаптической силы зависит от уровня увеличения концентрации Ca^{2+} : высокие концентрации Ca^{2+} активируют протеинкиназы и долговременную потенциацию, а незначительные концентрации Ca^{2+} — протеинфосфатазы и долговременную депрессию.

Существуют доказательства того, что NMDA-рецепторы играют важную роль в обучении и связанных с ним явлениях в других областях мозга, помимо гип-

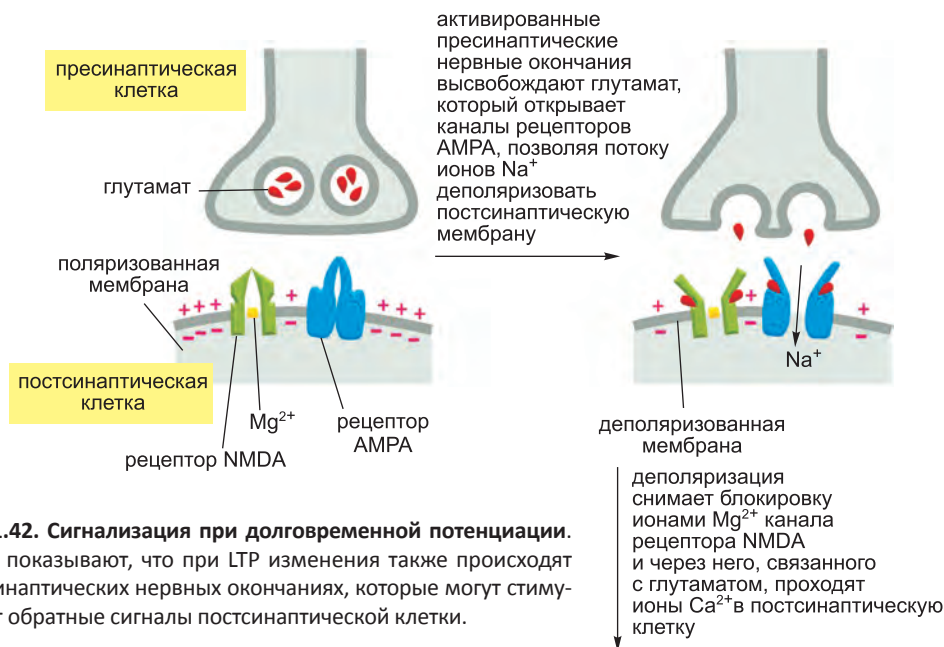


Рис. 11.42. Сигналинг при долговременной потенциации. Опыты показывают, что при LTP изменения также происходят в пресинаптических нервных окончаниях, которые могут стимулировать обратные сигналы постсинаптической клетки.

покампа. Более того, в главе 21 мы увидим, что NMDA-рецепторы играют ключевую роль в формировании анатомической структуры синаптических связей в свете развития нервной системы.

Таким образом, нейромедиаторы, высвобождаемые в синапсах, помимо передачи кратковременных электрических сигналов, также способны изменять концентрации внутриклеточных медиаторов, которые вызывают продолжительные изменения эффективности синаптической передачи. Однако до сих пор неясно, как такие изменения, несмотря на нормальный круговорот клеточных компонентов, сохраняются на протяжении недель, месяцев или всей жизни.

Краткая характеристика некоторых рассмотренных нами ионных каналов приведена в [таблице 11.2](#).

Заключение

Ионные каналы образуют в липидном бислое водные поры и позволяют неорганическим ионам подходящего размера пересекать мембрану по электрохимическому градиенту со скоростью, превышающей скорость транспортеров в 1000 раз. Каналы обладают «воротами», которые обычно временно открываются в ответ на определенное воздействие на мембрану, например изменение

Таблица 11.2. Некоторые семейства ионных каналов

ТИП КАНАЛА	ПОКАЗАТЕЛЬНЫЙ ПРИМЕР
Потенциал-зависимые катионные каналы	потенциал-зависимые Na^+ -каналы потенциал-зависимые K^+ -каналы (включая медленные и быстрые) потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы
Медиатор-зависимые ионные каналы	ацетилхолин-зависимые катионные каналы возбуждающие глутамат-зависимые Ca^{2+} -каналы серотонин-зависимые катионные каналы ГАМК-зависимые Cl^- -каналы тормозные глицин-зависимые Cl^- -каналы

мембранного потенциала (потенциал-зависимые каналы) или связывание нейромедиатора (медиатор-зависимые ионные каналы).

K^+ -селективные каналы утечки играют важную роль в установлении потенциала покоя плазматической мембраны большинства животных клеток. Потенциал-зависимые катионные каналы отвечают за генерацию самоусиливающихся потенциалов действия в таких электрически возбудимых клетках, как нейроны и клетки скелетных мышц. Медиатор-зависимые каналы переводят химический сигнал в электрический в химических синапсах. Возбуждающие нейромедиаторы, например ацетилхолин и серотонин, открывают медиатор-зависимые катионные каналы и деполяризуют постсинаптическую мембрану до порогового уровня генерации потенциала действия. Тормозные нейромедиаторы, такие как ГАМК и глицин, открывают медиатор-зависимые Cl^- - или K^+ -каналы и подавляют генерацию импульсов, поддерживая поляризацию постсинаптической мембраны. Подкласс глутамат-зависимых ионных каналов, носящий название NMDA-рецепторов, высоко проницаем для Ca^{2+} , который способен вызывать такие долговременные изменения синапсов, как LTP и LTD, и, соответственно, влиять на некоторые процессы обучения и памяти.

Ионные каналы сложным образом взаимодействуют, регулируя поведение электрически возбудимых клеток. Типичный нейрон, например, получает тысячи возбуждающих и тормозящих сигналов, которые суммируются в пространстве и времени для создания постсинаптического потенциала (ПСП) в теле клетки. Величина ПСП перекодируется в частоту генерации потенциалов действия комбинацией катионных каналов в мембране аксонного холмика.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

11.1. Транспорт, опосредуемый переносчиками, может быть как активным, так и пассивным, тогда как транспорт через каналы всегда пассивен.

11.2. Транспортеры достигают насыщения при высоких концентрациях транспортируемой молекулы, когда все их сайты связывания заняты; каналы, с другой

стороны, не связывают переносимые ионы, и, следовательно, поток ионов через канал никогда не достигает насыщения.

11.3. Мембранный потенциал возникает благодаря движению зарядов, почти не влияющему на концентрации ионов. В результате соотношение между положительными и отрицательными ионами по обеим сторонам мембраны не нарушается.

Решите следующие задачи

11.4. Расположите Ca^{2+} , CO_2 , этанол, глюкозу, РНК и H_2O в соответствии с их способностью диффундировать через липидный бислой, начиная с того вещества, которое легче всего пересекает бислой. Объясните ваш ответ.

11.5. Почему некоторые молекулы находятся в равновесии по обеим сторонам мембраны, но при этом их концентрации снаружи и внутри клетки различаются?

11.6. Ионные переносчики «сопряжены» — не физически, но через последствия их работы. Например, клетки могут повысить свой внутриклеточный pH, если он стал слишком кислым, путем обмена внешнего Na^+ на внутренний H^+ , используя Na^+/H^+ -антипорт. Изменение концентрации внутриклеточного Na^+ затем возмещается Na^+/K^+ -насосом.

а. Могут ли эти два транспортера, работая вместе, одновременно нормализовать концентрации Na^+ и H^+ внутри клетки?

б. Вызывает ли сопряженное действие этих двух насосов нарушение равновесия концентрации K^+ или мембранного потенциала? Почему?

11.7. Микроворсинки увеличивают площадь поверхности клеток кишечного тракта, что повышает эффективность всасывания питательных веществ. Поперечный и продольный срезы микроворсинок показаны на [рис. Q11.1](#). Используя указанный на рисунке масштаб, оцените увеличение площади поверхности за счет микроворсинок (для области плазматической мембраны, контактирующей с просветом кишечника) относительно клетки с «плоской» плазматической мембраной.

11.8. Согласно законам движения Ньютона ион в электрическом поле в вакууме будет испытывать действие электрической движущей силы и ускоряться, аналогично тому, как падение тела в вакууме постоянно ускоряется за счет силы гравитации. Однако в воде ион под действием электрической силы движется с постоянной скоростью. Как вы думаете, почему?

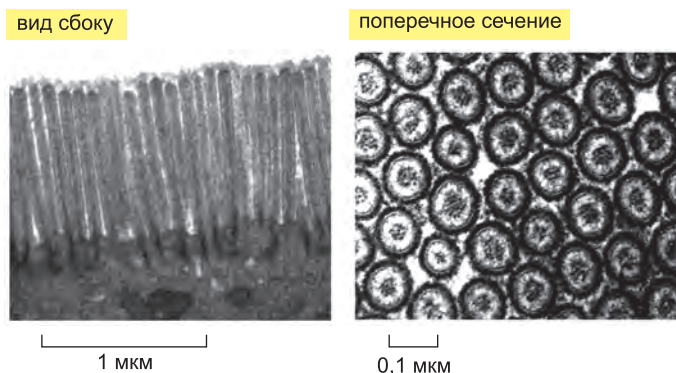


Рис. Q11.1. Микроворсинки эпителиальных клеток кишечника в продольном и поперечном срезах (задача 11.7). (Левый рисунок, с любезного разрешения Rippel Electron Microscope Facility, Dartmouth College; Правый рисунок, с любезного разрешения David Burgess.)

11.9. Модель «шарика на нитке» быстрой инактивации потенциал-зависимых K^+ -каналов изящно подтверждена на примере «трясущихся» (*shaker*) K^+ -каналов *Drosophila melanogaster*. (Название *shaker* произошло от мутанта *Drosophila* по этому гену, характеризующегося повышенной возбудимостью — даже под анестезией мушки продолжают дергаться.) Делеция N-концевых аминокислот нормального *shaker*-канала приводит к тому, что канал открывается в ответ на деполяризацию мембраны, но не закрывается, как нормальный канал. Пептид (MAAVAGLYGLGE-DRQHRKKQ), соответствующий удаленному N-концу, может инактивировать открытый канал при концентрации 100 мкМ.

Соответствует ли концентрация пептида (100 мкМ), необходимая для инактивации дефектного K^+ -канала, нормальной локальной концентрации связанного «шарика» нормального канала? Предположите, что связанный «шарик» способен обогнуть полусферу [объем = $(2/3)\pi r^3$] радиуса 21,4 нм, что соответствует длине полипептидной «нити» (рис. Q11.2). Рассчитайте концентрацию «шарика» в полусфере. Как полученное вами значение соотносится с необходимой для инактивации канала концентрацией свободного пептида?

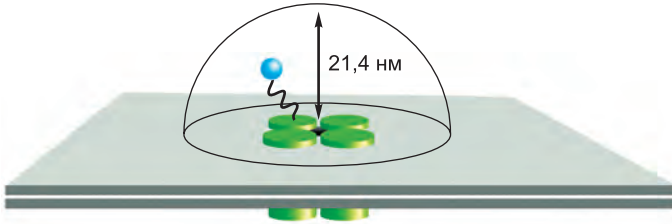


Рис. Q11.2. «Шарик», связанный «нитью» с потенциал-зависимым K^+ -каналом (задача 11.9).

11.10. Гигантский аксон кальмара занимает особое место в истории нашего понимания мембранных потенциалов клетки и работы нейронов. Когда в интактный гигантский аксон вставляется электрод, регистрируемый им мембранный потенциал равен -70 мВ. При стимуляции аксона, вымоченного в морской воде, и проведении им нервного импульса потенциал быстро меняется с -70 мВ до $+40$ мВ.

Для одновалентных ионов при 20°C (293 K) уравнение Нернста упрощается до

$$V = 58 \text{ мВ} \times \lg (C_o/C_i),$$

где C_o и C_i — внешняя и внутренняя концентрации иона соответственно.

При помощи данного уравнения рассчитайте потенциал покоя мембраны, предполагая, что (1) он зависит только от K^+ , и (2) он зависит только от Na^+ . (Концентрации Na^+ и K^+ в цитоплазме аксона и морской воде приведены в таблице Q11.1.) Какое из полученных вами значений ближе к измеренному потенциалу покоя? Какое ближе к измеренному потенциалу действия? Объясните, почему такие допущения позволяют получить приблизительные потенциалы покоя и действия.

Таблица Q11.1. Ионный состав морской воды и цитоплазмы гигантского аксона кальмара (задача 11.10)

ИОН	ЦИТОПЛАЗМА	МОРСКАЯ ВОДА
Na^+	65 мМ	430 мМ
K^+	344 мМ	9 мМ

Список литературы

Общий

Martonosi A.N. (ed.) (1985) The enzymes of Biological membranes, vol. 3: Membrane transport. 2nd edn. New York: Penum Press.

Stein W.D. (1990) Channels, carriers and pumps: An introduction to membrane transport. San Diego: Academic Press.

Принципы мембранного транспорта

Al-Awqati Q. (1999) One hundred years of membrane permeability: does Overton still rule? *Nature Cell Biol.* 1: E201–E202.

Forrest L.R. & Sansom M.S. (2000) Membrane simulations: bigger and better? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 174–181.

Gouaux E. and MacKinnon R. (2005) Principles of selective ion transport in channels and pumps. *Science* 310: 1461–1465.

Mitchell P. (1977) Vectorial chemiosmotic processes. *Annu. Rev. Biochem.* 46: 996–1005.

Tanford C. (1983) Mechanism of free energy coupling in active transport. *Annu. Rev. Biochem.* 52: 379–409.

Белки-переносчики

Aimers W. & Stirling C. (1984) Distribution of transport proteins over animal cell membranes. *J. Membr. Biol.* 77: 169–186.

Baldwin S.A. & Henderson P.J. (1989) Homologies between sugar transporters from eukaryotes and prokaryotes. *Annu. Rev. Physiol.* 51: 459–471.

Borst P. & Elferink R.O. (2002) Mammalian ABC transporters in health and disease. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 537–592.

Carafoli E. & Brini M. (2000) Calcium pumps: structural basis for and mechanism of calcium transmembrane transport. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4: 152–161.

Dean M., Rzhetsky A. et al. (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* 11: 1156–1166.

Doige C.A. & Ames G.F. (1993) ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 47: 291–319.

Gadsby D.C., Vergani P. & Csanady L. (2006) The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* 440: 477–83.

Higgins C.F. (2007) Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. *Nature* 446: 749–57.

Kaback H.R., Sahin-Toth M. et al. (2001) The kamikaze approach to membrane transport. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 610–620.

Kühlbrandt W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 282–295.

Lodish H.F. (1986) Anion-exchange and glucose transport proteins: structure, function, and distribution. *Harvey Lect.* 82: 19–46.

Pedersen P.L. & Carafoli E. (1987) Ion motive ATPases. 1. Ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends Biochem. Sci.* 12: 146–150.

Romero M.F. & Boron W.F. (1999) Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 699–723.

Saier M. H., Jr. (2000) Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. *J. Bacteriol.* 182: 5029–5035.

Scarborough G. A. (2003) Rethinking the P-type ATPase problem. *Trends Biochem. Sci.* 28: 581–584.

Stein W. D. (2002) Cell volume homeostasis: ionic and nonionic mechanisms. The sodium pump in the emergence of animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 215: 231–258.

Ионные каналы и электрические свойства мембран

Armstrong C. (1998) The vision of the pore. *Science* 280: 56–57.

Choe S. (2002) Potassium channel structures. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 115–21.

Choe S., Kreuzsch A. & Pfaffinger P. J. (1999) Towards the three-dimensional structure of voltage-gated potassium channels. *Trends Biochem. Sci.* 24: 345–349.

Franks N. P. & Lieb W. R. (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367: 607–614.

Greengard P. (2001) The neurobiology of slow synaptic transmission. *Science* 294: 1024–30.

Hille B. (2001) *Ionic Channels of Excitable Membranes*, 3rd ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Hucho F., Tsetlin V. I. & Machold J. (1996) The emerging three-dimensional structure of a receptor. The nicotinic acetylcholine receptor. *Eur. J. Biochem.* 239: 539–557.

Hodgkin A. L. & Huxley A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117: 500–544.

Hodgkin A. L. & Huxley A. F. (1952) Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* 116: 449–472.

Jessell T. M. & Kandel E. R. (1993) Synaptic transmission: a bidirectional and self-modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72[Suppl]: 1–30.

Kandel E. R., Schwartz J. H. & Jessell T. M. (2000) *Principles of Neural Science*, 4th ed. New York: McGraw-Hill.

Karlin A. (2002) Emerging structure of the nicotinic acetylcholine receptors. *Nature Rev. Neurosci.* 3: 102–114.

Katz B. (1966) *Nerve, Muscle and Synapse*. New York: McGraw-Hill.

King L. S., Kozono D. & Agre P. (2004) From structure to disease: the evolving tale of aquaporin biology. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 687–698.

MacKinnon R. (2003) Potassium channels. *FEBS Lett.* 555: 62–65.

Malenka R. C. & Nicoll R. A. (1999) Long-term potentiation — a decade of progress? *Science* 285: 1870–1874.

Moss S. J. & Smart T. G. (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nature Rev. Neurosci.* 2: 240–250.

Neher E. and Sakmann B. (1992) The patch clamp technique. *Sci. Am.* 266: 44–51.

Nicholls J. G., Fuchs P. A., Martin A. R. & Wallace B. G. (2000) *From Neuron to Brain*, 4th ed. Sunderland, MA: Sinauer.

Numa S. (1987) A molecular view of neurotransmitter receptors and ionic channels. *Harvey Lect.* 83: 121–165.

Scannevin R. H. & Haganir R. L. (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nature Rev. Neurosci.* 1: 133–141.

Seeburg P.H. (1993) The molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci.* 16: 359–365.

Snyder S.H. (1996) *Drugs and the Brain*. New York: WH Freeman/Scientific American Books.

Stevens C.F. (2004) Presynaptic function. *Curr. Opin. Neurobiol.* 14: 341–345.

Tsien R.W., Lipscombe D., Madison D.V. et al. (1988) Multiple types of neuronal calcium channels and their selective modulation. *Trends Neurosci.* 11: 431–438.

Unwin N. (2003) Structure and action of the nicotinic acetylcholine receptor explored by electron microscopy. *FEBS Lett.* 555: 91–95.

12

Внутриклеточные компартменты и сортировка белков

В отличие от бактерий, которые представляют собой единственный внутриклеточный компартмент, окруженный плазматической мембраной, эукариотическая клетка подразделена на функционально отличные друг от друга замкнутые мембранные компартменты. Каждый компартмент, или **органелла**, содержит свой собственный характерный набор ферментов и других специализированных молекул. Для транспорта определенных продуктов из одного компартмента в другой существуют сложные системы распределения. Чтобы понять эукариотическую клетку, необходимо знать, как она создает и поддерживает эти компартменты, что происходит в каждом из них и как молекулы движутся между ними.

Белки определяют характерные структурные и функциональные свойства каждого компартмента. Они катализируют реакции, протекающие в органелле, и селективно транспортируют малые молекулы из компартмента и в его просвет (т.е. в **люмен**). Белки также служат органелло-специфичными поверхностными маркерами, направляющими доставленные белки и липиды в соответствующую органеллу.

Животная клетка содержит около 10 миллиардов (10^{10}) белковых молекул примерно 10 тысяч видов. Синтез большинства из них начинается в цитозоле. Каждый новый белок затем доставляется именно в тот клеточный компартмент, которому он требуется. Внутриклеточный транспорт белков является центральной темой этой и следующей глав. Следя за передвижением белков из одного компартмента в другой, можно начать понимать запутанный лабиринт внутриклеточных мембран.

12.1. Компартментализация клеток

В данном кратком обзоре компартментов клетки и взаимоотношений между ними мы разделим органеллы на небольшое число семейств, обсудим, как белки направляются в определенные органеллы, и объясним, как белки проходят через мембраны органелл.

12.1.1. Все эукариотические клетки обладают одинаковым базовым набором мембранных органелл

Многие жизненно важные биохимические процессы происходят в мембранах или на их поверхности. Например, связанные с мембранами ферменты катализируют метаболизм липидов, а в случае окислительного фосфорилирования и фотосинтеза мембраны необходимы для сопряжения транспорта H^+ с синтезом АТФ. Помимо увеличения площади мембран для протекания на них биохимических реакций, внутриклеточные мембранные системы образуют замкнутые компартменты, отделенные

от цитозоля. Благодаря этому в пределах клетки создаются специализированные водные пространства. Поскольку липидный бислой мембран органелл непроницаем для большинства гидрофильных молекул, мембрана каждой органеллы должна содержать мембранные транспортные белки для импорта и экспорта специфических метаболитов. Каждая мембрана органеллы также должна обладать механизмом импорта и инкорпорации в органеллу специфических белков, делающих этот компартмент уникальным.

На **рис. 12.1** представлены основные внутриклеточные компартменты эукариотических клеток. В **ядре** содержится геном (за исключением митохондриального и хлоропластного геномов) и происходит основной синтез РНК и ДНК. Окружающая **цитоплазма** состоит из цитозоля и взвешенных в нем цитоплазматических органелл. **Цитозоль** составляет чуть более половины общего объема клетки и является местом синтеза и деградации белков. В нем также происходит большая часть промежуточного обмена веществ (метаболизма) клетки, т.е. многие реакции распада и синтеза малых молекул для создания «строительных блоков» для макромолекул (см. главу 2).

Около половины общей площади мембраны эукариотических клеток принадлежит извилистому лабиринту **эндоплазматического ретикулула (ЭР)**. **Шероховатый (гранулярный) ЭР** несет множество связанных с его цитоплазматической поверхностью рибосом; они синтезируют как растворимые, так и мембранные белки, большинство которых предназначено для секреции во внешнюю среду клетки или для других органелл. Мы увидим, что, несмотря на то что белки транспортируются в другие органеллы только после завершения их синтеза, по мере синтеза они транспортируются в ЭР. Это объясняет, почему мембрана ЭР несет рибосомы и отличается от других мембран. В ЭР также синтезируется большинство липидов клетки, и он служит депо ионов Ca^{2+} . Области ЭР, свободные от связанных рибосом, называются **гладким (агранулярным) ЭР**. ЭР посылает многие свои белки и липиды в **аппарат Гольджи**, который состоит из упорядоченных стопок плоских дисковидных компартментов, носящих название **цистерн Гольджи**. Аппарат Гольджи получает липиды и белки от ЭР и направляет их в другие органеллы, обычно ковалентно модифицируя их в процессе.

Митохондрии и (в растениях) **хлоропласты** синтезируют большую часть АТФ, используемого клеткой в качестве движущей силы реакций, требующих затраты свободной энергии; хлоропласты — разновидность **пластид**, которые в растительной клетке могут выполнять и другие функции, например, запасаение питательных веществ или молекул пигментов. **Лизосомы** содержат пищеварительные ферменты, которые деградируют дефектные внутриклеточные органеллы, макромолекулы и частицы, захваченные из окружающей среды посредством эндоцитоза. На пути к лизосомам эндоцитированное вещество сначала должно пройти через набор органелл, носящих название **эндосом**. Наконец, **пероксисомы** — это маленькие везикулярные компартменты, содержащие ферменты различных окислительных реакций.

В общем случае мембранные замкнутые органеллы во всех типах клеток выполняют одинаковый набор базовых функций. Но для выполнения специализированных функций клетки эти органеллы могут содержаться в разном количестве и обладать дополнительными свойствами, изменяющимися от клетки к клетке.

В среднем мембранные органеллы все вместе занимают около половины объема клетки (**таблица 12.1**), и для их создания требуется большое количество внутриклеточных мембран. В клетках печени и поджелудочной железы, например, площадь

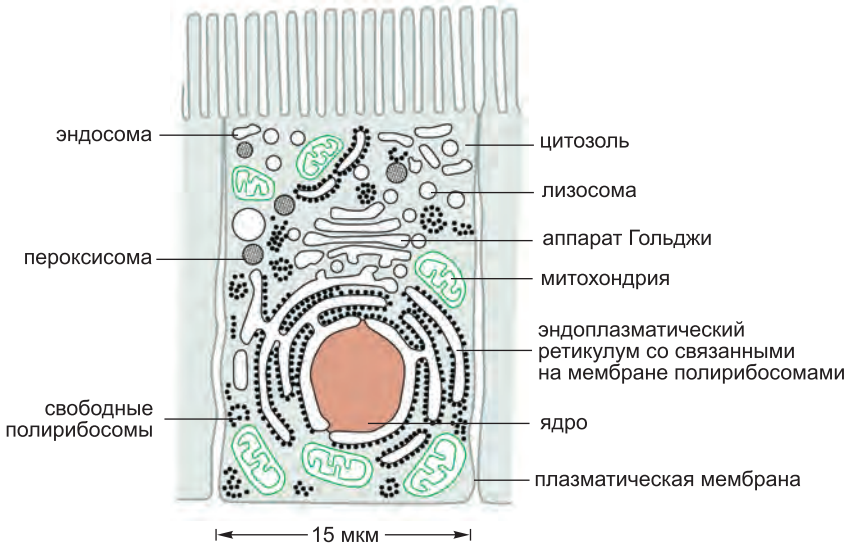


Рис. 12.1. Основные внутриклеточные компартменты животной клетки. Цитозоль (серый), эндоплазматический ретикулум, ядро, митохондрии, эндосомы, лизосомы и пероксисомы представляют собой различные компартменты, отделенные от остальной клетки по крайней мере одной селективно проницаемой мембраной.

мембраны эндоплазматического ретикулума в 25 и 12 раз соответственно превышает площадь плазматической мембраны (таблица 12.2). В терминах площади и массы плазматическая мембрана является малозначительной в большинстве эукариотических клеток, и органеллы плотно упакованы в цитозоле (рис. 12.2).

Мембранные органеллы часто расположены в цитозоле в определенной ориентации. Например, в большинстве клеток аппарат Гольджи находится вблизи ядра, а сеть трубочек ЭР распространяется от ядра по всему цитозолю. Такая характерная локализация зависит от взаимодействия органелл с цитоскелетом. Расположение как ЭР, так и аппарата Гольджи зависит от интактной сети микротрубочек; если микротрубочки искусственно деполимеризовать химическим веществом, аппарат Гольджи распадается и распространяется по всей клетке, а сеть ЭР схлопывается к центру клетки (см. главу 16).

Таблица 12.1. Относительные объемы, занимаемые основными внутриклеточными компартментами клетки печени (гепатоцита)

Внутриклеточный компартмент	Процент от общего объема клетки
Цитозоль	54
Митохондрия	22
Шероховатый ЭР	9
Гладкий ЭР и аппарат Гольджи	6
Ядро	6
Пероксисомы	1
Лизосомы	1
Эндосомы	1

Таблица 12.2. Относительное содержание разных типов мембран в двух видах эукариотических клеток

Тип мембраны	Процент от общей площади мембраны клетки	
	Гепатоцит печени*	Панкреатическая экзокринная клетка*
Плазматическая мембрана	2	5
Мембрана шероховатого ЭР	35	60
Мембрана гладкого ЭР	16	< 1
Мембрана аппарата Гольджи	7	10
Митохондрия		
Внешняя мембрана	7	4
Внутренняя мембрана	32	17
Ядро		
Внутренняя мембрана	0,2	0,7
Мембрана секреторных пузырьков	не определено	3
Лизосомальная мембрана	0,4	не определено
Мембрана пероксисом	0,4	не определено
Эндосомальная мембрана	0,4	не определено

*Эти клетки значительно различаются по размерам: объем среднего гепатоцита составляет 5000 мкм³, а панкреатической экзокринной клетки — 1000 мкм³. Общая площадь клеточных мембран, по оценкам, составляет 110 000 и 13 000 мкм² соответственно.

12.1.2. Эволюционное происхождение объясняет топологические взаимоотношения органелл

Чтобы понять взаимоотношения между компартментами клетки, полезно рассмотреть, как они могли эволюционировать. Считают, что предшественниками первых эукариотических клеток были простые организмы, напоминавшие бактерии, у которых обычно есть плазматическая мембрана, но отсутствуют внутренние. Таким образом, плазматическая мембрана таких клеток выполняет все мембранозависимые функции, включая транспорт ионов, синтез АТФ, секрецию белков и синтез липидов. Типичные современные эукариотические клетки в 10–30 раз больше в длину и в 1000–10000 раз больше по объему, чем типичная бактерия, например *E. coli*. Разнообразие внутренних мембран частично можно рассматривать как приспособление к увеличению размеров: эукариотическая клетка обладает значительно меньшим отношением площади поверхности к объему, и, следовательно, площадь их плазматической мембраны, по-видимому, слишком мала для поддержания многих жизненно важных функций, выполняемых мембранами. Множество внутренних мембранных систем эукариотических клеток решает эту проблему.

Эволюция внутриклеточных мембран, по-видимому, сопровождалась специализацией их функций. Рассмотрим, например, образование *тилакоидных пузырьков* в хлоропластах. Эти пузырьки формируются, когда в клетках зеленого листа хлоропласты развиваются из пропластид, маленьких органелл-предшественников, присутствующих во всех незрелых растительных клетках. Эти органеллы окружены двойной мембраной и развиваются в соответствии с нуждами дифференцирующейся клетки: например, они становятся хлоропластами в клетках листьев, но в других типах клеток они превращаются в органеллы, запасующие крахмал, жиры или

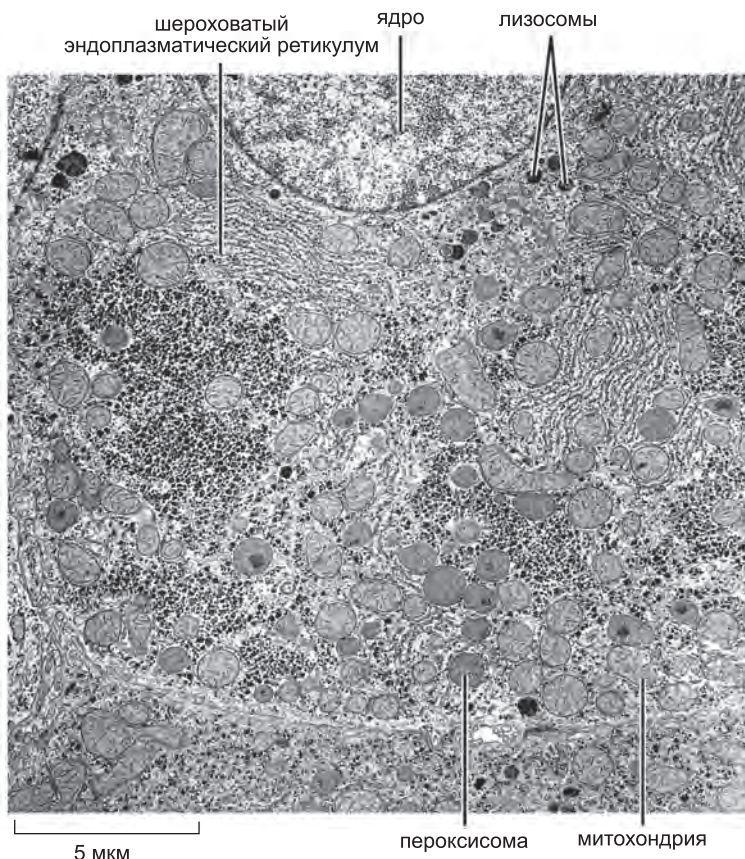


Рис. 12.2. Электронная микрофотография поперечного среза участка клетки печени. Показаны примеры большинства основных внутриклеточных компартментов. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

пигменты (**рис. 12.3, а**). Когда пропластиды переходят в хлоропласты, на их внутренней мембране формируются специализированные участки, которые затем изгибаются и отпочковываются. Эти везикулы образуют новый специализированный компартмент, *тилакоид*, в котором содержится весь синтетический аппарат хлоропласта (**рис. 12.3, б**).

Другие компартменты эукариотических клеток могли возникнуть сходным образом (**рис. 12.4**). В результате инвагинации и отпочковывания специализированных внутриклеточных мембранных структур от плазматической мембраны образуются органеллы, внутреннее пространство которых топологически эквивалентно окружению клетки. Мы увидим, что такие топологические взаимоотношения свойственны всем органеллам, участвующим в секреторных и эндоцитозных путях, включая ЭР, аппарат Гольджи, эндосомы и лизосомы. Таким образом, мы можем рассматривать эти органеллы как одно семейство. Как мы подробно обсудим в следующей главе, их внутренние пространства активно взаимодействуют друг с другом и внешней средой клетки посредством *транспортных пузырьков*, которые отпочковываются от одной органеллы и сливаются с другой (**рис. 12.5**).

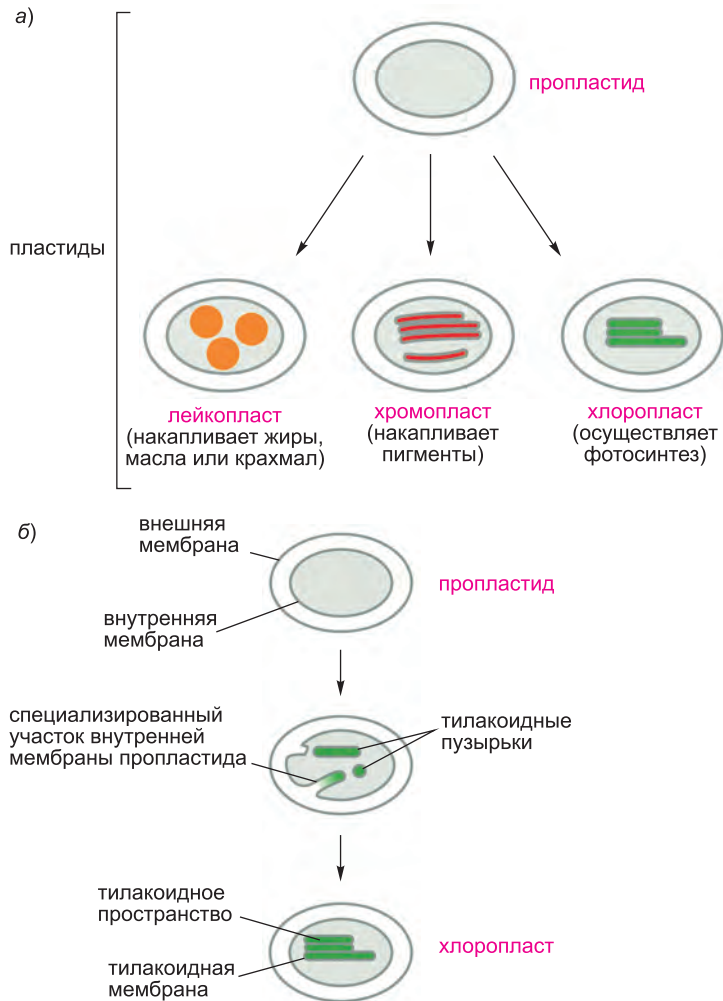


Рис. 12.3. Развитие пластид. (а) Пропластиды наследуются с цитоплазмой растительной яйцеклетки. По мере того как незрелые клетки дифференцируются, пропластиды развиваются в соответствии с нуждами специализированной клетки: они могут стать хлоропластами (в клетках зеленых листьев); лейкопластами, запасующими крахмал (например, в клубнях картофеля) или масляные и липидные капли (например, в семенах масличного растения); или хромопластами, в которых содержатся пигменты (например, в цветочных лепестках). (б) Развитие тилакоида. По мере развития хлоропласта происходит инвагинация и отпочковывание специализированных участков внутренней мембраны пропластида. Из них формируются тилакоидные пузырьки, которые затем развиваются в зрелый тилакоид. Мембрана тилакоида образует отдельный компартмент — тилакоидное пространство, которое структурно и функционально отличается от остальной части хлоропласта. Тилакоиды способны автономно расти и делиться по мере пролиферации хлоропласта.

Как описано в главе 15, митохондрии и пластиды отличаются от других мембранных органелл, поскольку они содержат свой собственный геном. Природа этих геномов и значительное сходство белков этих органелл с белками некоторых современных бактерий указывают на то, что митохондрии и пластиды эволюционировали из бактерий, поглощенных другими клетками и начавшими жить с ними

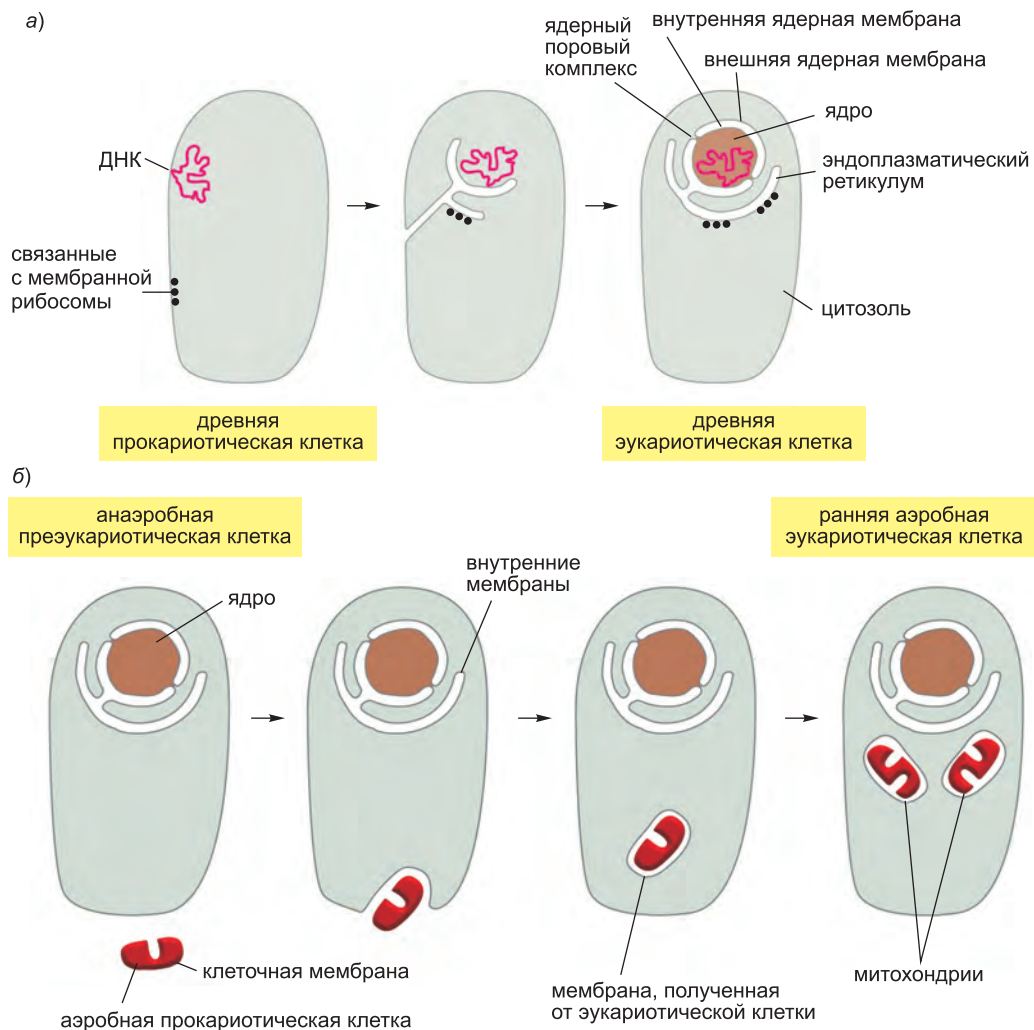


Рис. 12.4. Гипотетические схемы эволюционного происхождения некоторых органелл. Происхождение митохондрий, хлоропластов, ЭР и клеточного ядра может объяснить топологические взаимоотношения этих компартментов в эукариотической клетке. а) Возможный путь эволюции клеточного ядра и ЭР. У некоторых бактерий единственная молекула ДНК, образующая бактериальную хромосому, прикрепляется к выпячиванию плазматической мембраны. Такое выпячивание в очень древних прокариотических клетках могло превратиться в оболочку вокруг ДНК, позволяющую ДНК взаимодействовать с цитозолем (что необходимо для прямого синтеза белка с ДНК). Считают, что эта оболочка в конце концов полностью отделилась от плазматической мембраны, что привело к образованию ядерного компартмента, окруженного двойной мембраной. Как показано, регулируемые ядерные поровые комплексы (ЯПК) пронизывают оболочку ядра. Поскольку ядерный компартмент окружен двумя мембранами, которые непрерывно сообщаются друг с другом в местах расположения ЯПК, он топологически эквивалентен цитозолу; в самом деле, во время митоза содержимое ядра смешивается с цитозолем. Люмен ЭР продолжает пространство между внутренней и внешней ядерными мембранами, и он топологически эквивалентен внеклеточному пространству (см. рис. 12.5). б) Считается, что митохондрии (и пластиды) возникли, когда крупная пре-эукариотическая клетка поглотила бактерию. Это может объяснить, почему они несут свой собственный геном и почему люмены этих органелл изолированы от мембранного транспорта, соединяющего люмены других внутриклеточных компартментов.

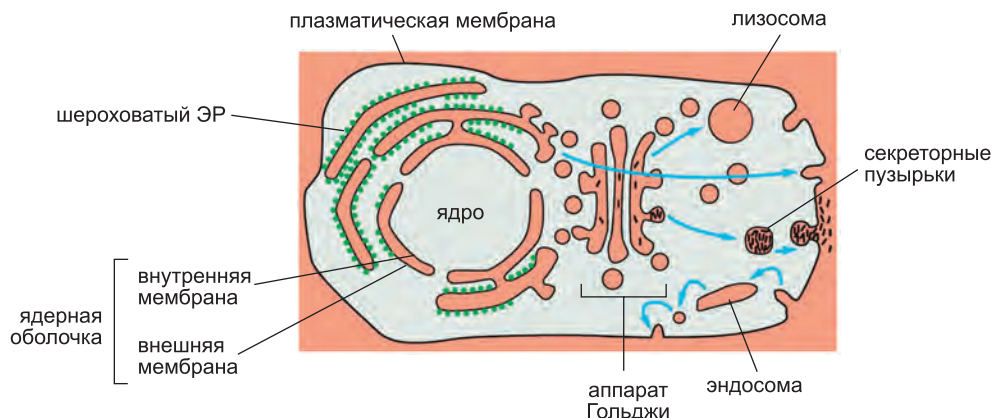


Рис. 12.5. Топологические взаимоотношения между компартментами секреторного и эндоцитозного путей эукариотической клетки. Топологически эквивалентные пространства показаны *красным*. В принципе, циклы отпочковывания и слияния мембран позволяют люмену любой из этих органелл взаимодействовать с люменом любой другой и внешней средой клетки посредством транспортных пузырьков. *Синими стрелками* показан интенсивный входящий и исходящий везикулярный транспорт (см. главу 13). Некоторые органеллы, в особенности митохондрии и пластиды (в растительных клетках), не участвуют в этой системе и изолированы от показанного здесь транспорта.

в симбиозе (смотри главы 1 и 14). Согласно гипотетической схеме, представленной на рисунке 12.4, б, внутренняя мембрана митохондрий и пластид соответствует исходной плазматической мембране бактерии, а люмен этих органелл эволюционировал из бактериального цитозоля. За счет такого эндоцитарного происхождения обе эти органеллы окружены двойной мембраной, и они изолированы от активного везикулярного транспорта, соединяющего внутреннее пространство большинства других мембранных органелл друг с другом и окружающей средой.

В соответствии с описанной выше эволюционной схемой внутриклеточные компартменты эукариотических клеток можно разделить на четыре семейства: (1) ядро и цитозоль, которые взаимодействуют друг с другом через *ядерные поровые комплексы* и, таким образом, топологически непрерывны (хотя и отличаются друг от друга функционально); 2) все органеллы, которые участвуют в секреции и эндоцитозе, включая аппарат Гольджи, эндосомы и лизосомы, а также многочисленные классы таких транспортных интермедиатов, как транспортные пузырьки, движущиеся между органеллами, и, возможно, пероксисомы; 3) митохондрии и 4) пластиды (только у растений).

12.1.3. Белки могут мигрировать между компартментами разными путями

За исключением тех немногочисленных белков, которые синтезируются на рибосомах митохондрий и пластид, синтез большинства белков начинается на рибосомах в цитозоле. Их последующая судьба зависит от их аминокислотной последовательности, в которой могут содержаться **сигналы сортировки**, направляющие доставку в другие органеллы, отличные от цитозоля. Большинство белков не несет сигналов сортировки и остается в цитозоле на постоянной основе. Однако многие другие обладают специфическими сигналами сортировки, направляющими

их транспорт из цитозоля в ядро, ЭР, митохондрии, пластиды или пероксисомы; сигналы сортировки также могут направлять транспорт белков из ЭР в другие компартменты клетки.

Чтобы понять общие принципы действия сигналов сортировки, важно разделить три фундаментально различных пути движения белков от одного компартмента в другой. Эти три механизма описаны ниже, а места их действия обозначены на **рис. 12.6**. Мы обсудим первые два механизма в этой главе, а третий (*зеленые стрелки* на рис. 12.6) — в главе 13.

1. При **воротном транспорте** белки мигрируют между цитозолем и ядром (которые топологически эквивалентны друг другу) через ядерные поровые комплексы в оболочке ядра. Ядерные поровые комплексы служат селективными воротами, активно транспортирующими определенные макромолекулы и макромолекулярные ансамбли. Также через них происходит свободная диффузия малых молекул.

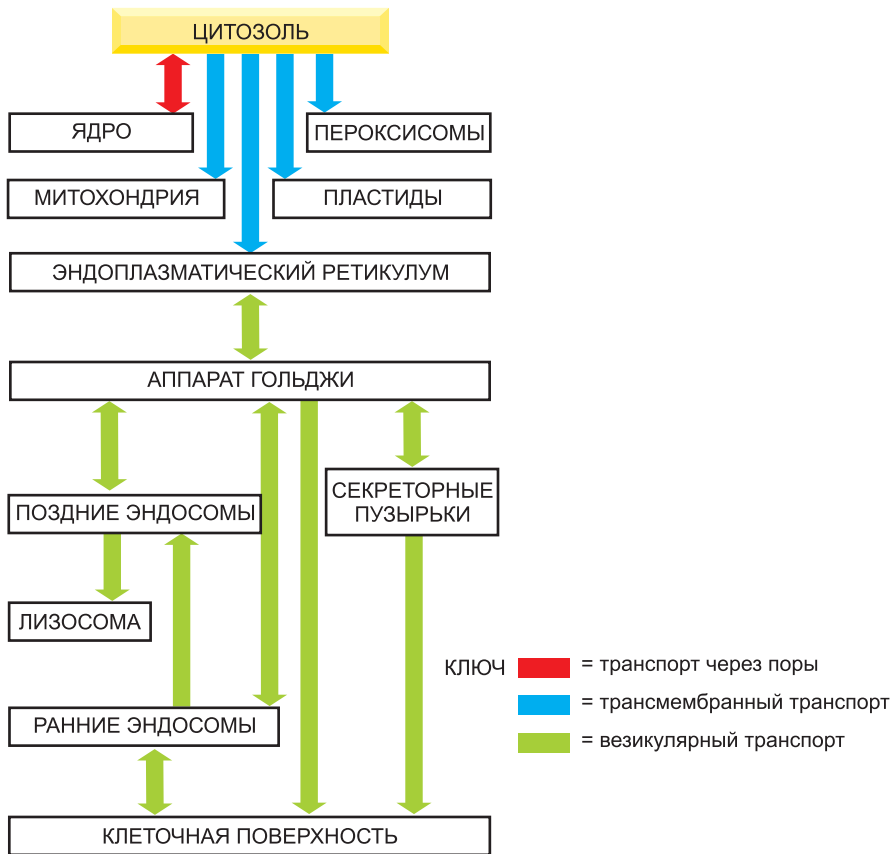


Рис. 12.6. Упрощенная «карта» движения белков. Белки могут мигрировать из одного компартмента в другой посредством воротного (*красный*), трансмембранного (*голубой*) или везикулярного транспорта (*зеленый*). Сигналы сортировки, направляющие движение данного белка через систему и, следовательно, определяющие его конечную локализацию в клетке, содержатся в аминокислотной последовательности каждого белка. Путешествие начинается с синтеза белка на рибосоме цитозоля и заканчивается, когда белок достигает места своего назначения. В каждой промежуточной точке (*рамки*) принимается решение о том, должен ли белок остаться в этом компартменте или транспортироваться дальше. В принципе, сигнал сортировки может требоваться либо для удержания белка, либо для его выхода из компартмента.

2. При **трансмембранном транспорте** трансмембранные *транслокаторы белков* напрямую переносят определенные белки через мембрану из цитозоля в топологически отличное пространство. Транспортируемые белковые молекулы обычно должны развернуться, чтобы пройти через транслокатор. Таким образом происходит, например, транспорт некоторых белков из цитозоля в люмен ЭР или митохондрии.

3. При **везикулярном транспорте** замкнутые мембранные транспортные интермедиаты, которыми могут быть маленькие сферические транспортные везикулы или более крупные фрагменты органелл неправильной формы, переправляют белки из одного компартмента в другой. Транспортные везикулы и фрагменты заполняются молекулами из люмена компартмента по мере того, как те отпочковываются от его мембраны; они избавляются от своего «груза» во втором компартменте, сливаясь с окружающей его мембраной (**рис. 12.7**). Например, по этому механизму происходит перенос растворимых белков из ЭР в аппарат Гольджи. Поскольку транспортируемые белки не проходят через мембрану, при помощи везикулярного транспорта может происходить миграция белков только между топологически эквивалентными компартментами (см. рис. 12.5).

Каждый вид переноса белков обычно направляется сигналами сортировки в транспортируемом белке, которые узнаются комплементарными рецепторами. Например, если нужно импортировать в ядро крупный белок, чтобы он прошел через ядерный поровый комплекс, он должен нести сигнал сортировки, узнаваемый рецепторными белками. Если белок должен быть напрямую перенесен через мембрану, он должен обладать сигналом сортировки, узнаваемым мембранными транслокаторами. Точно так же, если белок находится в определенном типе везикул или фрагменте органеллы, комплементарный рецептор соответствующей мембраны должен узнать его сигнал сортировки.

В этой и следующей главах мы часто будем обращаться к этому рисунку в качестве путеводителя, выделяя цветом определенный путь, рассматриваемый в данный момент.

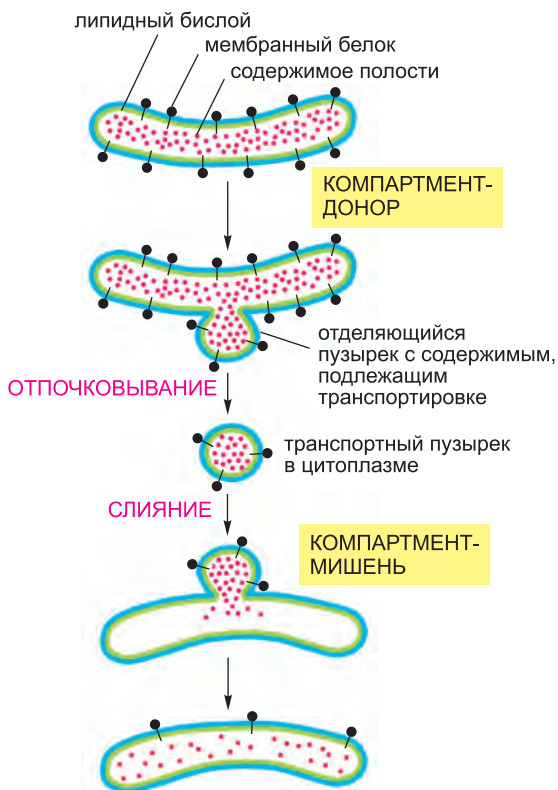


Рис. 12.7. Отпочковывание и слияние пузырьков во время везикулярного транспорта. Транспортные пузырьки отпочковываются от одного компартмента (донора) и сливаются с другим (мишенью). В процессе растворимое содержимое (красные точки) переносится из люмена в люмен. Обратите внимание, что мембрана также переносится, и что исходная ориентация как белков, так и липидов в мембране донорного компартмента сохраняется в мембране компартмента-мишени. Таким образом, мембранные белки сохраняют свою асимметричную ориентацию, т. е. одни и те же домены сообщаются с цитозолем.

12.1.4. Сигнальные последовательности направляют белки по правильному клеточному адресу

Большинство белковых сигналов сортировки содержатся в короткой аминокислотной последовательности длиной 15–60 остатков. Эти **сигнальные последовательности** часто располагаются на N-конце; специализированные **сигнальные пептидазы** удаляют сигнальную последовательность из законченного белка, после того как процесс сортировки завершается. Сигнальные последовательности также могут располагаться внутри белка, оставаясь его частью. В некоторых случаях сигналы сортировки состоят из нескольких внутренних аминокислотных последовательностей, формирующих специфическую трехмерную атомную структуру на поверхности белка, носящую название **сигнального участка**.

Каждая сигнальная последовательность специфически определяет место назначения в клетке. Белки, которые сначала должны быть транспортированы в ЭР, несут сигнальную последовательность на N-конце, которая включает в себя характерную последовательность 5–10 гидрофобных аминокислот. Многие из этих белков затем перейдут из ЭР в аппарат Гольджи. Но те белки, у которых на C-конце располагается характерная последовательность из четырех аминокислот, узнаются как постоянные белки ЭР и возвращаются туда. Белки, которые должны попасть в митохондрии, несут сигнальные последовательности еще одного типа — в них положительно заряженные аминокислоты чередуются с гидрофобными. Наконец, белки пероксисом несут на C-конце сигнальную последовательность, состоящую из трех характерных аминокислот.

В **таблице 12.3** представлены некоторые специфические сигнальные последовательности. Эксперименты, в которых методами генетической инженерии пептид переносится с одного белка на другой, показали важность каждой из этих сигнальных последовательностей в транспорте белков. Например, прикрепление N-концевой сигнальной последовательности белка ЭР к N-концу цитоплазматического белка

Таблица 12.3. Некоторые типичные сигнальные последовательности

Функция сигнальной последовательности	Пример сигнальной последовательности
Импорт в ядро	-Pro-Pro- Lys-Lys-Lys-Arg-Lys -Val-
Экспорт из ядра	-Leu-Ala-Leu-Lys-Leu-Ala-Gly-Leu-Asp-Ile-
Импорт в митохондрии	⁺ H ₃ N-Met-Leu-Ser-Leu- Arg -Gln-Ser-Ile- Arg -Phe-Phe- Lys -Pro-Ala-Thr- Arg -Thr-Leu-Cys-Ser-Ser- Arg -Tyr-Leu-Leu-
Импорт в пластиды	⁺ H ₃ N-Met-Val-Ala-Met-Ala-Met-Ala- Ser -Leu-Gln- Ser-Ser -Met- Ser-Ser-Leu-Ser-Ser-Ser -Asn- Ser -Phe-Leu-Gly-Gln-Pro-Leu- Ser -Pro-Ile- Thr -Leu- Ser -Pro-Phe-Leu-Gln-Gly-
Импорт в пероксисомы	- Ser-Lys -Leu-COO
Импорт в ЭР	⁺ H ₃ N-Met-Met-Ser-Phe-Val-Ser-Leu-Leu-Leu-Val-Gly-Ile-Leu-Phe-Trp-Ala-Thr- Glu -Ala- Glu -Gln-Leu-Thr- Lys -Cys- Glu -Val-Phe-Gln-
Возврат в ЭР	- Lys-Asp-Glu -Leu-COO

Примечание. Цветом обозначены некоторые характерные свойства различных классов сигнальных последовательностей. Важные для функционирования сигнальной последовательности положительно заряженные аминокислоты показаны *красным*, отрицательно заряженные — *зеленым*. Точно так же важные гидрофобные аминокислоты показаны *белым*, важные гидроксильные аминокислоты — *синим*. ⁺H₃N обозначает N-конец белка; COO — C-конец.

перенаправляет этот белок в ЭР. Таким образом, сигнальные последовательности — необходимое и достаточное условие эффективного распределения белков. Несмотря на то что их аминокислотные последовательности могут значительно изменяться, сигнальные последовательности всех белков, имеющих одно и то же место назначения, функционально взаимозаменяемы; физические свойства, такие как гидрофобность, часто играют большую роль в процессе узнавания сигнала, чем сама аминокислотная последовательность.

Сигнальные последовательности узнают комплементарные рецепторы сортировки, направляющие белки в соответствующее место локализации, где рецепторы избавляются от своего груза. Рецепторы функционируют каталитически: после завершения одного цикла транспорта они возвращаются в исходную точку для повторного использования. Большинство рецепторов сортировки узнает классы белков, а не отдельные их виды. Таким образом, их можно рассматривать как системы общественного транспорта, направленные на доставку различных компонентов в правильное место их локализации в клетке.

В **приложении 12.1** описаны основные пути изучения механизмов транслокации белков через мембраны и того, как они направляются из цитозоля в определенный компартмент.

12.1.5. Большинство органелл невозможно создать *de novo*: для этого требуется информация, заключенная в самой органелле

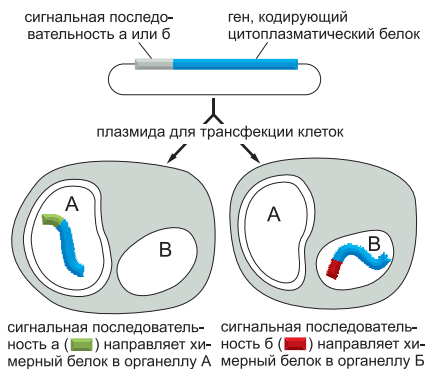
Когда клетка воспроизводит саму себя путем деления, она должна удвоить свои органеллы. В общем случае клетки делают это путем включения новых молекул в уже существующие органеллы, увеличивая их; затем увеличенные органеллы делятся и распределяются по двум дочерним клеткам. Таким образом, каждая дочерняя клетка наследует от материнской полный набор специализированных клеточных мембран. Например, если из клетки полностью удалить ЭР, как она сможет его восстановить? Как мы обсудим позже, мембранные белки, характеризующие ЭР и выполняющие многие его функции, сами по себе являются его продуктом. Новый ЭР не может быть создан в отсутствие уже существующего ЭР или по крайней мере мембраны, содержащей транслокаторы белков для импорта определенных белков из цитозоля в ЭР (включая сами ЭР-специфичные транслокаторы). Это справедливо и для митохондрий, и для пластид (см. рис. 12.6).

Таким образом, информация, необходимая для создания органеллы, содержится не только в ДНК, определяющей белки органеллы. Необходима информация в виде по крайней мере одного специфического белка мембраны органеллы, и эта информация передается от материнской клетки дочерней в форме самой органеллы. Предположительно, эта информация лежит в основе передачи потомству правильной организации компартментов клетки, точно так же как информация ДНК лежит в основе передачи нуклеотидных и аминокислотных последовательностей клетки.

Однако, как мы более подробно обсудим в главе 13, ЭР посылает постоянный поток мембранных пузырьков, в которых содержится только часть белков ЭР и которые обладают отличным от ЭР составом. Точно так же от плазматической мембраны постоянно отпочковываются различные специализированные эндоцитозные пузырьки. Таким образом, некоторые органеллы могут образовываться из других органелл и не наследуются при делении клеток.

ТРАНСФЕКЦИЯ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ СИГНАЛЬНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Один из подходов для доказательства того, что сигнальная последовательность является необходимым и достаточным условием направления белка в определенный внутриклеточный компартмент, состоит в создании химерного белка, в котором сигнальная последовательность методами генетической инженерии прикреплена к белку, в норме локализованному в цитозоле. После того как посредством трансфекции кодирующая этот белок ДНК переносится в клетки, иммуоокрашиванием или фракционированием клеток определяют место локализации химерного белка.



Изменяя сигнальную последовательность при помощи сайт-направленного мутагенеза, можно определить, какие структурные свойства важны для ее функционирования.

БИОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ТРАНСЛОКАЦИИ БЕЛКОВ

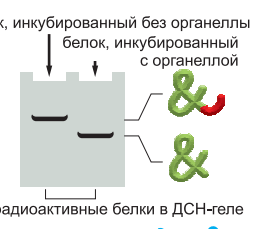
В этом подходе меченый белок, содержащий специфическую сигнальную последовательность, транспортируется в изолированные органеллы *in vitro*. Меченый белок обычно синтезируется путем бесклеточной трансляции кодирующей белок очищенной мРНК. Для мечения синтезированного белка используют радиоактивные аминокислоты, поэтому его можно отличить от множества других белков, присутствующих в трансляционной системе *in vitro*.

Для того чтобы узнать, произошла ли транслокация меченого белка в органеллу, обычно используют один из следующих трех методов:

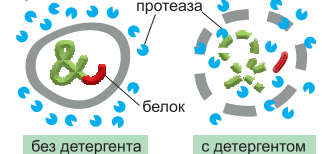
1. Меченый белок фракционируется с органеллой при центрифугировании.



2. Сигнальная последовательность удаляется специфической протеазой, присутствующей внутри органеллы.



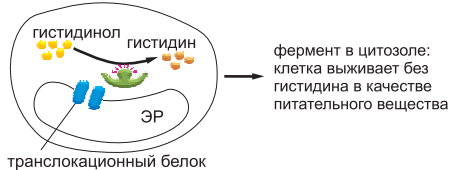
3. Когда в инкубационный объем добавляют протеазы, белки защищены от переваривания, но если сначала добавить детергент, нарушающий мембрану органеллы, то они будут расщеплены.



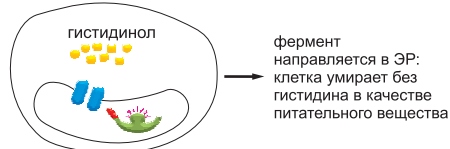
Такие эксперименты *in vitro* позволяют определить, какие компоненты (белки, АТФ, GTP и т. д.) необходимы для процесса транслокации.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МЕХАНИЗМА ТРАНСЛОКАЦИИ БЕЛКОВ

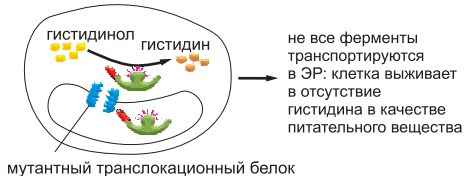
дрожжевая клетка дикого типа



модифицированная дрожжевая клетка



мутантная модифицированная клетка



Для изучения транслокации белков очень полезными оказались клетки дрожжей, содержащие мутации в компонентах, кодирующих аппарат транслокации. Поскольку мутантные клетки, не способные транспортировать белки через мембраны, умирают, необходимо найти такие мутации, которые вызывают только частичное нарушение транслокации белков.

Одна из экспериментальных стратегий состоит в создании методами генетической инженерии особых дрожжевых клеток. Например, фермент гистидинолдегидрогеназа в норме располагается в цитозоле, где она синтезирует жизненно важную аминокислоту гистидин из ее предшественника гистидинола. Создают дрожжевой штамм, у которого ген гистидинолдегидрогеназы заменяют геном, кодирующим химерный белок с дополнительной сигнальной последовательностью, направляющей фермент в эндоплазматический ретикулум (ЭР). Когда такие клетки выращивают в среде без гистидина, они умирают, поскольку гистидинолдегидрогеназа располагается в ЭР, где от нее нет никакой пользы. Однако клетки с мутацией, частично инактивирующей механизм транслокации белков из цитозола в ЭР, будут выживать, поскольку в цитозоле сохраняется достаточно дегидрогеназы для синтеза гистидина.

Часто получают клетки, в которых мутантный белок транслокационного аппарата частично функционирует при нормальной температуре, но полностью инактивируется при повышенной. Клетка, несущая такую температурочувствительную мутацию, умирает при повышенных температурах вне зависимости от того, присутствует ли гистидин, поскольку она совсем не способна транспортировать белки в ЭР. Нормальный ген, нарушенный температурочувствительной мутацией, можно идентифицировать путем трансфекции мутантной клетки дрожжевым плазмидным вектором, в котором клонированы случайные фрагменты геномной ДНК дрожжей: тот фрагмент ДНК, который спасает мутантные клетки при выращивании при повышенной температуре, кодирует дикий тип транслокационного белка.

Заключение

Эукариотические клетки содержат внутриклеточные мембраны, которые окружают почти половину всего объема клетки и образуют отдельные компартменты, носящие название органелл. Основные типы органелл, присутствующие по всем эукариотическим клеткам, — эндоплазматический ретикулум, аппарат Гольджи, ядро, митохондрии, лизосомы, эндосомы и пероксисомы; растительные клетки также содержат пластиды, к которым относятся, например, хлоропласты. В каждой органелле содержится определенный набор белков, опосредующий ее уникальные функции.

Каждый синтезированный белок органеллы должен найти путь от рибосомы цитозоля, где он синтезировался, до органеллы, в которой он функционирует. Для этого он идет по специфическому пути, направляясь сигналами сортировки в его аминокислотной последовательности, выполняющими функцию сигнальных последовательностей или сигнальных участков. Сигналы сортировки узнаются комплементарными рецепторами сортировки, которые доставляют белок в соответствующую органеллу-мишень. Белки, функционирующие в цитозоле, не несут сигналов сортировки и, следовательно, остаются там, где они синтезировались.

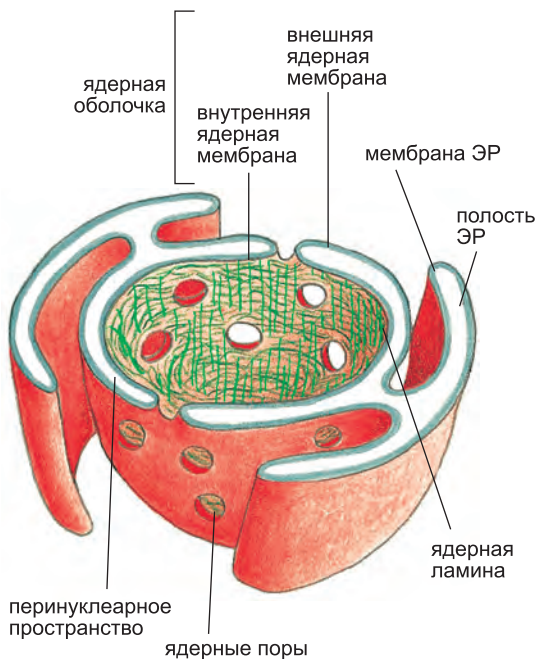
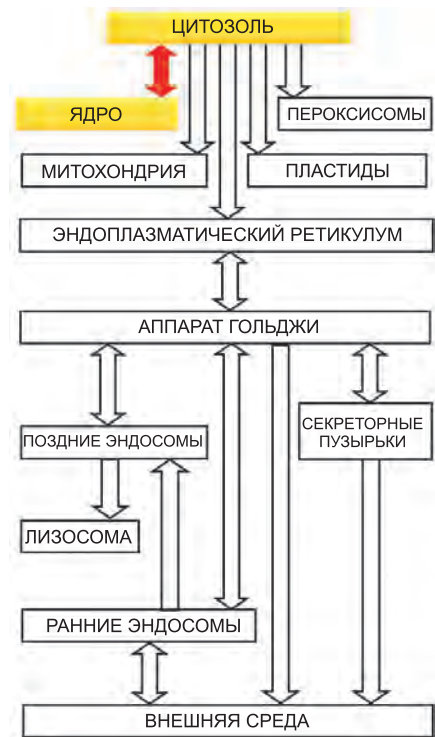
Во время клеточного деления такие органеллы, как ЭР и митохондрии, распределяются в интактном состоянии между двумя дочерними клетками. Эти органеллы содержат информацию, необходимую для их создания, и поэтому их нельзя сконструировать *de novo*.

12.2. Транспорт молекул между ядром и цитозолем

Ядерная оболочка окружает ДНК и ограничивает ядерный компартмент. Эта оболочка состоит из двух концентрических мембран, пронизанных ядерными поровыми комплексами (рис. 12.8). Несмотря на то что внутренняя и внешняя ядерные мембраны продолжают друг друга, они несут разный набор белков. **Внутренняя ядерная мембрана** содержит специфические белки, служащие сайтами заякоривания хроматина и ядерной пластинки (ламинаы), сети белков, служащей структурной поддержкой ядерной оболочки. Внутренняя мембрана окружена **внешней ядерной мембраной**, которая переходит в ЭР. Как и мембрана ЭР (рассматриваемая ниже), внешняя ядерная мембрана покрыта рибосомами, осуществляющими синтез белка. Белки, синтезированные этими рибосомами, транспортируются в пространство между внутренней и внешней ядерными мембранами (*перинуклеарное пространство*), которое сообщается с люменом ЭР.

Между цитозолем и ядром непрерывно происходит транспорт в обоих направлениях. Многие белки, функционирующие в ядре, включая гистоны, ДНК- и РНК-полимеразы, регуляторные белки генов и белки процессинга РНК, селективно импортируются в ядерный компартмент из цитозоля, где они синтезируются. В то же время тРНК и мРНК синтезируются в ядерном компартменте и затем экспортируются в цитозоль. Как и процесс импорта, процесс экспорта селективен; например, мРНК экспортируются только после того, как они были соответствующим образом модифицированы в ядре в реакциях процессинга РНК. В некоторых случаях процесс транспорта запутан. Например, рибосомальные белки синтезируются в цитозоле и импортируются в ядро, где они собираются с рибосомальной РНК в частицы. За-

тем частицы экспортируются в цитозоль, где они собираются в рибосомы. Каждый из этих этапов требует селективного транспорта.



12.2.1. Ядерные поровые комплексы пересекают ядерную оболочку

Крупные, сложные структуры, известные как **ядерные поровые комплексы (NPC)**, пересекают ядерную оболочку всех эукариотических клеток. В животных клетках масса одного NPC составляет около 125 миллионов дальтон. NPC состоит из примерно 30 различных **белков NPC**, или **нуклеопоринов**, которые присутствуют в нескольких копиях и образуют удивительно правильную восьмиугольную структуру (рис. 12.9).

Ядерная оболочка типичной животной клетки содержит 3 000–4 000 NPC, и суммарный транспорт через один NPC огромен: до 500 макромолекул в секунду. Более того, NPC способны одновременно осуществлять транспорт в противоположных направлениях. Как они координируют двунаправленный поток макромолекул и избегают закупорки и столкновений, неизвестно.

Каждый NPC содержит один или несколько водных проходов, через которые возможна пассивная диффузия малых водорастворимых молекул. Исследователи определили эффективный размер этих пор путем введения в цитозоль меченых водорастворимых молекул различного размера и измерения скорости их диффузии в ядро. Малые молекулы (5 000 дальтон и меньше) диффундируют очень быстро, поэтому можно считать, что ядерная оболочка для них свободно проницаема. Круп-

Рис. 12.8. Ядерная оболочка. Двумембранную оболочку пронизывают поры, в которых располагаются ЯПК. Оболочка переходит в эндоплазматический ретикулум. Рибосомы, которые обычно связаны с цитоплазматической поверхностью мембраны ЭР и внешней ядерной мембраной, на рисунке не показаны. Ядерная ламина — это фибриллярная сеть, лежащая под внутренней мембраной.

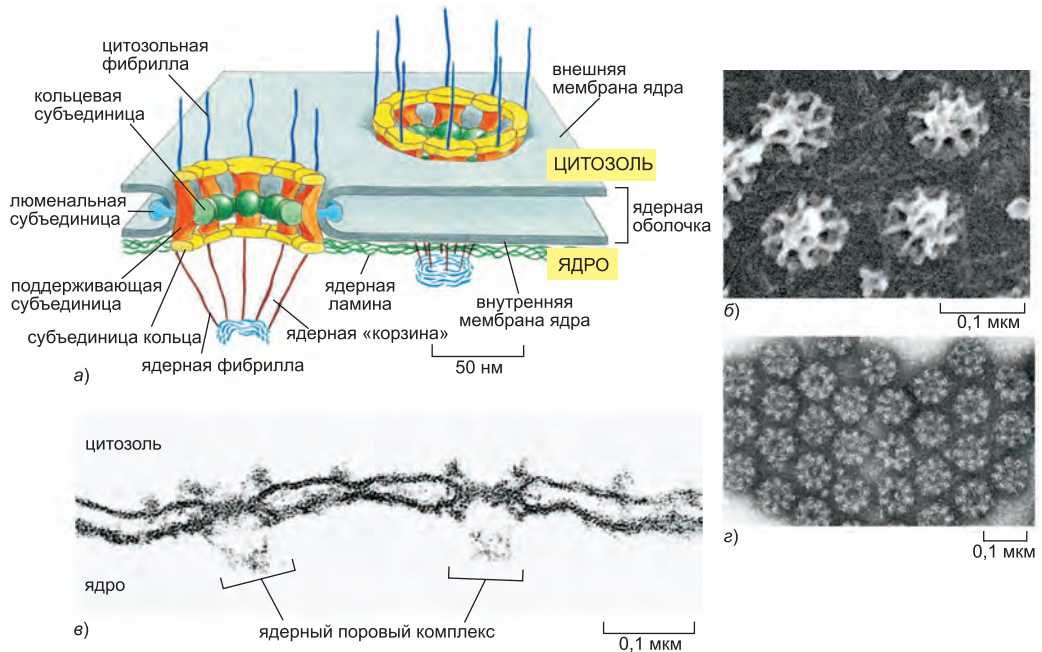


Рис. 12.9. Структура NPC ядерной оболочки. (а) Небольшой участок ядерной оболочки. На поперечном срезе видно, что NPC состоит из четырех «строительных блоков»: субъединиц, известных как «спицы», формирующих стенку поры; аннулярных субъединиц, расположенных в центре; люменальных субъединиц, содержащих трансмембранные белки, заякоривающие комплекс в ядерной мембране, и субъединиц колец, которые образуют цитоплазматическую и ядерную поверхности комплекса. От цитоплазматической и ядерной поверхностей NPC также отходят фибриллы. На ядерной стороне фибриллы сходятся и образуют похожую на корзину структуру. Иммуноэлектронная микроскопия показала, что белки, составляющие коровую часть NPC, симметрично ориентированы в ядерной оболочке, поэтому цитоплазматическая и ядерная стороны центральной части поры выглядят одинаково. Белки, образующие фибриллы, наоборот, различаются на цитоплазматической и ядерной сторонах NPC. Вращательная симметрия восьмого порядка и поперечная симметрия второго порядка коровой части NPC объясняют, как такая огромная структура может быть собрана из всего 30 различных белков: многие из этих белков присутствуют в 16 копиях (или в количестве, кратном 16). Предполагают, что неупорядоченные домены коровых белков (не показаны) направлены в сторону центра NPC, чтобы блокировать пассивную диффузию крупных макромолекул. (б) Сканирующая электронная микрофотография ядерной стороны ядерной оболочки ооцита (см. также рис. 9.55). (в) Электронная микрофотография продольного среза двух NPC (квадратные скобки); обратите внимание, что внутренняя и внешняя мембраны переходят друг в друга на границах поры. (г) Электронная микрофотография поверхностей негативно окрашенных NPC. Мембрана удалена выделением с детергентами. Обратите внимание, что некоторые из NPC содержат вещество в центре. Предполагают, что это макромолекулы в процессе транспорта через NPC. (б, из M. W. Goldberg and T. D. Allen, *J. Cell Biol.* 119: 1429–1440, 1992. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press; в, с любезного разрешения Werner Franke и Ulrich Scheer; г, с любезного разрешения Ron Milligan.)

ные белки, однако, проходят через NPC значительно медленнее; чем больше белок, тем медленнее он проходит через NPC. Белки, чья масса превышает 60 тысяч дальтон, едва проходят путем пассивной диффузии. Считают, что такое ограничение размеров молекул, способных к свободной диффузии, вытекает из структуры NPC (рис. 12.10). Многие белки NPC, выстилающие центральную пору, несут крупные

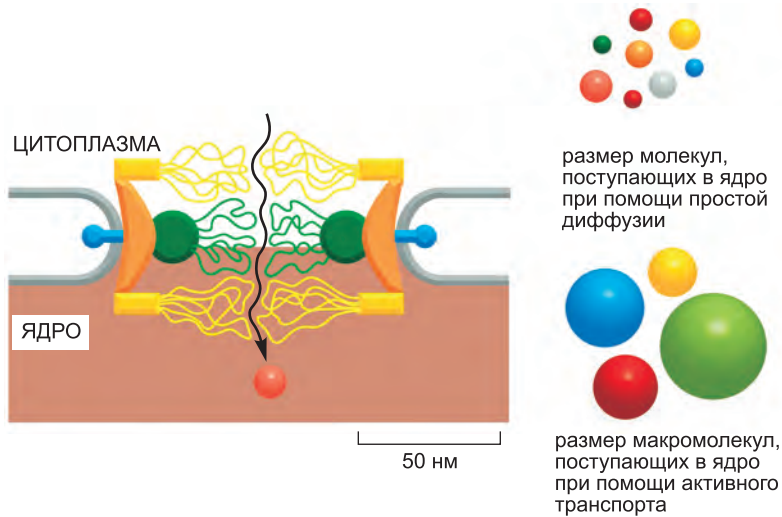


Рис. 12.10. Модель воротного барьера диффузии NPC. Показан вид NPC сбоку. Неструктурированные участки белков, выступающие центральную пору, образуют запутанную сеть, блокирующую пассивную диффузию крупных макромолекул. Однако во время активного транспорта через NPC способны пройти частицы, диаметр которых составляет до 39 нм.

неструктурированные участки, которые формируют неупорядоченные клубки (почти как водоросли, выступающие дно океана) и блокируют центральное отверстие NPC, не давая пройти крупным макромолекулам, но оставляя маленькие отверстия для диффузии малых молекул.

Поскольку многие клеточные белки слишком велики для пассивной диффузии через NPC, ядерный компартмент и цитозоль способны поддерживать различный белковый состав. Например, диаметр зрелых цитоплазматических рибосом составляет около 30 нм, и поэтому они не способны диффундировать через NPC, ограничивая белковый синтез цитозолем. Но как ядро экспортирует многие синтезированные в нем рибосомальные субъединицы или импортирует такие крупные макромолекулы, как ДНК- и РНК-полимеразы, молекулярная масса субъединиц которых составляет 100–200 тысяч дальтон? Ниже мы обсудим, как эти и многие другие молекулы белков и ДНК связываются с определенными рецепторными белками, которые активно переносят крупные молекулы через NPC.

12.2.2. Сигналы ядерной локализации направляют ядерные белки в ядро

Когда из ядра искусственно экстрагируют белки и вводят их в цитозоль, даже самые крупные из них эффективно возвращаются обратно в ядро. Сигналы сортировки, носящие название **сигналов ядерной локализации**, отвечают за селективность этого процесса активного ядерного импорта. Сигналы точно определили при помощи методов рекомбинантных ДНК как для разнообразных ядерных белков, так и для белков, которые входят в ядро только временно (**рис. 12.11**). Во многих белках сигнал состоит из одной или двух коротких последовательностей, обогащенных положительно заряженными аминокислотами лизином и аргинином (см.

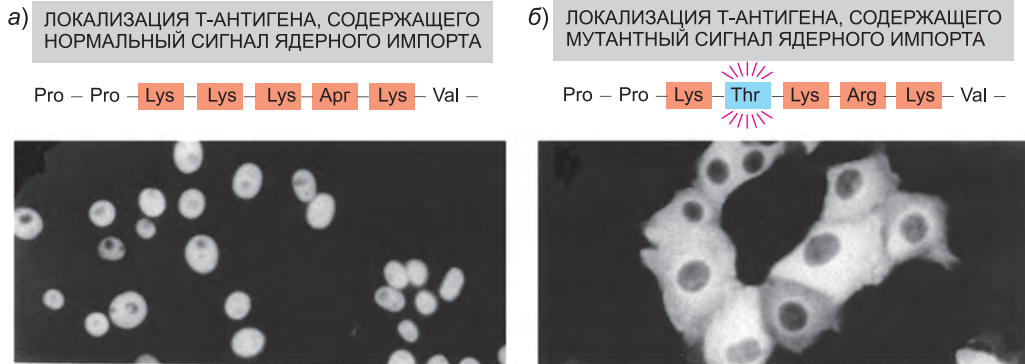


Рис. 12.11. Функция сигнала ядерной локализации. На иммунофлуоресцентных микрофотографиях показана клеточная локализация Т-антигена вируса SV40. В одном случае он содержит короткую последовательность, служащую сигналом ядерной локализации, в другом — нет. (а) Нормальный Т-антиген содержит указанную обогащенную лизином последовательность и импортируется в ядро, на что указывает иммунофлуоресцентное окрашивание антителами против Т-антигена. (б) Т-антиген с измененным сигналом ядерной локализации (лизин заменен треонином) остается в цитозоле. (Из D. Kalderon, B. Roberts, W. Richardson and A. Smith, *Cell* 39: 499–509, 1984. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

таблицу 12.3, **стр. 1237**). Для отдельных ядерных белков состав последовательности изменяется. Прочие ядерные белки содержат различные сигналы, часть из которых еще не охарактеризована.

Сигналы ядерной локализации могут располагаться практически в любом месте аминокислотной последовательности. Предполагают, что они образуют петли или специфические сайты на поверхности белка. Многие из них функционируют даже в форме коротких пептидов, прикрепленных к боковым цепям лизина на поверхности цитоплазматического белка. Это указывает на то, что точное положение сигнала в аминокислотной последовательности ядерного белка не имеет значения. Более того, если хотя бы одна субъединица многокомпонентного белкового комплекса несет сигнал ядерной локализации, комплекс будет импортирован в ядро.

Транспорт ядерных белков через NPC можно наблюдать, покрыв частицы золота сигналом ядерной локализации, введя их в цитозоль и следя за их дальнейшей судьбой при помощи электронной микроскопии (**рис. 12.12**). Транспорт начинается, когда частицы связываются с похожими на щупальца фибриллами, выступающими из кольца NPC в цитоплазму, и дальше идет через центр NPC. Предположительно, неструктурированные области белков NPC, образующие барьер для диффузии крупных молекул (упомянутый ранее), отодвигаются, что позволяет золотым частицам протиснуться сквозь пору.

Макромолекулярный транспорт через NPC фундаментально отличается от транспорта белков через мембраны других органелл тем, что он происходит с участием крупных водных пор, а не белкового транспортера, пересекающего один и более липидный бислой. По этой причине через NPC в ядро могут быть транспортированы полностью свернутые белки, а рибосомные субъединицы могут быть транспортированы из ядра в форме собранных частиц. В случае же других органелл транспортируемые белки должны быть в развернутом состоянии, это мы обсудим позже. Однако в электронный микроскоп видно, что очень крупные частицы, проходящие через NPC, сжимаются при прохождении через пору. Это указывает на то, что во время

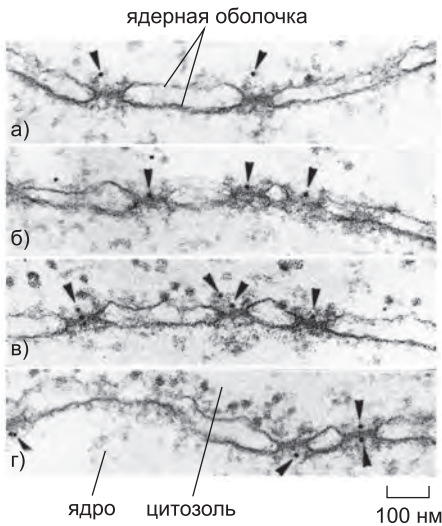


Рис. 12.12. Визуализация активного импорта через NPC. На этой серии электронных микрофотографий показан вход в ядро через NPC сферических частиц коллоидного золота (*стрелки*), покрытых пептидами, содержащими сигналы ядерной локализации. Золотые частицы ввели в живые клетки, которые затем фиксировали и подготавливали к электронной микроскопии через различные временные промежутки после инъекции. (а) Золотые частицы сначала видны вблизи цитоплазматических фибрилл NPC. (б, в) Они мигрируют к центру NPC, где они сначала видны только на цитоплазматической стороне. (г) Затем они появляются на ядерной стороне. Диаметр этих золотых частиц значительно превышает диаметр диффузионного канала NPC, поэтому они импортируются посредством активного транспорта. (Из N. Panté and U. Aebi, *Science* 273: 1729–1732, 1996. С любезного разрешения издательства AAAS.)

транспорта они претерпевают структурные изменения. Хорошо изучен экспорт некоторых очень крупных мРНК, обсуждаемый в главе 6 (см. рис. 6.39).

12.2.3. Рецепторы ядерного импорта связывают как сигналы ядерной локализации, так и белки NPC

Чтобы инициировать ядерный транспорт, большинство сигналов ядерной локализации должно быть узнано **рецепторами ядерного импорта**, кодируемыми семейством родственных генов. Каждый член семейства кодирует один рецепторный белок, специализирующийся на транспорте набора белков, содержащих связывающийся с рецептором сигнал ядерной локализации (**рис. 12.13, а**).

Рецепторы ядерного импорта — это растворимые цитоплазматические белки, связывающие сигналы ядерной локализации транспортируемого белка и белки NPC, некоторые из которых образуют цитоплазматические фибриллы на NPC. Эти фибриллы, так же как и многие белки, выстилающие центр поры и вносящие вклад в диффузионный барьер, несут большое число коротких аминокислотных повторов, содержащих фенилаланин и глицин. Эти последовательности называются *FG-повторами* (по однобуквенному обозначению этих аминокислот, обсуждаемому в главе 3). FG-повторы служат сайтами связывания рецепторов ядерного импорта. Предполагается, что они выстилают проход через NPC, по которому идут рецепторы импорта и связанные с ними белки. Комплексы рецептор-белок движутся по транспортному пути за счет последовательного связывания, диссоциации и повторного связывания с соседними FG-повторами. Таким образом, комплексы перескакивают с одного белка NPC на другой, избегая переплетения боковых цепей аминокислот в центре NPC. Оказавшись внутри ядра, рецепторы импорта диссоциируют от своего «груза» и возвращаются в цитозоль.

Рецепторы ядерного импорта не всегда напрямую связываются с ядерными белками. Иногда дополнительные адаптерные белки образуют мостик между рецептором импорта и сигналом ядерной локализации транспортируемого белка (рис. 12.13, б). Некоторые адаптерные белки структурно родственны рецепторам ядерного транспорта, что указывает на их общее эволюционное происхождение. При помощи раз-

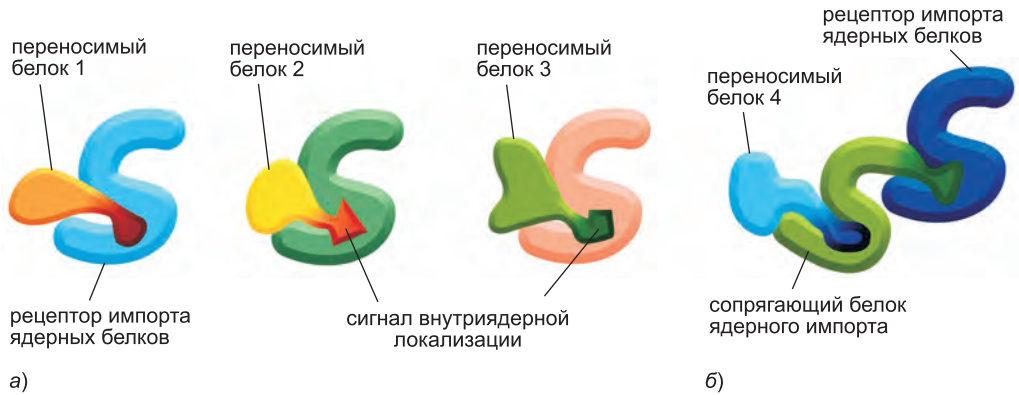


Рис. 12.13. Рецепторы ядерного импорта. (а) Многие рецепторы ядерного импорта связываются с белками NPC и сигналами ядерной локализации на транспортируемых ими белках. Белки 1, 2 и 3 в этом примере несут различные сигналы ядерной локализации и поэтому связываются с разными рецепторами ядерного импорта. (б) Для транспорта белка 4 необходимо связывание с его рецептором импорта адаптерного белка. Адаптеры структурно родственны рецепторам ядерного импорта и узнают сигналы ядерной локализации. Они также несут собственный сигнал ядерной локализации, связывающий их с рецептором импорта.

нообразных рецепторов импорта и адаптеров клетки способны узнавать широкий спектр сигналов ядерной локализации, расположенных на ядерных белках.

12.2.4. Ядерный экспорт работает так же, как ядерный импорт, но в обратном направлении

Экспорт из ядра крупных молекул, например новых рибосомальных субъединиц и молекул РНК, происходит через NPC и также зависит от системы селективного транспорта. Транспортная система основана на **сигналах ядерного экспорта** переносимых макромолекул и **рецепторах ядерного экспорта**. Эти рецепторы связывают как сигналы экспорта, так и белки NPC, направляющие свой «груз» через NPC в цитозоль.

Многие сигналы ядерного экспорта структурно родственны рецепторам ядерного импорта и кодируются тем же семейством генов **рецепторов ядерного транспорта**, или *кариофертинов*. В дрожжах содержится 14 генов, кодирующих членов этого семейства; в животных клетках их число значительно больше. Часто только по аминокислотной последовательности невозможно судить о том, является ли данный белок рецептором ядерного импорта или ядерного экспорта. Как и следовало ожидать, транспортные системы импорта и экспорта работают одинаково, но в противоположных направлениях: рецепторы импорта связывают свой «груз» в цитозоле, высвобождают их в ядре и затем возвращаются в цитозоль для повторного использования, а рецепторы экспорта функционируют в противоположном направлении.

12.2.5. GTPаза Ran определяет направление транспорта через NPC

Импорт ядерных белков через NPC концентрирует определенные белки в ядре и, следовательно, увеличивает упорядоченность в клетке, то есть уменьшает энтропию. Клетка получает энергию, необходимую для этого процесса, через гидролиз GTP мономерной GTPазой **Ran**. Ran содержится как в цитозоле, так и в ядре и необходима как для ядерного импорта, так и для ядерного экспорта.

Как и другие GTPазы, Ran представляет собой молекулярный переключатель, существующий в двух конформационных состояниях в зависимости от того, связан ли с ним GDP или GTP (см. главу 3). Два Ran-специфичных регуляторных белка инициируют переключение между состояниями: цитоплазматический *GTPаза-активирующий белок* (*GTPase-Activating Protein*, GAP) запускает гидролиз GTP и, следовательно, способствует переходу Ran-GTP в Ran-GDP и ядерный *фактор обмена гуаниновых нуклеотидов* (*Guanine Exchange Factor*, GEF) запускает обмен GDP на GTP и таким образом переводит Ran-GDP в Ran-GTP. Поскольку *Ran-GAP* располагается в цитозоле, а *Ran-GEF* — в ядре, цитозоль содержит в основном Ran-GDP, а ядро — Ran-GTP (рис. 12.14).

Такой градиент двух конформационных форм Ran служит движущей силой ядерного транспорта в соответствующем направлении (рис. 12.15). Докинг рецепторов ядерного импорта на FG-повторах на цитоплазматической стороне NPC, например, происходит в зависимости от того, несут ли эти рецепторы «груз». Рецепторы импорта затем перескакивают с одного FG-повтора на другой. Если они достигают ядерной стороны порового комплекса, с ними связывается Ran-GTP, и, если они несут молекулы «груза», это связывание приводит к тому, что они высвобождают свой «груз» (рис. 12.16). Поскольку Ran-GDP в цитозоле не связывается с нагруженными рецепторами, высвобождение происходит только на ядерной стороне NPC. Таким образом, ядерная локализация Ran-GTP определяет направленность процесса.

Освободившись от своего транспортируемого белка в ядре, рецептор импорта со связанной Ran-GTP переносится через поровый комплекс обратно в цитозоль. Там Ran-GAP активирует механизм гидролиза GTP в составе Ran-GTP, таким образом превращая его в Ran-GDP. После этого рецепторы импорта готовы к следующему циклу ядерного импорта.

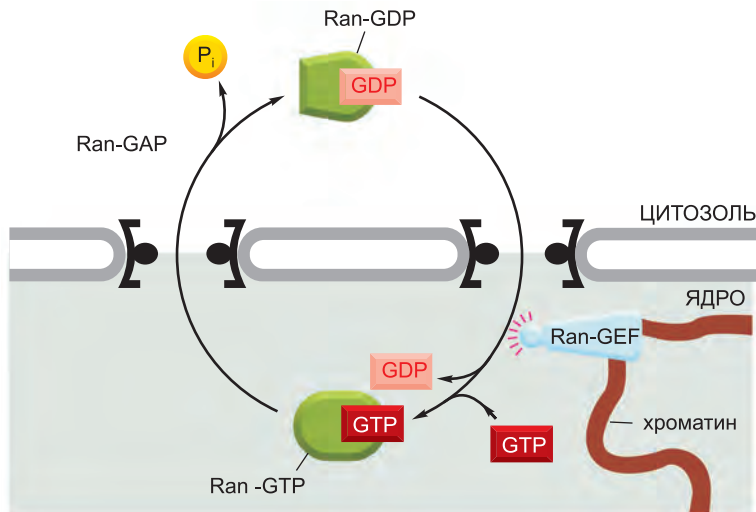


Рис. 12.14. Компартментализация Ran-GDP и Ran-GTP. Локализация Ran-GDP в цитозоле и Ran-GTP в ядре является следствием локализации двух Ran-регулирующих белков: Ran GTPаза-активирующий белок (Ran-GAP) локализован в цитозоле, а фактор обмена нуклеотидных оснований Ran (Ran-GEF) связывает хроматин и, следовательно, локализован в ядре.

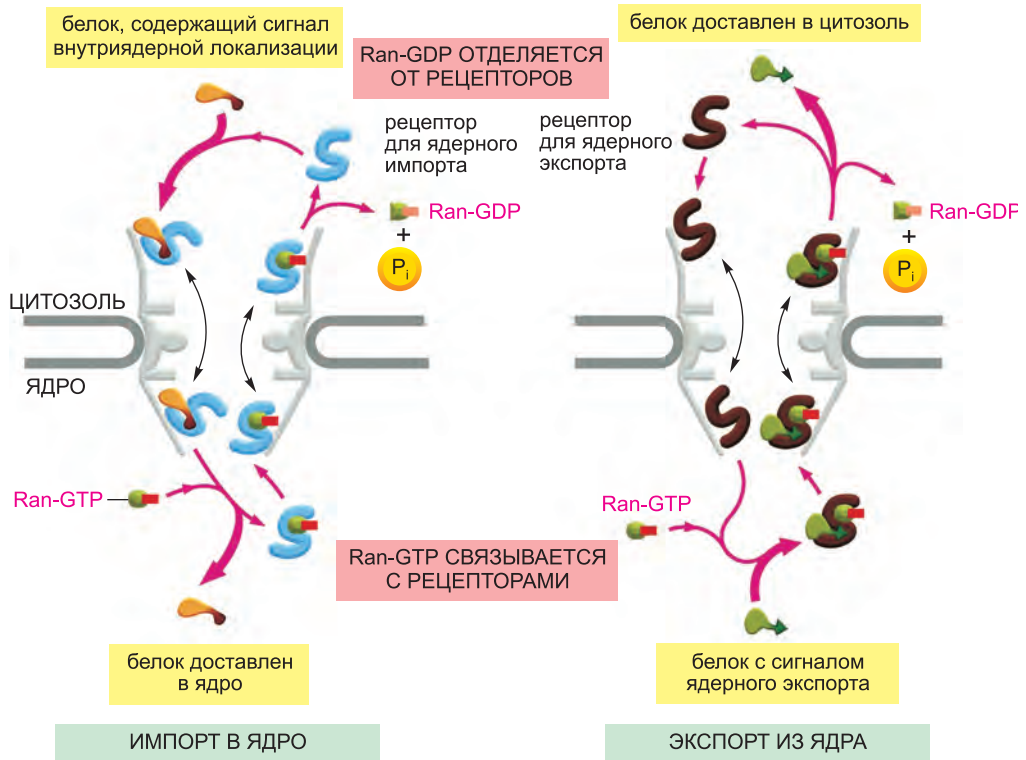


Рис. 12.15. Модель, объясняющая, как гидролиз GTP ГТФазой Ran в цитозоле определяет направленность ядерного транспорта. Движение сквозь NPC нагруженных рецепторов ядерного транспорта происходит вдоль FG-повторов на поверхности определенных белков NPC. Дифференциальная локализация Ran-GTP в ядре и Ran-GDP в цитозоле определяет направленность (красные стрелки) как ядерного импорта (слева), так и ядерного экспорта (справа). Ran-GAP активирует гидролиз GTP и образование Ran-GDP с цитоплазматической стороны NPC (см. рис. 12.14).

Ядерный экспорт происходит по сходному механизму, за исключением того, что Ran-GTP в ядре способствует связыванию «груза» с рецепторами экспорта, а не его диссоциации. После того как рецептор экспорта прошел через пору в цитозоль, его Ran-GTP взаимодействует с Ran-GAP и гидролизует GTP. В результате рецептор экспорта высвобождает как транспортируемую молекулу, так и Ran-GDP в цитозоль. Свободный рецептор затем возвращается в ядро, и цикл завершается (см. рис. 12.15).

Ran-GDP импортируется в ядро собственным рецептором импорта, специфичным к связанной с GDP конформации Ran. Рецептор Ran-GDP структурно не родственен основному семейству ядерных транспортных рецепторов. Однако он также связывается с FG-повторами на белках ЯПК и перескакивает между ними.

12.2.6. Транспорт через ЯПК может регулироваться контролирующим доступом к транспортному аппарату

Некоторые белки, например белки, связывающие только что синтезированные мРНК в ядре, одновременно содержат сигналы ядерной локализации и ядерного экспорта. Эти белки непрерывно движутся из ядра в цитозоль и обратно. Относи-

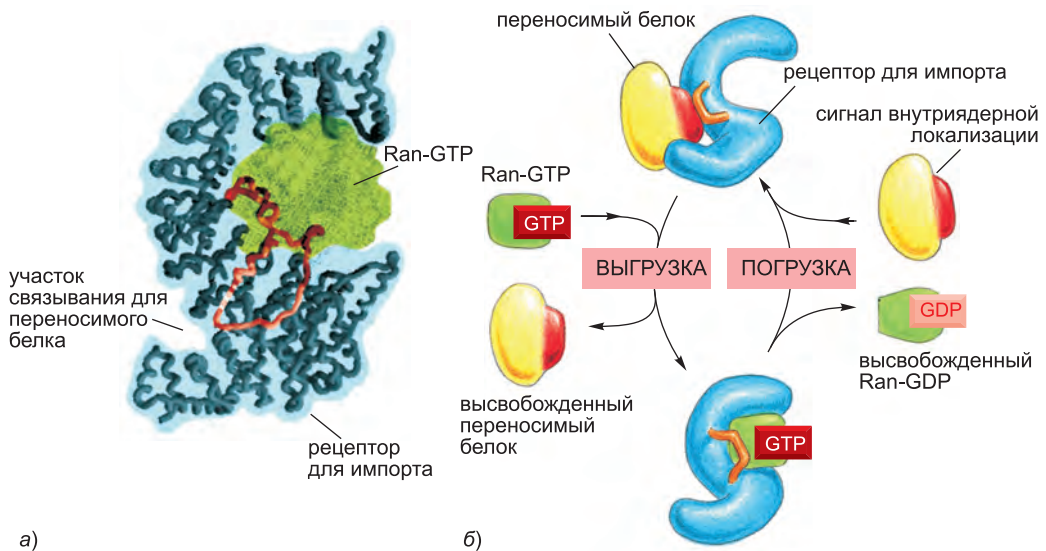


Рис. 12.16. Как связывание Ran-GTP может привести к высвобождению «груза» рецепторами импорта.

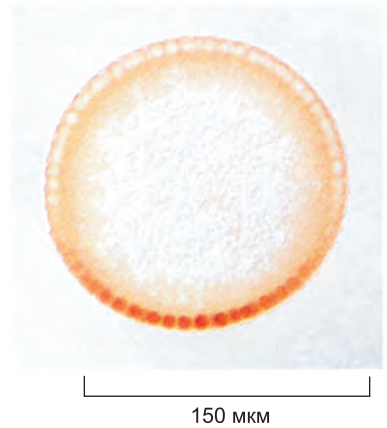
а) Структура рецептора ядерного транспорта со связанной Ran-GTP. Рецептор содержит повторяющиеся α-спиральные мотивы, располагающиеся друг над другом и формирующие гибкую пружиноподобную структуру, которая способна принимать различные конформации в ответ на связывание транспортируемых белков и Ran-GTP. Обратите внимание, что транспортируемые белки и Ran-GTP связываются с разными участками извитой пружины. Ran-GTP частично закрывает консервативную петлю (красная) рецептора, которая в свободном от Ran состоянии, по-видимому, играет важную роль в связывании «груза». б) Цикл загрузки в цитозоле и разгрузки в ядре рецептора ядерного импорта. (а, адаптировано из Y. M. Chook and G. Blobel, *Nature* 399: 230–237, 1999. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

тельные скорости импорта и экспорта определяют равновесную локализацию таких *шатлинг-белков* (от англ. *shuttling* — двигаться вперед и назад). Если скорость экспорта превышает скорость импорта, белок в основном будет находиться в цитозоле. Таким образом, изменяя скорость импорта, экспорта или их обоих, можно изменить локализацию белка.

Некоторые шатлинг-белки непрерывно мигрируют в ядро и обратно. В отдельных случаях, однако, транспорт жестко регулируется. Как обсуждается в главе 7, клетки контролируют активность некоторых белков-регуляторов генов, не пропуская их в ядро до тех пор, пока они там не понадобятся (**рис. 12.17**). Во многих случаях клетки контролируют транспорт путем регуляции сигналов ядерной локализации и ядерного экспорта; их можно включать и выключать, например, фосфорилируя аминокислоты вблизи сигнальных последовательностей (**рис. 12.18**).

Другие белки-регуляторы генов связаны с ингибиторными цитоплазматическими белками, которые либо заякоривают их в цитозоле (через взаимодействия с цитоскелетом или определенными органеллами), либо маскируют их сигналы ядерной локализации, не давая им взаимодействовать с рецепторами ядерного импорта. Соответствующий стимул освобождает белок-регулятор гена от его цитоплазматического якоря, или «маски», и белок транспортируется в ядро. Важным примером такого шатлинг-белка является латентный белок-регулятор гена, кон-

Рис. 12.17. Регуляция ядерного транспорта в зародыше мушки. Белок-регулятор гена *dorsal* экспрессируется однородно по всему раннему зародышу *Drosophila*, изображенному в поперечном срезе. Белок окрасили антителами, связанными с ферментом, дающим коричневый продукт. Он активен только в клетках, расположенных на вентральной стороне (*внизу*) зародыша, где он располагается в ядре. (С любезного разрешения Siegfried Roth.)



тролирующего экспрессию белков, участвующих в метаболизме холестерина. Белок синтезируется и хранится в неактивной форме в качестве транс-мембранного белка ЭР. При недостатке холестерина белок выходит из ЭР в аппарат Гольджи, где расщепляется специализированными протеазами, и его цитоплазматический домен высвобождается в цитозоль. Этот домен транспортируется в ядро, где активирует транскрипцию генов, необходимых для импорта и синтеза холестерина.

Как мы подробно обсудили в главе 6, клетка контролирует экспорт мРНК из ядра сходным образом. Белки, направляющие мРНК из ядра, загружаются на РНК в процессе транскрипции и сплайсинга. После входа в цитозоль белки отделяются и быстро возвращаются в ядро. Такие РНК, как мяРНК и тРНК, экспортируются другими рецепторами ядерного экспорта.

12.2.7. Во время митоза ядерная оболочка разбирается

Ядерная пластинка (ламина), расположенная на ядерной стороне внутренней ядерной мембраны, представляет собой сеть взаимосвязанных белковых субъединиц — **ядерных ламинов**. Ламины — это специализированный класс промежуточных белков-филаментов (обсуждаемых в главе 16), полимеризующихся в двумерную сетку (**рис. 12.19**). Ядерная пластинка придает форму и устойчивость ядерной оболочке, с которой она связана через NPC и интегральные мембранные белки внутренней ядерной мембраны. Ламина также напрямую взаимодействует с хроматином, который и сам по себе взаимодействует с интегральными белками внутренней ядерной мембраны. Ламина и эти белки внутренней мембраны формируют структурные связи между ДНК и ядерной оболочкой.

Когда ядро разбирается во время митоза, ядерная пластинка деполимеризуется. Разрушение, по крайней мере частично, является следствием прямого фосфорилирования ядерных ламинов циклин-зависимой протеинкиназой Cdk, активирующейся в начале митоза (см. главу 16). Одновременно фосфорилируются белки внутренней ядерной мембраны, и NPC распадаются и распространяются по цитозолю. Во время этого процесса некоторые белки NPC связываются с рецепторами ядерного импорта, играющими важную роль в восстановлении NPC после завершения митоза. Мембранные белки ядерной оболочки — более не связанные с поровыми комплексами, ламинной или хроматином, — распределяются по мембране ЭР. Двигательный белок динеин, мигрирующий вдоль микротрубочек (см. главу 17), активно участвует в отрывании ядерной оболочки от хроматина. Все эти процессы вместе разрушают барьеры, которые в норме отделяют ядро от цито-

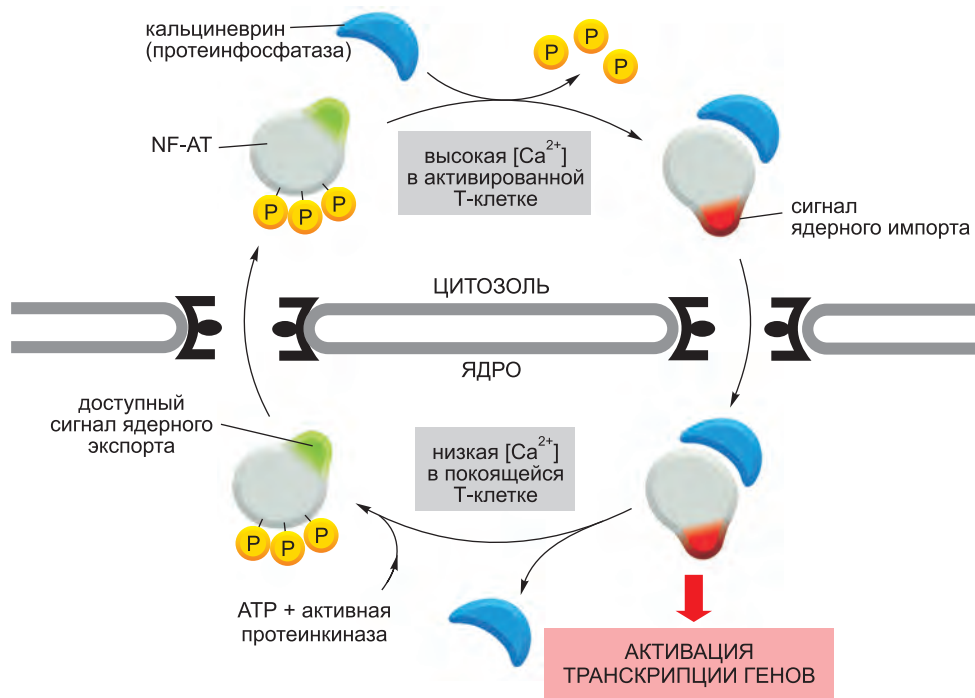
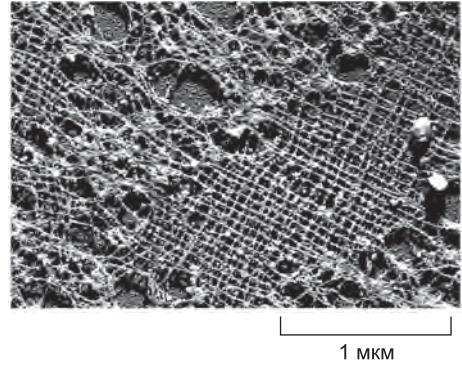


Рис. 12.18. Регуляция ядерного импорта во время активации Т-клеток. Ядерный фактор активированных Т-клеток (NF-AT) представляет собой белок-регулятор гена, который в покоей Т-клетке находится в цитозоле в фосфорилированном состоянии. Когда Т-клетки активирует чужеродный антиген (см. главу 25), концентрация внутриклеточного Ca^{2+} возрастает. При высоких концентрациях Ca^{2+} фосфатаза кальциневрин связывает NF-AT и дефосфорилирует его. Дефосфорилирование открывает сигнал ядерного импорта и блокирует сигнал ядерного экспорта. Затем комплекс NF-AT и кальциневрина импортируется в ядро, где он активирует транскрипцию многочисленных генов, необходимых для активации Т-клеток. Ответ прекращается, когда снижается уровень Ca^{2+} , что ведет к высвобождению NF-AT от кальциневрина. Повторное фосфорилирование NF-AT инактивирует сигнал ядерного импорта и вновь делает доступным сигнал ядерного экспорта, и NF-AT возвращается в цитозоль. Некоторые из наиболее эффективных лекарств для подавления иммунитета, включая циклоспорин А и FK506, ингибируют способность кальциневрина дефосфорилировать NF-AT и, следовательно, блокируют накопление NF-AT в ядре и активацию Т-клеток.

золя, и ядерные белки, не связанные с мембранами или хромосомами, полностью смешиваются с белками цитозоля (рис. 12.20).

Позднее в митозе ядерная оболочка собирается заново на поверхности хромосом. В дополнение к ее важной роли в ядерном транспорте, Ran-GTPаза также выполняет функции маркера локализации хроматина, когда ядерные и цитоплазматические компоненты перемешиваются. Поскольку Ran-GEF остается связанной с хроматином при разрушении ядерной оболочки, молекулы Ran вблизи хроматина в основном находятся в GTP-связывающей конформации. И наоборот, молекулы Ran вдали от хроматина с большой вероятностью встретят Ran-GAP, распределенную по цитозолю; таким образом, эти молекулы Ran в основном находятся в GDP-связывающей конформации.

Рис. 12.19. Ядерная пластинка. Электронная микрофотография участка ядерной пластинки ооцита *Xenopus*, подготовленной методами лиофилизации и напыления металла. Пластинка образована регулярной сетью специализированных промежуточных филаментов. (С любезного разрешения Ueli Aebi.)



Хроматин в митотических клетках окружен облаком Ran-GTP. Это облако локально удаляет рецепторы ядерного транспорта с белков NPC, с чего начинается процесс сборки NPC, прикрепленных к поверхности хромосом. Одновременно белки внутренней ядерной мембраны и дефосфорилированные ламины вновь связываются с хроматином. Мембраны ЭР оборачиваются вокруг групп хромосом и продолжают сливаться до тех пор, пока не сформируют замкнутую ядерную оболочку. Во время этого процесса NPC начинают активно импортировать белки, несущие сигналы ядерной локализации. Поскольку ядерная оболочка сначала располагается вблизи поверхности хромосом, заново сформированное ядро не несет других белков, кроме тех, которые были связаны с митотическими хромосомами или были селективно транспортированы через NPC. Таким образом, все крупные белки остаются за пределами нового ядра.

Сигналы ядерной локализации не отщепляются после транспорта в ядро. По-видимому, это объясняется тем, что ядерные белки должны импортироваться по многу раз после каждого клеточного деления. С другой стороны, как только белковая молекула была импортирована в любую другую мембранную органеллу, она передается из поколения в поколение в пределах этого компартмента, и в ее повторном перемещении нет необходимости; сигнальная последовательность этих молекул зачастую удаляется после их переноса в пункт назначения.

Как мы обсудим в главе 17, облако Ran-GTP, окружающее хроматин, также играет важную роль в формировании веретена деления митотической клетки.

Как показано, ядерная оболочка сначала восстанавливается вокруг отдельных деконденсирующихся хроматид. По мере протекания деконденсации эти структуры сливаются и образуют единое ядро.

Заключение

Ядерная оболочка состоит из внутренней и внешней ядерных мембран. Внешняя мембрана переходит в мембрану ЭР, и пространство между ней и внутренней мембраной сообщается с люменом ЭР. Молекулы РНК, синтезируемые в ядре, и рибосомальные субъединицы, собирающиеся там же, экспортируются в цитозоль; с другой стороны, все белки, функционирующие в ядре, синтезируются в цитозоле и затем импортируются в ядро. Интенсивный поток веществ между ядром и цитозолем происходит через ядерные поровые комплексы (NPC), создающие прямой проход через ядерную оболочку. Малые молекулы пассивно диффундируют через NPC, но крупные молекулы должны быть транспортированы активно.

Белки, несущие сигналы ядерной локализации, активно транспортируются внутрь через NPC, тогда как молекулы РНК и рибосомальные субъединицы

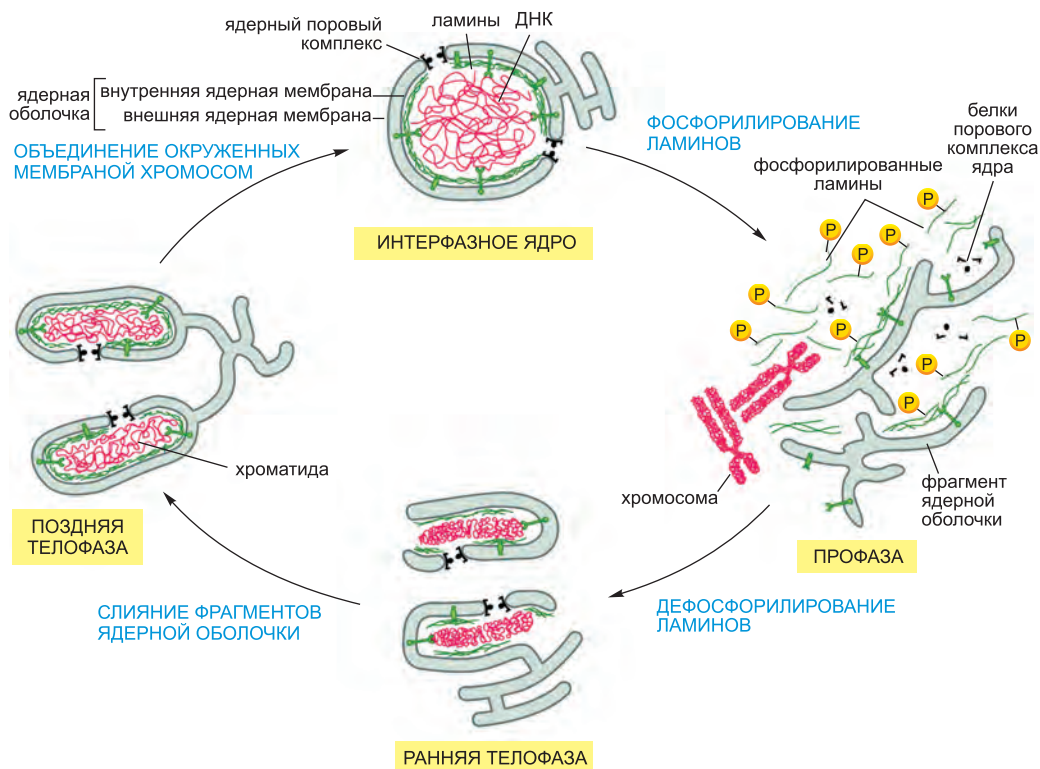


Рис. 12.20. Разрушение и восстановление ядерной оболочки во время митоза. Считается, что фосфорилирование ламин запускает разрушение ядерной пластинки, что способствует распаду ядерной оболочки. Дефосфорилирование ламин, по-видимому, направляет этот процесс в обратную сторону. Аналогичный цикл фосфорилирования-дефосфорилирования происходит с некоторыми поринами и белками внутренней ядерной мембраны, и некоторые из этих процессов дефосфорилирования также участвуют в показанном на рисунке процессе восстановления.

содержат сигналы ядерного экспорта, направляющие активный транспорт через NPC наружу. Некоторые белки, включая рецепторы ядерного импорта и экспорта, непрерывно мигрируют между цитозолем и ядром. *Ran-GTPаза* — движущая сила ядерного транспорта — и определяет его направление. Клетки регулируют транспорт ядерных белков и молекул РНК через NPC, контролируя доступ этих молекул к транспортному аппарату. Поскольку сигналы ядерной локализации не удаляются, ядерные белки могут быть повторно импортированы, что необходимо для восстановления ядра после митоза.

12.3. Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты

Митохондрии и хлоропласты представляют собой органеллы, окруженные двойной мембраной (см. главу 14). Они специализируются на синтезе АТФ, используя энергию электронного транспорта и окислительного фосфорилирования в митохондриях и фотосинтеза в хлоропластах. Несмотря на то что эти органеллы несут собственные ДНК, рибосомы и другие компоненты, необходимые для белкового

синтеза, большинство их белков кодируются ядром и импортируются из цитозоля. Каждый импортированный белок должен достичь определенного субкомпартмента органеллы, где он выполняет свои функции.

Митохондрии несут два субкомпартмента: внутреннее **пространство матрикса** и **межмембранное пространство**. Эти компартменты образованы двумя концентрическими митохондриальными мембранами: **внутренней мембраной**, окружающей матрикс и образующей многочисленные выпячивания — *кристы*, и **внешней мембраной**, контактирующей с цитозолем (рис. 12.21, а). Хлоропласты обладают такими же двумя субкомпартментами, но у них также есть дополнительный субкомпартмент — *тилакоидное пространство* — окруженный *тилакоидной мембраной* (рис. 12.21, б). Каждый субкомпартмент митохондрий и хлоропластов несет уникальный набор белков.

Новые митохондрии и хлоропласты образуются за счет роста и последующего деления уже существующих органелл (см. главу 14). Рост, в основном, зависит от импорта белков из цитозоля. Импортированные белки должны быть транспортированы через несколько последовательных мембран и оказаться в нужном месте. Процесс движения белков через мембраны часто называют *транслокацией белков*. В этом разделе объяснено, как она происходит.

12.3.1. Транслокация в митохондрии зависит от сигнальных последовательностей и транслокаторов белков

Белки, импортируемые в **митохондрии**, обычно захватываются из цитозоля через секунды или минуты после их высвобождения рибосомами. Таким образом, в отличие от транслокации белков в ЭР, которую мы опишем позже, митохондриальные белки сначала полностью синтезируются в форме **митохондриальных белков-предшественников** в цитозоле, а затем транспортируются в митохондрии по *посттрансляционному* механизму. Одна или несколько сигнальных последовательностей направляют все митохондриальные белки-предшественники в соответствующий субкомпартмент митохондрий. Многие белки, входящие в матриксное

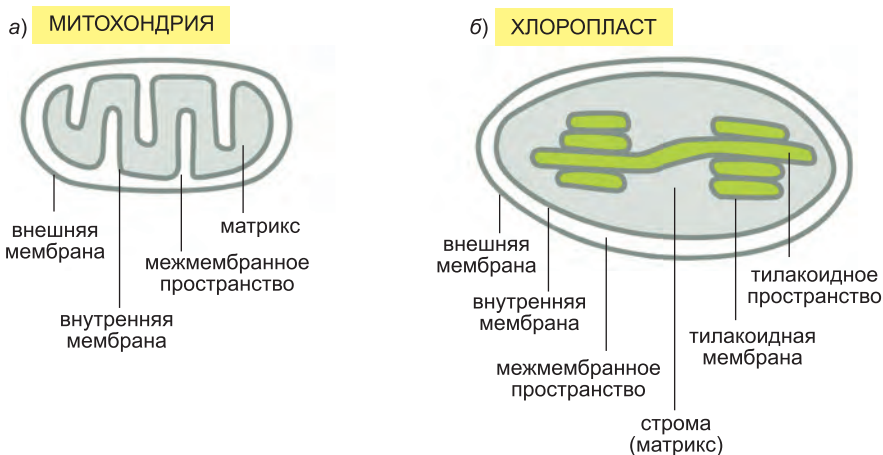


Рис. 12.21. Субкомпартменты митохондрий и хлоропластов. В отличие от крист митохондрий (а), тилакоиды хлоропластов не соединены с внутренней мембраной и, следовательно, образуют компартмент с отдельным внутренним пространством (см. рис. 12.3).

пространство, содержат на N-конце сигнальную последовательность, которая после импорта быстро удаляется сигнальной пептидазой. Другие, включая все белки внешней мембраны, многие белки внутренней мембраны и межмембранного пространства, несут внутреннюю сигнальную последовательность, которая не удаляется. Сигнальные последовательности являются необходимым и достаточным условием импорта и правильной локализации белков: когда методами генетической инженерии эти сигналы прикрепляют к цитоплазматическим белкам, они направляются в соответствующий митохондриальный субкомпартмент.

Наиболее изучены сигнальные последовательности, направляющие белки-предшественники в митохондриальный матрикс. Они все образуют амфифильную α -спираль, в которой с одной стороны располагается кластер положительно заряженных аминокислот, а с противоположной — кластер гидрофобных аминокислот. Специфические рецепторные белки, инициирующие транслокацию белков, узнают такую конфигурацию, а не точную аминокислотную последовательность сигнальной последовательности (рис. 12.22).

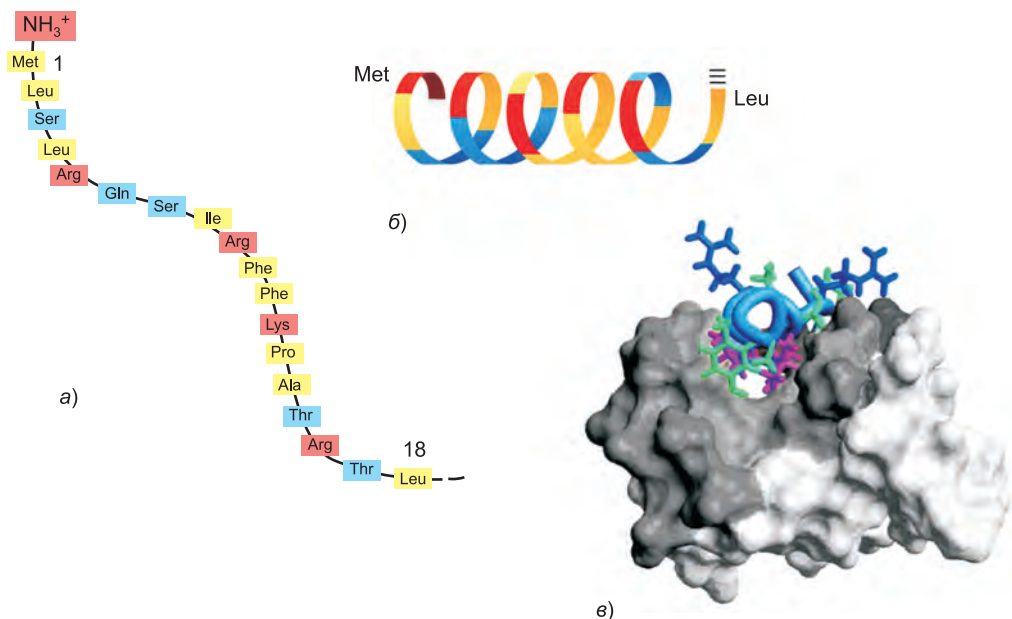


Рис. 12.22. Сигнальная последовательность импорта митохондриальных белков. Цитохромоксидаза — это крупный мультибелковый комплекс, расположенный во внутренней митохондриальной мембране, где он служит конечным ферментом электрон-транспортной цепи (рассматриваемой в главе 14). а) Первые 18 аминокислот предшественника субъединицы IV этого фермента — сигнальная последовательность его импорта в митохондрию. б) Когда сигнальная последовательность свернута в α -спираль, положительно заряженные аминокислоты (красные) расположены преимущественно на одной ее стороне, а неполярные (желтые) — на другой. Аминокислоты с незаряженными полярными боковыми цепями показаны синим. Сигнальные последовательности, направляющие белки в матрикс, всегда обладают потенциалом к формированию таких амфифильных α -спиралей, которые узнают по специфичным рецепторным белкам на поверхности митохондрий. (в) Расшифрованная методом ЯМР структура сигнальной последовательности еще одного фермента матрикса митохондрий алкогольдегидрогеназы, связанной с рецептором импорта. Амфифильная α -спираль связана своей гидрофобной поверхностью с гидрофобным желобом на рецепторе. (в, адаптировано из Y. Abe et al., *Cell* 100: 551–560, 2000. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Мультисубъединичные белковые комплексы, выполняющие функцию **транслокаторов белков**, опосредуют перенос белков через митохондриальные мембраны. **Комплекс TOM** (Translocase of the Outer Membrane — транслоказа внешней мембраны) транспортирует белки через внешнюю мембрану, а два **комплекса TIM** (Translocase of the Innner Membrane — транслоказа внутренней мембраны) TIM23 и TIM22 переносят белки через внутреннюю мембрану (**рис. 12.23**). Часть компонентов этих комплексов функционирует в качестве рецепторов митохондриальных белков-предшественников, остальные формируют транслокационные каналы.

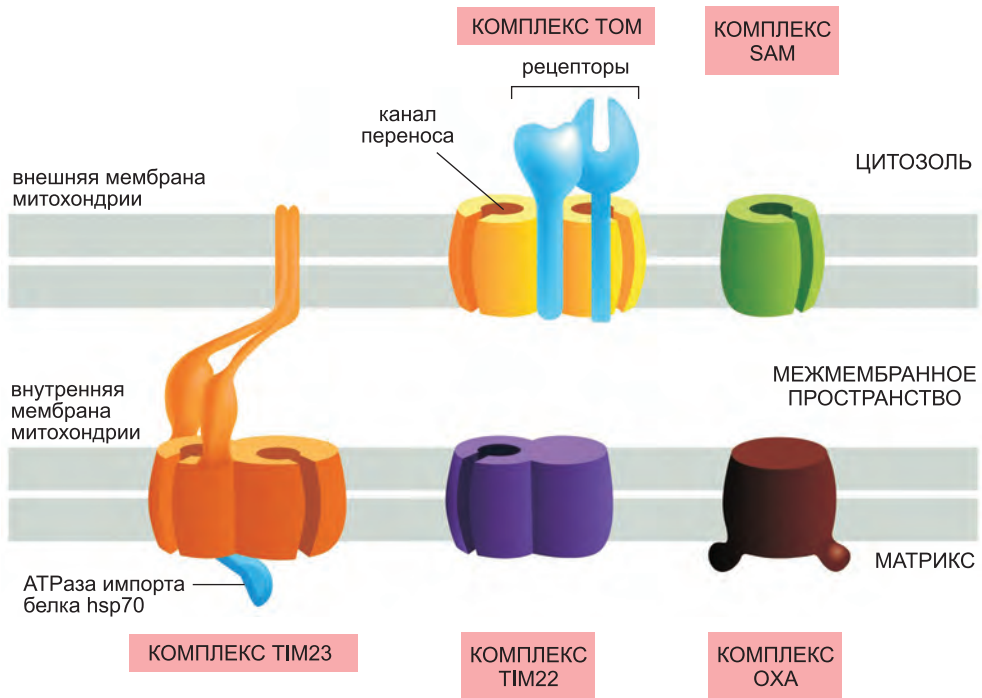


Рис. 12.23. Транслокаторы белков митохондриальных мембран. Комплексы TOM, TIM, SAM и OXA представляют собой мультисубъединичные мембранные белки, катализирующие транспорт белков через митохондриальные мембраны. Белковые компоненты комплексов TIM22 и TIM23, выступающие канал импорта, структурно родственны, что указывает на единое эволюционное происхождение обоих комплексов TIM. Как показано, один из компонентов комплекса TIM23 несет гидрофобный α -спиральный участок, встроенный во внешнюю митохондриальную мембрану. Таким образом, этот комплекс отличается от других тем, что одновременно пронизывает две мембраны.

Комплекс TOM необходим для импорта всех кодируемых ядром митохондриальных белков. Сначала он транспортирует их сигнальные последовательности в межмембранное пространство и помогает вставить трансмембранные белки во внешнюю мембрану. β -бочонковые белки, которых особенно много во внешней мембране, затем переходят на дополнительный транслокатор, **комплекс SAM** (Sorting and Assembly Machinery — аппарат сортировки и сборки), который способствует их правильному сворачиванию в мембране. Комплекс TIM23 транспортирует некоторые растворимые белки в матрикс и способствует встраиванию трансмембранных белков во внутреннюю мембрану. Комплекс TIM22 опосредует встраивание

подкласса белков внутренней мембраны, включая транспортер, переносящий ADP, АТР и фосфат. Еще один транслокатор внутренней митохондриальной мембраны, **комплекс ОХА** (*Oxidase Assembly* — сборка оксидазы), опосредует встраивание белков внутренней мембраны, синтезирующихся в самой митохондрии. Он также способствует встраиванию некоторых импортированных белков внутренней мембраны, которые сначала транспортировали в матрикс другие комплексы.

Со стороны матрикса комплекс TIM23 связан с белковым комплексом, содержащим митохондриальный Hsp70, служащий АТРазой импорта и использующий гидролиз АТР для протаскивания белков через пору.

12.3.2. Митохондриальные белки-предшественники импортируются в форме развернутых полипептидных цепей

Почти все, что нам известно о молекулярном механизме импорта белков в митохондрии, мы узнали благодаря анализу бесклеточных систем транспорта, в которых очищенные митохондрии в пробирке импортировали радиоактивно меченные белки-предшественники. Изменяя условия в пробирке, можно установить биохимические условия процесса импорта.

Митохондриальные белки-предшественники не сворачиваются в нативную структуру после синтеза; благодаря взаимодействиям с другими белками они остаются в цитозоле в несвернутой конформации. Некоторые из этих взаимодействующих белков представляют собой *белки-шапероны семейства Hsp70* (см. главу 6), другие же специфичны к митохондриальным белкам-предшественникам и напрямую связываются с их сигнальными последовательностями. Все взаимодействующие белки предотвращают спонтанную агрегацию или фолдинг белков-предшественников после их связывания с комплексом ТОМ внешней мембраны митохондрий. Первый этап процесса импорта состоит в связывании рецепторами импорта комплекса ТОМ сигнальной последовательности митохондриального белка-предшественника. Затем взаимодействующие белки отделяются, и развернутая полипептидная цепь проходит сигнальной последовательностью вперед в транслокационный канал.

В принципе, белок может попасть в матрикс митохондрии либо одновременно пройдя через обе мембраны, либо пересекая их по очереди. Определить, как именно это происходит, можно путем охлаждения бесклеточной системы митохондриального импорта, останавливая белки на промежуточном этапе процесса транслокации. В результате остановленные белки не будут содержать N-концевую сигнальную последовательность, и, следовательно, N-конец должен находиться в матриксе, где расположена сигнальная пептидаза, но основная часть белка все еще может быть атакована за пределами митохондрии искусственно введенными в систему протеолитическими ферментами (рис. 12.24). Очевидно, белки-предшественники способны одновременно проходить через обе мембраны митохондрии и входить в матрикс (рис. 12.25). Предполагают, что комплекс ТОМ сначала транспортирует сигнальную последовательность через внешнюю мембрану в межмембранное пространство, где она связывается с комплексом TIM, открывая его канал. Полипептидная цепь затем либо входит в матрикс, либо встраивается во внутреннюю мембрану.

Несмотря на то что комплексы ТОМ и TIM обычно работают совместно при одновременном переносе белков-предшественников через обе мембраны, они могут работать и независимо друг от друга. Например, в изолированных внешних мембранах комплекс ТОМ способен транслоцировать сигнальную последователь-

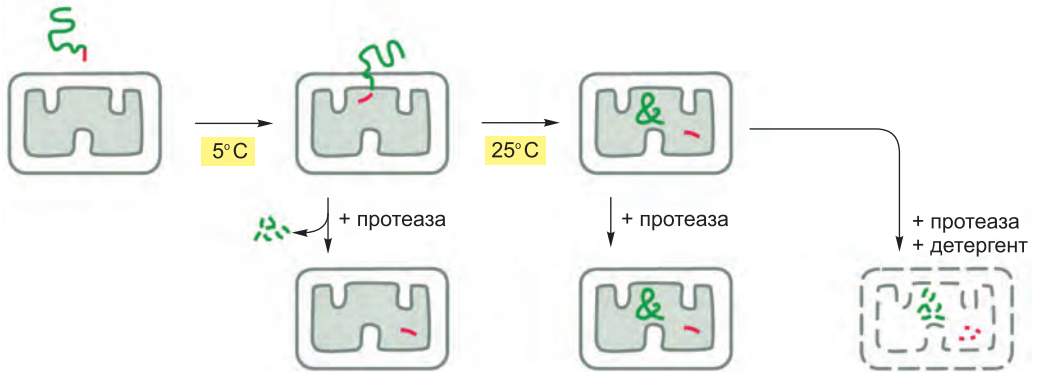


Рис. 12.24. В процессе транслокации в матрикс белки одновременно пронизывают внутреннюю и внешнюю мембрану митохондрии. Когда изолированные митохондрии инкубируют с белком-предшественником при 5° С, белок лишь частично транслоцируется через митохондриальные мембраны. N-концевая сигнальная последовательность (красная) отрезается в матриксе; но большая часть полипептидной цепи остается за пределами митохондрии, где она доступна искусственно добавленным в систему протеолитическим ферментам. При повышении температуры до 25° С транслокация завершается. Внутри митохондрии полипептидная цепь защищена от протеолитических ферментов. В качестве контроля добавляют детергенты, разрушающие митохондриальные мембраны. При этом импортированные белки быстро перевариваются при обработке протеолитическими ферментами.

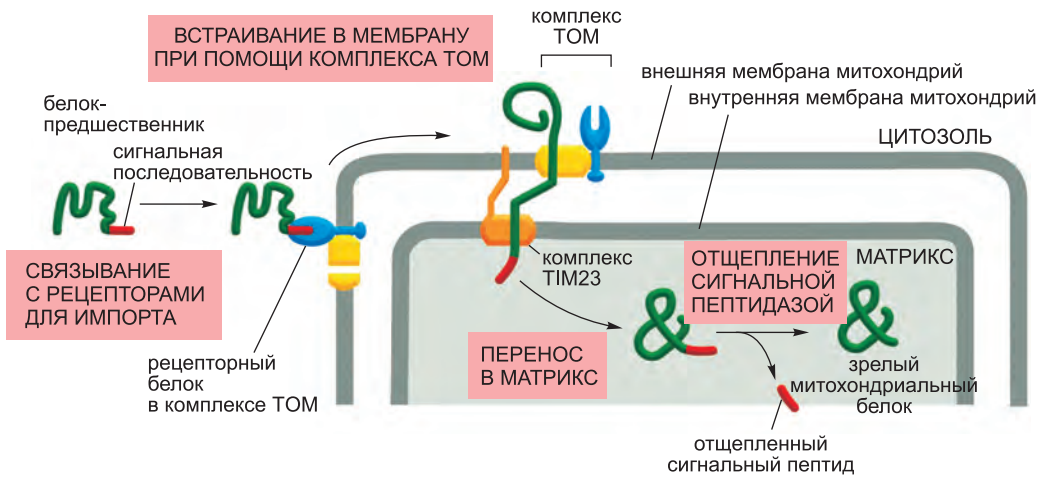


Рис. 12.25. Импорт белков в митохондрии. N-концевую сигнальную последовательность митохондриального белка-предшественника узнают рецепторы комплекса TOM. Затем белок транслоцируется через комплекс TIM23 таким образом, чтобы в какой-то момент он одновременно пересекал обе мембраны. Сигнальная последовательность в матриксе отщепляется сигнальной пептидазой, и образуется зрелый белок. Затем свободная сигнальная последовательность быстро деградирует (не показано).

ность белков-предшественников через мембрану. Точно так же, если внешнюю мембрану изолированных митохондрий искусственно нарушить, комплекс TIM23 способен эффективно импортировать белки в матрикс.

12.3.3. Гидролиз АТФ и мембранный потенциал — движущая сила импорта белков в матрикс

Направленный транспорт требует затраты энергии, которая в большинстве биологических систем получается путем гидролиза АТФ. Гидролиз АТФ — движущая сила импорта митохондриальных белков в двух разных сайтах. Один из них расположен снаружи от митохондрии, другой — в матриксе (рис. 12.26). Помимо этого, импорт белков требует другого источника энергии — мембранного потенциала через внутреннюю мембрану митохондрии.

Первый раз энергия необходима на начальном этапе процесса транслокации, когда несвернутый белок-предшественник, связанный с шаперонами, взаимодействует с рецепторами импорта комплекса ТОМ. Как обсуждается в главе 6, для связывания и высвобождения новосинтезированных полипептидов от шаперонов семейства Hsp70 требуется гидролиз АТФ. Необходимость присутствия Hsp70 и АТФ в цитозоле можно обойти, если к очищенным митохондриям добавить искусственно развернутый белок.

После того как сигнальная последовательность прошла через комплекс ТОМ и связалась с комплексом TIM, дальнейшая транслокация через канал TIM требует мембранного потенциала, который представляет собой электрический компонент электрохимического градиента H^+ через внутреннюю мембрану (см. рис. 11.4). Откачивание H^+ из матрикса в межмембранное пространство, опосредуемое транспортными процессами во внутренней мембране (обсуждаемыми в главе 14), поддерживает электрохимический градиент. Энергия электрохимического градиента H^+ через внутреннюю мембрану не только способствует синтезу почти всего АТФ клетки, но и является движущей силой транслокации через комплексы TIM положительно заряженных сигнальных последовательностей путем электрофореза.

Митохондриальный Hsp70 также играет ключевую роль в процессе импорта. Митохондрии, несущие мутантные формы белка, не способны импортировать белки-предшественники. Hsp70 является частью мультисубъединичного белкового комплекса, связанного с матричной частью комплекса TIM23 и служащего мотором, протаскивающим белок-предшественник в матрикс. Как и его цитоплазматический родственник,

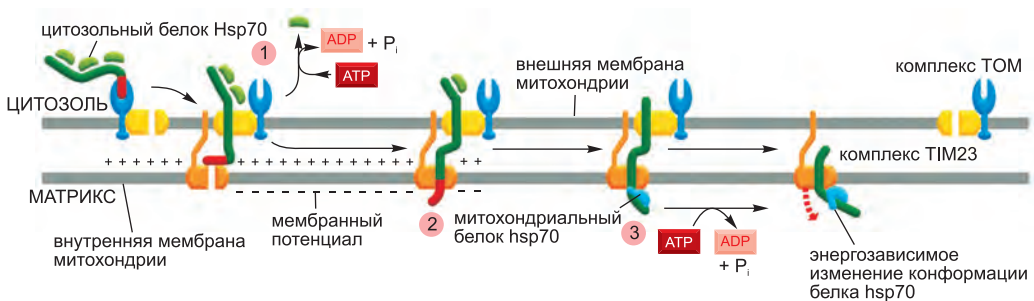


Рис. 12.26. Роль энергии в импорте в матрикс митохондрий. (1) Связанный цитоплазматический Hsp70 отделяется от белка в процессе, зависящем от гидролиза АТФ. После вхождения сигнальной последовательности и соседних участков полипептидной цепи в комплекс ТОМ сигнальная последовательность взаимодействует с комплексом TIM. (2) Затем сигнальная последовательность транслоцируется в матрикс в процессе, требующем наличия мембранного потенциала на внутренней мембране. (3) Митохондриальный Hsp70, являющийся частью важного АТФ-зависимого комплекса, связывается с полипептидной цепью по мере ее прохождения в матрикс и протаскивает ее через транслокационный канал.

митохондриальный Hsp70 обладает высоким сродством к несвернутому полипептидным цепям и крепко связывается с импортированным белком, как только тот выходит из транслокатора TIM в матрикс. Затем Hsp70 высвобождает белок в АТР-зависимом процессе. Предполагают, что этот энергозатратный цикл связывания и последующего высвобождения служит конечной движущей силой, необходимой для завершения импорта белка после его вхождения в комплекс TIM23 (см. рис. 12.26).

После взаимодействия с митохондриальным Hsp70 многие импортированные белки матрикса переходят на другой белок-шаперон, *митохондриальный Hsp60*. Как показано в главе 6, Hsp60 способствует фолдингу несвернутой полипептидной цепи через серию последовательных циклов связывания и высвобождения, сопровождаемых гидролизом АТР.

12.3.4. Бактерии и митохондрии используют сходные механизмы встраивания поринов в свои внешние мембраны

Внешняя мембрана митохондрий, как и внешняя мембрана грамотрицательных бактерий (см. рис. 11.18), содержит большое число порообразующих белков, носящих название поринов. Это позволяет им быть проницаемыми для неорганических ионов и метаболитов (но не для большинства белков). Порины — это белки со структурой β -бочонка (см. рис. 10.26), и сначала они импортируются через комплекс TOM (рис. 12.27). Комплекс TOM не способен интегрировать порины в липидный бислой, в отличие от других белков внешней мембраны, закоренных в ней α -спиральными участками. Вместо этого, порины сначала транспортируются в межмембранное пространство, где они временно связываются со специализированными шаперонами, не позволяющими им агрегировать. Затем они связываются с комплексом SAM во внешней мембране, который встраивает их в мембрану и способствует их правильному сворачиванию.

Одна из центральных субъединиц комплекса SAM гомологична белку внешней мембраны бактерий, который способствует встраиванию β -бочоночных белков из периплазматического пространства (топологически эквивалентного межмембранному пространству митохондрий) во внешнюю мембрану. Этот консервативный путь встраивания β -бочоночных белков вновь подтверждает эндосимбиотическое происхождение митохондрий.

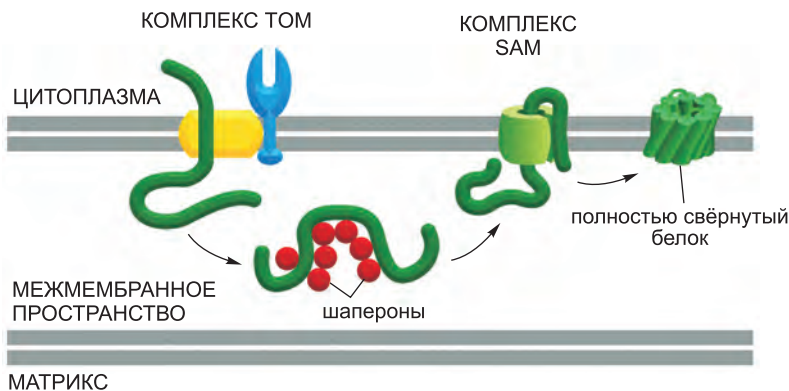


Рис. 12.27. Интеграция поринов во внешнюю мембрану митохондрий. После транслокации через комплекс TOM β -бочоночные белки связываются в межмембранном пространстве с шаперонами. Затем комплекс SAM встраивает несвернутую полипептидную цепь во внешнюю мембрану.

12.3.5. Транспорт во внутреннюю мембрану и межмембранное пространство митохондрий протекает по нескольким путям

Механизм, посредством которого белки транспортируются в матрикс через транслокаторы TOM и TIM23 (см. рис. 12.25), также отвечает за первичную транслокацию многих белков, определяемых во внутреннюю митохондриальную мембрану или межмембранное пространство. В наиболее распространенном пути транслокации только N-концевая сигнальная последовательность транспортируемого белка входит в матрикс (**рис. 12.28, а**). Кластер гидрофобных аминокислот, стратегически расположенных в N-концевой сигнальной последовательности, служит *последовательностью остановки переноса*, запрещающей дальнейшую транслокацию через внутреннюю мембрану. Комплекс TOM протягивает остальной белок через внешнюю мембрану в межмембранное пространство, сигнальная последовательность отщепляется в матриксе, и гидрофобная последовательность, высвобожденная из TIM23, остается заякоренной в мембране.

В другом пути транспорта во внутреннюю мембрану или межмембранное пространство комплекс TIM23 сначала транслоцирует весь белок в матрикс (**рис. 12.28, б**). Сигнальная пептидаза матрикса удаляет N-концевую сигнальную последовательность, обнажая гидрофобный кластер на новом N-конце. Эта сигнальная последовательность направляет белок в комплекс OXA, который встраивает белок во внутреннюю мембрану (см. рис. 12.23). Как упомянуто ранее, комплекс OXA в основном встраивает во внутреннюю мембрану белки, кодируемые и транслируемые в митохондриях, и только несколько импортируемых белков идут по этому пути. Транслокаторы, близко родственные комплексу OXA, обнаружены в плазматической мембране бактерий и тилакоидной мембране хлоропластов, где они, по-видимому, встраивают мембранные белки по подобному механизму.

Многие белки, использующие эти пути встраивания во внутреннюю мембрану, остаются заякоренными в ней через гидрофобную сигнальную последовательность (см. рис. 12.28, а и б). Другие же, однако, высвобождаются в межмембранное пространство протеазой, удаляющей мембранный якорь (см. рис. 12.28, в). Многие из таких расщепленных белков остаются связанными с внешней поверхностью внутренней мембраны в качестве периферических субъединиц белковых комплексов, содержащих трансмембранные белки.

Митохондрии — это принципиальные сайты синтеза АТФ в клетке, но они также содержат множество метаболических ферментов, участвующих, например, в цикле лимонной кислоты. Таким образом, в дополнение к белкам митохондрии должны транспортировать через свои мембраны малые метаболиты. Тогда как во внешней мембране присутствуют порины, делающие ее проницаемой для таких небольших молекул, во внутренней мембране их нет. Вместо этого, семейство метаболит-специфичных транспортеров переносит большое число малых молекул через внутреннюю мембрану. В клетках дрожжей эти транспортеры составляют семейство из 35 различных белков, из которых больше всего переносчиков АТФ, АДФ и фосфата. Эти многопроходные трансмембранные белки не несут отщепляемых сигнальных последовательностей на N-конце, но содержат внутренние сигнальные последовательности. Они проходят через комплекс TOM во внешней мембране, и межмембранные шапероны направляют их в комплекс TIM22, который встраивает их во внутреннюю мембрану в процессе, требующем мембранного потенциала, но не митохондриального Hsp70 или АТФ (**рис. 12.28, г**). Энергетически выгодное

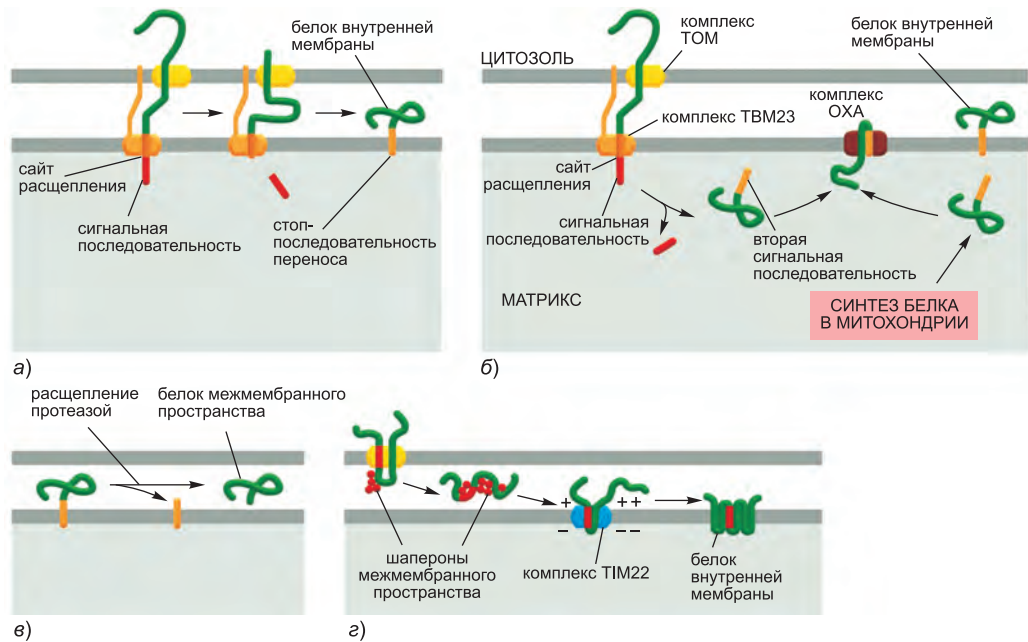


Рис. 12.28. Импорт белков из цитозоля во внутреннюю мембрану и межмембранное пространство митохондрий. (а) N-концевая сигнальная последовательность (красная) инициирует импорт в матрикс (см. рис. 12.25). Гидрофобная последовательность (оранжевая), следующая за сигналом транспорта в митохондрию, связывается с комплексом TIM23 во внутренней мембране и останавливает транслокацию. Оставшаяся часть белка протаскивается в межмембранное пространство через транслокатор TOM во внешней мембране, а гидрофобная последовательность высвобождается во внутренней. (б) Во втором пути встраивания белков во внутреннюю мембрану белок сначала полностью доставляется в матриксное пространство. Отщепление сигнальной последовательности (красная), используемое для начальной транслокации, открывает соседнюю гидрофобную сигнальную последовательность (оранжевая) на новом N-конце. Затем этот сигнал направляет белок во внутреннюю мембрану по тому же OXA-зависимому пути, который встраивает белки, кодируемые митохондриальным геномом и транскрибируемые в матриксе. (в) Некоторые растворимые белки межмембранного пространства также используют пути, показанные на (а) и (б), до тех пор, пока они не высвобождаются второй сигнальной пептидазой, активный сайт которой располагается в межмембранном пространстве и которая удаляет гидрофобную сигнальную последовательность. (г) Транспортёры метаболитов содержат внутренние сигнальные последовательности и проходят через комплекс TOM в форме петли. Затем в межмембранном пространстве они связываются с шаперонами, направляющими их в комплекс TIM22. Комплекс TIM22 специализируется на встраивании многопроходных белков внутренней мембраны.

встраивание гидрофобных трансмембранных участков во внутреннюю мембрану также, вероятно, является движущей силой этого процесса.

12.3.6. Две сигнальные последовательности направляют белки в тилакоидную мембрану хлоропластов

Транспорт белков в **хлоропластах** похож на транспорт в митохондриях. Оба процесса происходят посттрансляционно, через разные транслокационные комплексы в каждой мембране, требуют затрат энергии и используют амфифильные N-концевые последовательности, удаляемые в конце. Однако, за исключением не-

скольких молекул шаперонов, белковые компоненты, образующие транслокационные комплексы, отличаются. Более того, когда митохондрии используют в качестве движущей силы транспорта электрохимический градиент H^+ через внутреннюю мембрану, хлоропласты, которые обладают электрохимическим градиентом H^+ через тилакоидную мембрану, используют гидролиз АТФ и GTP для обеспечения энергией транспорта через их двойную мембрану. Таким образом, функциональное сходство должно быть следствием конвергентной эволюции, отражающей общие требования для транслокации через двойную мембрану.

Несмотря на то что сигнальные последовательности импорта в хлоропласты немного напоминают последовательности импорта в митохондрии, одни и те же растительные клетки несут одновременно обе органеллы, поэтому белки должны распределяться между ними правильным образом. Например, в растениях бактериальный фермент может быть направлен в митохондрию, если к нему присоединить N-концевую сигнальную последовательность митохондриального белка; тот же самый белок, объединенный с N-концевой сигнальной последовательностью белка хлоропластов, окажется в хлоропласте. Таким образом, рецепторы импорта на каждой органелле распознают различные сигнальные последовательности.

Хлоропласты обладают дополнительным замкнутым мембранным компартментом — **тилакоидом**. Многие хлоропластные белки, включая белковые субъединицы фотосинтетической системы и АТФ-синтазы (см. главу 14), расположены в мембране тилакоидов. Как и предшественники некоторых митохондриальных белков, транспорт этих белков-предшественников из цитозоля в их конечный пункт назначения происходит в два этапа. Сначала они проходят через двойную мембрану в матрикс (который в хлоропластах называется **стромой**) в специальных сайтах контакта и затем транслоцируются либо в тилакоидную мембрану, либо в тилакоидное пространство (рис. 12.29, а). Предшественники этих белков несут после N-концевой последовательности импорта в хлоропласт гидрофобную сигнальную последовательность импорта в тилакоид. После того как N-концевая последовательность была использована для импорта белка в строму, стромальная сигнальная пептидаза удаляет ее и делает доступной сигнальную последовательность тилакоида, инициирующую транспорт через мембрану тилакоида. Существует по крайней мере четыре пути прохождения через тилакоидную мембрану и встраивания в нее, отличающихся друг от друга по участвующим в процессе шаперонам и источникам энергии (рис. 12.29, б).

Заключение

Несмотря на то что митохондрии и хлоропласты обладают собственными генетическими системами, они синтезируют лишь малую часть своих белков. Эти органеллы импортируют большую часть своих белков из цитозоля, используя сходные механизмы. В обоих случаях белки в несвернутом состоянии одновременно транспортируются через внешнюю и внутреннюю мембраны в матрикс или строму. Движущей силой транслокации в митохондриях служат гидролиз АТФ и мембранный потенциал, в хлоропластах — гидролиз либо АТФ, либо GTP. Белки-шапероны семейства цитоплазматических Hsp70 поддерживают несвернутое состояние белков-предшественников, а второй набор белков Hsp70 в матриксе или стромах затаскивают полипептидную цепь в органеллу. Транслоцируются только белки, несущие специфическую сигнальную последовательность. Сигнальная последовательность может располагаться на N-конце

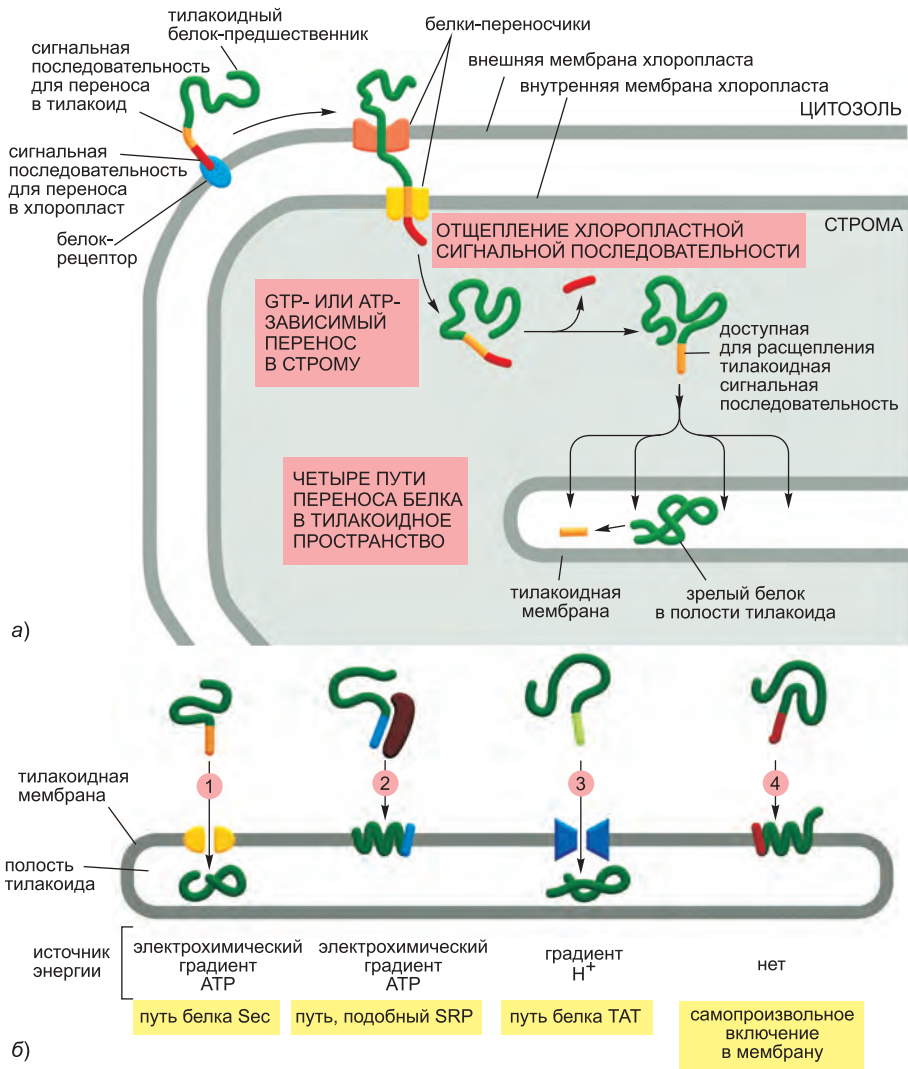
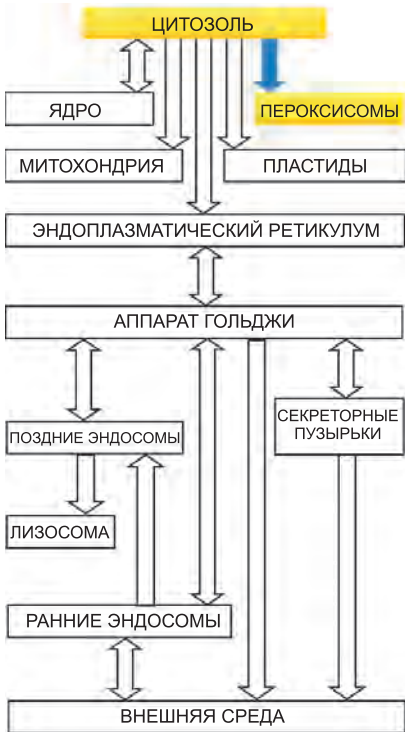


Рис. 12.29. Транслокация хлоропластных белков-предшественников в тилакоидное пространство. (а) Белок-предшественник несет N-концевую сигнальную последовательность импорта в хлоропласт (красная), за которой следует сигнальная последовательность тилакоида (оранжевая). Хлоропластная сигнальная последовательность инициирует транслокацию в строму через сайт контакта на мембране посредством механизма, сходного с механизмом транслокации белков-предшественников в матрикс митохондрий. Затем сигнальная последовательность отщепляется, и открывается тилакоидная сигнальная последовательность, запускающая транспорт через тилакоидную мембрану. (б) Транслокация в тилакоидное пространство или тилакоидную мембрану может происходить по крайней мере четырьмя способами: (1) *Sec*-зависимый путь, в котором используются компоненты, гомологичные белкам *Sec*, опосредующим транслокацию белков через плазматическую мембрану бактерий (обсуждается позднее); (2) *SPR*-подобный путь, носящий такое название потому, что в нем используется хлоропластный гомолог сигнал-узнающей частицы — *SRP* (обсуждается позднее); (3) *путь TAT* (транслокация двойными аргининами), носящий такое название потому, что в сигнальных последовательностях, направляющих белки в этом пути, ключевую роль играют два аргинина; этот путь зависит от градиента H^+ через тилакоидную мембрану; и (4) *путь самопроизвольного встраивания*, для которого, по-видимому, не требуется никаких транслокаторов.

и отщепляться после импорта или находиться внутри белка и сохраняться. При транспорте во внутреннюю мембрану иногда используется вторая, гидрофобная сигнальная последовательность, которая становится доступной после удаления первой сигнальной последовательности. В хлоропластах импорт из стромы в тилакоид может происходить несколькими путями, отличающимися участвующими в процессе шаперонами и источниками энергии.

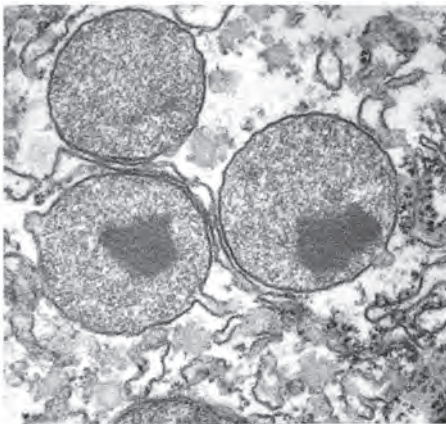


12.4. Пероксисомы

Пероксисомы многим отличаются от митохондрий и хлоропластов. Главное отличие состоит в том, что они окружены единственной мембраной, и они не содержат ДНК или рибосом. Таким образом, в отсутствие собственного генома все их белки кодируются в ядре. Пероксисомы получают большинство своих белков путем селективного импорта из цитозоля, хотя некоторые проникают через мембрану пероксисом через ЭР.

Поскольку мы больше нигде не обсуждаем пероксисомы, стоит сделать небольшое отступление и рассмотреть некоторые функции этого разнообразного класса органелл, и только после этого перейти к их биосинтезу. Во всех эукариотических клетках есть пероксисомы. Они содержат окислительные ферменты, например *каталазу* и *оксидазу мочевой кислоты*, в таких высоких концентрациях, что в некоторых клетках пероксисомы выделяются на электронных микрофотографиях благодаря присутствию в них кристаллического ядра (**рис. 12.30**).

Как и митохондрии, пероксисомы являются местом утилизации кислорода. Одна из гипотез их происхождения заключается в том, что они являются остатками древней органеллы, в которой протекал весь кислородный метаболизм примитивных предшественников эукариотических клеток. Когда кислород, синтезированный фотосинтетическими бактериями, впервые стал накапливаться в атмосфере, он был крайне ядовит для большинства клеток. Пероксисомы могли снижать внутриклеточную концентрацию кислорода



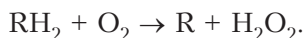
200 нм

Рис. 12.30. Электронная микрофотография трех пероксисом в клетке печени крысы. Ложнокристаллические электронно-плотные включения состоят из фермента оксидазы мочевой кислоты. (С любезного разрешения Daniel. S. Friend.)

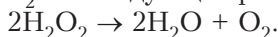
и одновременно использовать его высокую реакционную способность для полезных реакций окисления. Согласно этому взгляду, последующее развитие митохондрий сделало пероксисомы ненужными, поскольку многие биохимические реакции, которые происходили в пероксисомах без производства энергии, теперь стали сопряжены с синтезом АТФ через окислительное фосфорилирование. Реакции окисления, протекающие в пероксисомах в современных клетках, представляют собой реакции, которые не взяли на себя митохондрии.

12.4.1. Пероксисомы используют молекулярный кислород и перекись водорода для проведения окислительных реакций

Пероксисомы носят такое название потому, что обычно они содержат один или несколько ферментов, использующих молекулярный кислород для удаления атомов водорода с определенных органических субстратов (обозначенных здесь через R) в реакции окисления, продуктом которой служит *пероксид (перекись) водорода* (H_2O_2):



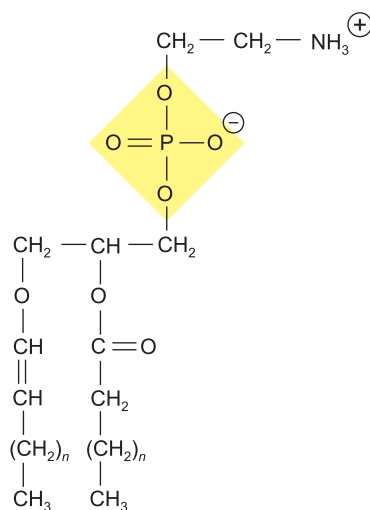
Каталаза использует синтезированную другими ферментами H_2O_2 в органелле для окисления различных субстратов, включая фенолы, муравьиную кислоту, формальдегид и этанол, в реакции «пероксидации»: $H_2O_2 + R'H_2 \rightarrow R' + 2H_2O$. Этот тип окислительной реакции играет важную роль в клетках печени и почек, где пероксисомы обезвреживают различные ядовитые молекулы, попадающие в кровоток. Около 25% потребляемого нами этанола таким образом окисляется до ацетальдегида. Более того, когда в клетке накапливается избыточное количество H_2O_2 , каталаза переводит его в H_2O в следующей реакции:



Важной функцией протекающих в пероксисомах окислительных реакций является деградация молекул жирных кислот. Этот процесс, носящий название *β-окисления*, последовательно укорачивает алкильные цепи жирных кислот блоками по два углеродных атома, превращая жирные кислоты в ацетил-КоА. Затем пероксисомы экспортируют ацетил-КоА в цитозоль для повторного его использования в реакциях биосинтеза. В клетках млекопитающих β-окисление происходит как в митохондриях, так и в пероксисомах; однако в дрожжевых и растительных клетках эта жизненно важная реакция протекает исключительно в пероксисомах.

Необходимой биосинтетической функцией животных пероксисом является катализ первых реакций образования *плазмалогенов*, самого распространенного класса фосфолипидов миелина (рис. 12.31).

Рис. 12.31. Структура плазмалогена. Очень много плазмалогенов содержится в миелиновых оболочках, изолирующих аксоны нервных клеток. Плазмалогены составляют до 80–90% всех фосфолипидов миелиновой мембраны. Помимо этаноламинной головки и длинноцепочечной жирной кислоты, связанной с тем же фосфатом глицерина, что и во всех фосфолипидах, плазмалогены содержат необычный жирнокислотный спирт, присоединенный через эфирную связь (внизу слева).



Недостаток плазмалогенов приводит к тяжелым нарушениям миелинизации аксонов нервных клеток, поэтому часто при нарушении работы пероксисом наблюдаются неврологические заболевания.

Пероксисомы — очень разнообразные органеллы, и даже в различных типах клеток одного организма они могут нести разный набор ферментов. Также они удивительно хорошо приспосабливаются к изменению условий. Например, дрожжи, растущие на сахаре, имеют маленькие пероксисомы. Но если дрожжи выращивать на метаноле, у них развиваются крупные пероксисомы, окисляющие метанол; если же их выращивать на жирных кислотах, у них развиваются большие пероксисомы, разрушающие жирные кислоты до ацетил-КоА в реакциях β -окисления.

Пероксисомы также важны для растений. Хорошо изучено два типа растительных пероксисом. Один из них содержится в листьях, где он участвует в *фотодыхании* (обсуждаемом в главе 14) (рис. 12.32, а). Второй тип пероксисом присутствует в прорастающих семенах, где он превращает жирные кислоты, запасенные в жирах семени, в сахара, необходимые для роста молодого растения. Поскольку это превращение жиров в сахара происходит путем последовательных реакций, носящих название *глиоксилатного цикла*, такие пероксисомы также называют глиоксисомами (рис. 12.32, б). В глиоксилатном цикле две молекулы ацетил-КоА, полученные при расщеплении жирных кислот в пероксисоме, используются для синтеза янтарной кислоты, которая затем покидает пероксисому и в цитозоле превращается в глюкозу. В животных клетках нет глиоксилатного цикла, и поэтому животные не способны превращать жирные кислоты жиров в углеводы.

12.4.2. Короткая сигнальная последовательность направляет импорт белков в пероксисомы

Специфическая последовательность трех аминокислот (Ser-Lys-Leu), расположенная на С-конце многих белков пероксисом, выполняет функцию сигнала импорта (см. таблицу 12.3, стр. 1237). Другие белки пероксисом содержат сигнальную последовательность вблизи N-конца. Если какую-либо из этих последовательностей присоединить к цитоплазматическому белку, он будет импортироваться в пероксисомы. Процесс импорта до сих пор малоизучен, но известно, что в нем принимают участие растворимые рецепторные белки цитозоля, узнающие целевые сигналы, и белки докинга на цитоплазматической поверхности пероксисом. В процессе импорта, сопряженного с гидролизом АТР, участвуют по крайней мере 23 разных белка, называемыхся **пероксинами**. Комплекс из 6 различных пероксинов образует мембранный транслокатор. Поскольку даже олигомерные белки не нуждаются в разворачивании для импорта в пероксисому, механизм транспорта отличается от механизма, используемого в митохондриях и хлоропластах. По крайней мере один растворимый рецептор импорта, пероксин Pex5, сопровождает свой груз внутрь пероксисом и, после высвобождения белка, возвращается обратно в цитозоль. Эти аспекты пероксисомального импорта белков напоминают транспорт белков в ядро.

Значение процесса импорта и пероксисом ярко иллюстрирует наследственное заболевание человека синдром Зельвегера, при котором нарушение процесса импорта в пероксисомы ведет к тяжелой пероксисомальной недостаточности. У больных, клетки которых несут «пустые» пероксисомы, наблюдаются тяжелые нарушения мозга, печени и почек, и они погибают вскоре после рождения. Мутация гена,

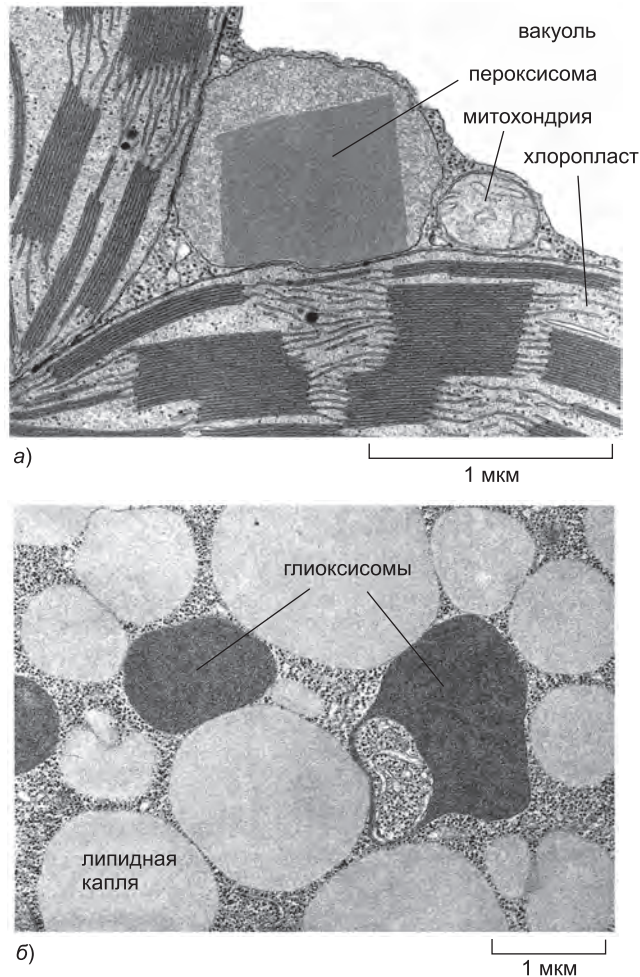


Рис. 12.32. Электронные микрофотографии двух типов пероксисом растительных клеток. (а) Пероксисома с ложнокристаллическим ядром в клетке мезофилла табачного листа. Близкое расположение пероксисом и хлоропластов, по-видимому, ускоряет обмен веществ между этими органеллами в процессе фотодыхания. (б) Пероксисомы в запасящей жиры клетке семядоли семени помидора через 4 дня после прорастания. Здесь пероксисомы (глиоксисомы) связаны с липидными каплями, в которых запасены жиры, что отражает их центральную роль в мобилизации жиров и глюконеогенезе в процессе прорастания семян. (а, из S. E. Frederick and E. H. Newcomb, *J. Cell Biol.* 43: 343–353, 1969. С любезного разрешения Rockefeller Press; б, из W. P. Wergin, P. J. Gruber and E. H. Newcomb, *J. Ultrastruct. Res.* 30: 533–557, 1970. С любезного разрешения издательства Academic Press.)

кодирующего пероксин Pex2, пероксомальный интегральный мембранный белок, участвующий в импорте белков, вызывает одну форму заболевания. Дефектный рецептор N-концевого сигнала импорта вызывает более слабое наследственное заболевание пероксисом.

Долгое время дискутируют, возникают ли новые пероксисомы из ранее существовавших путем роста и деления органеллы (т.е. происходит их автономная репликация, как в упомянутом ранее случае митохондрий и пластид), или они

становятся самостоятельным компартментом после отщепления от ЭР. Некоторые аспекты обеих точек зрения могут соответствовать действительности (рис. 12.33). Большинство мембранных белков пероксисом синтезируется в цитозоле и встраивается в мембрану уже существующих органелл, однако есть белки, которые сначала интегрируются в мембрану ЭР, где они могут входить в состав специализированных везикул-предшественников пероксисом. Новые везикулы-предшественники затем могут сливаться друг с другом и начать импортировать дополнительные пероксомальные белки при помощи собственного аппарата импорта и вырастать в зрелые пероксисомы, которые уже вступают в цикл роста и деления.

Заключение

Пероксисомы специализируются на реакциях окисления с участием молекулярного кислорода. Они синтезируют перекись водорода, которую используют для окисления, и содержат каталазу для нейтрализации избытка перекиси. Как митохондрии и пластиды, пероксисомы являются самовоспроизводящимися органеллами. Однако, поскольку они не содержат ДНК или рибосом, все их белки кодируются в клеточном ядре. Некоторые из этих белков доставляются в пероксисомы через ЭР, но большинство синтезируется в цитозоле. Специфическая последовательность трех аминокислот вблизи С-конца многих цитоплазматических белков служит сигналом импорта в пероксисомы. Механизм процесса импорта отличается от механизма в митохондриях и хлоропластах тем, что даже олигомерные белки транспортируются из цитозоля без разво-

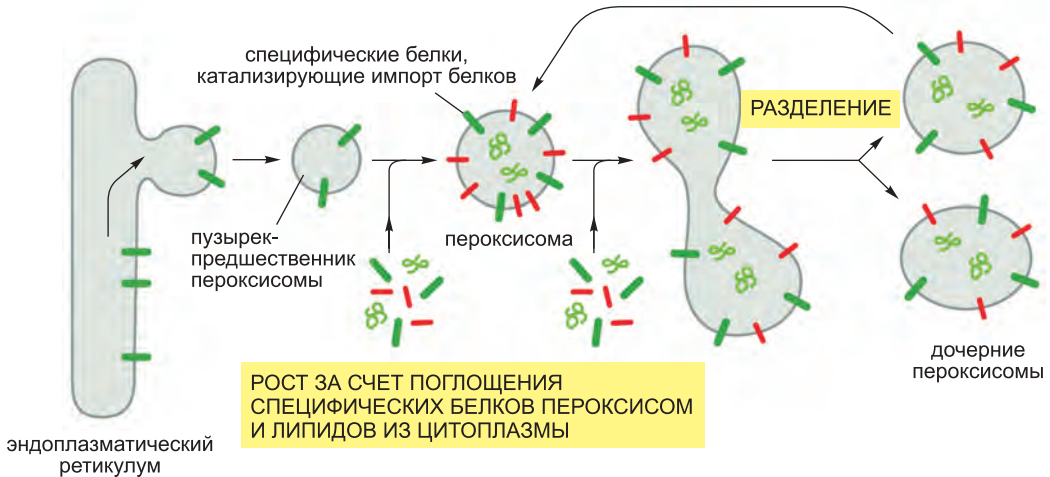


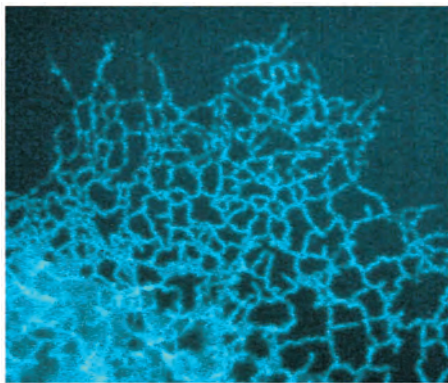
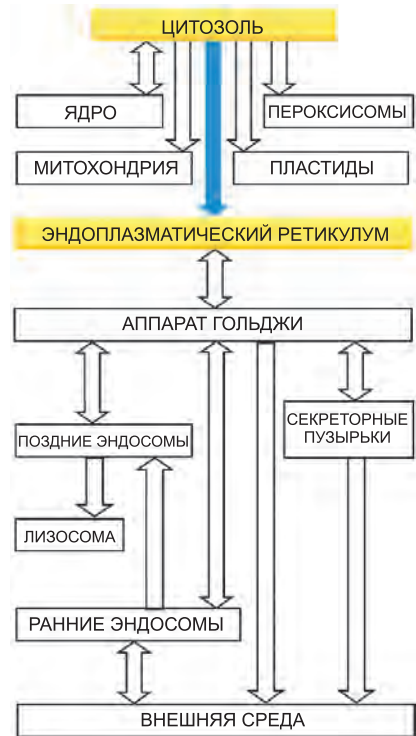
Рис. 12.33. Модель, объясняющая, как пероксисомы пролиферируют и как могут появляться новые пероксисомы. Везикулы-предшественники пероксисом отпочковываются от ЭР. Неизвестно, какой аппарат управляет реакцией отпочковывания и отбирает для упаковки в везикулы только пероксомальные белки, а не белки ЭР или белки, предназначенные для других компартментов клетки. Везикулы-предшественники пероксисом затем могут сливаться друг с другом или уже существующими пероксисомами. Мембрана пероксисом содержит рецепторные белки импорта. Цитоплазматические рибосомы синтезируют пероксомальные белки, включая новые копии рецептора импорта, и затем импортируют их в органеллу. Предполагают, что липиды, необходимые для роста, также импортируются, хотя некоторые из них могут напрямую происходить из ЭР в мембранах везикул-предшественников пероксисом. (Позднее мы обсудим транспорт синтезированных в ЭР липидов через цитозоль в другие органеллы.)

рачивания.

12.5. Эндоплазматический ретикулум

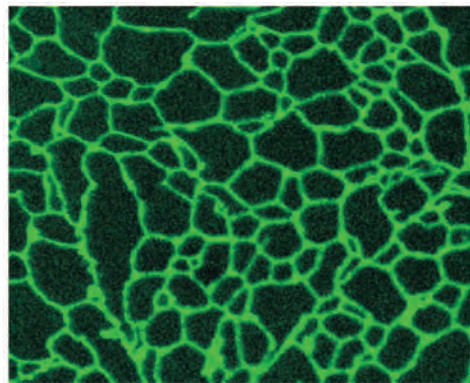
У всех эукариотических клеток есть **эндоплазматический ретикулум (ЭР)**. Его мембрана обычно составляет более половины всех мембран типичной животной клетки (см. таблицу 12.2, **стр. 1233**). ЭР — лабиринт разветвленных трубочек и уплощенных мешочков, распространяющихся по всему цитозолю (**рис. 12.34**). Трубочки и мешочки сообщаются друг с другом, а их мембрана продолжает внешнюю мембрану ядра. Таким образом, мембраны ЭР и ядра образуют непрерывную поверхность, окружающую единое внутреннее пространство, носящее название **люмена ЭР**, или *цистернального пространства ЭР*, которое часто занимает более 10% общего объема клетки (см. таблицу 12.1, **стр. 1228**).

ЭР играет центральную роль в биосинтезе липидов и белков и служит депо внутриклеточного Ca^{2+} , участвующего во многих сигнальных процессах клеточного ответа (см. главу 15). Мембрана ЭР является местом синтеза всех трансмембранных белков и липидов большинства клеточных органелл, включая сам ЭР, аппарат Гольджи, лизосомы, эндосомы, секреторные пузырьки и плазматическую



а)

2 мкм



б)

10 мкм

Рис. 12.34. Флуоресцентные микрофотографии эндоплазматического ретикулума. (а) Часть сети ЭР в культуре клеток млекопитающего, окрашенной антителом, связывающимся с белком ЭР. ЭР распространяет свою сеть по всему цитозолю, и все области цитоплазмы находятся вблизи какой-либо части мембраны ЭР. (б) Часть сети ЭР в живой растительной клетке, которую генетически модифицировали таким образом, чтобы она экспрессировала в ЭР флуоресцентный белок. (а, с любезного разрешения Hugh Pelham; б, с любезного разрешения Petra Boevink и Chris Hawes.)

мембрану. Мембрана ЭР также производит большую часть липидов митохондриальной и пероксисомальной мембран. Более того, почти все белки, которые секретируются клеткой во внешнюю среду, а также белки, предназначенные в люмен ЭР, аппарат Гольджи или лизосомы, сначала транспортируются из люмена ЭР.

12.5.1. ЭР структурно и функционально неоднороден

Если разнообразные функции ЭР необходимы для выживания любой клетки, то их относительная важность в значительной степени зависит от типа клетки. Чтобы удовлетворять различным функциональным требованиям, отдельные части ЭР стали высокоспециализированными. Мы наблюдаем такого рода функциональную специализацию как принципиальные изменения структуры ЭР, и, следовательно, различным типам клетки свойственны различные типы мембран ЭР. Одной из наиболее важных специализаций ЭР является *шероховатый ЭР*.

Клетки млекопитающих начинают импортировать большинство белков в ЭР до полного синтеза полипептидной цепи, т. е. импорт представляет собой **котрансляционный** процесс (рис. 12.35, а). Импорт белков в митохондрии, хлоропласты, ядро и пероксисомы, наоборот, является **посттрансляционным** процессом (рис. 12.35, б). При котрансляционном транспорте рибосома, синтезирующая белок, напрямую прикреплена к мембране ЭР, что позволяет одному концу белка транслацироваться в люмен ЭР, а остальная полипептидная цепь при этом продолжает собираться. Такие мембраносвязанные рибосомы покрывают поверхность ЭР, образуя участки, носящие название **шероховатого эндоплазматического ретикула**, или **шероховатого ЭР** (рис. 12.36, а).

Области ЭР, лишенные связанных рибосом, называются **гладким эндоплазматическим ретикулумом**, или **гладким ЭР**. У большинства клеток есть небольшие участки гладкого ЭР, и ЭР обычно частично гладкий и частично шероховатый. Области гладкого ЭР, от которых отпочковываются транспортные везикулы, несущие в аппарат Гольджи синтезированные белки и липиды, называются **переходным ЭР**.

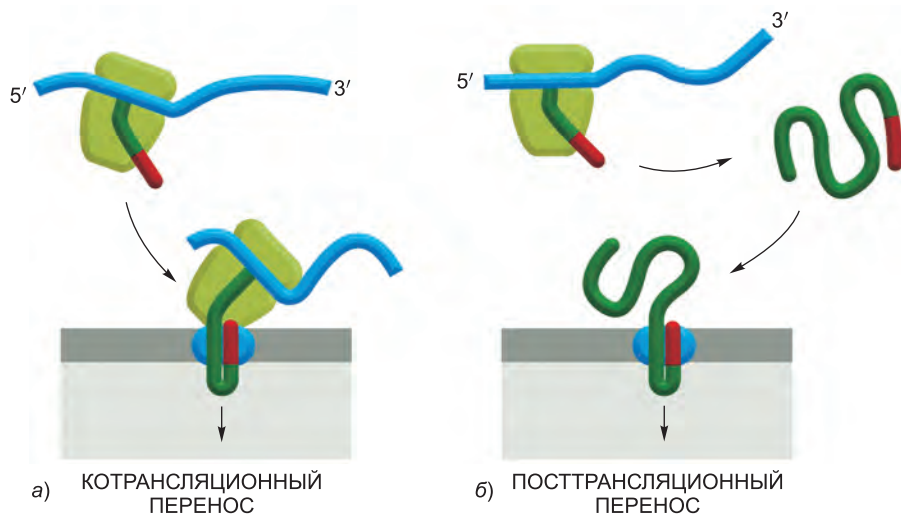


Рис. 12.35. Котрансляционная и посттрансляционная транслокация белков. (а) Рибосомы связываются с мембраной ЭР в процессе котрансляционной транслокации. (б) Рибосомы, наоборот, завершают синтез белка и высвобождают его перед посттрансляционной транслокацией.

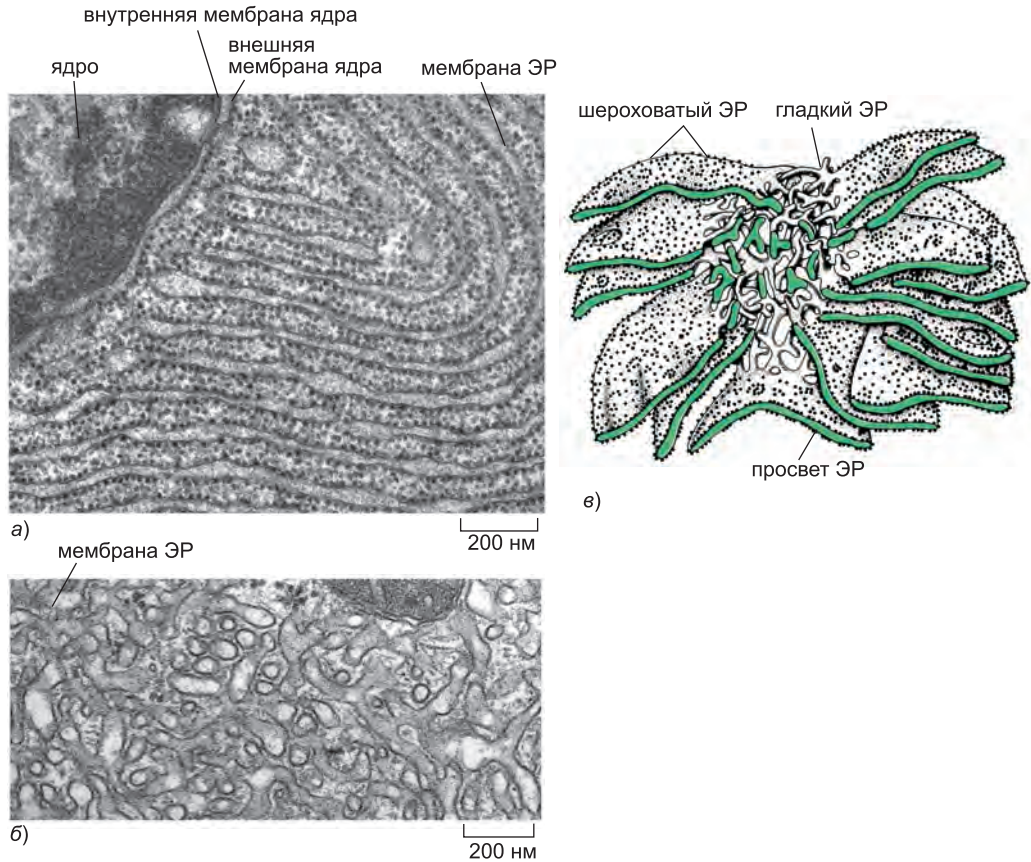


Рис. 12.36. Шероховатый и гладкий ЭР. (а) Электронная микрофотография шероховатого ЭР экзокринной клетки поджелудочной железы, которая каждый день синтезирует и секретирует большие количества пищеварительных ферментов. Цитозоль заполнен плотно упакованными стопками мембраны ЭР, покрытой рибосомами. В левом верхнем углу видна часть ядра и ядерная оболочка; обратите внимание, что внешняя ядерная мембрана, перетекающая в ЭР, также покрыта рибосомами. (б) Гладкий ЭР в клетке, секретирующей стероидные гормоны. Это электронная микрофотография клетки Лейдига, секретирующей тестостерон в яичках человека. (в) Трехмерная реконструкция участка гладкого ЭР и шероховатого ЭР в клетке печени. Шероховатый ЭР образует ориентированные стопки уплощенных цистерн, ширина люминального пространства которых составляет 20–30 нм. Мембрана гладкого ЭР соединяется с этими цистернами и образует тонкую сеть трубочек диаметром 30–60 нм. (а, с любезного разрешения Lelio Orci; б, с любезного разрешения Daniel S. Friend; в, согласно R. V. Krstić, *Ultrastructure of the Mammalian Cell*. New York: Springer-Verlag, 1979.)

В определенных специализированных клетках много гладкого ЭР, выполняющего дополнительные функции. Например, им богаты клетки, синтезирующие из холестерина стероидные гормоны; увеличенный гладкий ЭР несет ферменты, производящие холестерин и модифицирующие его в гормоны (рис. 12.36, б).

В основном типе клеток печени, *гепатоцитах*, также содержится много гладкого ЭР. Это принципиальное место синтеза *липопротеиновых частиц*, которые переносят липиды по кровотоку в другие части тела. Ферменты, синтезирующие липидные компоненты частиц, располагаются в мембране гладкого ЭР, который

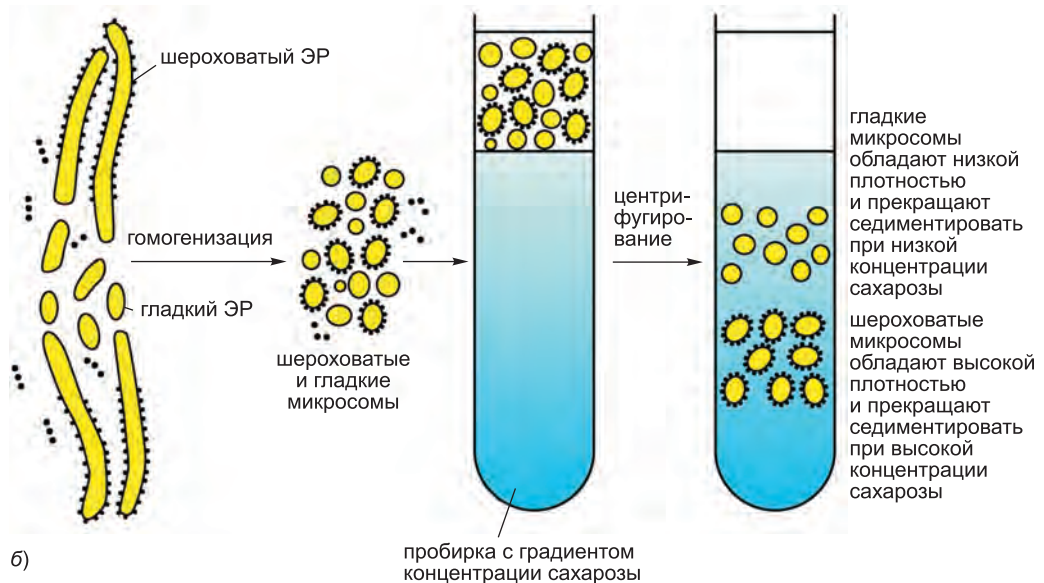
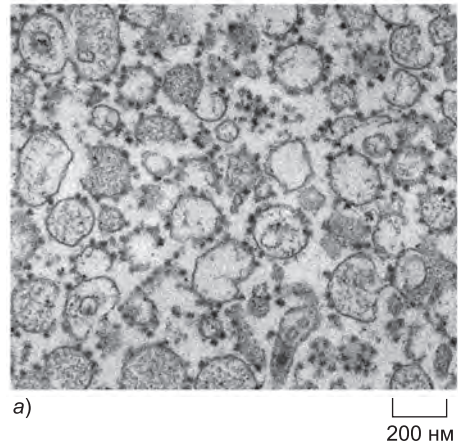
также содержит ферменты, катализирующие последовательность реакций обезвреживания жирорастворимых лекарств и различных вредных побочных продуктов метаболизма. Лучше всего из этих *реакций детоксикации* изучены реакции, протекающие при участии семейства ферментов *цитохромов P450*. Они катализируют последовательные реакции, при которых нерастворимые в воде лекарства или метаболиты, которые в противном случае могли бы накопиться в мембране в ядовитых концентрациях, становятся водорастворимыми и могут быть выведены с мочой. Поскольку шероховатый ЭР сам по себе не способен нести достаточное число этих и других необходимых ферментов, значительная часть мембраны гепатоцитов в норме состоит из гладкого ЭР (рис. 12.36, в; см. таблицу 12.2).

Другой жизненно важной функцией ЭР в большинстве эукариотических клеток является депонирование Ca^{2+} из цитозоля. Высвобождение Ca^{2+} в цитозоль из ЭР и его последующий обратный захват происходят при многих быстрых ответах на внеклеточные сигналы, это обсуждается в главе 15. Ca^{2+} -насос транспортирует Ca^{2+} из цитозоля в люмен ЭР. Высокие концентрации Ca^{2+} -связывающих белков в ЭР способствуют запасанию Ca^{2+} . В некоторых типах клеток (возможно, даже в большинстве) определенные области ЭР специализируются на депонировании Ca^{2+} . В мышечных клетках содержится большой модифицированный гладкий ЭР, носящий название *саркоплазматического ретикулума*. Высвобождение и обратный захват Ca^{2+} саркоплазматическим ретикулумом запускают соответственно сокращение и расслабление миофибрилл в процессе сокращения мышцы (обсуждаемого в главе 16).

Для изучения функций и биохимии ЭР необходимо его выделить. Это кажется безнадежным делом, поскольку ЭР расположен пластами между другими компонентами цитоплазмы и переплетается с ними. К счастью, когда ткани или клетки разрушаются гомогенизацией, ЭР распадается на фрагменты, которые заново замыкаются и образуют маленькие (~ 100–200 нм в диаметре) везикулы, называемые **микросомами**. Микросомы относительно легко очищать. Для биохимика микросомы представляют собой маленькие достоверные копии ЭР, способные транслоцировать и гликозилировать белки, захватывать и высвобождать Ca^{2+} и синтезировать липиды. Микросомы, образующиеся из шероховатого ЭР, покрыты рибосомами и носят название *шероховатых микросом*. Рибосомы всегда расположены на внешней поверхности, поэтому внутреннее пространство микросом эквивалентно люмену ЭР (рис. 12.37, а).

В гомогенатах клеток также находят множество везикул, сходных по размерам с шероховатыми микросомами, но лишенных рибосомы. Такие *гладкие микросомы* частично образуются из гладких участков ЭР и частично — из фрагментов плазматической мембраны, аппарата Гольджи, эндосом и митохондрий (соотношение зависит от типа ткани). Таким образом, если шероховатые микросомы точно происходят из шероховатых частей ЭР, происхождение «гладких микросом», приготовленных из разрушенных клеток, определить не так просто. Исключением служат гладкие микросомы, полученные из клеток печени или мышц. Благодаря необычно большому содержанию соответственно гладкого ЭР и саркоплазматического ретикулума, большая часть гладких микросом в гомогенатах этих тканей образуется из гладкого ЭР. Рибосомы, прикрепленные к шероховатому ЭР, делают его более плотным, чем гладкие микросомы. В результате мы можем использовать равновесное центрифугирование для разделения шероховатых и гладких микросом (рис. 12.37, б). Микросомы сыграли неоценимую роль в объяснении молекулярных

Рис. 12.37. Выделение из ЭР очищенных шероховатых и гладких микросом. (а) Электронная микрофотография тонкого среза очищенной фракции шероховатого ЭР показывает обилие покрытых рибосомами пузырьков. (б) При равновесном центрифугировании в градиенте сахарозы два типа микросом разделяют по их разной плотности. (а, с любезного разрешения George Palade.)



аспектов функционирования ЭР, как мы покажем ниже.

12.5.2. Сигнальные последовательности впервые обнаружены у белков, импортируемых в шероховатый ЭР

ЭР захватывает определенные белки из цитозоля по мере их синтеза. Это белки двух типов: трансмембранные белки, которые только частично транслируются через мембрану ЭР и остаются встроенными в нее, и водорастворимые белки, которые полностью переносятся через мембрану ЭР и высвобождаются в люмен. Некоторые из трансмембранных белков функционируют в ЭР, но большинство будет транспортировано в плазматическую мембрану или мембраны других органелл. Водорастворимые белки предназначены для секреции или люмена ЭР и других органелл. Все эти белки, независимо от их последующей судьбы, направляет

в мембрану ЭР **сигнальная последовательность ЭР**, которая инициирует их транслокацию по обычному механизму.

Сигнальные последовательности (и связанный с ними принцип сортировки белков) открыты в начале 70-х гг. XX века в секретируемых белках, которые переносятся через мембрану ЭР на первом этапе их вывода из клетки. В ключевом эксперименте мРНК, кодирующая секретируемый белок, транслировалась рибосомами *in vitro*. Когда в такой бесклеточной системе отсутствовали микросомы, синтезированный белок был немного больше, чем нормальный секретируемый белок. Дополнительной частью служил N-концевой *лидерный пептид*. Однако в присутствии полученных из шероховатого ЭР микросом получался белок правильного размера. Согласно *сигнальной гипотезе*, лидерный пептид — это сигнальная последовательность, направляющая секретируемый белок в мембрану ЭР и отрезаемая *сигнальной пептидазой* в мембране ЭР перед завершением синтеза полипептидной цепи (**рис. 12.38**). Бесклеточные системы, в которых белки импортировались в микросомы, позволили разработать эффективные методы идентификации, очистки и исследования различных компонентов молекулярного аппарата, ответственного за процесс импорта в ЭР.

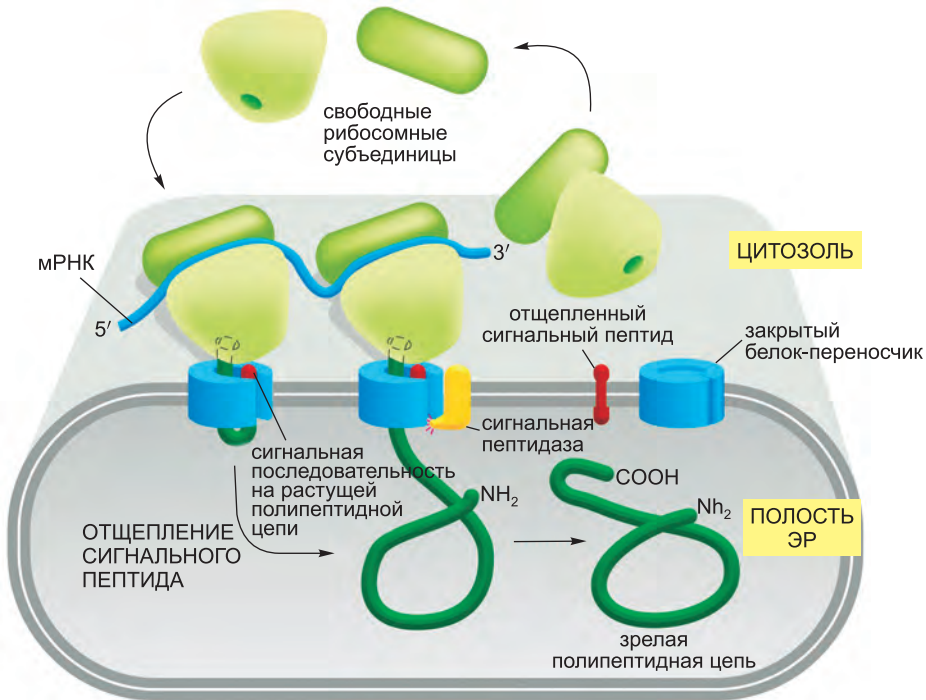


Рис. 12.38. Сигнальная гипотеза. Исходно предложенный упрощенный взгляд на механизм транслокации белков через мембрану ЭР. Когда сигнальная последовательность ЭР выходит из рибосомы, она направляет рибосому к транслокатору на мембране ЭР, образуя пору, через которую переносится пептид. Сигнальная пептидаза тесно связана с транслокатором и отщепляет сигнальную последовательность в процессе транслокации, а зрелый белок высвобождается в люмен ЭР сразу после синтеза. Транслокатор закрыт до тех пор, пока с ним не свяжется рибосома, поэтому барьер непроницаемости мембраны ЭР поддерживается постоянно.

12.5.3. Сигнал-узнающая частица (SRP) направляет сигнальные последовательности к определенному рецептору в мембране шероховатого ЭР

Сигнальная последовательность ЭР направляется в мембрану ЭР по крайней мере двумя компонентами: **сигнал-узнающей частицей** (Signal Recognition Particle, **SRP**), которая циркулирует между мембраной ЭР и цитозолем и связывает сигнальную последовательность, и **рецептором SPR** в мембране ЭР. SRP представляет собой сложную частицу, состоящую из шести различных полипептидных цепей, связанных с единственной маленькой молекулой РНК (**рис. 12.39**). SRP и их рецептор присутствуют во всех клетках. Это указывает на то, что этот направленный на белки механизм эволюционировал очень рано и является консервативным.

Сигнальные последовательности ЭР значительно различаются по аминокислотному составу, но все они несут в центре восемь и более неполярных аминокислот (см. таблицу 12.3, **стр. 1237**). Благодаря чему SRP способны специфически связывать так много различных последовательностей? Ответ на этот вопрос дала кристаллическая структура белка SRP. Она показала, что сайт связывания сигнальной последовательности представляет собой крупный гидрофобный карман, выстланный метионинами. Поскольку боковые цепи метионинов не ветвятся и обладают гибкостью, карман достаточно пластичен для захвата гидрофобных сигнальных последовательностей различного аминокислотного состава, размера и формы.

SRP представляет собой стержневую структуру, оборачивающуюся вокруг большой рибосомной субчастицы. Один ее конец связывается с сигнальной последовательностью по мере ее выхода из рибосомы в составе синтезируемой полипептидной цепи; второй конец блокирует сайт связывания фактора элонгации в месте соединения большой и малой рибосомных субъединиц (**рис. 12.39**). Благодаря этой блокировке синтез белка останавливается сразу после того, как сигнальная последовательность выходит из рибосомы. Эта пауза, по-видимому, дает рибосоме достаточно времени для связывания с мембраной ЭР до завершения полипептидной цепи и, следовательно, не позволяет белку оказаться в цитозоле. Такое защитное приспособление особенно важно для секретируемых и лизосомальных гидролаз, которые могут нанести значительный ущерб цитозолу; однако клетки, секретирующие большое количество гидролаз, принимают дополнительные меры безопасности — в их цитозоле содержится высокая концентрация ингибиторов этих ферментов. Также, благодаря паузе, пока рибосома не достигнет транслокатора в мембране ЭР, не синтезируются способные свернуться в компактную структуру большие участки белков. Таким образом, в отличие от посттрансляционного импорта белков в митохондрии и хлоропласты, для противодействия сворачиванию белков не нужны шапероны.

После образования комплекс SRP-рибосома связывается с рецептором SRP, который представляет собой интегральный мембранный белковый комплекс, встроенный в мембрану шероховатого ЭР. За счет этого взаимодействия происходит сближение комплекса SRP-рибосома и транслокатора белков. Затем SRP и рецептор SRP высвобождаются, и транслокатор переносит растущую полипептидную цепь через мембрану (**рис. 12.40**).

Процесс котрансляционного переноса создает две пространственно разделенные популяции рибосом в цитозоле. **Мембраносвязанные рибосомы**, прикрепленные к ци-

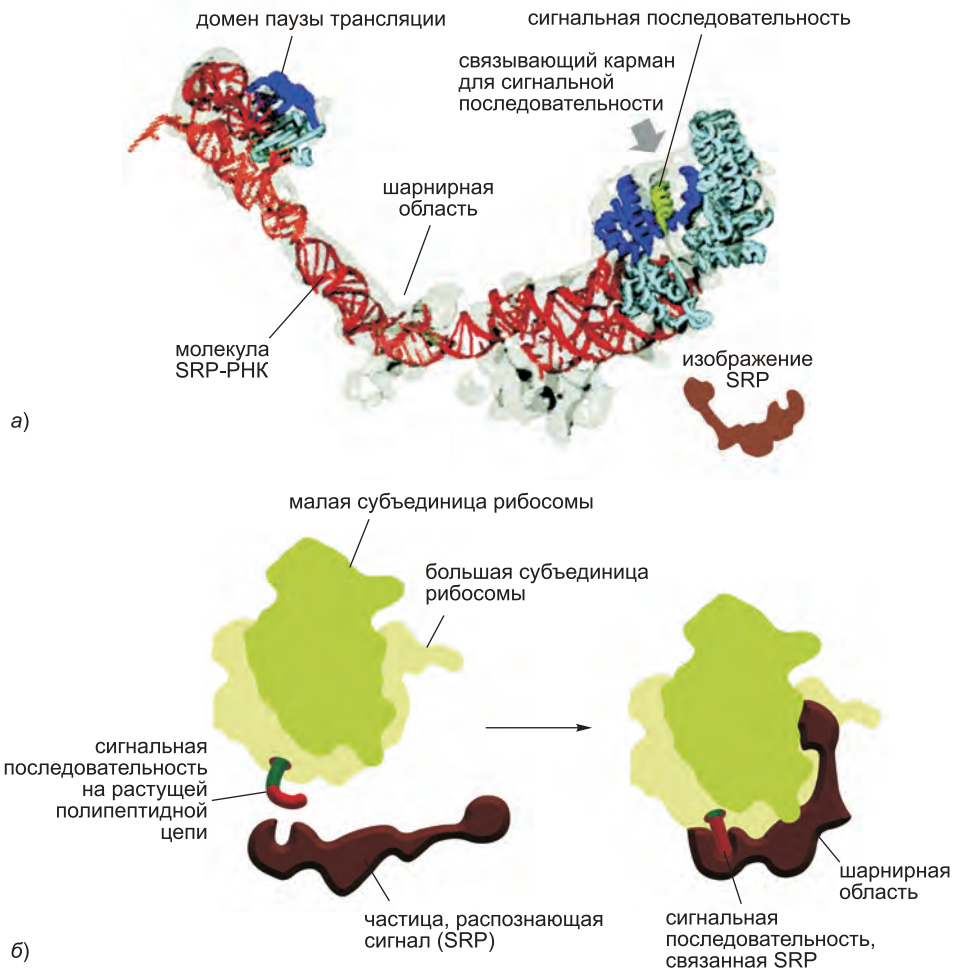


Рис. 12.39. Сигнал-узнающая частица (SRP). (а) SRP млекопитающих представляет собой продолговатый комплекс, состоящий из шести белковых субъединиц и одной молекулы РНК (показана *красным*). РНК SRP образует стержень, соединяющий домен SRP, несущий карман связывания сигнальной последовательности, с доменом, ответственным за остановку трансляции. Трехмерная поверхность SRP (показана *серым*) определена при помощи криоэлектронной микроскопии. Известные кристаллические структуры отдельных частей SRP встроены в оболочку и показаны в виде ленточных диаграмм. Связанная сигнальная последовательность показана в виде *зеленой* спирали. (б) Связанный с рибосомой SRP, визуализированный посредством криоэлектронной микроскопии. SRP связывается с большой рибосомной субчастицей так, что ее карман связывания сигнальной последовательности расположен вблизи сайта выхода синтезируемой цепи, а домен остановки трансляции — в месте соединения рибосомных субчастиц, где он мешает связыванию фактора элонгации. (Адаптировано из M. Halic et al., *Nature* 427: 808–814, 2004. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

топлазматической поверхности ЭР, участвуют в синтезе белков, которые будут впоследствии транслированы в ЭР. **Свободные рибосомы**, не прикрепленные к какой-либо мембране, синтезируют все остальные белки, кодируемые ядерным геномом.

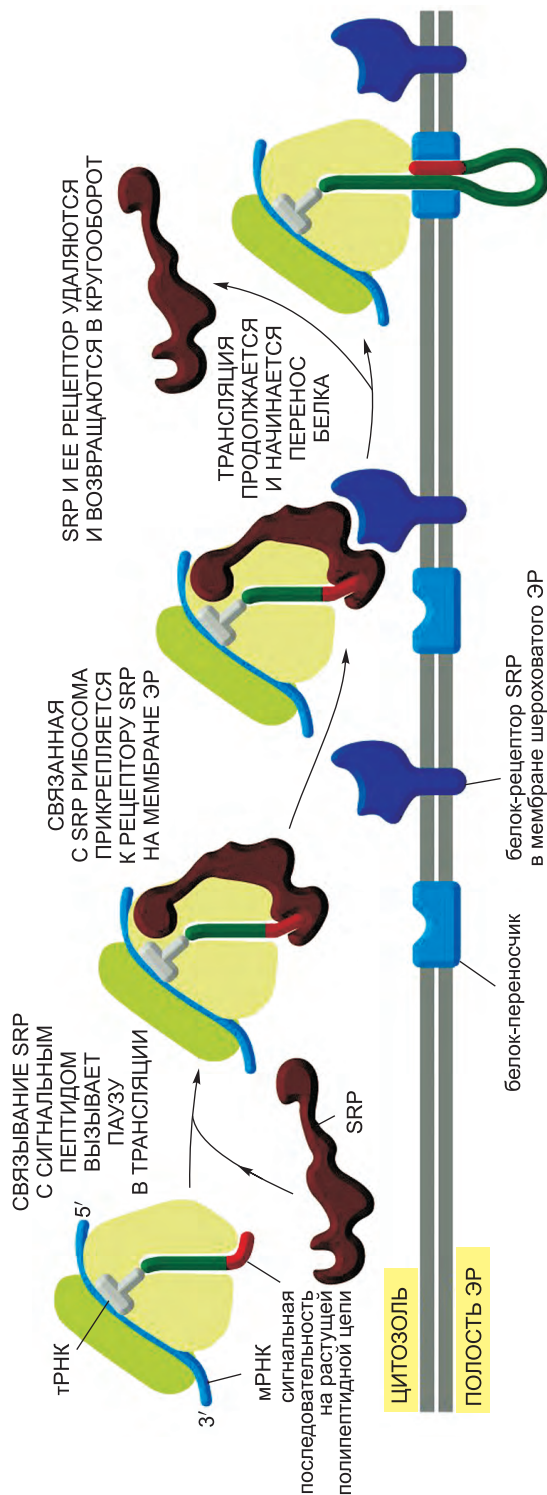


Рис. 12.40. Как сигнальные последовательности ЭР направляют рибосомы в мембрану ЭР. По-видимому, SRP и ее рецептор работают согласованно. SRP одновременно связывается с доступной сигнальной последовательностью ЭР и рибосомой, вызывая паузу трансляции. Рецептор SRP в мембране ЭР, состоящий из двух разных полипептидных цепей, связывает SRP-рибосомный комплекс и направляет его в транслокатор. В мало изученной реакции SRP и ее рецептор высвобождаются, оставляя рибосому прикрепленной к транслокатору в мембране ЭР. Затем транслокатор встраивает полипептидную цепь в мембрану и переносит ее через липидный бислой. Поскольку один из белков SRP и обе цепи рецептора SRP содержат GTP-связывающие домены, считается, что конформационные перестройки, происходящие во время цикла связывания и гидролиза GTP (см. главу 15), обеспечивают высвобождение SRP только после достаточно крепкого связывания рибосомы с транслокатором в мембране ЭР. Транслокатор закрыт до связывания с ним рибосомы, поэтому барьер проницаемости мембраны ЭР никогда не нарушается.

Мембраносвязанные и свободные рибосомы структурно и функционально идентичны. Они отличаются только синтезируемыми в данный момент времени белками.

Поскольку с единственной молекулой мРНК может связаться несколько рибосом, обычно образуется *полирибосома*, которая прикрепляется в мембране ЭР посредством сигнальных последовательностей нескольких растущих полипептидных цепей (рис. 12.41, а). Отдельные рибосомы, связанные с такой молекулой мРНК, могут после окончания трансляции возвращаться в цитозоль и смешиваться с пулом свободных рибосом. Однако сама мРНК остается связанной с мембраной ЭР через сменяющие друг друга рибосомы, каждая из которых лишь на короткий промежуток времени связывается с транслокатором (рис. 12.41, б).

12.5.4. Полипептидная цепь проходит через водную пору транслокатора

Долгое время обсуждали, как белок переносится в люмен ЭР: взаимодействует ли он напрямую с липидным бислоем или проходит через пору в белковом транслокаторе. В конце концов, идентифицировали транслокатор, образующий заполненную водой пору в мембране, через которую проходит полипептидная цепь. Ядро транслокатора, носящего название **комплекса Sec61**, состоит из трех высококонсервативных субъединиц, мало отличающихся у бактерий и эукариотических клеток. Недавно с помощью рентгеноструктурного анализа расшифровали структуру комплекса Sec61. Согласно полученным данным α -спирали самой большой субъединицы окружают центральную пору, через которую, по-видимому, полипептидная цепь пересекает мембрану (рис. 12.42). Воротами поры служит короткая спираль, которая, предположительно, закрывает транслокатор, когда с ним не связаны рибосомы, и отходит от поры, когда через нее проходит полипептидная цепь. Согласно этой точке зрения, пора является динамической воротной структурой, которая открывается лишь временно, когда полипептидная цепь пересекает мембрану. При свободном транслокаторе важно держать пору закрытой, чтобы мембрана оставалась непроницаемой для ионов, например, Ca^{2+} , который в противном случае утечет из ЭР.

Структура комплекса Sec61 указывает на то, что пора также может открываться сбоку по шву между субъединицами. Благодаря этому становится возможным латеральное прохождение транспортирующейся пептидной цепи в гидрофобную сердцевину мембраны. Этот процесс играет важную роль в высвобождении отцепленного сигнального пептида в мембрану (см. рис. 12.38) и интеграции мембранных белков в бислой, как мы обсудим позже.

В эукариотических клетках четыре комплекса Sec61 образуют крупный транслокаторный агрегат, который можно визуализировать на рибосомах после солиubilизации детергентом мембран ЭР (рис. 12.43). Вероятно, не все четыре комплекса Sec61 эукариотического транслокатора напрямую участвуют в транслокации белка. Некоторые из них могут быть неактивными, создавая сайты связывания рибосом и вспомогательных белков, помогающих полипептидной цепи сворачиваться при входе в ЭР. Согласно одной из гипотез, связанная рибосома тесно состыкована с транслокатором, и в результате ее внутреннее пространство продолжает люмен ЭР. Благодаря этому ни одна молекула не может покинуть ЭР. С другой стороны, структура комплекса Sec61 указывает на то, что пора транслокатора может образовывать плотно прилегающую к транслоцируемой цепи диафрагму, не позволяющую другим молекулам выйти из ЭР.

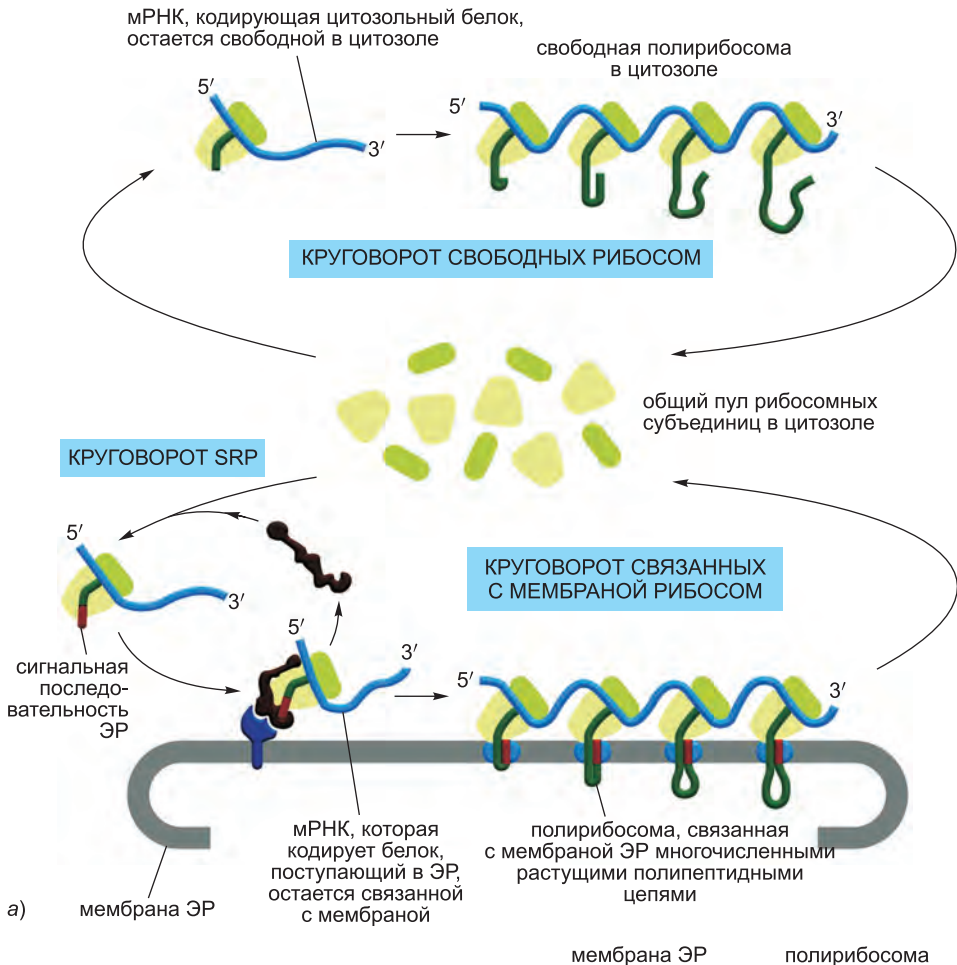
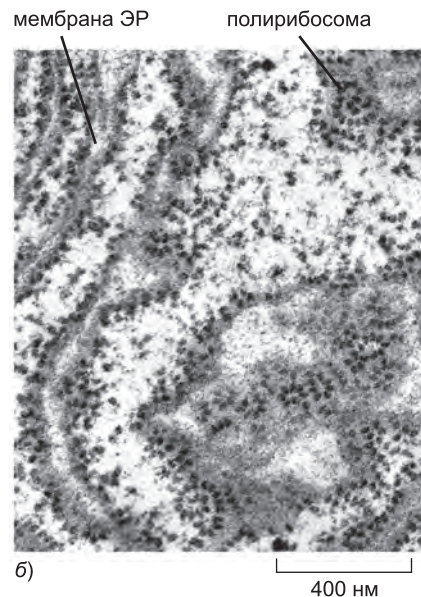


Рис. 12.41. Свободные и мембраносвязанные рибосомы.

(а) Общий пул рибосом синтезирует как белки, остающиеся в цитозоле, так и белки, транспортирующиеся в ЭР. Сигнальная последовательность ЭР на синтезируемой полипептидной цепи связывается с SRP, которая направляет транслирующую рибосому в мембрану ЭР. Молекула мРНК навсегда остается связанной с ЭР в составе полирибосомы, а рибосомы, движущиеся вдоль нее, рециркулируют; в конце каждого цикла белкового синтеза рибосомные субчастицы высвобождаются и возвращаются в общий пул в цитозоле. (б) Электронная микрофотография тонкого среза полирибосом, прикрепленных к мембране ЭР. Плоскость среза через ЭР в некоторых местах практически параллельна мембране, благодаря чему видна розеточная структура рибосом. (б, с любезного разрешения George Palade.)



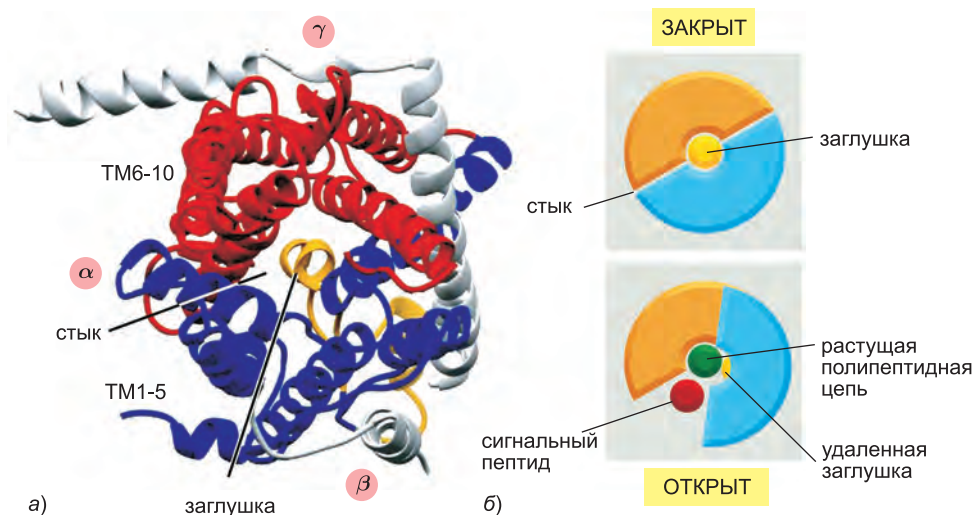


Рис. 12.42. Структура комплекса Sec61. (а) Вид сверху на комплекс Sec61 археи *Methanococcus jannaschii* с цитоплазматической стороны мембраны. α-субъединица комплекса Sec61 показана красным и синим; меньшие по размеру субъединицы β и γ показаны серым. Предполагают, что желтая короткая спираль образует «заглушку», закрывающую пору, когда транслокатор неактивен. При открывании комплекс перестраивается, и спираль отходит в сторону. Считается, что пора комплекса Sec61 также способна открываться в бок по шву между субъединицами. (б) Модель открытого и закрытого состояний транслокатора, показывающая, как сигнальная последовательность может высвобождаться в мембрану после открывания шва. (а, из B. van der Berg et al., *Nature* 427: 36–44, 2004. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

12.5.5. Транслокация через мембрану ЭР не всегда требует элонгации полипептидной цепи

Как мы видели, транслокация белков в митохондрии, хлоропласты и пероксисомы происходит посттрансляционно, после того как белок синтезировался и высвободился в цитозоль. Транслокация через мембрану ЭР, наоборот, происходит во время трансляции (котрансляционно). Это объясняет, почему рибосомы связаны с ЭР, но не с другими органеллами.

Некоторые полностью синтезированные белки, однако, импортируются в ЭР, указывая на то, что транслокация может протекать и после завершения трансляции. Посттрансляционная транслокация белков часто встречается в мембране ЭР дрожжей и бактериальной плазматической мембране (которая, предположительно, эволюционно родственна ЭР; см. рис. 12.4). Для проведения посттрансляционной транслокации транслокатору необходимы сопутствующие белки, которые проталкивают полипептидную цепь в пору и обеспечивают транслокацию энергией (рис. 12.44). У бактерий двигательный белок транслокации, АТРаза SecA, прикрепляется к цитоплазматической стороне транслокатора, где она претерпевает конформационные перестройки за счет энергии гидролиза АТФ. При гидролизе одной молекулы АТФ часть белка SecA входит в пору транслокатора, протаскивая вместе с собой короткий участок транспортируемого белка. В результате за счет такого храпового механизма белок SecA постепенно проталкивает полипептидную цепь транспортируемого белка через мембрану.

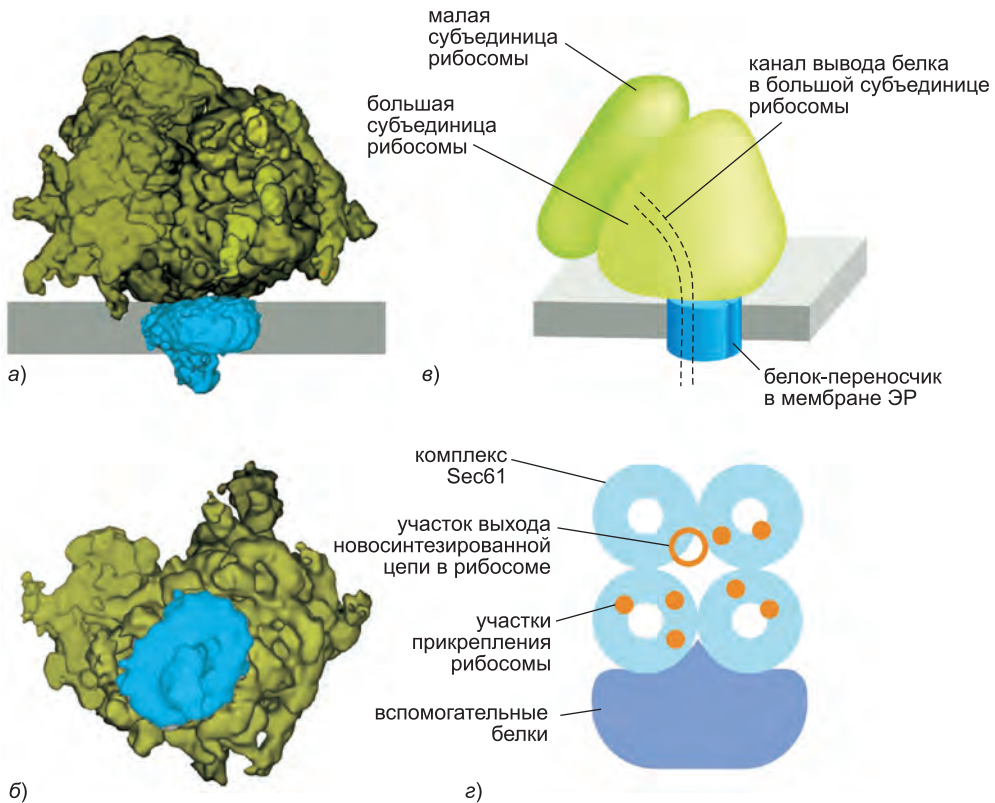


Рис. 12.43. Рибосома, связанная с эукариотическим транслокатором белков. (а) Реконструкция комплекса по микроскопическим изображениям, вид сбоку. (б) Транслокатор со стороны люмена ЭР. Предполагается, что транслокатор состоит из четырех копий комплекса Sec61. (в) Схематическое изображение связанной с мембраной рибосомы, прикрепленной к транслокатору, с каналом в большой рибосомной субъединице, через который растущая полипептидная цепь выходит из рибосомы (см. рис. 6.70). (г) Схематическая модель возможной сборки четырех комплексов Sec61 и различных сопровождающих белков в транслокатор. Красными точками показаны сайты прикрепления рибосом, видимые на реконструкции изображений электронного микроскопа, а красными кругами — положения выходных отверстий рибосомных каналов. Неизвестно, какие из комплексов Sec61 активно участвуют в процессе транслокации белков. Домены вспомогательных белков пересекают мембрану и образуют видимый на (а) выступ в люмене ЭР. (а, б и в, адаптировано из J. F. Ménétret et al., *J. Mol. Biol.* 348: 445–457, 2005. С любезного разрешения издательства Academic Press.)

Эукариотические клетки используют другой набор сопутствующих белков, связывающихся с комплексом Sec61. Эти белки встроены в мембрану ЭР и используют небольшой домен на люминальной стороне мембраны ЭР для прикрепления Hsp70-подобного шаперона (носящего название *BiP*, от «*binding protein*» — белок связывания) к полипептидной цепи по мере ее выхода из поры в люмен ЭР. Циклы связывания и высвобождения BiP служат движущей силой ненаправленной транслокации так же, как это происходит в случае митохондриальных белков Hsp70, протаскивающих белки через мембрану митохондрий.

Белки, транспортируемые в ЭР по посттрансляционному механизму, сначала высвобождаются в цитозоль, где они связываются с шаперонами для предотвращения фолдинга, как описано ранее для белков митохондрий и хлоропластов.

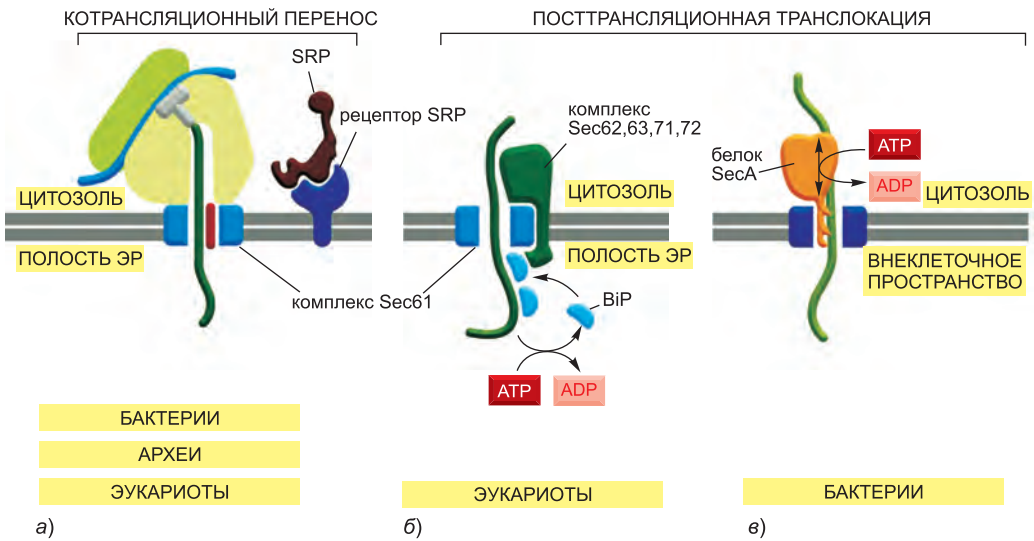


Рис. 12.44. Три способа протекания транслокации через структурно подобные транслокаторы. (а) Котрансляционная транслокация. Рибосома доставляется к мембране SRP и ее рецептором и взаимодействует с белковым транслокатором Sec61. Растущая полипептидная цепь протаскивается через мембрану по мере синтеза. Дополнительной энергии не требуется, поскольку единственный доступный для растущей цепи путь — через мембрану. (б) Посттрансляционная транслокация в эукариотических клетках. К транслокатору Sec61 прикреплен дополнительный комплекс, состоящий из белков Sec62, Sec63, Sec71 и Sec72 и перекидывающий молекулы BiP на транслоцирующую цепь по мере ее входа в люмен ЭР. АТФ-зависимые циклы связывания и высвобождения BiP проталкивают белок в люмен. Это напоминает механизм митохондриального импорта, показанный на рис. 12.26. (в) Посттрансляционная транслокация у бактерий. Законченная полипептидная цепь с цитоплазматической стороны проталкивается в транслокатор в плазматической мембране АТФазой SecA. Зависимые от гидролиза АТФ конформационные перестройки запускают поршневое движение в SecA, в результате чего в каждом цикле через пору транслокатора проходит около 20 аминокислот. Сек-зависимый путь транслокации белков через мембрану хлоропластов идет по подобному механизму (см. рис. 12.29, б).

Транслокатор Sec61, SRP и рецептор SRP встречаются у всех организмов, SecA — только бактерий, а белки Sec62, Sec63, Sec71 и Sec72 — только у эукариотических клеток. (Адаптировано из P. Walter and A. E. Johnson, *Annu. Rev. Cell Biol.* 10: 87–119, 1994. С любезного разрешения Annual Reviews.)

12.5.6. В однопроходных трансмембранных белках единственная внутренняя сигнальная последовательность ЭР остается в липидном бислое в виде пронизывающей мембрану α -спирали

Сигнальная последовательность на растущей полипептидной цепи, по-видимому, инициирует открывание поры транслокатора белков: после того как сигнальная последовательность высвобождается из SRP и растущая цепь достигает определенной длины, сигнальная последовательность связывается со специфическим сайтом на поре, открывая ее. Таким образом, сигнальная последовательность ЭР распознается дважды: первый раз SRP в цитозоле, второй — сайтом связывания в поре транслокатора, где она служит **сигналом начала (старта) переноса** (или пептидом начала переноса), открывающим пору (показано для растворимого белка

ЭР на **рис. 12.45**). Двойное узнавание может обеспечивать вход в люмен ЭР только правильных белков.

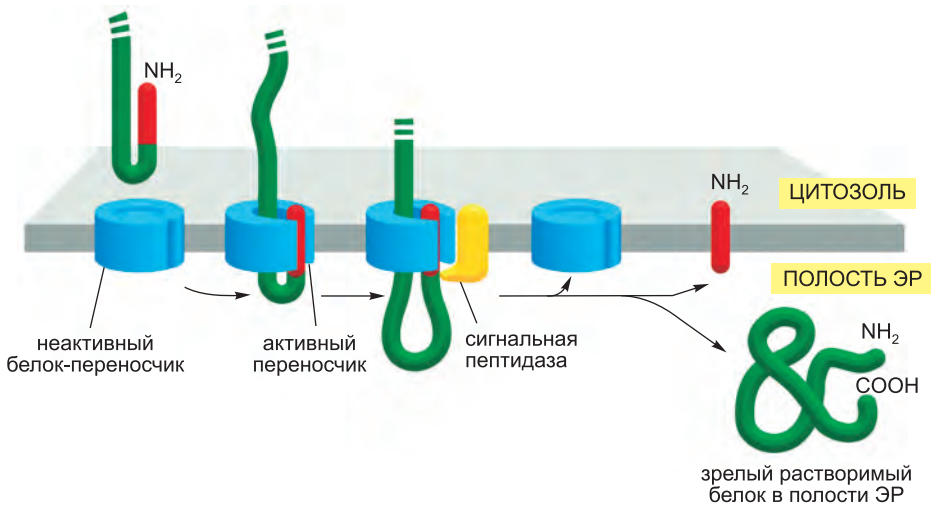


Рис. 12.45. Модель, объясняющая, как растворимый белок транслируется через мембрану ЭР. При связывании сигнальной последовательности ЭР (которая служит сигналом начала переноса) открывается пора транслатора, что позволяет полипептидной цепи пересечь липидный бислой в форме петли. После полной транслкации белка пора закрывается, но транслатор теперь открывается латерально в липидный бислой, и гидрофобная последовательность диффундирует в бислой, где она быстро распадается. (На данном и трех последующих рисунках рибосомы опущены для наглядности.)

Когда сигнальная последовательность связана с порой транслатора, она контактирует не только с комплексом Sec61, образующим стенки поры, но и с гидрофобной липидной сердцевиной мембраны. Это показано в экспериментах по сшивке белков, в которых сигнальные последовательности и углеводородные цепи липидов ковалентно связывали друг с другом. Когда растущая полипептидная цепь достигает достаточной длины, сигнальная пептидаза ЭР отрезает сигнальные последовательности и высвобождает их из поры в мембрану, где они быстро расщепляются до аминокислот другими протеазами мембраны ЭР. Чтобы высвободить сигнальную последовательность в мембрану, транслатор открывается латерально. Таким образом, транслатор работает в двух направлениях: он может открыться и образовать пору в мембране, позволяя гидрофильным частям белков пересечь липидный бислой, и он может открываться латерально в мембране и давать гидрофобным участкам белка выделяться в липидный бислой. Латеральное открывание поры является важным этапом процесса интеграции мембранных белков.

Для интеграции мембранных белков необходимо, чтобы некоторые части полипептидной цепи транслировались через липидный бислой, а другие — нет. Несмотря на такое дополнительное усложнение, все способы встраивания мембранных белков представляют собой модификации только что описанной последовательности событий переноса растворимого белка в люмен ЭР. Мы начнем с описания трех путей, по которым **однопроходные трансмембранные белки** (см. рис. 10.19) встраиваются в ЭР.

В самом простом случае N-концевая сигнальная последовательность инициирует транслокацию точно так же, как и для растворимых белков, но дополнительный гидрофобный участок полипептидной цепи останавливает процесс переноса до того, как вся полипептидная цепь транслоцировалась. **Стоп-сигнал переноса** (сигнал остановки переноса) закоривает белок в мембране после того, как сигнальная последовательность ЭР (старт-сигнал переноса) высвобождается из транслокатора и отщепляется (рис. 12.46). Механизм латерального открывания переносит последовательность остановки переноса в бислой, и она остается там в форме единственного пронизывающего мембрану α -спирального сегмента. При этом N-конец белка располагается на люминальной стороне мембраны, а С-конец — на цитоплазматической.

В двух других случаях сигнальная последовательность расположена внутри белка, а не на его N-конце. SRP связывается с внутренними сигнальными последовательностями точно так же, как и с N-концевыми. SRP доставляет рибосому, синтезирующую белок, к мембране ЭР и служит старт-сигналом переноса, запускающим транслокацию белка. После высвобождения из транслокатора внутренняя последовательность начала переноса остается в липидном бислое в виде единственной пронизывающей мембрану α -спирали.

Внутренние последовательности старта переноса могут связываться с аппаратом транслокации в одной из двух ориентаций; это, в свою очередь, определяет, какой

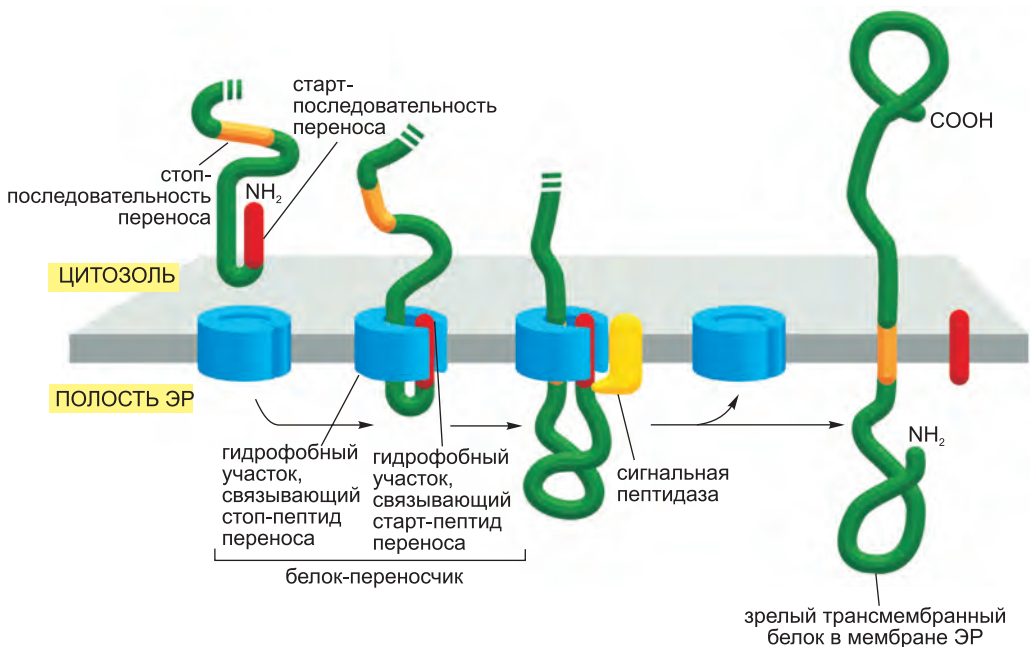


Рис. 12.46. Как однопроходные трансмембранные белки с отрезанной сигнальной последовательностью ЭР интегрируются в мембрану ЭР. В данном случае котрансляционный процесс транслокации запускается N-концевой сигнальной последовательностью (красная), которая служит сигналом начала переноса, как на рис. 12.45. Но, в дополнение в старт-сигналу переноса, белок также несет стоп-сигнал переноса (оранжевый). Когда последовательность остановки переноса входит в транслокатор и взаимодействует с сайтом связывания, транслокатор изменяет свою конформацию и латерально высвобождает белок в липидный бислой.

сегмент белка (расположенный до старт-сигнала переноса или после него) переносится через мембрану в люмен ЭР. В одном случае С-конец получившегося мембранного белка будет располагаться на люминальной стороне (путь А на [рис. 12.47](#)), в другом — на люминальной стороне будет находиться N-конец белка (путь Б на [рис. 12.47](#)). Ориентация старт-последовательности переноса зависит от распределения соседних заряженных аминокислот, как описано в подписи к рисунку.

12.5.7. Различные сочетания сигналов начала и остановки переноса определяют топологию многопроходных трансмембранных белков

В случае **многопроходных трансмембранных белков** полипептидная цепь несколько раз проходит туда и обратно через липидный бислой (см. [рис. 10.19](#)). Считается, что внутренняя сигнальная последовательность служит в этих белках старт-сигналом переноса, инициирующим транслокацию, которая продолжается до тех пор, пока транслокатор не встречает стоп-последовательность переноса. В двупроходных трансмембранных белках, например, полипептидная цепь может быть высвобождена в бислой ([рис. 12.48](#)). В более сложных многопроходных белках, в которых бислой пересекают многочисленные α -спирали, вторая старт-последовательность переноса повторно инициирует дальнейшую транслокацию полипептидной цепи, протекающую до тех пор, пока стоп-сигнал переноса не вызовет высвобождение белка, и цикл повторяется для всех следующих последовательностей начала и остановки переноса ([рис. 12.49](#)).

Будет ли данная гидрофобная сигнальная последовательность служить сигналом начала или остановки переноса, зависит от ее положения в полипептидной цепи. Это доказали при помощи методов рекомбинантных ДНК: функцию сигнальной последовательности можно изменить, изменив ее локализацию в белке. Таким образом, разница между старт- и стоп-сигналами переноса состоит в их относительном расположении в растущей полипептидной цепи. По-видимому, SRP начинает сканировать несвернутую полипептидную цепь на наличие гидрофобных участков на N-конце и движется в направлении С-конца, т.е. в направлении синтеза белка. Распознав, что первый подходящий гидрофобный участок вышел из рибосомы, SRP назначает «рамку считывания» интеграции в мембрану: после того как SRP инициирует транслокацию, транслокатор узнает следующий соответствующий гидрофобный участок полипептидной цепи как стоп-сигнал переноса, и сегмент цепи между стоп- и старт-последовательностями протягивается через мембрану. Процесс сканирования продолжается до тех пор, пока все гидрофобные участки белка не окажутся в мембране.

Поскольку мембранные белки всегда встраиваются с цитоплазматической стороны ЭР при помощи такого «запрограммированного» механизма, все копии одной полипептидной цепи будут ориентированы в липидном бислое одинаково. Это создает асимметрию мембраны ЭР, потому что белковые домены на одной стороне отличаются от белковых доменов на другой. Эта асимметрия поддерживается в многочисленных процессах отпочковывания и слияния, при которых синтезированные в ЭР белки транспортируются в другие клеточные мембраны (см. главу 13). Таким образом, способ, которым новосинтезированный белок встраивается в мембрану ЭР, определяет ориентацию этого белка во всех остальных мембранах.

Когда белки диссоциируют от мембраны и встраиваются в искусственные липидные везикулы, обычно получается случайная смесь правильно и вверх но-

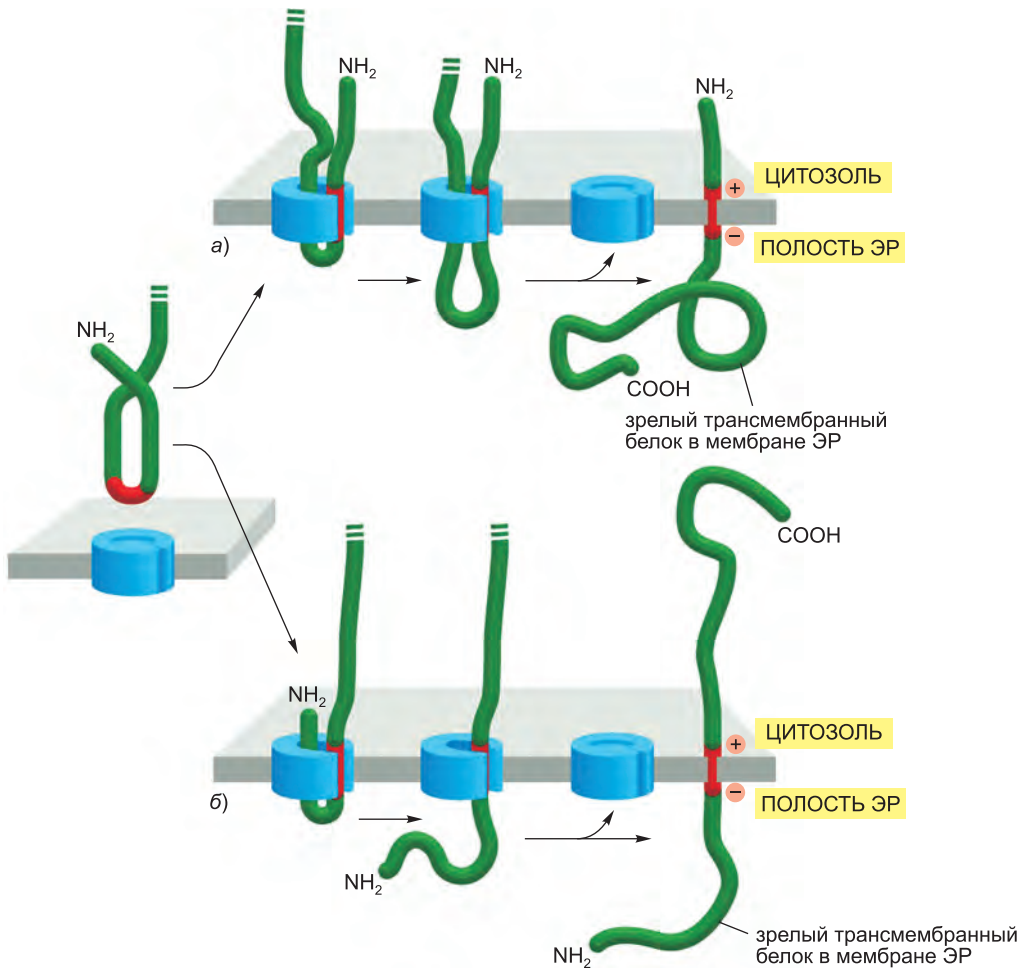


Рис. 12.47. Интеграция в мембрану ЭР однопроходных трансмембранных белков, несущих внутреннюю сигнальную последовательность. Внутренняя сигнальная последовательность ЭР, служащая стартом переноса, может связываться с транслокатором двумя способами. В одном случае в люмене ЭР будет располагаться С-конец (путь А), во втором — N-конец (путь Б). Белки направляются в один из путей согласно свойствам полипептидной цепи, фланкирующей внутреннюю последовательность начала переноса: если до гидрофобной сердцевины старт-сигнала переноса содержится больше положительно заряженных аминокислот, чем после нее, то мембранный белок входит в транслокатор в ориентации, показанной в пути А. Если же положительно заряженных аминокислот больше после гидрофобной сердцевины старт-сигнала переноса, чем до нее, то белок входит в транслокатор в ориентации, показанной в пути Б. Поскольку транслокация не может начаться до тех пор, пока последовательность начала переноса не выйдет из рибосомы, транслокация N-концевой части белка, показанного на (Б), может протекать только после того, как эта часть полностью синтезировалась. Обратите внимание, что существует два способа встраивания в мембрану однопроходных белков таким образом, чтобы их N-конец оказался в люмене ЭР: показанный на рис. 12.46 и здесь на (Б).

гами ориентированных белков. Таким образом, асимметрия белков, наблюдаемая в клеточных мембранах, не является внутренним свойством белков, а является результатом процесса их встраивания в мембрану ЭР из цитозоля.

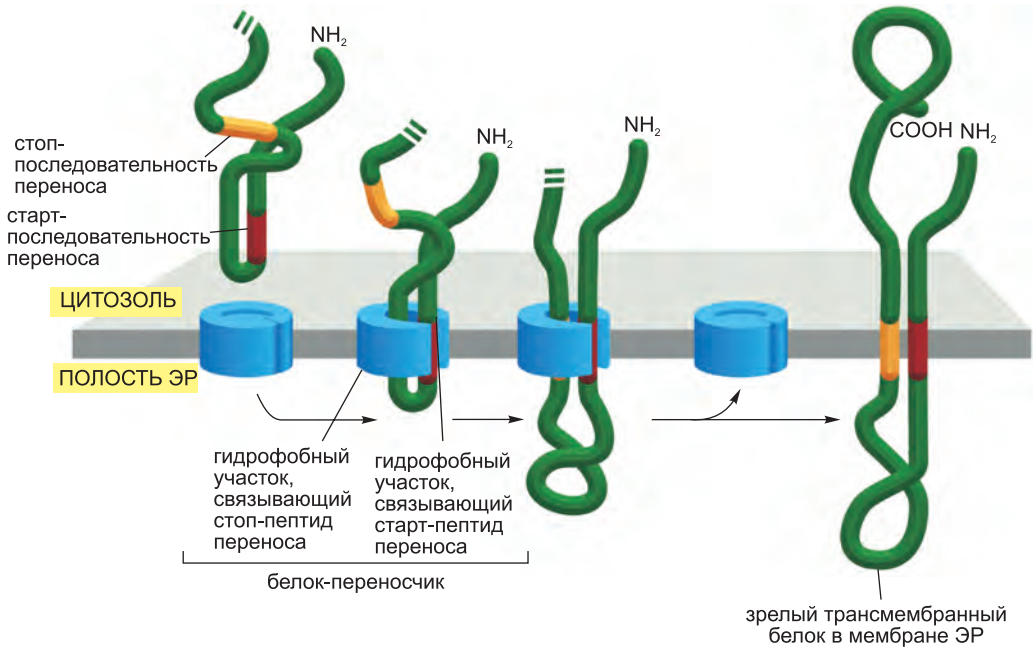


Рис. 12.48. Интеграция двупроходных трансмембранных белков с внутренней сигнальной последовательностью в мембрану ЭР. В случае данного белка внутренняя сигнальная последовательность ЭР служит старт-сигналом переноса (как на рис. 12.47) и инициирует перенос С-концевой части белка. В определенный момент в транслокатор входит стоп-последовательность переноса, и транслокатор латерально высвобождает белок в мембрану.

12.5.8. Транслоцированные полипептидные цепи сворачиваются и собираются в люмене шероховатого ЭР

Многие белки в люмене ЭР находятся там временно (транзитные белки), по пути в другие органеллы; однако часть белков в норме расположена там и содержатся в высоких концентрациях. Эти **резидентные белки ЭР** несут **сигнал удержания в ЭР**, состоящий из четырех аминокислот на С-конце и ответственный за сохранение белка в люмене ЭР (см. таблицу 12.3 и главу 13). Некоторые из этих белков служат катализаторами, способствующими правильному сворачиванию и сборке белков, транслоцируемых в ЭР.

Важный резидентный белок ЭР — *протеиндисульфидизомераза* (Protein Disulfide Isomerase, *PDI*), которая катализирует окисление свободных сульфгидрильных (SH) групп цистеинов с образованием дисульфидных (S-S) связей. В секреторном и эндоцитозном путях почти все цистеины доменов белков, расположенных во внеклеточном пространстве или люмене органелл, образуют дисульфидные мостики. С другой стороны, дисульфидные связи очень редко образуются в доменах, расположенных в цитозоле, который обладает восстановительными свойствами.

Другим резидентным белком ЭР является шаперон **BiP**. Мы уже обсудили, как BiP посттрансляционно проталкивает белки в ЭР через транслокатор. Как и другие шапероны, BiP узнает неправильно свернутые белки и белковые субъединицы, еще не встроившиеся в свой олигомерный комплекс. Он связывается с открытыми аминокислотными последовательностями, которые в норме должны быть

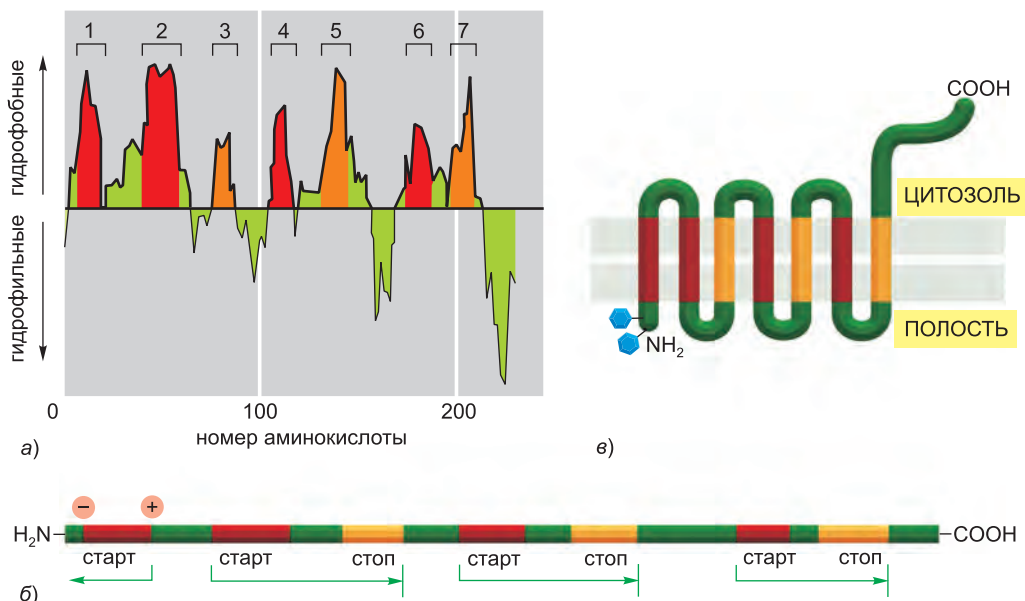


Рис. 12.49. Встраивание многопроходного мембранного белка родопсина в мембрану ЭР. Родопсин — это светочувствительный белок палочек сетчатки млекопитающих (см. главу 15). (а) Профиль гидрофобности указывает на наличие в родопсине семи коротких гидрофобных участков. (б) Гидрофобная область вблизи N-конца служит стартовой последовательностью переноса, инициирующей транслокацию через мембрану ЭР лежащего до нее N-концевого участка белка. Следующие далее гидрофобные последовательности служат чередующимися сигналами начала и остановки переноса. (в) После окончательной интеграции родопсина его N-конец располагается в люмене ЭР, а С-конец — в цитозоле. *Голубыми шестиугольниками* показаны ковалентно связанные с белком олигосахариды. Стрелками показаны входящие в транслокатор парные сигналы начала и остановки переноса.

спрятаны в глубине правильно свернутого белка или собранной полипептидной цепи. Примером сайта связывания ViP является участок чередующихся гидрофобных и гидрофильных аминокислот, который в норме должен быть упакован глубоко в β -листе. Связанный ViP препятствует агрегации белков и способствует их удержанию в ЭР (то есть не дает им попасть в аппарат Гольджи и последующие участки секреторного пути). Как и некоторые другие члены семейства белков Hsp70, которые связывают несвернутые белки и ускоряют их импорт в митохондрии и хлоропласты, ViP гидролизует АТФ для получения энергии, необходимой для посттрансляционной транслокации в ЭР. Он также способствует фолдингу этих и других белков.

12.5.9. Большинство синтезированных в шероховатом ЭР белков гликозилируется путем добавления одного N-связанного олигосахида

Ковалентное присоединение сахаров к белкам является одной из основных биосинтетических функций ЭР. Около половины всех эукариотических белков гликозилированы. Большая часть растворимых и мембраносвязанных белков, синтезируемых в ЭР, включая белки, предназначенные для транспорта в аппарат Гольджи, лизосомы, плазматическую мембрану и внеклеточное пространство, представляют собой **гликопротеины**. С другой стороны, в цитозоле содержится очень

мало гликозилированных белков, и они несут значительно более простую углеводную модификацию, при которой *N*-ацетилглюкозаминовая группа присоединяется к сериновому или треониновому остатку белка.

Важным шагом в понимании процесса **гликозилирования белков** было открытие того, что заранее синтезированный *олигосахарид-предшественник* (состоящий из *N*-ацетилглюкозамина, маннозы, глюкозы и — в общей сложности — из 14 сахаров) переносится на белки ЭР единым блоком. Поскольку этот олигосахарид переносится на боковую цепь NH_2 -группы аспарагина белка, он называется *N*-связанным, или *аспарагин-связанным* (рис. 12.50). Перенос катализируется мембраносвязанным ферментным комплексом, *олигосахаридтрансферазой*, чей активный сайт расположен на люминальной стороне мембраны ЭР; это объясняет, почему цитоплазматические белки не гликозилируются таким способом. Специальная липидная молекула **долихол** удерживает олигосахарид-предшественник в мембране ЭР. Она переносит олигосахаридную цепь на аспарагин в единственной ферментативной реакции сразу после того, как аминокислота достигает люмена ЭР в процессе транслокации белка (рис. 12.51). С каждым транслокатором связана одна копия олигосахаридтрансферазы, что позволяет последней эффективно сканировать и гликозилировать входящую полипептидную цепь.

Олигосахарид-предшественник связан с долихолом высокоэнергетической пирофосфатной связью, которая обеспечивает энергию активации реакции гликозилирования, проиллюстрированной на рис. 12.51. Весь олигосахарид-предшественник собирается сахар за сахаром на его мембраносвязанной липидной молекуле и затем переносится на белок. Сахара сначала активируются в цитозоле путем образования *нуклеотидсахаров*, которые затем последовательно передают свои сахара (напрямую или опосредованно) на липид. В середине этого процесса связанный с ли-

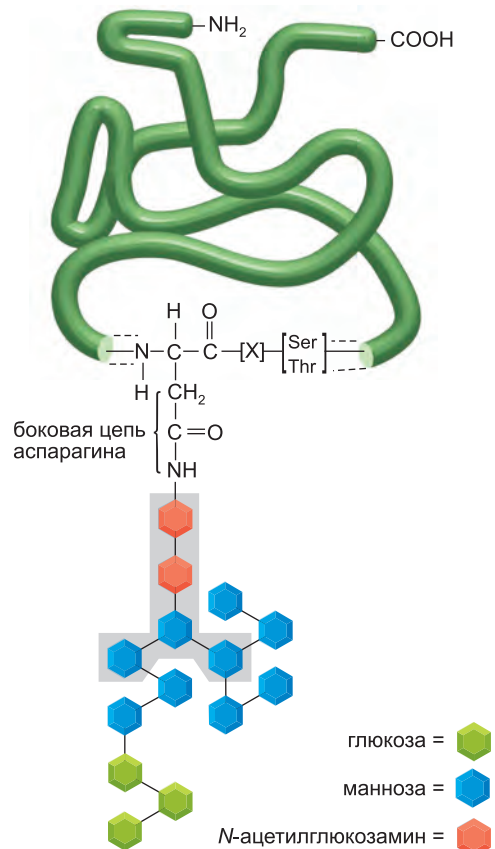


Рис. 12.50. Аспарагин-связанный (*N*-связанный) олигосахарид-предшественник добавляется к большинству белков в мембране шероховатого ЭР. Пять сахаров (выделены серым) образуют «сердцевину» этого олигосахарида. В случае многих гликопротеинов только эти остатки сохраняются после процесса удаления сахаров в аппарате Гольджи. Только аспарагины в последовательностях Asn-X-Ser и Asn-X-Thr (где X — любая аминокислота, кроме пролина) гликозилируются. Эти две последовательности встречаются в гликопротеинах значительно реже, чем в негликозилированных цитоплазматических белках. По-видимому, во время эволюции эти последовательности испытывали против себя давление отбора, поскольку гликозилирование слишком большого числа сайтов мешало бы фолдингу белков.

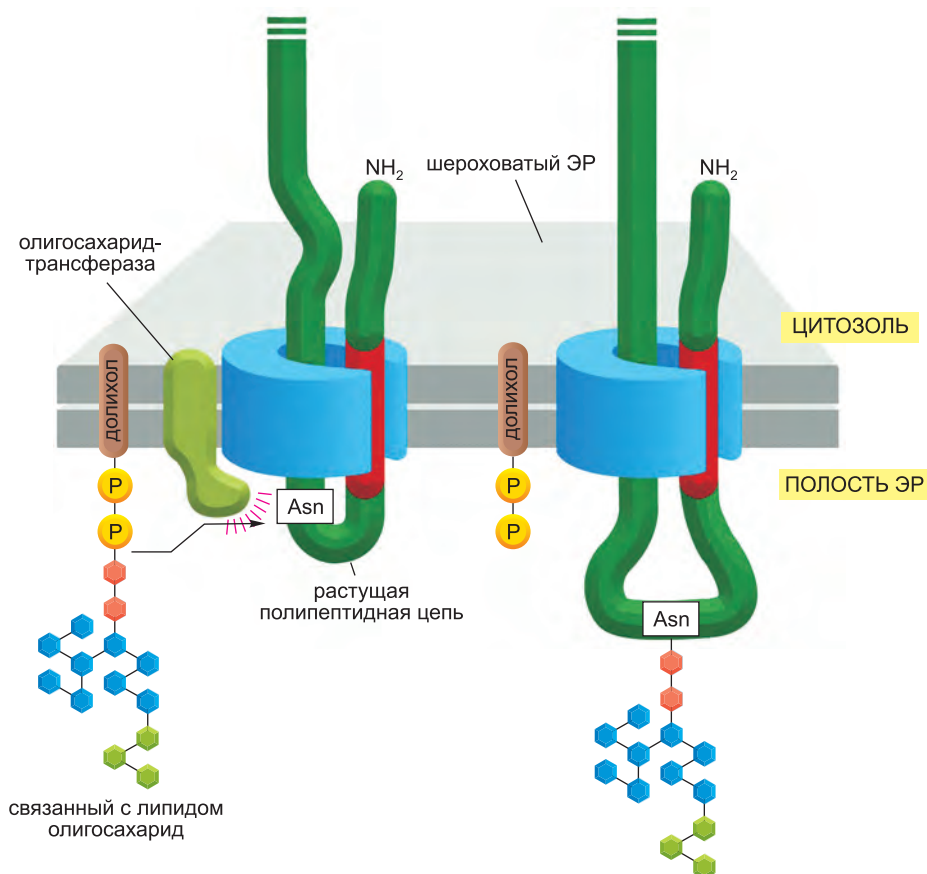


Рис. 12.51. Гликозилирование белков в шероховатом ЭР. Как только полипептидная цепь входит в люмен ЭР, она гликозилируется по соответствующим аспарагинам. Олигосахарид-предшественник, изображенный на рис. 12.50, переносится на аспарагин единым блоком в реакции, катализируемой ферментом олигосахаридтрансферазой. Как и в случае сигнальной пептидазы, с каждым транслокатором в мембране ЭР связана одна олигосахаридтрансфераза. (Рибосома не показана.)

пидом олигосахарид при помощи транспортера переходит с цитоплазматической на люминальную сторону мембраны ЭР (рис. 12.52).

Все разнообразие *N*-связанных олигосахаридных структур зрелых гликопротеинов является результатом последующей модификации исходного олигосахарида-предшественника. В ЭР три глюкозы (см. рис. 12.50) и одна манноза быстро снимаются с олигосахаридов большинства гликопротеинов. Мы скоро вернемся к вопросу важности удаления глюкозы. Такой «процессинг» олигосахаридов продолжается в аппарате Гольджи и рассмотрен в главе 13.

На данный момент *N*-связанные олигосахариды считаются наиболее распространенными олигосахаридами, их обнаружили в 90% всех гликопротеинов. Реже олигосахариды присоединяются к гидроксильной группе боковых цепей остатков серина, треонина или гидроксилизина. Такие *O*-связанные олигосахариды синтезируются в аппарате Гольджи.

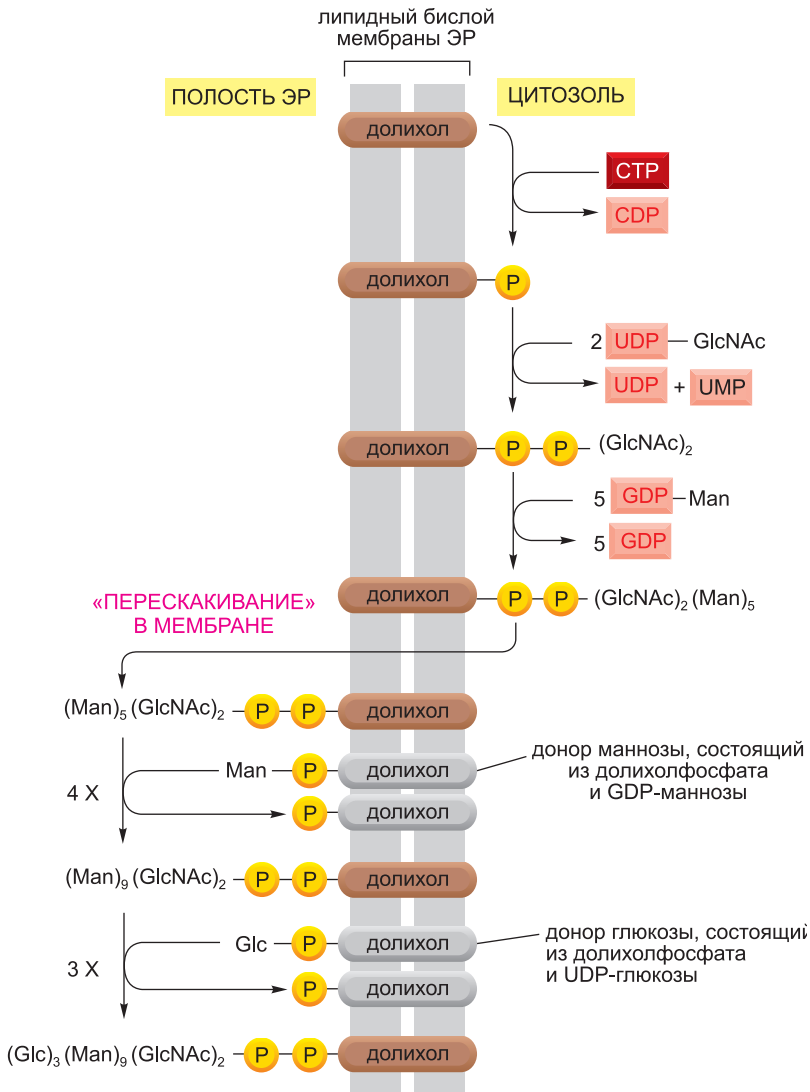


Рис. 12.52. Синтез связанного с липидом олигосахарида-предшественника в мембране шероховатого ЭР. Олигосахарид собирается сахар за сахаром на липиде, носящем название долихол (полиизопреноид; см. приложение 2.5, **стр. 114–115**). Долихол — это длинная и очень гидрофобная молекула, ее 22 пятиуглеродных строительных блока способны пронизывать бислой более трех раз, поэтому олигосахарид крепко удерживается в мембране. Первый сахар связан с долихолом пиррофосфатным мостиком. Эта высокоэнергетическая связь активирует олигосахарид при его переносе с липида на аспарагин растущей полипептидной цепи на люминальной стороне мембраны шероховатого ЭР. Как показано, синтез олигосахарида начинается на цитоплазматической стороне мембраны ЭР и продолжается на люминальной после того, как липидный интермедиат $(\text{Man})_5(\text{GlcNAc})_2$ переносится транспортером на другую сторону бислоя. Все последующие реакции переноса гликозильных остатков на люминальной стороне ЭР протекают с участием долихол-Р-глюкозы и долихол-Р-маннозы; эти активированные связанные с липидом моносахариды синтезируются из долихолфосфата и UDP-глюкозы или GDP-маннозы (соответственно) на цитоплазматической стороне ЭР и затем, по-видимому, переносятся на другую сторону бислоя. GlcNAc = N-ацетилглюкозамин; Man = манноза; Glc = глюкоза.

12.5.10. Олигосахариды служат маркерами протекания фолдинга белков

Долгое время обсуждали, почему гликозилирование является такой распространенной формой модификации белков, входящих в ЭР. Одним из наиболее странных наблюдений было то, что некоторым белкам *N*-гликозилирование необходимо для правильного сворачивания в ЭР, но точное расположение олигосахаридов на поверхности белка значения не имеет. Роль гликозилирования в фолдинге белков установили, когда исследовали два белка-шаперона ЭР, носящих названия **кальнексина** и **кальретикулина**, поскольку для их функционирования им нужен Ca^{2+} . Эти шапероны представляют собой углевод-связывающие белки, или *лектины*, и присоединяются к олигосахаридам на не до конца свернувшихся белках, удерживая их в ЭР. Как и другие шапероны, они не дают необратимо агрегировать не до конца свернутым белкам. Кальнексин и кальретикулин также способствуют ассоциации белков с другим шапероном ЭР, который связывается с цистеинами, не успевшими образовать дисульфидные связи.

Кальнексин и кальретикулин узнают *N*-связанные олигосахариды, содержащие одну терминальную глюкозу, и, следовательно, связывают только те белки, у которых две из трех глюкоз уже удалены глюкозидазами с олигосахарида-предшественника. Когда удаляется третья глюкоза, белок диссоциирует от шаперона и может покинуть ЭР.

Как тогда кальнексин и кальретикулин отличают правильно свернутые белки от несвернутых? Ответ состоит в еще одном ферменте ЭР — глюкозилтрансферазе, которая продолжает добавлять глюкозу к олигосахаридам, потерявшим свою последнюю глюкозу. Однако она добавляет моносахарид только к тем олигосахаридам, которые присоединены к несвернутым белкам. Таким образом, несвернутый белок непрерывно претерпевает последовательные удаление (глюкозидазой) и добавление (глюкозилтрансферазой) глюкозы. Благодаря этому, до тех пор пока не завершится фолдинг, поддерживается сродство белка к кальнексину и кальретикулину (**рис. 12.53**).

12.5.11. Неправильно свернутые белки экспортируются из ЭР и деградируют в цитозоле

Несмотря на всю помощь шаперонов, многим молекулам белков (в случае некоторых типов белков более 80 %), транслоцированным в ЭР, не удастся правильно свернуться или собраться в комплекс. Такие белки экспортируются из ЭР обратно в цитозоль, где они деградируют. Механизм обратной транслокации (также называемой ретротранслокацией и *дислокацией*) до сих пор неизвестен, но, скорее всего, он похож на другие посттрансляционные способы переноса белков. Например, как и при транслокации в митохондрии и хлоропласты, вероятно, необходимы шапероны, удерживающие полипептидную цепь в развернутом состоянии до транспорта и во время него. Точно так же для обеспечения направленности транспорта и проталкивания белка в цитозоль необходим источник энергии. Наконец, скорее всего, требуется транслокатор, некоторые компоненты которого, предположительно, также используются для прямого транспорта в ЭР (например, Sec61).

Отбор белков ЭР, которые должны быть направлены на деградацию, представляет собой непростой процесс. Неправильно свернутые белки или не собравшиеся в комплекс белковые субъединицы должны уничтожаться, но интермедиаты фолдинга новосинтезированных белков должны сохраняться. *N*-связанные

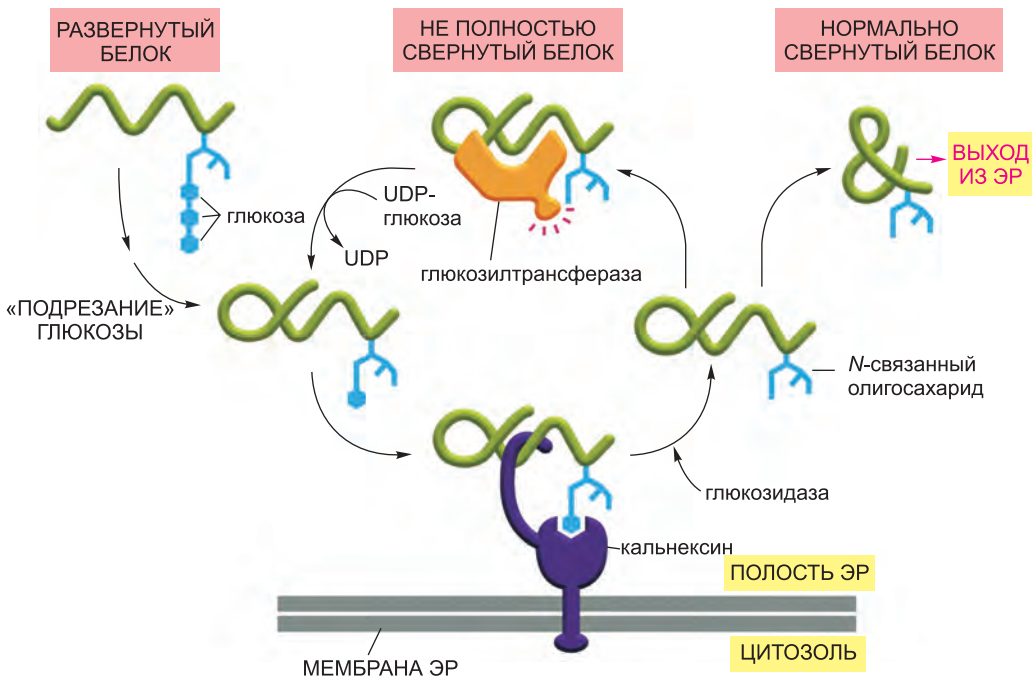


Рис. 12.53. Роль *N*-связанного гликозилирования в фолдинге белков ЭР. Связанный с мембраной ЭР шаперон кальнексин присоединяется к не до конца свернутым белкам, содержащим одну терминальную глюкозу на *N*-связанных олигосахаридах, удерживая их в ЭР. Удаление терминальной глюкозы глюкозидазой высвобождает белок от кальнексина. Глюкозилтрансфераза — ключевой фермент, определяющий правильно ли свернулся белок: если белок еще не до конца свернут, фермент переносит с UDP-глюкозы на *N*-связанный олигосахарид новую глюкозу, восстанавливая сродство белка к кальнексину и задерживая его в ЭР. Цикл повторяется до тех пор, пока белок полностью не свернется. Кальретикулин работает подобным образом, за исключением того что он является растворимым резидентным белком ЭР. Еще один шаперон ЭР, ERp57 (не показан), работает совместно с кальнексином и кальретикулином, удерживая не до конца свернутые белки в ЭР.

олигосахарида помогают различать эти случаи. Они служат показателями того, сколько времени белок провел в ЭР. Медленное удаление ферментом маннозидазой сердцевины олигосахаридного дерева в ЭР, по-видимому, приводит к образованию новой олигосахаридной структуры, узнаваемой аппаратом дислокации. Белки, сворачивающиеся и покидающие ЭР быстрее, чем действует маннозидаза, таким образом избегают деградации.

Как только неправильно свернутый белок транслоцировался обратно в цитозоль, *N*-гликаназа в одном ферментативном акте удаляет всю его олигосахаридную цепь. Убиквитин-лигазы быстро присоединяют к дегликозилированному полипептиду убиквитин, и белок скормливается протеасоме (см. главу 6), где он деградирует (рис. 12.54).

12.5.12. Неправильно свернутые белки в ЭР активируют реакцию несвернутых белков

Клетки пристально следят за количеством несвернутых белков в различных компартментах. Накопление несвернутых белков в цитозоле, например, запускает

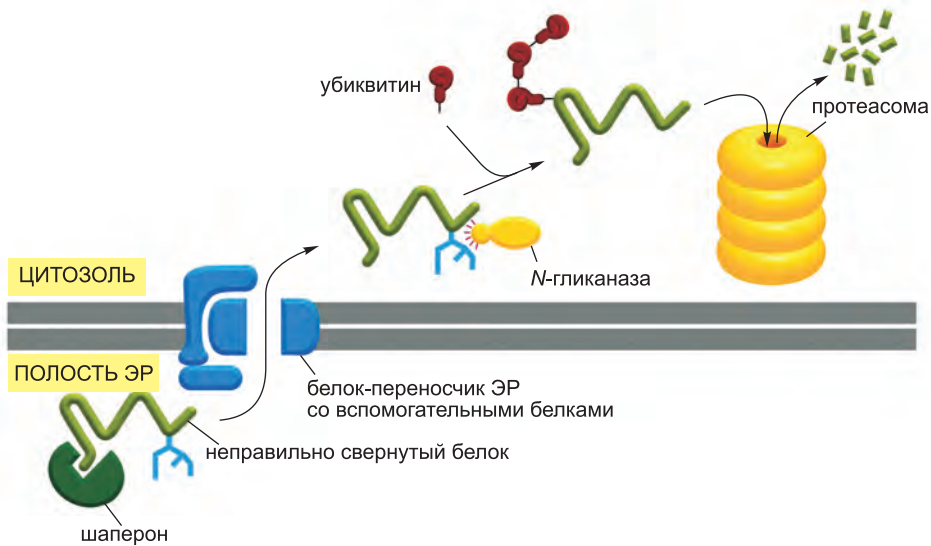


Рис. 12.54. Экспорт и деградация неправильно свернутых белков ЭР. Неправильно свернутые белки в люмене ЭР транслицируются обратно в цитозоль, где они дегликозилируются, убиквитинируются и деградируют в протеасомах. Неправильно свернутые мембранные белки ждет сходная судьба.

реакцию теплового шока (обсуждаемую в главе 6), которая стимулирует транскрипцию генов, кодирующих цитоплазматические шапероны, способствующие повторному фолдингу белков. Точно так же накопление неправильно свернутых белков в ЭР запускает **реакцию несвернутых белков**, которая включает в себя увеличение транскрипции генов, кодирующих шапероны ЭР, белки, участвующие в ретротранслокации и деградации белков в цитозоле, и многие другие белки, способствующие усилению способности ЭР к фолдингу.

Как неправильно свернутые белки в ЭР посылают сигнал в ядро? Существуют три параллельных пути, по которым протекает реакция несвернутых белков (рис. 12.55, а). Первый путь, который впервые обнаружили в клетках дрожжей, особенно интересен. Неправильно свернутые белки активируют в ЭР трансмембранную протеинкиназу, что приводит к олигомеризации и аутофосфорилированию этого фермента. (Некоторые рецепторы поверхности клетки плазматической мембраны активируются сходным образом, как описано в главе 15.) Олигомеризация и аутофосфорилирование активируют эндорибонуклеазный домен на цитоплазматической стороне этой же молекулы, который расщепляет специфическую цитоплазматическую РНК в двух положениях, вырезая интрон. Разделенные экзоны затем соединяются вместе РНК-лигазой, создающей мРНК, которая затем транслируется с образованием активного регуляторного белка. Этот белок активирует транскрипцию генов, опосредующих реакцию несвернутых белков (рис. 12.55, б).

Несвернутые белки также активируют в ЭР вторую трансмембранную киназу, которая путем фосфорилирования ингибирует фактор инициации трансляции, снижая уровень синтеза новых белков во всех клетках. Одним из последствий снижения трансляции белков является уменьшение потока белков в ЭР, что, в свою очередь, уменьшает количество белков, которые необходимо там свернуть. Однако некоторые белки лучше транслируются, когда факторов инициации трансляции

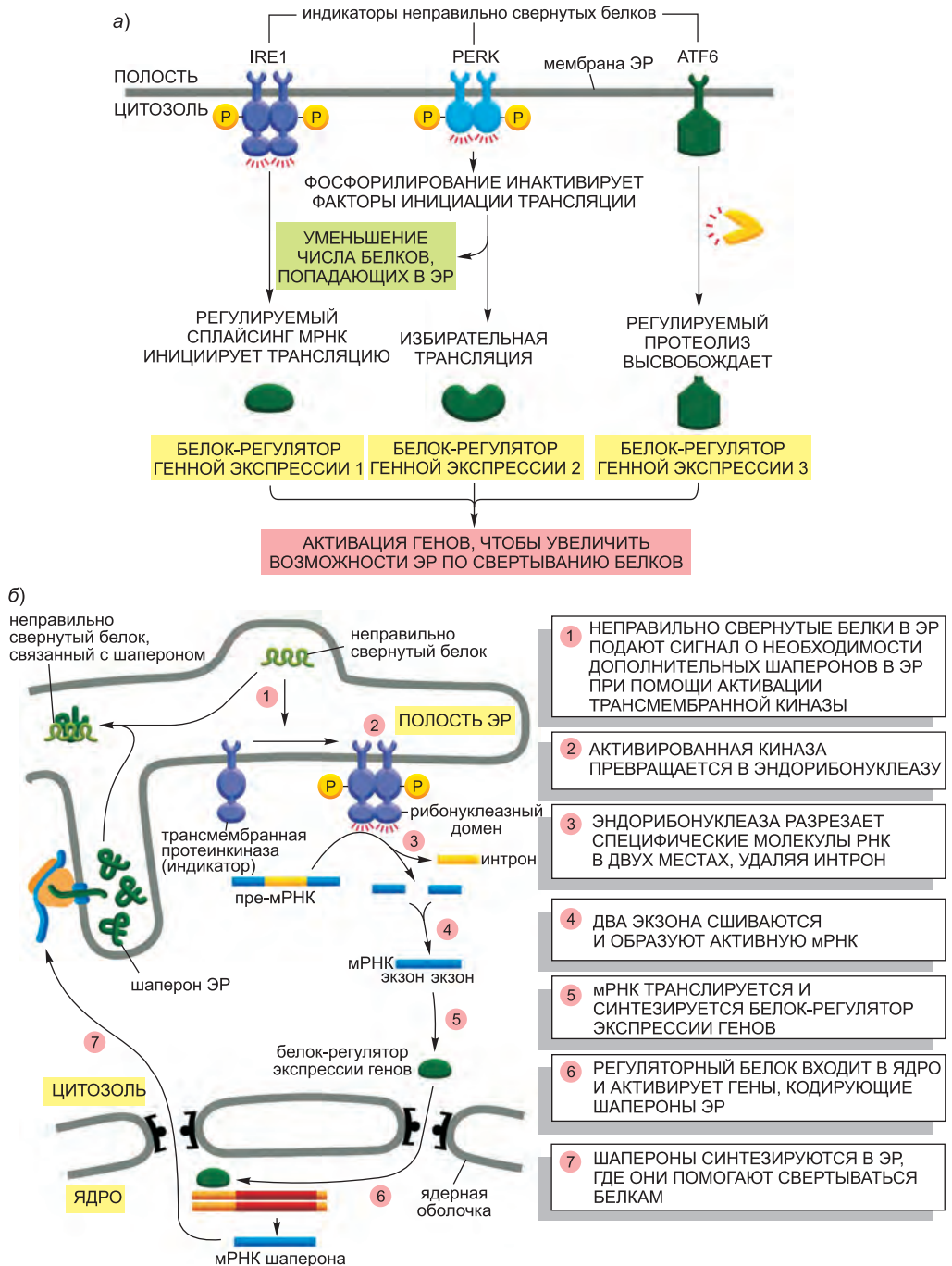


Рис. 12.55. Реакция несвернутых белков. (а) Три параллельных сигнальных пути сообщают ядру о накоплении в люмене ЭР неправильно свернутых белков. В результате активируется транскрипция генов, кодирующих белки, помогающая клетке справиться с избытком таких белков в ЭР. (б) Регулируемый сплайсинг мРНК является ключевым этапом переключения в пути 1 реакции несвернутых белков.

мало (см. **стр. 490**). Одним из таких белков является белок-регулятор, помогающий активировать транскрипцию генов, кодирующих белки, участвующие в реакции несвернутых белков.

Наконец, третий белок-регулятор гена исходно синтезируется как интегральный мембранный белок ЭР. Поскольку он ковалентно заякорен в мембране, то не способен активировать транскрипцию генов в ядре. Когда в ЭР накапливаются неправильно свернутые белки, трансмембранный белок транспортируется в аппарат Гольджи, где он взаимодействует с протеазами, отщепляющими его цитоплазматический домен, который теперь может мигрировать в ядро и способствовать активации транскрипции белков, участвующих в реакции несвернутых белков. Относительная важность каждого из этих путей изменяется от клетки к клетке, позволяя каждому типу клеток регулировать реакцию несвернутых белков в соответствии с их нуждами.

12.5.13. Некоторые мембранные белки приобретают ковалентно связанный гликозилфосфатидилинозитольный (GPI) якорь

Как обсуждалось в главе 10, несколько цитоплазматических ферментов катализируют ковалентное присоединение одной жирнокислотной цепи или пренильной группы к определенным белкам. Эти липиды помогают направлять белки в плазматическую мембрану. Сходный процесс катализируется ферментами ЭР, которые ковалентно присоединяют **гликозилфосфатидилинозитольный** (glycosylphosphatidylinositol, **GPI**) **якорь** к С-концу некоторых мембранных белков, предназначенных для транспорта в плазматическую мембрану. Эта связь образуется в люмене ЭР, где одновременно отщепляется трансмембранный участок белка (**рис. 12.56**). Таким способом модифицируется большое число белков плазматической мембраны. Поскольку они прикреплены к внешней поверхности плазматической мембраны только GPI-якорями, они, в принципе, могут отделяться от клетки в растворимой форме в ответ на сигналы, активирующие специфическую фосфолипазу плазматической мембраны. Например, паразит трипаносома использует этот механизм для избавления от покрывающих ее GPI-заякоренных белков при атаке иммунной системы. GPI-якоря также могут использоваться для направления белков плазматической мембраны в *липидные рафты*, т.е. для отделения одних мембранных белков от других, как мы обсудим в главе 13.

12.5.14. ЭР собирает большинство липидных бислоев

Мембрана ЭР синтезирует почти все основные классы липидов, включая фосфолипиды и холестерин, необходимые для образования новых клеточных мембран. Основным синтезируемым фосфолипидом является *фосфатидилхолин* (также называемый *лецитином*), который может быть образован в три этапа из холина, двух жирных кислот и глицеролфосфата (**рис. 12.57**). Каждый этап катализируется ферментами мембраны ЭР, активные сайты которых обращены в цитозоль, содержащий все необходимые метаболиты. Таким образом, синтез фосфолипидов происходит исключительно на цитоплазматической стороне мембраны ЭР. Поскольку жирные кислоты нерастворимы в воде, они транспортируются из сайтов их синтеза в ЭР связывающим их белком цитозоля. После доставки в мембрану ЭР и активации КоА, ацилтрансферазы последовательно присоединяют две жирные кислоты к глицеролфосфату с образованием фосфатидной кислоты. Фосфатидная кислота достаточно

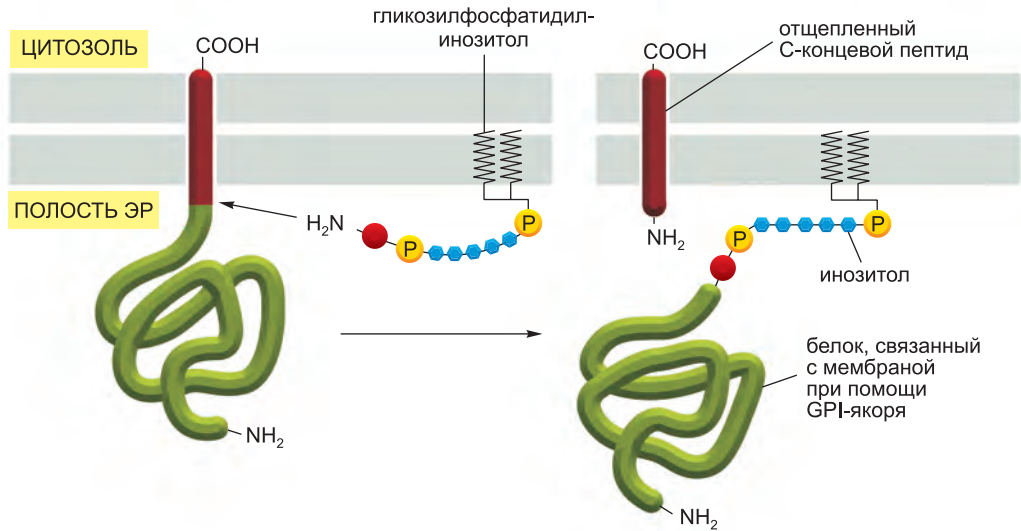


Рис. 12.56. Присоединение GPI-якоря к белку в ЭР. Первое время после завершения белкового синтеза белок-предшественник остается заякоренным в мембране ЭР гидрофобной С-концевой последовательностью длиной 15–20 аминокислот; остальная часть белка располагается в люмене ЭР. Менее чем через минуту фермент ЭР отрезает белок от его С-конца, связанного с мембраной, и одновременно присоединяет новый С-конец к аминокруппе на пресинтезированном интермедиате GPI. Углеводная цепь содержит инозитол, присоединенный к липиду, давшему GPI-якорю его имя. За ним следуют глюкозамин и три маннозы. Терминальная манноза связана с фосфэтаноламином, несущим аминогруппу для присоединения к белку. Сигнал, определяющий такую модификацию, содержится в гидрофобной С-концевой последовательности и нескольких прилегающих аминокислотах с люминальной стороны мембраны ЭР; если этот сигнал присоединить к другим белкам, они тоже модифицируются таким способом. Благодаря ковалентно связанному липидному якорю белок остается присоединенным к мембране, а все его аминокислоты сначала экспонированы в люмен ЭР, а затем во внеклеточное пространство.

нерастворима в воде, чтобы оставаться в липидном бислое, и ее нельзя экстрагировать из мембраны белками, связывающими жирные кислоты. Таким образом, это первый шаг, приводящий к увеличению липидного бислоя ЭР. Последующие шаги определяют, какую головную группу будет нести новосинтезированная липидная молекула, и, следовательно, какую химическую природу будет иметь бислой, но не приводят к росту мембраны. Два других часто встречаемых мембранных фосфолипидов, фосфатидилэтаноламин и фосфатидилсерин, а также малораспространенный фосфолипид фосфатидилинозитол (PI) синтезируются сходным образом.

Поскольку синтез фосфолипидов происходит в цитоплазматической половине липидного бислоя ЭР, должен существовать механизм, переносающий некоторые новосинтезированные фосфолипидные молекулы в люминальный монослой. В искусственных липидных бислоях не происходит такого флип-флопа липидов. Однако в ЭР фосфолипиды равновесно распределяются между монослоями за несколько минут, что почти в 100 тысяч раз быстрее, чем это происходило бы при самопроизвольном флип-флопе. Такое быстрое движение опосредуется малоизученным транслокатором фосфолипидов *скрамблазой*, который уравнивает липиды между монослоями липидного бислоя (рис. 12.58). Таким образом, различные типы фосфолипидов равномерно распределены между слоями мембраны ЭР.

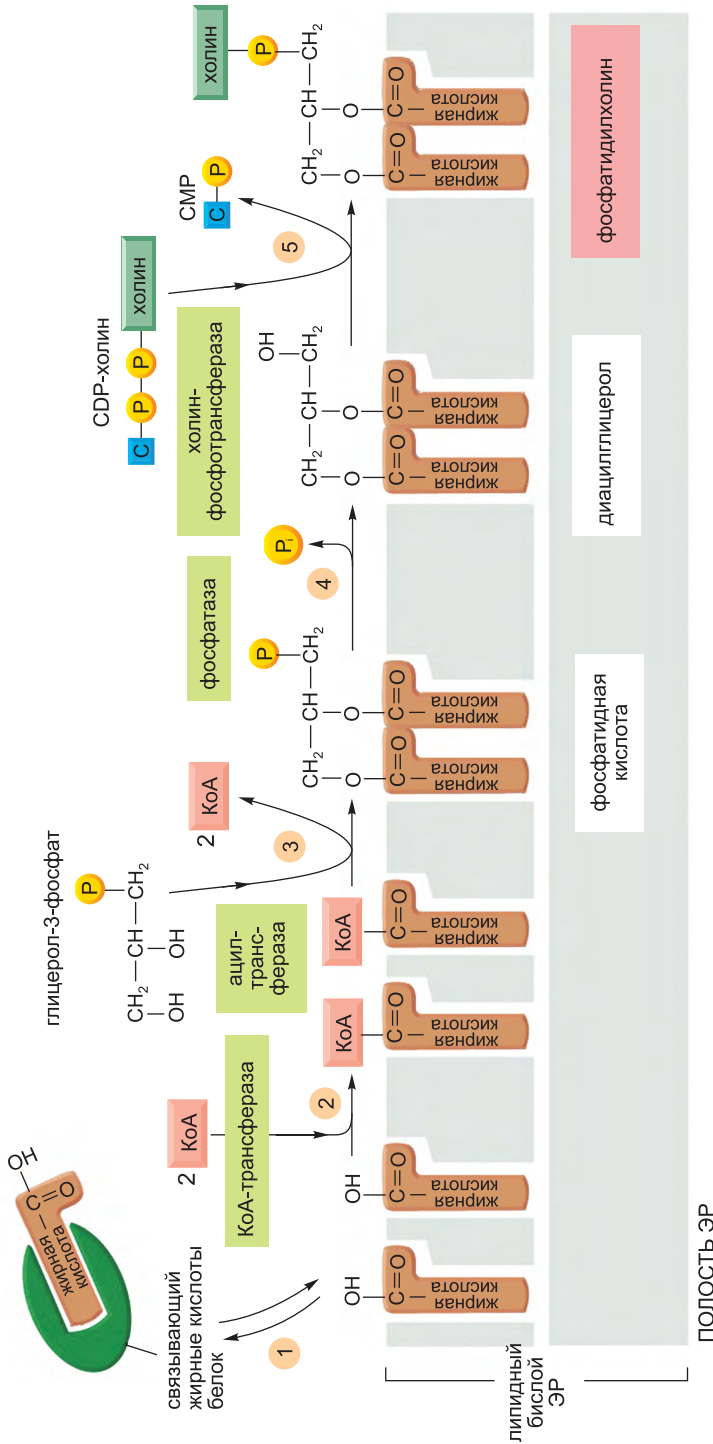


Рис. 12.57. Синтез фосфатидилхолина. Этот фосфолипид синтезируется из глицерол-3-фосфата, цитидиндифосфохолина (CDP-холина) и жирных кислот, доставляемых в ЭР белком, связывающим жирные кислоты.

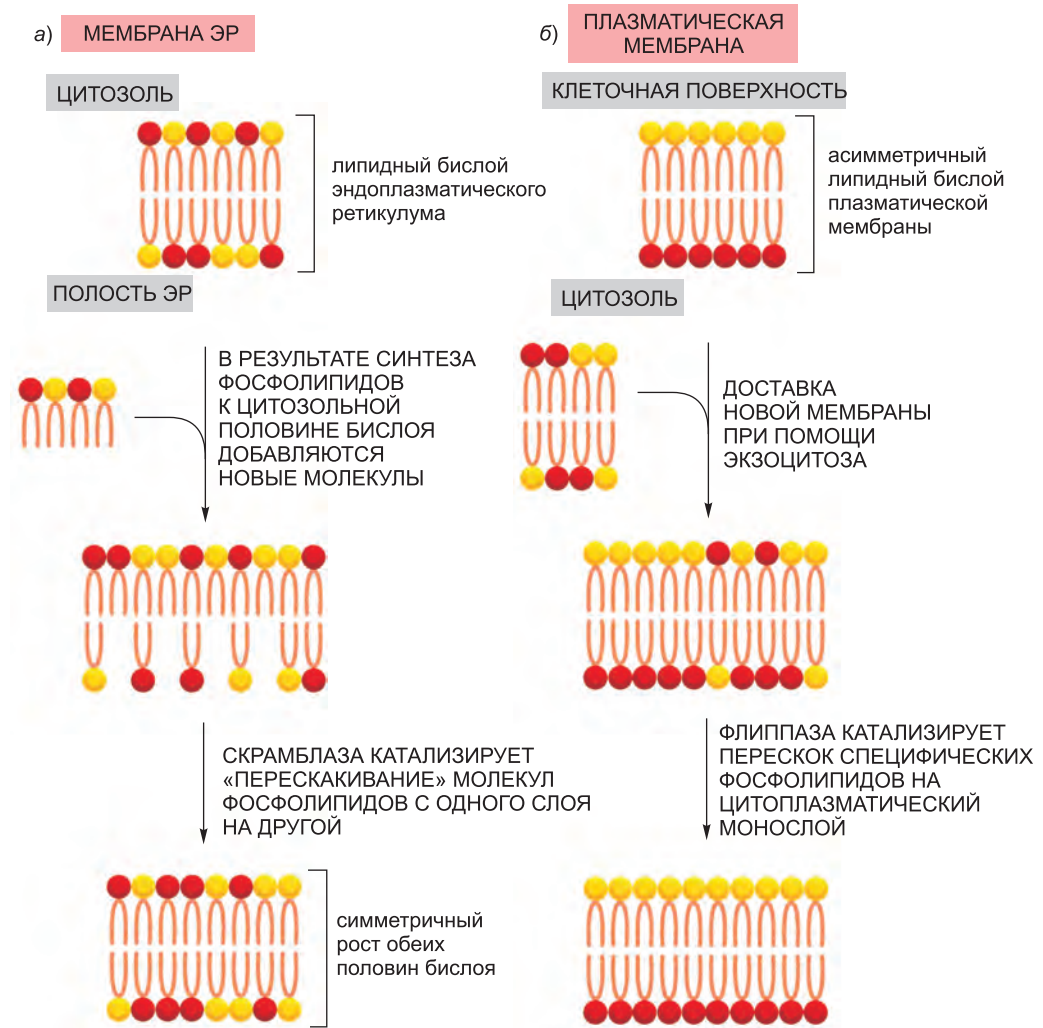


Рис. 12.58. Роль транслокаторов фосфолипидов в синтезе липидных бислоев. (а) Поскольку новые липидные молекулы добавляются только в цитоплазматическую половину бислоя и не могут самопроизвольно перескакивать из одного монослоя в другой, для переноса липидных молекул с цитоплазматической стороны в люменальную и роста мембраны как бислоя требуется мембраносвязанный транслокатор липидов (называющийся скрамблазой). Скрамблаза неспецифична по отношению к определенным фосфолипидным головкам и, следовательно, уравнивает содержание различных фосфолипидов в монослоях. (б) За счет энергии гидролиза АТФ специфичная по отношению к головным группам флиппаза плазматической мембраны активно и направленно переносит фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин из внеклеточного монослоя в цитоплазматический, создавая характерный асимметричный липидный бислой плазматической мембраны животных клеток (см. рис. 10.16).

Плазматическая мембрана несет другой тип транслокаторов фосфолипидов, принадлежащий семейству насосов Р-типа (см. главу 11). Эти *флиппазы* специфически отбирают во внеклеточном монослое фосфолипиды, содержащие в своей головке свободные аминогруппы (фосфатидилсерин и фосфатидилэтаноламин —

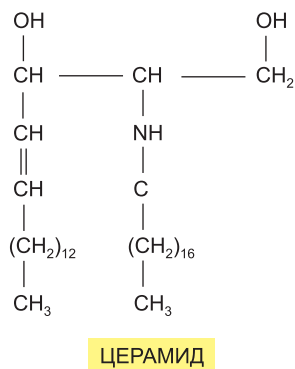


Рис. 12.59. Структура церамид.

см. рис. 10.3), и используют энергию гидролиза АТФ для их направленного переноса в цитоплазматический монослой. Таким образом, плазматическая мембрана по своему фосфолипидному составу асимметрична, и такое распределение активно поддерживается флиппазами (см. рис. 10.16). Плазматическая мембрана также содержит скрамблазу, но, в отличие от скрамблазы ЭР, которая активна постоянно, фермент плазматической мембраны регулируется и активируется только в некоторых случаях. Например, при апоптозе и в активированных тромбоцитах она снимает липидную асимметрию; результирующее появление на поверхности апоптотных клеток фосфатидилсерина служит сигналом фагоцитам, которые поглощают и переваривают мертвую клетку.

ЭР также производит холестерин и церамид (рис. 12.59). Церамид синтезируется путем конденсации аминокислоты серина с жирной кислотой с образованием аминок спирта *сфингозина* (см. рис. 10.3); затем добавляется вторая жирная кислота и образуется церамид. Церамид экспортируется в аппарат Гольджи, где он служит предшественником синтеза двух типов липидов: для образования *глико-сфинголипидов* к нему присоединяются олигосахаридные цепи (гликолипиды; см. рис. 10.18), а для синтеза *сфингомиелина* (см. главу 10) на него с фосфатидилхолина переносятся две фосфохолиновые головки. Таким образом, гликолипиды и сфингомиелин образуются на относительно поздних этапах синтеза мембраны. Поскольку они синтезируются ферментами, экспонированными в люмен аппарата Гольджи, то во всех липидных бислоях, где они есть, располагаются в нецитоплазматическом монослое.

Как обсуждается в главе 13, плазматическая мембрана и мембраны аппарата Гольджи, лизосом и эндосом образуют общую мембранную систему, сообщающуюся с ЭР через транспортные пузырьки, переносящие как белки, так и липиды. Митохондрии и пластиды, однако, не входят в эту систему, и им необходимы другие механизмы импорта липидов для роста. Мы уже видели, что они импортируют большинство своих белков из цитозоля. Несмотря на то что митохондрии модифицируют некоторые импортированные липиды, они не синтезируют их *de novo*; вместо этого, их липиды импортируются из ЭР либо напрямую, либо опосредованно через другие мембраны клетки. В любом случае для транспорта нужны специальные механизмы.

Подробности того, как катализируется и регулируется распределение липидов между мембранами, неизвестны. Водорастворимые белки, носящие название *белков-обменников фосфолипидов* (или *белков-переносчиков фосфолипидов*), переносят отдельные молекулы фосфолипидов между мембранами. Они функционируют сходно с белками, связывающими жирные кислоты и проводящими их через цитозоль. Более того, на электронных фотографиях митохондрии часто соприкасаются с ЭР, что указывает на возможное существование специфических механизмов переноса липидов, действующих между прилегающими друг к другу мембранами.

Заключение

Крупная сеть ЭР служит фабрикой по производству почти всех липидов клетки. Более того, значительная часть белкового синтеза клетки происходит

на цитоплазматической поверхности ЭР: все белки, предназначенные для секреции и самого ЭР, аппарата Гольджи, лизосом, эндосом и плазматической мембраны, сначала импортируются из цитозоля в ЭР. В люмене ЭР белки сворачиваются и олигомеризуются, образуются дисульфидные связи и добавляются N-связанные олигосахариды. Протекание N-связанного гликозилирования указывает на уровень фолдинга белков, поэтому белки покидают ЭР, только если они правильно свернулись. Белки, которые не свернулись или не олигомеризовались, транслоцируются обратно в цитозоль, где дегликозилируются, убиквитинируются и деградируются протеасомами. Если неправильно свернутые белки в избытке накапливаются в ЭР, они запускают реакцию несвернутых белков, которая активирует гены ядра, помогающие ЭР справиться с несвернутыми белками.

В ЭР импортируются только белки, несущие специальную сигнальную последовательность ЭР. Сигнальная последовательность узнается сигналузнающей частицей (SRP), которая связывает растущую полипептидную цепь и рибосому и направляет их к рецепторному белку на цитоплазматической поверхности мембраны шероховатого ЭР. Связывание с мембраной ЭР инициирует процесс транслокации, начинающийся с проталкивания петли полипептидной цепи через мембрану ЭР сквозь гидрофильную пору трансмембранного белкового транслокатора.

Растворимые белки, предназначенные для люмена ЭР, секреции или транспорта в люмен других органелл, полностью проходят в люмен ЭР. Трансмембранные белки, предназначенные для мембран ЭР и других клеточных органелл, транслоцируются частично через мембрану ЭР и остаются заякоренными там посредством одного или нескольких пересекающих мембрану α -спиральных участков их полипептидных цепей. Эти гидрофобные участки белка могут служить сигналами начала или остановки транслокации. Когда белок содержит многочисленные чередующиеся стоп- и старт-сигналы транслокации, он будет несколько раз проходить туда и обратно через бислой и станет многопроходным белком.

Асимметрия встраивания и гликозилирования белков в ЭР определяет асимметрию мембран всех органелл, для которых ЭР синтезирует мембранные белки.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

12.1. Как и люмен ЭР, внутреннее пространство ядра топологически эквивалентно внеклеточному пространству.

12.2. Связанные с мембраной и свободные рибосомы структурно и функционально идентичны, они отличаются только белками, которые они синтезируют в данный момент времени.

12.3. Чтобы избежать столкновения, которое произойдет, если через одну пору будет происходить движение в обоих направлениях, ядерные поровые комплексы специализированы: через одни протекает импорт, а через другие — экспорт.

12.4. Пероксисомы встречаются только в нескольких специализированных типах эукариотических клеток.

12.5. В многопроходных трансмембранных белках нечетные трансмембранные участки (если считать с N-конца) служат старт-сигналами транслокации, а четные — стоп-сигналами.

Решите следующие задачи

12.6. Какова судьба белка, не несущего сигнала сортировки?

12.7. Представьте себе, что вы получили набор генов, каждый из которых кодирует белок с парой конфликтующих сигнальных последовательностей, направляющих белок в разные компартменты. Предскажите, какой сигнал победит в следующих комбинациях, если эти гены экспрессировать в клетке. Объясните свой ответ.

- а. Сигналы импорта в ядро и импорта в ЭР.
- б. Сигналы импорта в пероксисомы и импорта в ЭР.
- в. Сигналы импорта в митохондрии и удержания в ЭР.
- г. Сигналы импорта в ядро и экспорта из ядра.

12.8. В шероховатом ЭР синтезируются различные классы мембранных белков. Некоторые из этих белков остаются в ЭР, другие же сортируются по компартментам, включая аппарат Гольджи, лизосомы и плазматическую мембрану. Одним из показателей сложности задачи сортировки является уровень «очистки», который необходимо достичь во время транспорта в ЭР. Часто ли в ЭР встречаются белки, предназначенные в плазматическую мембрану?

Несколько простых соображений помогают ответить на этот вопрос. В типичной растущей клетке, делящейся каждые 24 часа, через ЭР должен раз в день проходить эквивалент одной плазматической мембраны. Если площадь ЭР в 20 раз превышает площадь плазматической мембраны, каково соотношение между белками плазматической мембраны и другими мембранными белками в ЭР? (Предположите, что все белки на пути в плазматическую мембрану удерживаются в ЭР в среднем в течение 30 минут и что соотношение липидов и белков в плазматической мембране и мембране ЭР одинаково.)

12.9. До того как ядерные поровые комплексы подробно изучили, было неясно, пассивно ли диффундируют ядерные белки в ядро и накапливаются там за счет связывания с такими постоянными структурами ядра, как хромосомы, или они активно транспортируются и накапливаются вне зависимости от родства к компонентам ядра.

В классическом эксперименте, разрешившем эту проблему, использовалось несколько радиоактивно меченых форм нуклеоплазмина, крупного пентамерного белка, участвующего в сборке хроматина. В этом эксперименте в цитоплазму или ядро ооцита лягушки вводили интактный нуклеоплазмин или его головку, хвост или головку с одним хвостом (**рис. Q12.1**). Все формы нуклеоплазмина, за исключением головок, накапливались в ядре при введении в цитоплазму, и все формы удерживались в ядре при прямом введении в органеллу.

- а. Какая часть молекулы нуклеоплазмина отвечает за ядерную локализацию?
- б. Как эти эксперименты позволили различить активный транспорт, при котором сигнал ядерной локализации запускает транспорт ядерным поровым комплексом, и пассивную диффузию, при которой сайт связывания ядерного компонента приводит к накоплению в ядре?

12.10. Предполагая, что для упаковки человеческого генома требуется 32 миллиона гистонов, сколько молекул гистонов в секунду должно транспортироваться

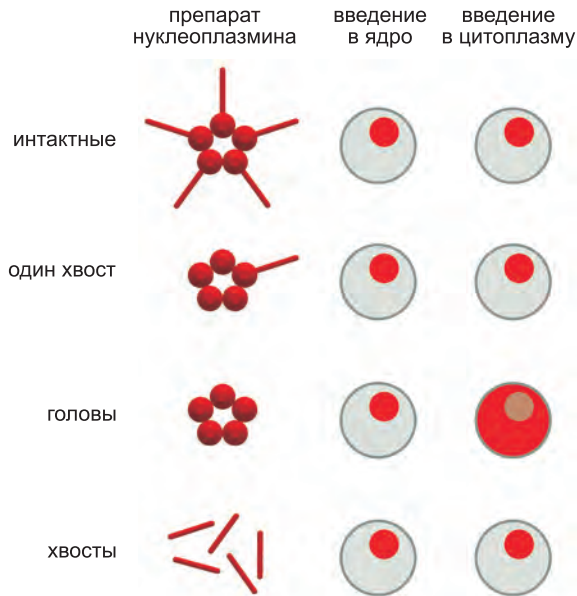


Рис. Q12.1. Распределение в клетке введенных в нее нуклеоплазмина и его компонентов (задача 12.9). На схемах радиоавтограмм цитоплазма и ядро, несущие нуклеоплазмин, показаны красным.

через один ядерный поровый комплекс, если ядро содержит 3000 ядерных пор и делится раз в день?

12.11. Структуры Ran-GDP и Ran-GTP (точнее, Ran-GppNp, стабильного аналога GTP) значительно отличаются друг от друга, как показано на [рис. Q12.2](#). Неудивительно, что Ran-GDP и Ran-GTP связываются с разными наборами белков.

Чтобы наблюдать вход Ran в ядро проницаемых клеток, к боковым цепям цистеинов Ran присоединяют красную флуоресцентную метку. Такой модифицированный Ran поддерживает нормальный ядерный импорт. Флуоресцентный Ran-GDP захватывается ядром только при добавлении цитоплазмы, тогда как его мутантная форма, RanQ69L-GTP, не способная гидролизовать GTP, не проходит в ядро как в присутствии цитоплазмы, так и в ее отсутствие. Для идентификации цитоплазматического белка, необходимого для захвата Ran-GDP, вы разрабатываете аффинные колонки со связанным Ran-GDP или RanQ69L-GTP и пропускаете через них цитоплазму. Цитоплазма, пропущенная через колонку с Ran-GDP, больше не поддерживает импорт в ядро, тогда как цитоплазма, пропущенная через колонку с RanQ69L-GTP, сохраняет эту способность. Вы элюируете связанные белки из каждой колонки и анализируете их на ДСН-полиакриламидном геле, пытаясь найти отличия, которые позволят обнаружить фактор, необходимый для захвата Ran ядром ([рис. Q12.3](#)).

а. Почему в этих экспериментах вы используете RanQ69L-GTP вместо Ran-GTP? Разве

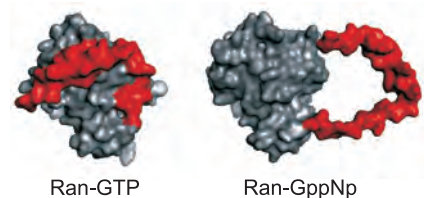


Рис. Q12.2. Структуры Ran-GDP и Ran-GppNp (задача 12.11). Красным показан участок Ran, наиболее сильно различающийся у белков, связанных с GDP и GTP.

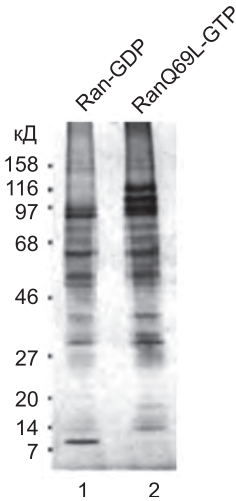


Рис. Q12.3. Белки, элюированные из аффинных колонок Ran-GDP (дорожка 1) и RanQ69L-GTP (дорожка 2) (задача 12.11). Молекулярные веса белковых маркеров показаны слева. (Из К. Ribbeck et al., *EMBO J.* 17: 6587–6598, 1998. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Ran-GppNp на месте RanQ69L-GTP не позволил бы достичь тех же результатов?

б. Какой из множества белков, элюированных с двух разных колонок, является наиболее вероятным кандидатом в факторы, способствующие ядерному импорту Ran-GDP?

в. Предскажите один или несколько белков, с которыми фактор импорта Ran-GDP мог бы связываться для выполнения своей функции.

г. Как вы можете подтвердить, что идентифицированный вами фактор необходим для входа Ran в ядро?

12.12. Компонентов комплекса TIM, мультисубъединичного белкового транслокатора внутренней мембраны митохондрий, значительно меньше, чем компонентов комплекса TOM. Для их идентификации пришлось прибегнуть к генетической уловке. Ген дрожжей *Ura3*, чей продукт в норме локализован в цитозоле, где он необходим для синтеза урацила, модифицировали: к нему присоединили сигнал импорта в матрикс митохондрий. Популяцию клеток, несущую модифицированный ген *Ura3*, выращивали в отсутствие урацила. Большинство клеток погибло, но показали, что немногочисленные выросшие клетки дефектны по митохондриальному транспорту. Объясните, как такая селекция позволяет идентифицировать клетки с нарушениями компонентов, необходимых для митохондриального импорта. Почему нормальные клетки с модифицированным геном *Ura3* не растут в отсутствие урацила? Почему клетки с дефектным митохондриальным импортом растут в отсутствие урацила?

12.13. Если фермент дигидрофолатредуктазу (ДФФР, DHFR), в норме локализованную в цитозоле, модифицировать, присоединив к ее N-концу сигнал транспорта митохондрий, она эффективно импортируется в митохондрии. Если затем модифицированную ДФФР сначала инкубировать с метотрексатом, крепко связывающимся с активным сайтом, фермент остается в цитозоле. Предположите, как связывание метотрексата мешает митохондриальному импорту.

12.14. Зачем митохондриям сложный транслокатор для переноса белков через внешнюю мембрану? В их внешних мембранах уже есть образованные поринами крупные поры.

12.15. Каталаза, фермент, в норме локализованный в пероксисомах, также присутствует в нормальных количествах в клетках, у которых отсутствуют видимые пероксисомы. При помощи иммунофлуоресцентной микроскопии с антителами каталазы можно определить ее месторасположение в таких клетках. Флуоресцентные клетки показаны на [рис. Q12.4](#). Где локализована каталаза в клетках без пероксисом ([рис. Q12.4, б](#))? Почему каталаза выглядит в нормальных клетках как маленькие флуоресцентные точки ([рис. Q12.4, а](#))?

12.16. Рассмотрите изображенный на [рис. Q12.5](#) многопроходной трансмембранный белок. Что произойдет, если превратить первый гидрофобный трансмембранный сегмент в гидрофильный? Нарисуйте упаковку такого модифицированного белка в мембране ЭР.

Рис. Q12.4. Определенная при помощи иммунофлуоресцентной микроскопии локализация каталазы ([задача 12.15](#)). (а) Нормальные клетки. (б) Лишенные пероксисом клетки. Клетки обрабатывали антителами, специфичными к каталазе, отмывали и окрашивали вторым антителом, меченным флуоресцеином и специфичным к первым антителам. Увеличение на фотографиях одинаковое. (Из N. Kinoshita et al., *J. Biol. Chem.* 273: 24122–24130, 1998. С любезного разрешения American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

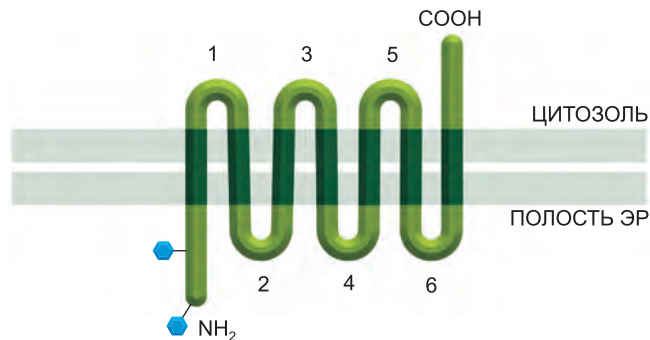
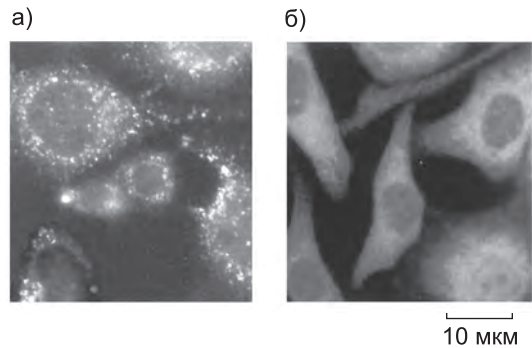


Рис. Q12.5. Упаковка трансмембранного многопроходного белка в мембране ЭР ([задача 12.16](#)). Шестиугольниками показаны ковалентно связанные олигосахариды.

12.17. Все новые фосфолипиды добавляются в цитоплазматический монослой мембраны ЭР, однако мембрана обладает симметричным распределением различных фосфолипидов в монослоях. С другой стороны, плазматическая мембрана, которая получает все свои компоненты из ЭР, имеет очень асимметричное распределение фосфолипидов в двух монослоях липидного бислоя. Как в мембране ЭР создается симметрия, а в плазматической мембране — асимметрия?

Список литературы

Общий

Palade G. (1975) Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189: 347–358.

Компартментализация клеток

Blobel G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 1496–1500.

De Duve C. (2007) The origin of eukaryotes: a reappraisal. *Nature Rev. Genet.* 8: 395–403.

Schatz G. & Dobberstein B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271: 1519–1526.

Warren G. & Wickner W. (1996) Organelle inheritance. *Cell* 84: 395–400.

Транспорт молекул между ядром и цитозолем

Adam S.A. & Gerace L. (1991) Cytosolic proteins that specifically bind nuclear location signals are receptors for nuclear import. *Cell* 66: 837–847.

Bednenko J., Cingolani G. & Gerace L. (2003) Nucleocytoplasmic transport: navigating the channel. *Traffic* 4: 127–135.

Chook Y.M. & Blobel G. (2001) Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11: 703–715.

Cole C.N. & Scarcelli J.J. (2006) Transport of messenger RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 299–306.

Fahrenkrog B., Koser J. & Aebi U. (2004) The nuclear pore complex: a jack of all trades? *Trends Biochem. Sci.* 29: 175–182.

Gorlich D. & Kutay U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 607–660.

Hetzer M.W., Walther T.C. & Mattaj I.W. (2005) Pushing the envelope: structure, function, and dynamics of the nuclear periphery. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 347–380.

Komeili A. & O'Shea E.K. (2000) Nuclear transport and transcription. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 355–360.

Kuersten S., Ohno M. & Mattaj I.W. (2001) Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond. *Trends Cell Biol.* 11: 497–503.

Tran E.J. & Wente S.R. (2006) Dynamic nuclear pore complexes: life on the edge. *Cell* 125: 1041–1053.

Weis K. (2002) Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 328–335.

Транспорт белков в митохондрии и хлоропласты

Jarvis P. & Robinson C. (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* 14: R1064–R1077.

Kessler F. & Schnell D.J. (2004) Chloroplast protein import: solve the GTPase riddle for entry. *Trends Cell Biol.* 14: 334–338.

Koehler C.M., Merchant S. & Schatz G. (1999) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* 24: 428–432.

Mokranjac D. & Neupert W. (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1019–1023.

Prakash S. & Matouschek A. (2004) Protein unfolding in the cell. *Trends Biochem. Sci.* 29: 593–600.

Soil J. & Schleiff E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 198–208.

Truscott K.N., Brandner K. & Pfanner N. (2003) Mechanisms of protein import into mitochondria. *Curr. Biol.* 13: R326–R337.

Пероксисомы

Fujiki Y. (2000) Peroxisome biogenesis and peroxisome biogenesis disorders. *FEBS Lett.* 476: 42–46.

Lazarow P.B. (2003) Peroxisome biogenesis: advances and conundrums. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 489–497.

van der Zand A., Braakman I. & Tabak H.F. (2006) The return of the peroxisome. *J. Cell Sci.* 119: 989–994.

Эндоплазматический ретикулум

Adelman M.R., Sabatini D.D. et al. (1973) Ribosome-membrane interaction. Nondestructive disassembly of rat liver rough microsomes into ribosomal and membranous components. *J. Cell Biol.* 56: 206–229.

Bermales S., Papa F.R. & Walter P. (2006) Intracellular signaling by the unfolded protein response. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22: 487–508.

Bishop W.R. & Bell R.M. (1988) Assembly of phospholipids into cellular membranes: biosynthesis, transmembrane movement and intracellular translocation. *Annu. Rev. Cell Biol.* 4: 579–610.

Blobel G. & Dobberstein B. (1975) Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J. Cell Biol.* 67: 835–851.

Borgese N., Mok W. & Sabatini D.D. (1974) Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J. Mol. Biol.* 88: 559–580.

Daleke D.L. (2003) Regulation of transbilayer plasma membrane phospholipid asymmetry. *J. Lipid Res.* 44: 233–242.

Deshaies R.J., Sanders S.L. & Schekman R. (1991) Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* 349: 806–808.

Ellgaard L. & Helenius A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 181–191.

Ferguson M.A. (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. *J. Cell Sci.* 112: 2799–2809.

Gething M.J. (1999) Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin. Cell Dev. Biol.* 10: 465–472.

Görllich D., Prehn S. et al. (1992) A mammalian homolog of SEC61p and SECYp is associated with ribosomes and nascent polypeptides during translocation. *Cell* 71: 489–503.

Helenius J. & Aebi M. (2002) Transmembrane movement of dolichol linked carbohydrates during N-glycoprotein biosynthesis in the endoplasmic reticulum. *Semin. Cell Dev. Biol.* 13: 171–178.

Johnson A.E. & van Waes M.A. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 799–842.

Keenan R.J., Freymann D.M. & Walter P. (2001) The signal recognition particle. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 755–775.

Kostova Z. & Wolf D.H. (2003) For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *EMBO J.* 22: 2309–2317.

Levine T. & Loewen C. (2006) Inter-organelle membrane contact sites: through a glass, darkly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 371–378.

Marciniak S.J. & Ron D. (2006) Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol. Rev.* 86: 1133–1149.

Milstein C., Brownlee G.G. et al. (1972) A possible precursor of immunoglobulin light chains. *Nature New Biol.* 239: 117–120.

Romisch K. (2005) Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 435–456.

Simon S. M. & Blobel G. (1991) A protein-conducting channel in the endoplasmic reticulum. *Cell* 65: 371–380.

Staehelin L. A. (1997) The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *Plant J.* 11: 1151–1165.

Trombetta E. S. & Parodi A. J. (2003) Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 649–676.

Tsai B., Ye Y. & Rapoport T. A. (2002) Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 246–255.

Shibata Y., Voeltz G. K. & Rapoport T. A. (2006) Rough sheets and smooth tubules. *Cell* 126: 435–439.

White S. H. & von Heijne G. (2004) The machinery of membrane protein assembly. *Curr. Opin Struct. Biol.* 14: 397–404.

Yan A. & Lennarz W. J. (2005) Unraveling the mechanism of protein N-glycosylation. *J. Biol. Chem.* 280: 3121–3124.

13

Внутриклеточный везикулярный транспорт

Все клетки должны питаться, взаимодействовать с окружающим миром и быстро реагировать на изменения внешней среды. Для этого клетки непрерывно модифицируют состав своей плазматической мембраны в ответ на сигналы извне. Они используют сложную систему внутренних мембран для добавления и удаления расположенных на поверхности клетки мембранных белков — рецепторов, ионных каналов и переносчиков. В процессе *экзоцитоза* новосинтезированные белки, углеводы и липиды по *биосинтетическому секреторному пути* доставляются в плазматическую мембрану или внеклеточное пространство. В обратном процессе *эндоцитоза* (рис. 13.1) клетки удаляют компоненты плазматической мембраны и транспортируют их во внутренние компартменты, называемые *эндосомами*, откуда эти компоненты возвращаются в плазматическую мембрану или доставляются в лизосомы для деградации. Клетки также используют эндоцитоз для захвата важных питательных веществ, например: витаминов, липидов, холестерина и железа; эти вещества переносятся в клетку вместе с макромолекулами, с которыми они связаны, и затем высвобождаются в эндосомах или лизосомах и транспортируются в цитозоль, где участвуют в различных биосинтетических процессах.

Внутреннее пространство, или *люмен*, каждого замкнутого мембранного компартмента, принимающего участие в биосинтетическом секреторном и эндоцитозном путях, топологически эквивалентен люмену почти всех остальных мембранных компартментов и внешней среде. Белки способны путешествовать по этому пространству, не пересекая и переходя из одного компартмента в другой в составе многочисленных замкнутых мембранных резервуаров. Некоторые из этих резервуаров представляют собой маленькие сферические *пузырьки*, тогда как другие — это более крупные везикулы или трубочки неправильной формы, образующиеся из донорного компартмента. Мы будем использовать термин **транспортная везикула** (или **пузырек**) по отношению ко всем видам этих резервуаров.

В пределах эукариотической клетки транспортные везикулы непрерывно отпочковываются от одной мембраны и сливаются с другой, перенося мембранные компоненты и растворимые молекулы, которые называют «грузом» (рис. 13.2). Такое мембранное движение происходит по упорядоченным, направленным маршрутам, что позволяет клетке эффективно секретировать, питаться и перестраивать плазматическую мембрану. Биосинтетический секреторный путь направлен от эндоплазматического ретикулума (ЭР) к аппарату Гольджи и поверхности клетки с ответвлением к лизосомам. Эндоцитозный путь направлен внутрь от плазматической мембраны. В обоих случаях поток мембран между компартментами сбалансирован ретроградными путями, уравнивающими поток в обратном направлении и возвращающими определенные белки в исходный компартмент (рис. 13.3).

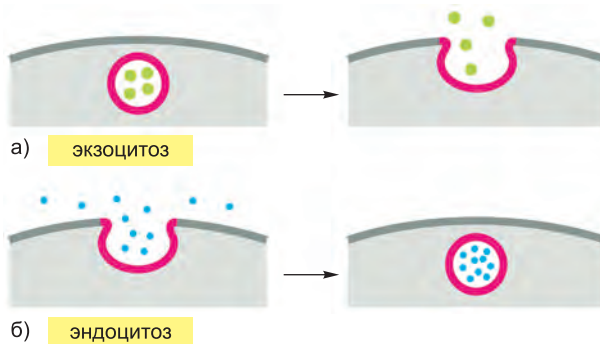


Рис. 13.1. Экзоцитоз и эндоцитоз. (а) При экзоцитозе транспортная везикула сливается с плазматической мембраной. Ее содержимое высвобождается во внеклеточное пространство, а мембрана везикулы (красная) сливается с плазматической мембраной. (б) При эндоцитозе участок плазматической мембраны (красный) изгибается внутрь, образуя транспортную везикулу. Ее содержимое происходит из внеклеточного пространства.

Чтобы выполнять свою функцию, каждая везикула, отпочковавшаяся от компартмента, должна быть селективной. Она должна забирать только подходящие молекулы и сливаться только с соответствующей мембраной-мишенью. Например, везикула, несущая груз от аппарата Гольджи в плазматическую мембрану, должна исключить белки, функционирующие в аппарате Гольджи, и не должна сливаться ни с одной органеллой, за исключением плазматической мембраны.

Мы начнем эту главу с рассмотрения молекулярных механизмов отпочковывания и слияния, лежащих в основе везикулярного транспорта. Затем мы рассмотрим фундаментальный вопрос о том, как клетка, в условиях такого транспорта, под-

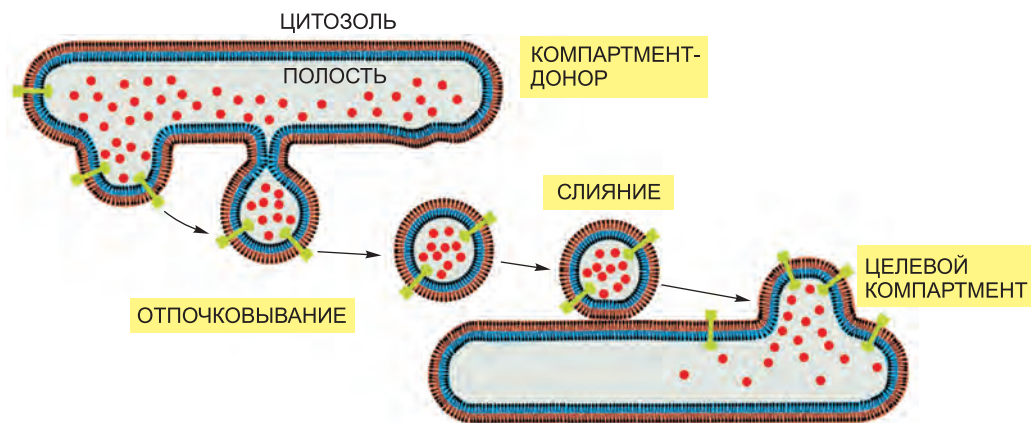


Рис. 13.2. Везикулярный транспорт. Транспортные пузырьки отпочковываются от одного компартмента и сливаются с другим. При этом они переносят вещество в форме груза из *люмена* (пространства внутри замкнутого мембранного компартмента) и мембраны донорного компартмента в люмен и мембрану компартмента-мишени, как показано. Обратите внимание, что процессы отпочковывания и слияния не симметричны: для отделения везикулы необходимо слияние мембран, инициируемое на люминальной стороне мембраны, а процесс слияния требует смыкания мембран, инициируемого с цитоплазматической стороны как донорной, так и акцепторной мембран.

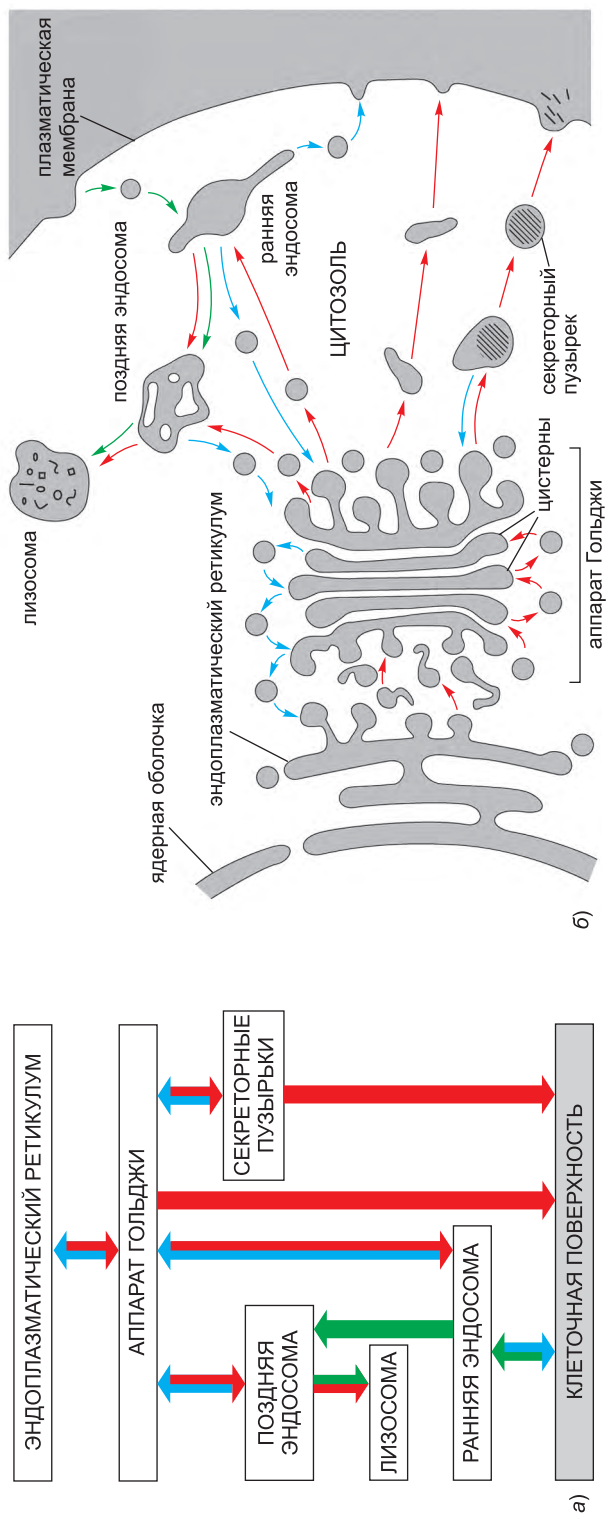


Рис. 13.3. «Карта» биосинтетического секреторного и эндоцитозного путей. (а) На этой диаграмме, представленной в главе 12, эндоцитозный и биосинтетический секреторный пути показаны *зелеными* и *красными* стрелками соответственно. *Голубыми* стрелками обозначены пути возврата, обеспечивающие обратный поток некоторых компонентов. (б) Компартменты эукариотической клетки, участвующие в везикулярном транспорте. Люмен всех замкнутых мембранных компартментов топологически эквивалентен внешней среде. Все представленные на рисунке компартменты сообщаются друг с другом и внешней средой посредством транспортных везикул. В биосинтетическом секреторном пути (*красные стрелки*) белковые молекулы транспортируются из ЭР в плазматическую мембрану или (через эндосомы) в лизосомы. В эндоцитозном пути (*зеленые стрелки*) молекулы поглощаются везикулами, отщепляющимися от плазматической мембраны, и доставляются в ранние эндосомы и затем (через поздние эндосомы) в лизосомы. Многие эндоцитированные молекулы забираются из ранних эндосом и возвращаются в плазматическую мембрану для повторного использования; точно так же молекулы из ранних и поздних эндосом могут возвращаться в аппарат Гольджи, а оттуда – в ЭР. Все пути возврата показаны *голубыми стрелками*, как на (а).

держивает различия между компартментами. Наконец, в ходе рассмотрения путей, соединяющих аппарат Гольджи, лизосомы, секреторные везикулы и эндосомы, мы обсудим функции этих органелл.

13.1. Молекулярные механизмы мембранного транспорта и поддержания различий между компартментами

Везикулярный транспорт опосредует непрерывный обмен компонентами между более чем десятком химически различными замкнутыми компартментами, которые вместе образуют биосинтетический секреторный и эндоцитозный пути. Как при таком непрерывном обмене веществами компартменты способны поддерживать свою уникальность? Чтобы ответить на этот вопрос, сначала мы должны рассмотреть свойства, определяющие характер каждого компартмента. Прежде всего, это состав внешней мембраны: молекулярные маркеры на цитоплазматической стороне мембраны служат сигналами для входящего транспорта, обеспечивающими слияние только с правильным компартментом. Однако многие из этих мембранных маркеров характерны для нескольких компартментов, и именно специфическое сочетание маркерных молекул обеспечивает уникальность молекулярного «адреса».

Как поддерживаются высокие концентрации этих маркеров в одном компартменте и низкие — в другом? Для ответа на этот вопрос необходимо рассмотреть, как участки мембраны, обогащенные определенным компонентом или лишенные его, отпочковываются от одного компартмента и переносятся в другой. В **приложении 13.1** дан краткий обзор основных биохимических подходов к изучению молекулярного аппарата, принимающего участие в везикулярном транспорте.

Мы начнем с обсуждения того, как клетки распределяют белки по разным мембранным доменам путем сборки особого белкового слоя (каймы) на цитоплазматической стороне мембраны. Мы рассмотрим, как эти оболочки образуются, из чего они сделаны и как используются для выделения специфических компонентов из мембраны и их транспорта в другие компартменты. Наконец, мы обсудим, как транспортные везикулы стыкуются и сливаются с соответствующей мембраной-мишенью и доставляют свой груз.

13.1.1. Существует несколько типов окаймленных пузырьков

Большинство транспортных везикул образуется из специализированных окаймленных областей мембран. Они отщипываются в форме **окаймленных пузырьков**, которые несут на цитоплазматической стороне специфический набор белков. Перед тем как слиться с мембраной-мишенью, они сбрасывают свою оболочку, что необходимо для прямого взаимодействия и слияния двух цитоплазматических поверхностей мембран.

Кайма выполняет две основные функции. Во-первых, она концентрирует специфические мембранные белки на специализированном участке, из которого затем образуется мембрана везикулы. Таким образом, она отбирает правильные молекулы для транспортировки. Во-вторых, кайма придает форму образуемому пузырьку. Белки каймы собираются в изогнутую, похожую на корзину сетку, которая деформирует участок мембраны и таким образом определяет форму пузырька. Это позволяет объяснить, почему везикулы с одним типом каймы часто имеют относительно однородную форму и размер.

Существует три подробно охарактеризованных типа окаймленных пузырьков, отличающихся по составу белков: окаймленные *клатрином*, окаймленные *COP I* (*Coat Protein Complex I* — комплекс белков окаймления I) и окаймленные *COP II* (рис. 13.4). На разных этапах транспорта используются разные типы везикул. Окаймленные клатрином пузырьки, например, опосредуют транспорт из аппарата Гольджи и плазматической мембраны, а окаймленные *COP I* и *COP II* обычно опосредуют транспорт из ЭР и цистерн Гольджи (рис. 13.5). Однако, разнообразных окаймленных пузырьков, выполняющих различные функции, значительно больше, чем перечислено в этом коротком списке. Как мы обсудим ниже, существует несколько типов клатриновых пузырьков, каждый из которых специализируется на разных этапах транспорта. Окаймленные *COP I* и *COP II* пузырьки также могут быть разными.

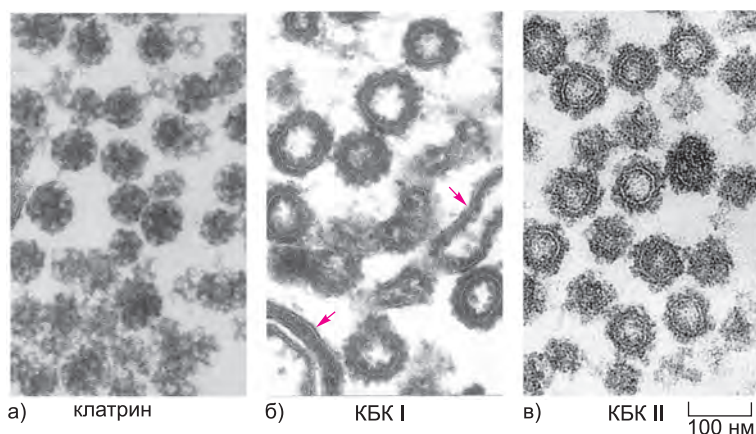


Рис. 13.4. Электронная микрофотография пузырьков, окаймленных клатрином, *COP I* и *COP II*. Электронные микрофотографии представлены в одном масштабе. (а) Окаймленные клатрином пузырьки. (б) Цистерны Гольджи (стрелки) в бесклеточной системе, от которых в пробирке отпочковываются окаймленные *COP I* пузырьки. (в) Окаймленные *COP II* пузырьки. (а и б, из L. Orci, B. Glick and J. Rothman, *Cell* 46: 171–184, 1986. С любезного разрешения издательства Elsevier; и Charles Barlowe and Lelio Orci (в).)

13.1.2. Сборка клатриновой оболочки является движущей силой формирования пузырьков

Клатриновые пузырьки, первые идентифицированные окаймленные пузырьки, транспортируют вещества из плазматической мембраны и между эндосомами и аппаратом Гольджи. Окаймленные ***COP I*-пузырьки** и ***COP II*-пузырьки** транспортируют вещества на ранних этапах секреторного пути: *COP II*-пузырьки отпочковываются от ЭР, а *COP I*-пузырьки — от компартмента Гольджи (см. рис. 13.5). Сначала мы обсудим клатриновые пузырьки, поскольку на их примере хорошо видно, как формируются везикулы.

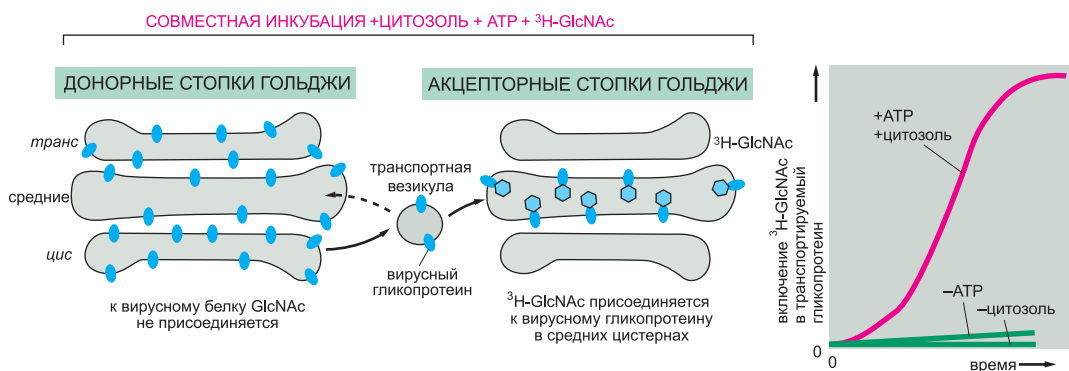
Основным белковым компонентом клатриновых везикул является сам **клатрин**. Каждая субъединица белка состоит из трех больших и трех маленьких полипептидных цепей, вместе образующих трехлопастную структуру, носящую название *трискелион*. Клатриновые трискелионы собираются в похожую на корзинку выпуклую сеть шестиугольников и пятиугольников, образующую окаймленную ямку на цитоплазматической поверхности мембраны (рис. 13.6). В подходящих условиях изолированные трискелионы в пробирке самопроизвольно собираются в характерные

БЕСКЛЕТОЧНЫЕ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ КОМПОНЕНТОВ И МЕХАНИЗМОВ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА

Везикулярный транспорт можно воссоздать в бесклеточных системах. Впервые это сделано для аппарата Гольджи. Когда стопки Гольджи изолируют от клеток и инкубируют с цитозолем и АТФ в качестве источника энергии, транспортные пузырьки отпочковываются от их краев и транспортируют белки между цистернами. Наблюдая за процессингом олиго-сахаридов на гликопротеинах по мере их продвижения из одного компартмента Гольджи в другой, можно проследить процесс везикулярного транспорта.

Для наблюдения транспорта вместе инкубируют две различные популяции стопок Гольджи. «Донорная» популяция выделяется из мутантных клеток, у которых отсутствует фермент N-ацетилглюкозамин (GlcNAc) трансфераза I и которые заражены вирусом; за счет мутации важный вирусный гликопротеин не может быть модифицирован ГлNAc в аппарате Гольджи мутантных клеток. «Акцепторные» стопки Гольджи

выделяются из неинфицированных клеток дикого типа и, следовательно, содержат нормальную копию GlcNAc-трансферазы I, но не несут вирусного гликопротеина. В смеси стопок Гольджи вирусный гликопротеин приобретает GlcNAc, что указывает на то, что он был транспортирован между цистернами, предположительно, посредством везикул, отпочковывающихся от цис-компартамента донорного Гольджи и сливающихся со средними цистернами акцепторного Гольджи, или посредством слияния цистерн двух аппаратов Гольджи. Такое транспортзависимое гликозилирование наблюдают путем измерения переноса ^3H -GlcNAc от UDP- ^3H -GlcNAc на вирусный гликопротеин. Транспорт происходит только в присутствии АТФ и цитозоля. Фракционирование цитозоля позволило идентифицировать несколько белков, необходимых для отпочковывания и слияния.



Похожие бесклеточные системы используются для изучения транспорта из средних цистерн Гольджи в транс-цистерны, из транс-цистерн в плазматическую мембрану, из эндосом в лизосомы, из транс-цистерн Гольджи в поздние эндосомы, и для изучения гомотипического слияния сходных компартментов, например эндосом и секреторных везикул.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА

Генетические исследования мутантных дрожжевых клеток с нарушенной секрецией позволили идентифицировать более 25 генов, принимающих участие в секреторном пути. Многие мутантные гены кодируют *температурочувствительные* белки. Они нормально функционируют при 25° С, но, когда температуру среды, где растут мутантные клетки (А-1), повышают, например, до 35° С, они теряют способность транспортировать белки из ЭР в аппарат Гольджи, из одних цистерн Гольджи в другие, или из аппарата Гольджи в вакуоли (лизосомы дрожжей) или плазматическую мембрану.

После идентификации при помощи данного метода белка, требующегося для транспорта, можно использовать явление *подавления множественных копий* для идентификации генов, кодирующих взаимодействующие с исходным белком. При высоких температурах температурозависимый мутантный белок зачастую обладает слишком низким сродством к своим нормальным партнерам. Однако если взаимодействующие белки синтезируются в концентрациях, значительно превышающих нормальные, связывание происходит и дефект устраняется. Для создания экспериментальной

парадигмы, в которой существуют такие высокие концентрации лигандов, в мутантные дрожжевые клетки (с температурочувствительной мутацией в гене, участвующем в везикулярном транспорте) вводят дрожжевой плазмидный вектор с клонированными случайными фрагментами нормальной дрожжевой ДНК. Поскольку эти плазмиды поддерживаются в клетке в большом количестве, клетки, несущие плазмиды с интактными генами, будут в избыточных количествах синтезировать нормальный продукт гена, позволяя некоторым клеткам выживать при высоких температурах. Соответствующие фрагменты ДНК, которые предположительно кодируют белки, взаимодействующие с исходным мутантным белком, можно затем выделить из выживших клонов.

Генетические и биохимические подходы дополняют друг друга, и многие белки, принимающие участие в везикулярном транспорте, независимо идентифицированы биохимическими исследованиями бесклеточных систем млекопитающих и генетическими исследованиями дрожжей.

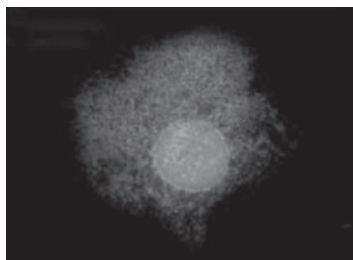
ХИМЕРНЫЕ БЕЛКИ С GFP СОВЕРШИЛИ ПЕРЕВОРОТ В ИЗУЧЕНИИ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО ТРАНСПОРТА

Одним из способов наблюдения за месторасположением белка в живой клетке является создание химерных белков, в которых зеленый флуоресцентный белок (GFP) методами генетической инженерии присоединяется к интересующему белку. Когда кДНК, кодирующая такой химерный белок, экспрессируется в клетке, белок сразу становится виден в флуоресцентный микроскоп, и его можно наблюдать в живой клетке в реальном времени. К счастью, присоединение GFP к большинству исследованных белков не влияет на их функционирование.

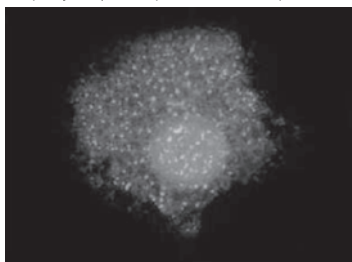
Химерные белки с GFP широко используются для изучения локализации и движения белков в клетках. GFP, присоединенные, например, к белкам, переносимым между ядром и цитоплазмой, ускорили исследование ядерного транспорта и регуляции. GFP, слитые с белками митохондрий или Гольджи, используются для исследования поведения этих органелл. GFP, связанные с белками плазматической мембраны, позволяют измерять кинетику их движения из ЭР по секреторному пути. Яркие примеры таких экспериментов можно посмотреть в форме фильмов на DVD, сопровождающем эту книгу.

При изучении химерных белков с GFP часто применяют методы FRAP и FLIP (см. главу 10), при которых определенные области клеток отбеливаются мощным пучком лазера. Можно определить скорость диффузии неотбеленных химерных белков с GFP в эту область и, следовательно, количественно охарактеризовать диффузию и транспорт белка в клетке. Например, этим методом установлено, что многие белки Гольджи рециркулируют между аппаратом Гольджи и ЭР.

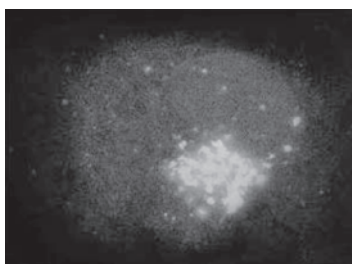
(а–г, с любезного разрешения Jennifer Lippincott-Schwartz Lab.)



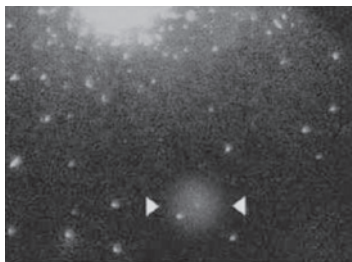
(а) В этом эксперименте культивируемые клетки экспрессируют химерный белок, состоящий из GFP и белка вирусной капсулы, носящего название белка оболочки вируса везикулярного стоматита. Вирусный белок представляет собой интегральный белок мембраны, который в норме движется по секреторному пути из ЭР на поверхность клетки, где, если клетка синтезирует другие компоненты вируса, собирается вирусная частица. Вирусный белок содержит мутацию, благодаря которой экспорт из ЭР происходит только при низкой температуре. Таким образом, при высокой температуре (как на рисунке) химерный белок окрашивает ЭР.



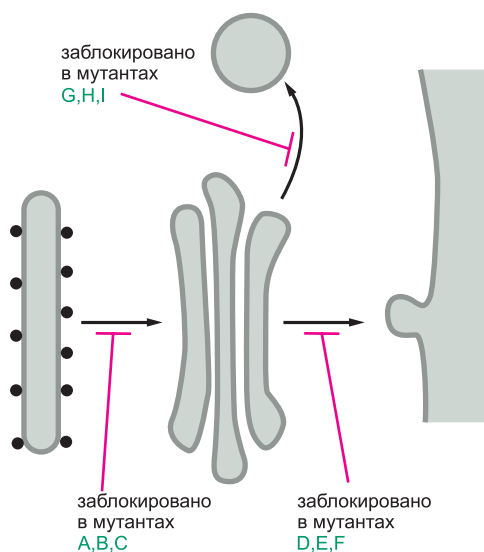
(б) При понижении температуры химерный белок быстро концентрируется в сайтах выхода из ЭР.



(в) Затем химерный белок транспортируется в аппарат Гольджи.



(г) Наконец, химерный белок доставляется в плазматическую мембрану и диффундирует в нее (стрелками показано слияние). Такого рода исследования позволяют измерить кинетику каждого этапа.



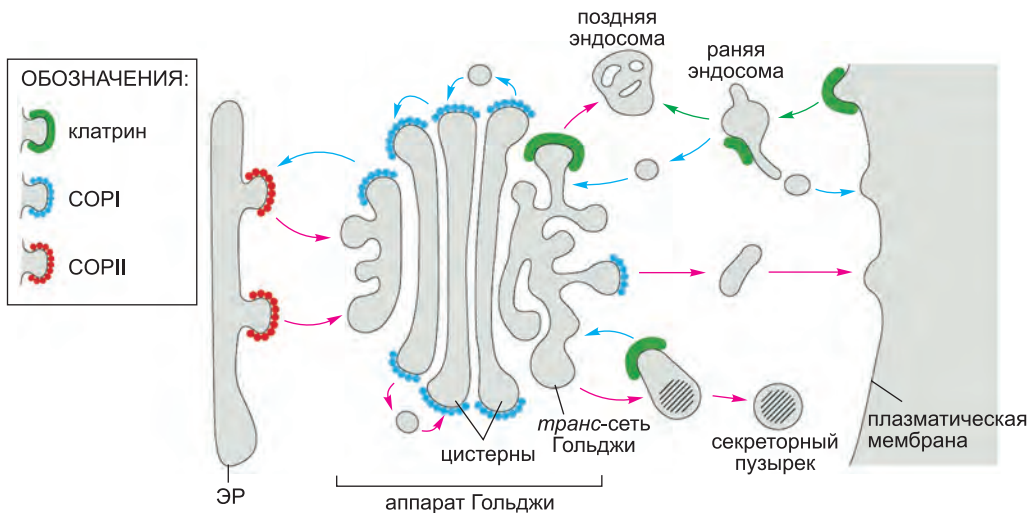


Рис. 13.5. Использование различного окаймления в везикулярном транспорте. Разные белки каймы улавливают разный груз и придают форму транспортным пузырькам, опосредующим разные этапы биосинтетического секреторного и эндоцитозного путей. Когда одинаковые белки каймы функционируют в различных областях клетки, они обычно несут разные субъединицы, модифицирующие их свойства (не показано). Многие дифференцированные клетки обладают, помимо показанных здесь, дополнительными путями, включая путь сортировки из *транс*-цистерн Гольджи на апикальную поверхность эпителиальных клеток и специализированный путь рециркуляции белков синаптических пузырьков в синапсах нейронов.

многоугольные сети, даже в отсутствие мембранных пузырьков, которые эти «корзинки» обычно окружают (рис. 13.7). Таким образом, клатриновые трискелионы определяют геометрию клатриновой оболочки.

Адаптерные белки, еще один важный компонент оболочки клатриновых пузырьков, образуют второй слой, располагающийся между клатриновой сетью и мембраной. Они связывают клатриновую оболочку с мембраной и иммобилизуют различные трансмембранные белки, включая трансмембранные рецепторы, захватывающие молекулы груза — так называемые *рецепторы груза*. Таким образом, определенный набор трансмембранных белков и взаимодействующих с ними растворимых белков упаковывается в каждую новообразованную клатриновую везикулу (рис. 13.8).

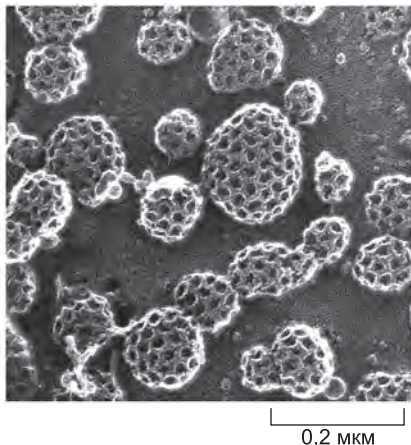


Рис. 13.6. Клатриновые ямки и пузырьки. На электронной микрофотографии, полученной после быстрой заморозки и глубокого травления, видны многочисленные клатриновые ямки и пузырьки на внутренней поверхности плазматической мембраны фибробластов в культуре. Для экспонирования цитоплазматической поверхности плазматической мембраны использовали быструю заморозку жидким гелием, фракционирование и глубокое травление. (Из J. Heuser, *J. Cell Biol.* 84: 560–583, 1980. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

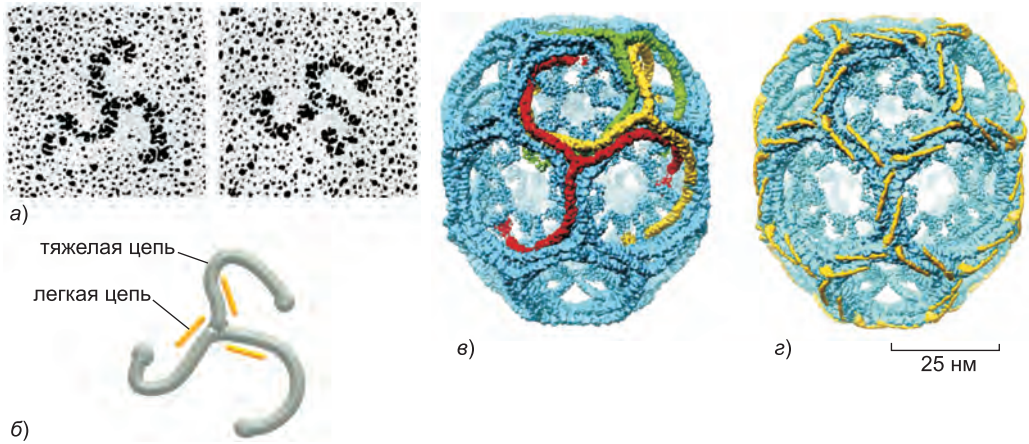


Рис. 13.7. Структура клатриновой оболочки. (а) Электронная микрофотография клатриновых трискелионов, полученная методом напыления платины. Каждый трискелион состоит из трех тяжелых цепей клатрина и трех легких цепей клатрина, как показано на (б). (в и г) Криоэлектронная микрофотография клатриновой оболочки, состоящей из 36 трискелионов, объединенных в сеть из 12 пятиугольников и 6 шестиугольников с обозначенными тяжелыми (в) и легкими (г) цепями. Переплетенные лопасти клатриновых трискелионов образуют внешнюю оболочку, в которую входят N-концевые домены трискелионов внутреннего слоя, видимые на открытых участках. Именно внутренний слой взаимодействует с адаптерными белками, показанными на рис. 13.8. Несмотря на то что показанная здесь оболочка слишком мала, чтобы образовать везикулу, клатриновые оболочки пузырьков устроены сходным образом и состоят из 12 пятиугольников и большого числа шестиугольников, напоминая по форме футбольный мяч. (а, из E. Ungewickell and D. Branton, *Nature* 289: 420–422, 1981; в и г, из A. Fotin et al., *Nature* 432: 573–579, 2004. Все с любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Существует несколько типов адаптерных белков. Наиболее полно охарактеризованы белки, состоящие из четырех разных белковых субъединиц; другие представляют собой одноцепочечные белки. Каждый тип адаптерных белков специфичен к определенному набору рецепторов груза, и их использование приводит к формированию различных клатриновых пузырьков. Клатриновые пузырьки, отшнуровывающиеся от различных мембран, используют различные адаптерные белки и, следовательно, несут различные рецепторы и молекулы груза.

Последовательная сборка адаптерных комплексов и клатриновой оболочки на цитоплазматической поверхности мембраны создает силы, приводящие к образованию клатриновых пузырьков. Латеральные взаимодействия между адаптерными комплексами и молекулами клатрина способствуют образованию везикулы.

13.1.3. Не все оболочки образуют корзиноподобную структуру

Не все оболочки такие же упорядоченные и универсальные, как клатриновые и СОР. Некоторые оболочки, скорее, представляют собой специализированные белковые комплексы, формирующие специфичные к определенным грузам «бляшки». Примером является **ретромер**, который собирается на эндосомах и образует везикулы, которые возвращают *рецепторы кислых гидролаз*, например *рецептор маннозо-6-фосфата*, в аппарат Гольджи (рис. 13.9). Позже мы рассмотрим роль этих рецепторов в доставке белков в новые лизосомы.

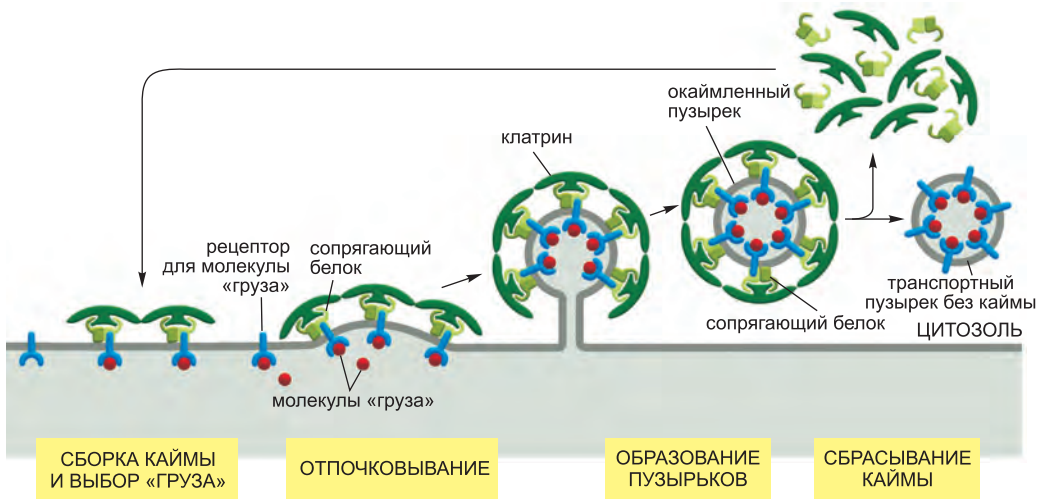


Рис. 13.8. Сборка и разборка клатриновой оболочки. Сборка оболочки придает изгиб мембране, который, в свою очередь, ведет к образованию одинаковых по размеру окаймленных бугорков. Адаптерные белки связывают клатриновые трискелионы и связанные с мембраной рецепторы «груза», опосредуя селективную упаковку мембранных молекул и молекул «груза» в везикулу. Клатриновая оболочка быстро сбрасывается после образования пузырька.

Ретромер — это мультибелковый комплекс, который собирается на мембранах эндосом, только когда:

- 1) он способен связаться с цитоплазматическими хвостами рецепторов груза,
- 2) он может напрямую взаимодействовать с изогнутым фосфолипидным бислоем, и
- 3) он может связаться со специфическим фосфорилированным фосфатидилинозитольным липидом (*фосфоинозитидом*), который, как мы обсудим ниже, служит маркером эндосом.

Поскольку эти три условия должны выполняться одновременно, предполагается, что ретромер служит *детектором совпадений* и собирается только в правильное время и в правильном месте. После связывания в форме димера он стабилизирует изгиб мембраны, что увеличивает вероятность связывания рядом дополнительных ретромеров. Затем кооперативная сборка ретромеров приводит к образованию и отщуровыванию транспортного пузырька, который доставляет свой груз в аппарат Гольджи.

Адаптерные белки, присутствующие в клатриновых оболочках, также связываются с фосфоинозитидами, которые не только играют важную роль в управлении тем, когда и где оболочки собираются в клетке, но также более широко используются в качестве молекулярных маркеров компартментов, что способствует регуляции внутриклеточного транспорта.

13.1.4. Фосфоинозитиды маркируют органеллы и мембранные домены

Несмотря на то что инозитольные фосфолипиды обычно составляют менее 10 % всех фосфолипидов мембраны, они выполняют важные регуляторные функции. Они

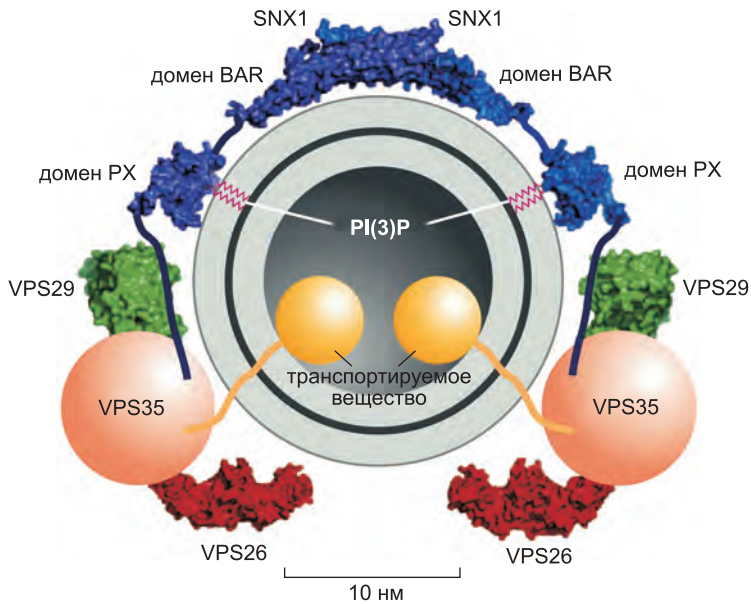


Рис. 13.9. Модель сборки ретромеров на эндосомальных мембранах. Четыре субъединицы ретромера, SNX1, VPS29, VPS35 и VPS26, образуют окаймленные домены на эндосомальных мембранах. Они захватывают молекулы груза, включая трансмембранные белки, например рецепторы кислых гидролаз, в везикулы, возвращающиеся в *транс*-сеть Гольджи. VPS35 связывается с цитоплазматическими хвостами транспортируемых трансмембранных белков. Белок SNX1 содержит несколько разных белковых модулей: *домен PX*, связывающийся с фосфорилированным фосфоинозитолом PI(3)P, и *домен BAR*, который опосредует димеризацию и прикрепление к изогнутым мембранам. Домены PX и BAR — белковые модули, встречающиеся у многих белков, в которых они выполняют сходные функции. За исключением PI(3)P, который увеличен для наглядности, мембрана и остальные компоненты изображены в масштабе. (Адаптировано из J. S. Bonifacino and R. Rojas, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 568–579, 2006. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

претерпевают быстрые циклы фосфорилирования и дефосфорилирования в положениях 3', 4' и 5' своей инозитольной углеводной головной группы с образованием различных типов **фосфоинозитидов (PIP)**. Взаимопревращение фосфоинозида (PI) и PIP компартментализовано: разные органеллы в эндоцитозном и биосинтетическом секреторном путях несут разные наборы PI- и PIP-киназ и PIP-фосфатаз (**рис. 13.10**). Распределение, регуляция и локальное равновесие этих ферментов определяют стационарное распределение всех разновидностей PIP. В результате распределение PIP изменяется от органеллы к органелле и зачастую в пределах непрерывной мембраны от одной ее области к другой, разбивая ее на специализированные мембранные домены.

Многие белки, принимающие участие в различных этапах везикулярного транспорта, содержат домены, с высокой специфичностью связывающиеся с головными группами определенных PIP, отличая одну фосфорилированную форму от другой. Таким образом, локальная регуляция PI- и PIP-киназ и PIP-фосфатаз может использоваться для быстрой регуляции сайтов связывания белков с мембраной или мембранным доменом. Синтез определенного типа PIP рекрутирует белки, содержащие подходящие PIP-связывающие домены. Затем PIP-связывающие белки

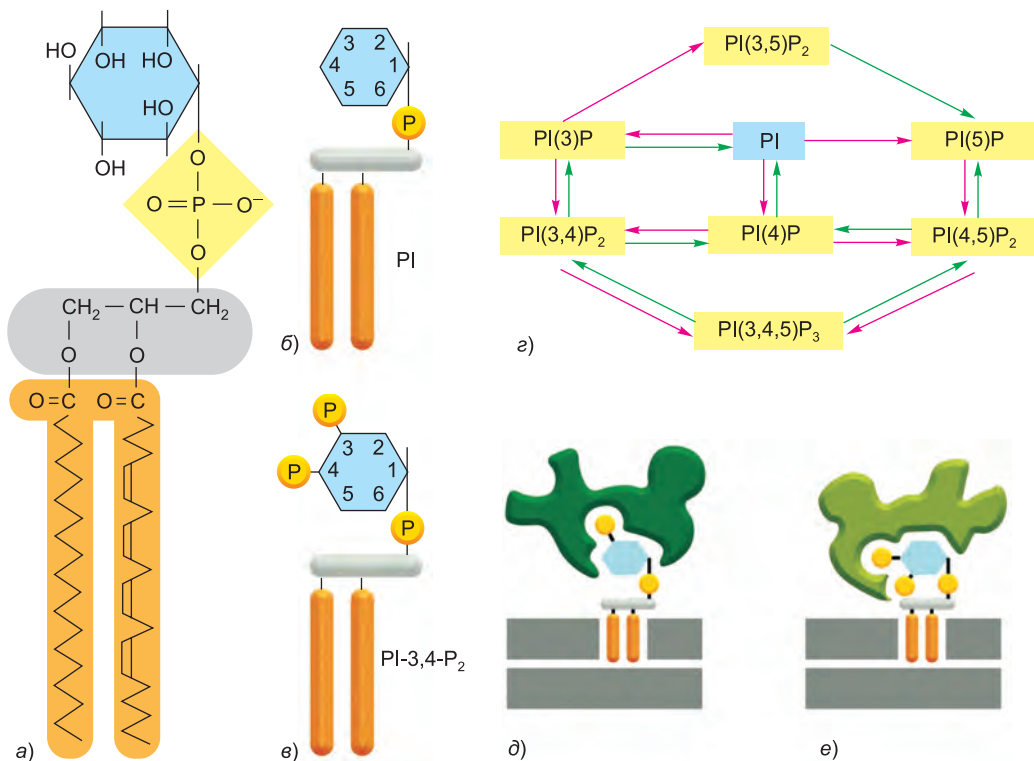


Рис. 13.10. Фосфатидилинозитол (PI) и фосфатидилинозитиды (PIP). (а, б) На структуре PI видны три свободные гидроксильные группы, которые, в принципе, могут быть модифицированы. (в) Фосфорилирование одной, двух или трех гидроксильных групп PI PI- или PIP-киназами формирует разнообразие видов PIP. Их названия составляют путем добавления к PI положения фосфатных групп в кольцо (в скобках) и их числа (нижний индекс). Показан PI(3,4)P₂. (г) В животных клетках содержится несколько PI- и PIP-киназ и такое же число PIP-фосфатаз, которые локализованы в разных органеллах, где они регулируются и катализируют синтез определенных PIP. Красными и зелеными стрелками показаны реакции киназ и фосфатаз соответственно. (д, е) Фосфоинозитидные головки узнают белковые домены, способные различать разные виды PIP. Таким образом, определенные группы белков, содержащие такого рода домены, рекрутируются в области мембраны, где присутствуют эти фосфоинозитиды. Показаны PI(3)P и PI(4,5)P₂. (г, модифицировано из M. A. de Matteis and A. mGodi, *Nat. Cell Biol.* 6: 487–492, 2004. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

способствуют регуляции образования везикул и других этапов внутриклеточного транспорта (**рис. 13.11**). Сходная стратегия широко используется для рекрутирования специфических внутриклеточных сигнальных белков к плазматической мембране в ответ на внеклеточные сигналы (см. главу 15).

13.1.5. Цитоплазматические белки регулируют отшнуровывание и сбрашивание оболочки окаймленных везикул

По мере роста окаймленного клатрином бугорка растворимые цитоплазматические белки, включая **динамин**, собираются в кольцо вокруг основания каждого бугорка (**рис. 13.12**). Динамин содержит PI(4,5)P₂-связывающий домен, который

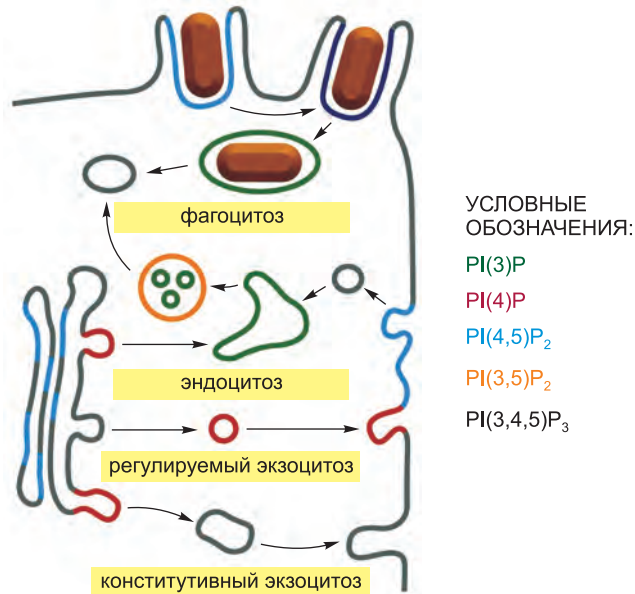


Рис. 13.11. Внутриклеточная локализация фосфоинозитидов. Различные типы PIP располагаются в различных мембранах и мембранных доменах, где они часто принимают участие в специфических событиях везикулярного транспорта. Например, мембрана секреторных пузырьков содержит PI(4)P. Когда пузырьки сливаются с плазматической мембраной, расположенная там PI 5-киназа превращает PI(4)P в PI(4,5)P₂. PI(4,5)P₂, в свою очередь, способствует рекрутированию адаптерных белков, которые инициируют формирование клатриновых окаймленных ямок, что является первым этапом опосредованного клатрином эндоцитоза. Как только клатриновый пузырек отпочковывается от плазматической мембраны, PI(5)P-фосфатаза гидролизует PI(4,5)P₂, что ослабляет связывание с адаптерными белками и вызывает сбрасывание везикулой белковой оболочки. Мы обсудим фагоцитоз и различия между регулируемым и конститутивным экзоцитозом позже в этой главе. (Модифицировано из M. A. de Matteis and A. Godi, *Nat. Cell Biol.* 6: 487–492, 2004. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

прикрепляет белок к мембране, и GTPазный домен, который регулирует скорость отшнуровывания везикул от мембраны. В процессе отшнуровывания два нецитоплазматических монослоя мембраны сближаются и сливаются, запечатывая образующийся пузырек. Для этого динамин рекрутирует к основанию отпочковывающегося пузырька другие белки, и все вместе они способствуют изгибу участка мембраны за счет прямого нарушения структуры бислоя путем изменения его липидного состава через рекрутирование модифицирующих липиды ферментов либо за счет обоих механизмов.

Вскоре после того как пузырек отделился от мембраны, он теряет свою клатриновую оболочку. PIP-фосфатаза, которая также содержится в окаймленных пузырьках, убирает из мембраны PI(4,5)P₂, что ослабляет связывание с адаптерными белками. Более того, шаперон Hsp70 служит АТРазой «раздевания» везикул, используя гидролиз АТФ для удаления клатриновой оболочки. Считается, что ауксинин, еще один белок везикул, активирует АТРазу. Поскольку окаймленный бугорок существует значительно дольше, чем оболочка везикулы, дополнительные механизмы регуляции препятствуют удалению клатрина до окончательного образования везикулы (см. ниже).

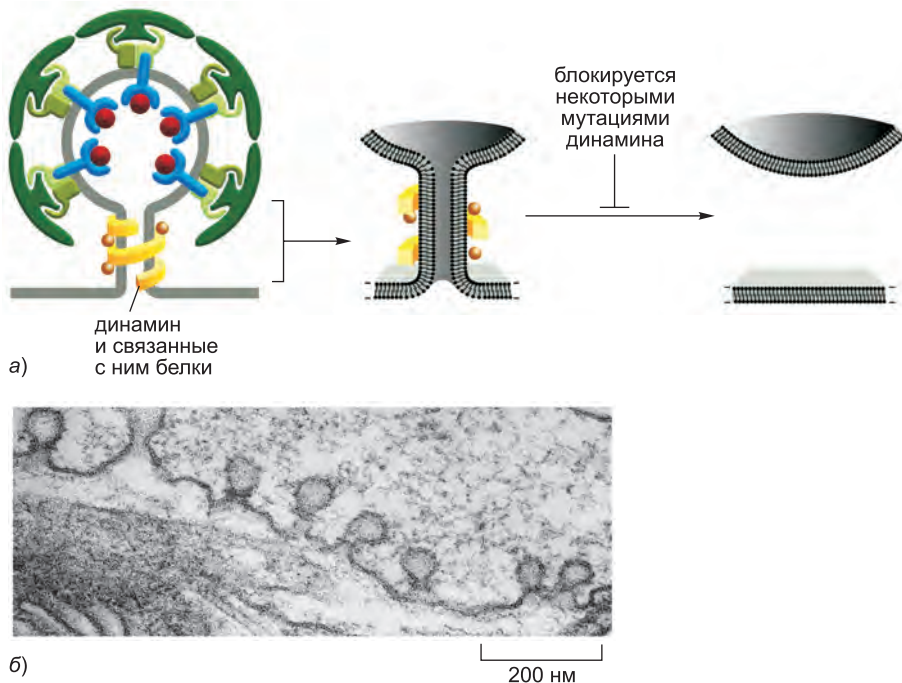


Рис. 13.12. Роль динамина в отшнуровывании клатриновых пузырьков. (а) Динамин собирается в кольцо вокруг основания формирующегося пузырька. Предполагают, что динаминовое кольцо привлекает к основанию везикулы другие белки, которые вместе с динамином дестабилизируют взаимодействующие липидные бислои, что приводит к слиянию нецитоплазматических монослоев. Затем новообразованная везикула отшнуровывается от мембраны. Определенные мутации динамина могут как ускорить, так и блокировать процесс отшнуровывания. (б) Динамин открыли в мутантах *shibire* мушки *Drosophila*. У этих мутантных мушек наступает паралич, вызванный дефектом динамина, останавливающим опосредуемый клатрином транспорт и, следовательно, рециркуляцию синаптических пузырьков и высвобождение нейромедиатора. В нервных клетках мушек формируются изогнутые клатриновые ямки, в основании которых лежит кольцо динамина, как показано на микрофотографии в поперечном срезе. Отшнуровывания не происходит, потому что не происходит слияния мембран. (б, из J. H. Koenig and I. Ikeda, *J. Neurosci.* 9: 3844–3860, 1989. С любезного разрешения Society of Neuroscience.)

13.1.6. Мономерные GTPазы регулируют сборку оболочек

Белки окаймления для уравнивания везикулярного транспорта между компартментами должны собираться только там, где они нужны, и только тогда, когда они нужны. Хотя локальный синтез РИР играет важную роль в регуляции сборки клатриновых оболочек на плазматической мембране и в аппарате Гольджи, в клетках существуют дополнительные пути регуляции образования каймы. *Рекрутирующие оболочку GTPазы*, например, контролируют сборку клатриновых оболочек на эндосомах и СОРІ и СОРІІ на мембранах Гольджи и ЭР.

Многие этапы везикулярного транспорта зависят от различных GTP-связывающих белков, контролирующих пространственный и временной аспекты обмена мембранами. Как обсуждается в главе 3, GTP-связывающие белки регулируют большинство процессов в эукариотических клетках. Они служат молекулярными переключателями, переходящими из активного состояния при связывании GTP в неактивное при связы-

вании GDP. Два класса белков регулируют переход между состояниями: *факторы обмена гуаниновых нуклеотидов* (*Guanine-Nucleotide-Exchange Factors — GEF*) активируют белки, катализирующие обмен GDP на GTP, и GTPаза-активирующие белки (*GTPase-Activating Proteins, GAP*) инактивируют белки за счет инициации гидролиза связанного GTP до GDP (см. рис. 3.71). Несмотря на то что как мономерные GTP-связывающие белки (мономерные GTPазы), так и тримерные GTP-связывающие белки (G-белки) играют важную роль в везикулярном транспорте, роль мономерных GTPаз лучше изучена, и здесь мы сконцентрируемся на них.

Рекрутирующие оболочку GTPазы входят в семейство мономерных GTPаз. Они включают в себя белки **Arf** (*ADP ribosylation factor* — фактор рибосилирования ADP), которые отвечают за сборку клатриновых и COPI-оболочек в мембранах Гольджи, и белок **Sar1**, который отвечает за сборку COPII-оболочки в ЭР. Рекрутирующие оболочку GTPазы в цитоплазме обычно содержатся в больших концентрациях в неактивном, связанном с GDP состоянии. Когда окаймленная COPII везикула отпочковывается от мембраны ЭР, специфическая Sar1-GEF мембраны ЭР связывается с цитоплазматическим Sar1, который в результате высвобождает GDP и связывает GTP. (Вспомните, что в цитозоле GTP содержится в значительно больших концентрациях, чем GDP, и, следовательно, будет самопроизвольно связываться с белком после отделения GDP.) В GTP-связанном состоянии белок Sar1 выставляет наружу амфифильную спираль, которая входит в цитоплазматический монослой липидного бислоя мембраны ЭР. Затем связанный Sar1 привлекает в мембрану ЭР белковые субъединицы оболочки для инициации отпочковывания (рис. 13.13). Остальные GEF и рекрутирующие оболочку GTPазы в других мембранах действуют сходным образом.

Некоторые белки оболочки также взаимодействуют, хотя и слабее, с головками определенных липидных молекул, а именно с фосфатидной кислотой и фосфоинозитидами, а также с цитоплазматическими хвостами некоторых трансмембранных белков, которые они рекрутируют в бугорок. Все вместе эти белок-липидные и белок-белковые взаимодействия крепко связывают оболочку с мембраной, заставляя последнюю сначала формировать ямку, а затем отшнуровываться в форме окаймленного пузырька.

Рекрутирующие оболочку GTPазы также играют роль в разборке каймы. Гидролиз связанного GTP до GDP вызывает изменение конформации GTPазы, приводящее к выходу ее гидрофобного хвоста из мембраны и разборке оболочки пузырька. Несмотря на то что до сих пор точно не известно, как запускается процесс гидролиза GTP, предполагают, что GTPазы работают как таймеры, медленно гидролизующие GTP. Причем скорость гидролиза можно предсказать. Например, COPII-оболочки ускоряют гидролиз GTP белком Sar1, запуская разборку оболочки в определенный момент времени после начала ее сборки. Таким образом, полностью сформированная везикула будет образовываться, только если образование ямки происходит быстрее, чем запрограммированный процесс разборки; в противном случае разборка начнется до отшнуровывания пузырька, и процесс должен будет начаться заново в более подходящем месте и в более подходящее время.

Считают, что другие окаймленные пузырьки образуются сходным образом. Рекрутирующая оболочку GTPаза Arf также содержит регулируемую амфифильную спираль, но, в отличие от Sar1, ее спираль несет ковалентно связанную жирнокислотную цепь, которая вносит вклад в ее гидрофобность. Как и в Sar1, регулируемая амфифильная спираль спрятана в GDP-связанном состоянии и выдвигается при связывании GTP.

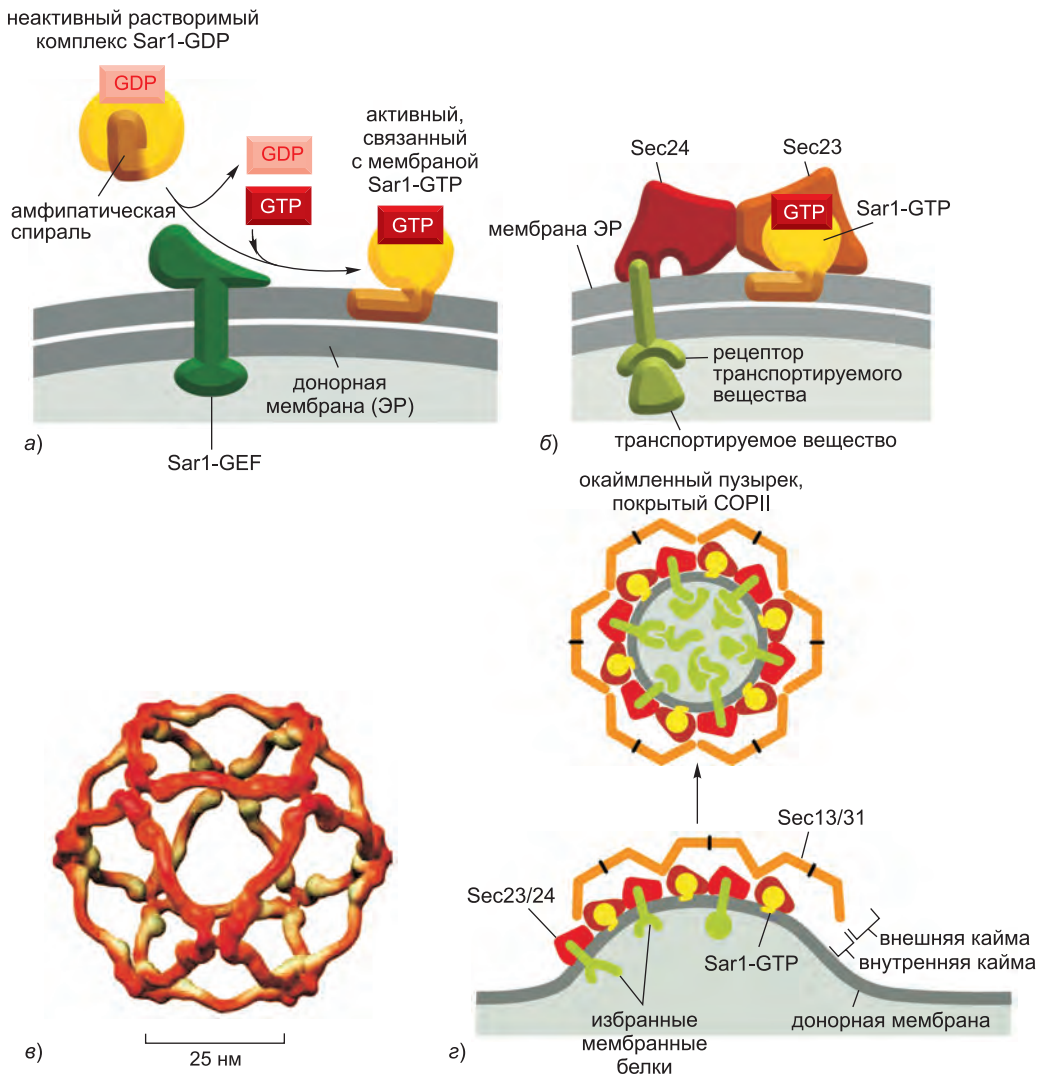


Рис. 13.13. Образование окаймленной COPII-везикулы. (а) Белок Sar1 представляет собой рекрутирующую оболочку GTPазу. В неактивном состоянии растворимый Sar1-GDP связывается с Sar1-GEF в мембране ЭР, после чего Sar1 высвобождает GDP и связывает GTP. Sar1-GEF (или Sec12) обнаружен в температурочувствительных мутантах, у которых заблокирован транспорт из ЭР в аппарат Гольджи (см. приложение 13.1). GTP-зависимая конформационная перестройка Sar1 приводит к выходу наружу амфифильной спирали, которая встраивается в цитоплазматический монослой мембраны ЭР, запуская процесс инвагинации мембраны. (б) GTP-связанный Sar1 связывается с комплексом двух COPII — Sec23 и Sec24. Кристаллическая структура Sec23/24 и Sar1 позволяет предсказать, как амфифильная спираль Sar1 заякоривает комплекс в мембране. На Sec24 расположено несколько разных сайтов связывания цитоплазматических хвостов рецепторов груза. Вся поверхность комплекса, взаимодействующая с мембраной, мягко изгибается, чтобы соответствовать диаметру окаймленной COPII везикулы. (в) Комплекс двух дополнительных белков COPII, Sec13 и Sec31, образует внешний слой оболочки. Как и клатрин, комплекс Sec13/31 сам по себе способен собираться в симметричные сетки подходящего для окаймления везикулы размера. (г) Связанный с мембраной активный Sar1-GTP рекрутирует к мембране субъединицы COPII. Это вызывает формирование на мембране бугорка, в котором содержатся определенные трансмембранные белки. При последующем слиянии мембран везикула отшнуровывается.

Как мы обсудим ниже, *GTPазы Rab* сходным образом регулируют свое прикрепление к мембране (см. рис. 13.14, в, модифицировано из S.M. Stagg et al., *Nature* 439: 234–238, 2006. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.).

13.1.7. Не все транспортные везикулы имеют сферическую форму

Несмотря на то что отпочковывание везикул в различных компартментах клетки обладает многими сходными признаками, каждая клеточная мембрана обладает особыми свойствами. Плазматическая мембрана, например, относительно плоская и жесткая за счет обогащенного холестерина липидного состава и нижележащего кортикального цитоскелета. Таким образом, клатриновые оболочки должны прикладывать значительную силу для образования изгиба, особенно в основании выпячивания, где динамин и связанные с ним белки создают крутые изгибы, необходимые для отшнуровывания. С другой стороны, отпочковывание везикул от многих внутриклеточных мембран происходит преимущественно на участках, где мембрана уже изогнута, например на краях цистерн Гольджи или кончиках мембранных трубочек. На этих участках основной функцией оболочек является захват соответствующего груза, а не деформация мембраны.

Транспортные везикулы бывают разных форм и размеров. Когда методами генной инженерии живые клетки заставляют экспрессировать флуоресцентные мембранные компоненты, в флуоресцентном микроскопе видно, как от эндосом и *транс*-сети Гольджи непрерывно отходят длинные трубочки. Белки окаймления собираются на трубочках и способствуют захвату определенного груза. Затем трубочки либо втягиваются обратно, либо отшнуровываются при помощи динамин-подобных белков и образуют транспортные везикулы. В зависимости от относительной эффективности образования трубочек и процесса отшнуровывания образуются везикулы различных форм и размеров. Таким образом, везикулярный транспорт не обязательно опосредуется сферическими пузырьками одного размера, в нем могут участвовать большие участки донорной органеллы.

Трубочки обладают большим соотношением площади к объему, чем органеллы, из которых они образуются. Таким образом, по сравнению с растворимыми белками они несут большее количество мембранных белков. Как мы обсудим ниже, это свойство трубочек используется белками сортировки в эндосомах.

13.1.8. Белки Rab направляют везикулы к их мишеням

Чтобы обеспечить упорядоченный везикулярный транспорт, транспортные пузырьки должны быть высокоселективными при узнавании правильной мембраны-мишени и слиянии с ней. За счет разнообразия и плотной упаковки мембранных систем в цитоплазме везикула, скорее всего, встретит много потенциальных мембран-мишеней, прежде чем найдет нужную. Специфичность узнавания обеспечивается тем, что все транспортные везикулы несут поверхностные маркеры, указывающие на их происхождение и тип груза, а мембраны-мишени несут комплементарные рецепторы, связывающие соответствующие маркеры. Этот ключевой процесс зависит от двух типов белков: *белки Rab* направляют везикулу к определенным участкам на правильной мембране-мишени, а *белки SNARE* опосредуют слияние с липидным бислоем.

Белки Rab играют центральную роль в специфичности везикулярного транспорта. Как и рассмотренные ранее рекрутирующие оболочки *GTPазы* (см. рис. 13.13),

они представляют собой мономерные ГТРазаы. Они формируют самое крупное подсемейство таких ГТРаза, состоящее из более 60 белков. Каждый белок Rab соотнесен с одной или несколькими мембранными органеллами биосинтетического секреторного или эндоцитозного пути, и каждая из этих органелл несет по крайней мере один белок Rab на своей цитоплазматической поверхности (**таблица 13.1**). Их крайне селективное распределение на этих мембранных системах делает белки Rab идеальными молекулярными маркерами для идентификации каждого типа мембраны и направления везикулярного транспорта между ними. Белки Rab могут функционировать на транспортных мембранах, на мембранах-мишенях или и там, и там.

Как и рекрутирующие оболочку ГТРазаы, белки Rab циркулируют между мембраной и цитозолем и регулируют обратимую сборку белковых комплексов на мембране. В связанном с GDP состоянии они неактивны и связаны с другим белком (*ингибитор диссоциации GDP — Rab-GDP Dissociation Inhibitor, GDI*), который делает их растворимыми в цитозоле. В GTP-связанном состоянии они активны и прикреплены к мембране органеллы или транспортной везикулы. Связанные с мембраной Rab-GEF активируют белки Rab как на транспортных везикулах, так и на мембранах-мишенях, поскольку активированные молекулы Rab обычно необходимы с обеих сторон. Как только Rab связывают GTP и заякориваются в мембране посредством гидрофобного липидного хвоста, они связывают другие белки, **эффекторы Rab**, которые ускоряют везикулярный транспорт, укрепляют белок в мембране и способствуют слиянию (**рис. 13.14**). Гидролиз GTP определяет концентрацию активного Rab и, следовательно, концентрацию эффекторов на мембране.

В отличие от высококонсервативной структуры белков Rab, структура эффекторов Rab значительно варьирует. Некоторые эффекторы Rab, например, представляют собой *двигательные белки*, которые толкают везикулы вдоль актиновых филаментов или микротрубочек к мембранам-мишеням. Другие представляют собой *соединительные белки*, некоторые из которых несут длинные нитевидные домены, которые способны связывать мембраны на расстоянии 200 нм и более; некоторые соединительные белки формируют крупные комплексы, связывающие близко расположенные мембраны. Эффекторы Rab также способны взаимодействовать с SNARE, сопрягая заякоривание в мембране со слиянием.

Одни и те же белки Rab могут связываться с несколькими эффекторами. Объединение белков Rab с их эффекторами на мембране является кооперативным

Таблица 13.1 Субклеточная локализация некоторых белков Rab

Белок	Органелла
Rab1	ЭР и комплекс Гольджи
Rab2	<i>цис</i> -сеть Гольджи
Rab3A	синаптические пузырьки, секреторные гранулы
Rab4/Rab11	рециркулирующие эндосомы
Rab5A	плазматическая мембрана, клатриновые пузырьки, ранние эндосомы
Rab5C	ранние эндосомы
Rab6	средние и <i>транс</i> -цистерны Гольджи
Rab7	поздние эндосомы
Rab8	ранние эндосомы
Rab9	поздние эндосомы, <i>транс</i> -сеть Гольджи

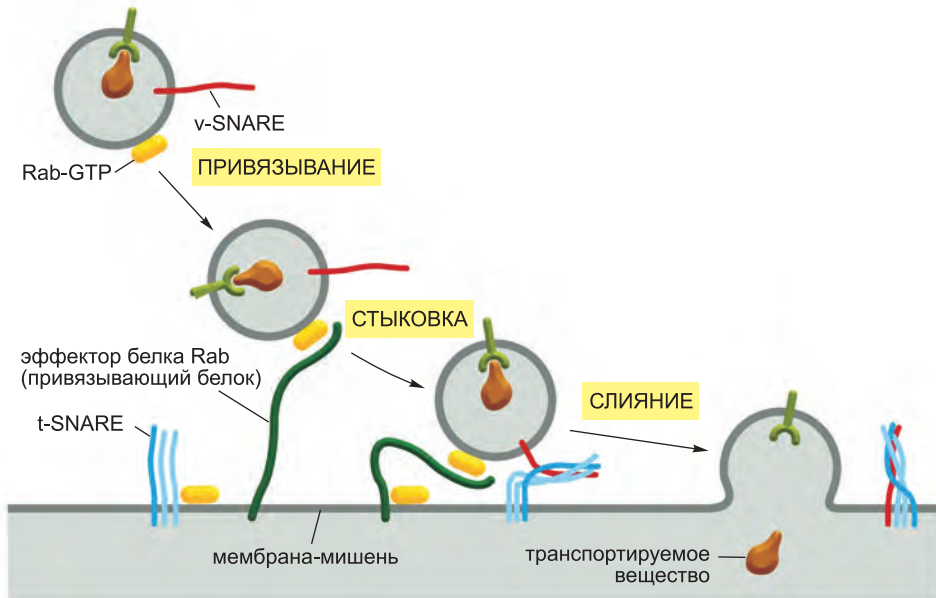


Рис. 13.14. Заякоривание везикулы в мембране-мишени. Эффекторные белки Rab взаимодействуют посредством активных белков Rab (Rab-GTP, желтые), расположенных в мембране везикул или и там, и там, и устанавливают первую связь между двумя сливающимися впоследствии мембранами. В приведенном здесь примере эффектор Rab представляет собой филаментный соединительный белок (зеленый). Затем белки SNARE на двух мембранах (красные и голубые) связываются для заякоривания везикулы в мембране-мишени и катализируют слияние двух расположенных друг напротив друга мембран.

процессом и приводит к образованию крупных специализированных мембранных доменов. Rab5, например, собирается на эндосомальных мембранах и опосредует захват клатриновых везикул, приходящих из плазматической мембраны. Он рекрутирует соединительные белки, улавливающие прибывающие везикулы. Rab5-GEF сначала рекрутирует Rab5 на эндосому и переводит его в активную GTP-связанную форму, которая заякоривается в мембране (рис. 13.15). Активный Rab5 рекрутирует дополнительные Rab5-GEF в эндосомы, способствуя, таким образом, привлечению еще большего числа Rab5. Более того, активный Rab5 активирует PI 3-киназу, которая локально превращает PI в PI(3)P, который, в свою очередь, связывается с некоторыми эффекторами Rab. Такой тип положительной обратной связи значительно ускоряет процесс сборки и способствует формированию функционально отличающихся друг от друга доменов в пределах одной непрерывной мембраны.

Эндосомальная мембрана — яркий пример того, как различные белки Rab и их эффекторы способствуют формированию множественных мембранных доменов, каждый из которых выполняет свой определенный набор функций. Таким образом, когда домен Rab5 принимает прибывающие из плазматической мембраны везикулы, в той же мембране отличные от него домены Rab11 и Rab4 организуют отпочковывание рециркулирующих везикул, которые возвращают белки из эндосом в плазматическую мембрану. После сборки эти домены продолжительное время сосуществуют в мембране.

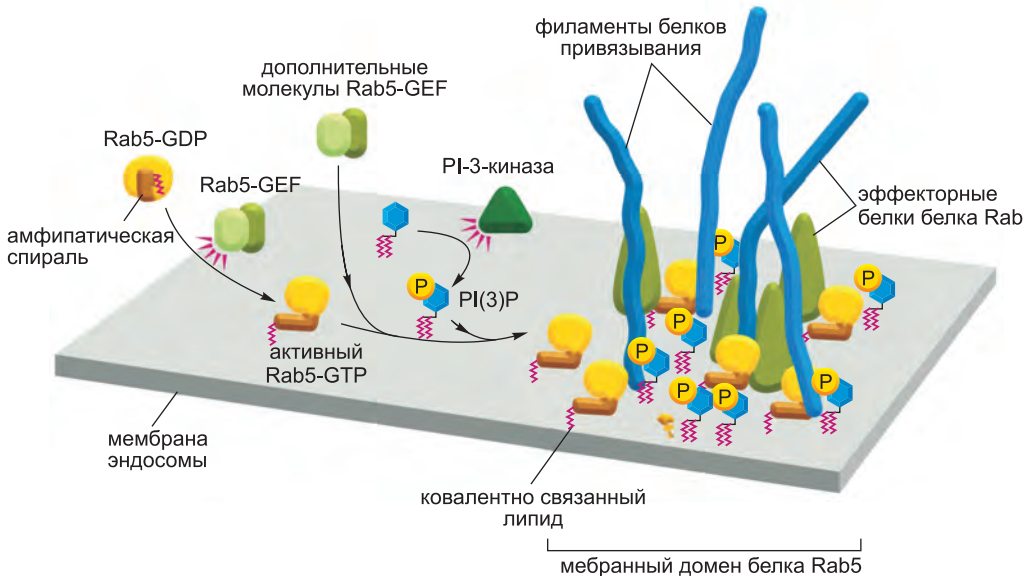


Рис. 13.15. Образование Rab5 домена на мембране эндосомы. Rab5-специфический GEF в мембране эндосомы связывает белок Rab5 и вызывает обмен GDP на GTP. Связывание GTP изменяет конформацию белка Rab, делая доступной его амфифильную спираль и ковалентно связанную с ней липидную группу, которые вместе закоривают Rab5-GTP в мембране. Активный Rab5 активирует PI 3-киназу, которая превращает PI в PI(3)P. PI(3)P и активный Rab5 вместе связывают разнообразных эффекторов Rab, содержащие сайты связывания PI(3)P, в числе filament-ные соединительные белки, улавливающие клатриновые везикулы из плазматической мембраны. Активный Rab5 также рекрутирует Rab5-GEF, ускоряя сборку Rab5-домена на мембране.

Предполагают, что контролируемые циклы гидролиза GTP и обмена GDP на GTP динамически регулируют размер и активность таких доменов Rab. В отличие от интегральных белков мембраны SNARE GTP/GDP, обмен, сопряженный с циклом транслокации мембрана/цитозоль, придает аппарату Rab способность собираться и разбираться на мембране. Например, во время транспорта из ранних в поздние эндосомы Rab5 может быть замещен Rab7, что приводит к деградации груза. (Адаптировано из M. Zerial and H. McBride, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 107–117, 2001. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

13.1.9. Белки SNARE опосредуют слияние мембран

После того как транспортный пузырек привязался к мембране, он разгружает свое содержимое путем слияния мембран. Чтобы объединиться при слиянии мембран, липидные бислои должны сблизиться на расстояние 1,5 нм. Когда мембраны находятся на таком близком расстоянии, липиды могут переходить из одного бислоя в другой. Для такого сближения с гидрофильной поверхности мембраны должна быть удалена вода. Этот процесс энергетически очень невыгоден. По-видимому, специализированные белки слияния, преодолевающие этот энергетический барьер, катализируют все процессы слияния мембран в клетках. Мы уже обсудили роль динамина в сходном процессе отщипывания клатриновых везикул (см. рис. 13.12).

Белки SNARE (SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptors — рецепторы растворимого белка прикрепления к NSF) катализируют реакции слияния мембран при везикулярном транспорте. Они также вносят вклад в специфичность процес-

са транспорта, позволяя только правильно направленным везикулам сливаться. В животной клетке содержится по крайней мере 35 различных SNARE, каждый из которых связан с определенной органеллой в биосинтетическом секреторном и эндоцитозном путях. Эти трансмембранные белки существуют в форме комплементарных наборов, причем **v-SNARE** (v от «vesicle» — везикула) обычно располагаются в мембране везикул, а **t-SNARE** (t от «target» — мишень) — в мембранах-мишенях (см. рис. 13.14). v-SNARE — это одна полипептидная цепь, тогда как t-SNARE состоят из двух или трех белков (рис. 13.16). v-SNARE и t-SNARE содержат характерные спиральные домены, и, когда v-SNARE взаимодействует с t-SNARE, спиральный домен одного белка оборачивается вокруг спирального домена другого и образуется стабильный четырехспиральный тяж. Образующиеся транс-SNARE комплексы иммобилизуют две мембраны относительно друг друга.

SNARE лучше всего охарактеризованы в нейронах, где они опосредуют докинг и слияние синаптических пузырьков на плазматической мембране нервных окончаний в процессе высвобождения нейромедиатора. Бактерии, вызывающие столбняк и ботулизм, секретируют сильные протеолитические нейротоксины, которые проникают в определенные нейроны и отщепляют белки SNARE в нервных окончаниях. Таким образом, бактерии нарушают процесс синаптической передачи, что зачастую приводит к смерти.

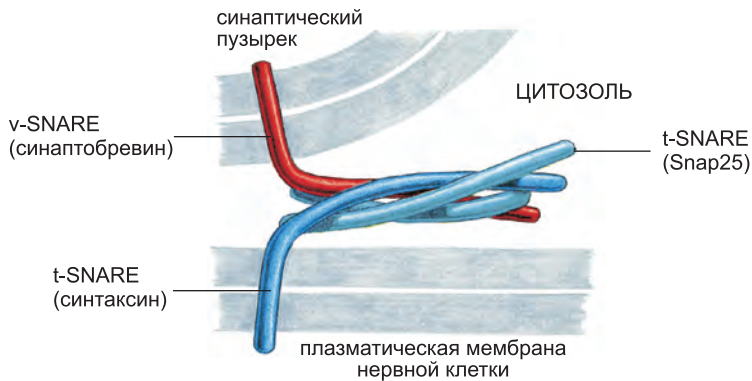
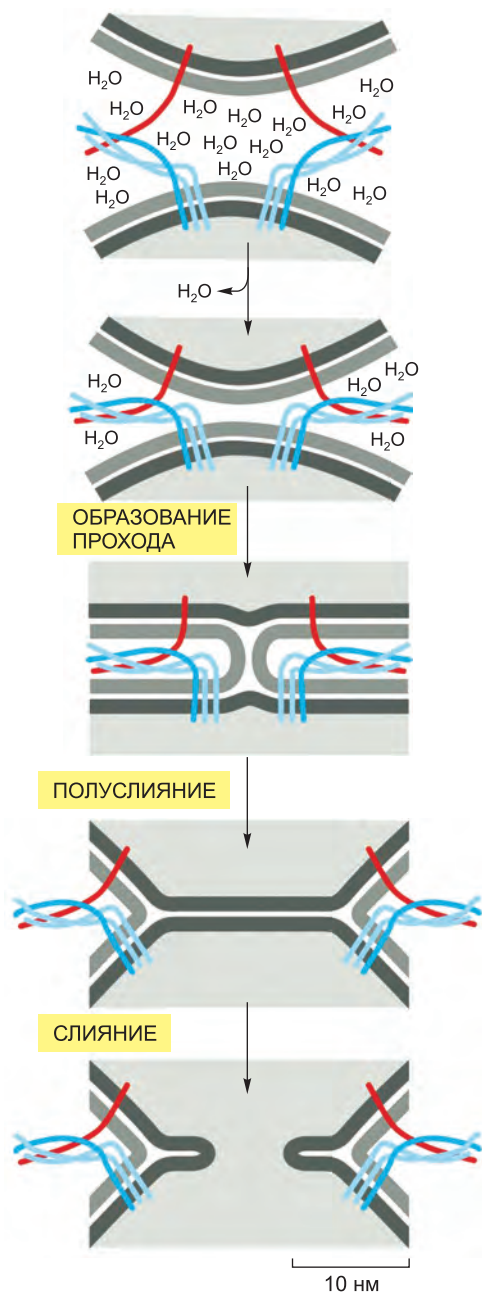


Рис. 13.16. Структура транс-SNARE комплекса. Белки SNARE, отвечающие за докинг синаптических пузырьков на плазматической мембране нервных окончаний, состоят из трех белков. *Синаптобrevин* белка v-SNARE и *синтаксин* белка t-SNARE являются трансмембранными белками, и каждый из них вносит одну α -спираль в комплекс. Периферический мембранный белок *Snap25* t-SNARE вносит две α -спирали в четырехспиральный тяж. Они соединены петлей (на рисунке опущена), которая лежит параллельно мембране и несет заякоренные в ней жирные ацильные цепи. Во многих других t-SNARE каждая α -спираль представляет собой отдельный белок, заякоренный в мембране трансмембранной спиралью. Транс-SNARE комплексы всегда состоят из четырех плотно переплетенных α -спиралей, три из которых вносятся t-SNARE и одна — v-SNARE. t-SNARE состоят из нескольких белков, один из которых всегда представляет собой трансмембранный белок, вносящий одну спираль, а один или два представляют собой более легкие цепи, которые не всегда являются трансмембранными белками и которые вносят две остальные спирали в четырехспиральный тяж транс-SNARE комплекса. Здесь представлена модель кристаллической структуры стабильного комплекса четырех переплетающихся α -спиралей, полученная на основе структур всех четырех белков. Для наглядности α -спирали представлены стержнями. (Адаптировано из R. B. Sutton et al., *Nature* 395: 347–353, 1998. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.

Считают, что транс-SNARE комплексы катализируют слияние мембран, используя энергию, высвобождающуюся при оборачивании друг вокруг друга взаимодействующих спиралей и притягивании мембран друг к другу, что одновременно выталкивает молекулы воды с поверхности бислоев (рис. 13.17). При смешивании липосом, содержащих очищенные v-SNARE, с липосомами, содержащими комплементарные t-SNARE, их мембраны сливаются, хотя и медленно. В клетке другие белки, рекрутируемые к месту слияния (предположительно, эффекторы Rab), совместно со SNARE ускоряют слияние.



Слияние не всегда происходит сразу после образования комплекса v-SNARE и t-SNARE. Как мы обсудим позже, в процессе регулируемого экзоцитоза слияние откладывается до тех пор, пока не поступит специфический внеклеточный сигнал. В данном случае, по-видимому, локальный входящий ток Ca^{2+} инициирует слияние за счет высвобождения ингибиторных белков, не позволяющих полностью сомкнуться транс-SNARE комплексам.

Белки Rab, регулирующие доступность белков SNARE, обеспечивают дополнительный уровень контроля. t-SNARE в мембранах-мишенях зачастую связаны с ингибиторными белками, которые должны высвободиться для того, чтобы t-SNARE смогли функционировать в полную силу. Белки Rab и их эффекторы инициируют высвобождение этих ингибиторных белков SNARE. Таким образом, белки SNARE концентрируются и активируются в правильном месте мембраны, где соединительные белки улавливают приходящие везикулы. Белки Rab в результате ускоряют процесс, благодаря которому

Рис. 13.17. Модель того, как белки SNARE катализируют слияние мембран. Слияние мембран происходит в несколько этапов. Благодаря крепкому сцеплению белков v-SNARE и t-SNARE, липидные бислои фиксируются друг напротив друга, и молекулы воды вытесняются с поверхности мембран. Липидные молекулы двух взаимодействующих монослоев перетекают между мембранами и образуют соединительную перемычку (stalk). Затем начинают взаимодействовать липиды двух других монослоев, образуя новый бислой, который расширяется в область слияния (*гемислияние*, или *полуслияние*). Разрыв нового бислоя завершает реакцию слияния.

правильные белки SNARE в двух мембранах узнают друг друга.

Чтобы везикулярный транспорт правильно функционировал, транспортные пузырьки должны нести правильные белки Rab и SNARE. Тогда неудивительно, что многие транспортные везикулы будут образовываться только после того, как в их мембрану будут включены соответствующие комплементарные белки Rab и SNARE. Как работает этот ключевой механизм процесса отпочковывания мембран, остается загадкой.

13.1.10. Взаимодействующие SNARE должны разойтись, прежде чем они смогут снова функционировать

Большинство белков SNARE в клетке уже поучаствовало в многочисленных клеточных слияниях и часто присутствует в мембране в форме стабильных комплексов с комплементарными SNARE. Комплексы должны распасться, прежде чем SNARE смогут опять опосредовать везикулярный транспорт. Ключевой белок, носящий название **NSF** (**N**-ethylmaleimid-sensitive **F**usion **P**rotein — фактор, чувствительный к N-этилмалеимиду), циркулирует между мембранами и цитозолем и катализирует процесс разборки комплексов. Это АТРаза, использующая энергию гидролиза АТФ для распутывания тонких связей между спиральными доменами взаимодействующих белков SNARE (рис. 13.18). Требование NSF-зависимой реактивации SNARE путем разборки комплекса SNARE препятствует беспорядочному слиянию мембран: если бы t-SNARE в мембране-мишени всегда были активными, любая мембрана, содержащая комплементарные v-SNARE, смогла бы слиться с ней при контакте. Неизвестно, как же контролируется активность NSF, что аппарат SNARE активируется в нужное время и в нужном месте, но, вероятно, в этом процессе участвуют эффекторы Rab.

13.1.11. Вирусные белки слияния и белки SNARE могут работать по одинаковым механизмам слияния

Слияние мембран играет важную роль не только в процессах везикулярного транспорта. Плазматические мембраны сперматозоида и яйцеклетки сливаются при оплодотворении (см. главу 21), и миобласты сливаются друг с другом в процессе развития многоядерных мышечных волокон (см. главу 22). Митохондрии также постоянно динамически сливаются и фрагментируются (см. главу 14). Все процессы слияния клеточных мембран требуют специальных белков и точно ре-

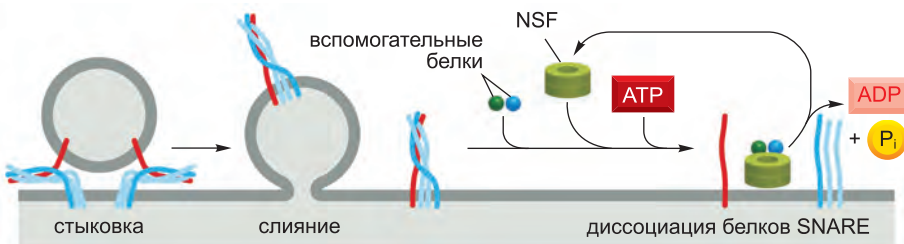


Рис. 13.18. Диссоциация спаренных SNARE белком NSF после цикла слияния мембран. После того как, благодаря v-SNARE и t-SNARE, транспортная везикула слилась с мембраной-мишенью, NSF связывается с комплексом SNARE и с помощью двух дополнительных белков гидролизует АТФ и растаскивает белки SNARE.

гулируются, обеспечивая слияние только правильных мембран. Регуляция необходима для поддержания как индивидуальности клеток, так и индивидуальности внутриклеточных компартментов.

Лучше всего изучено слияние мембран, катализируемое вирусными белками слияния. Эти белки играют ключевую роль во вхождении капсульных вирусов (несущих мембранную оболочку, основанную на липидном бислое) в инфицируемые ими клетки (см. главы 5 и 24). Например, такие вирусы, как вызывающий СПИД вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), связываются с рецепторами на поверхности клетки и затем сливаются с плазматической мембраной клетки-мишени (**рис. 13.19**). В результате, вирусная нуклеиновая кислота, расположенная внутри нуклеокапсида, входит в цитозоль и там реплицируется. Другие вирусы, например вирус гриппа, сначала входят в клетку посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза (обсуждаемого ниже) и доставляются в эндосомы; низкий pH эндосом активирует белок слияния в оболочке вируса, катализирующий слияние вирусной и эндосомальной мембран с одновременным выходом вирусной нуклеиновой кислоты в цитозоль.

Трехмерные структуры белков слияния ВИЧ и вируса гриппа предоставили бесценные сведения о молекулярном механизме слияния мембран, катализируемого этими белками. Взаимодействие белка слияния ВИЧ с рецепторами на поверхности мембраны или белка слияния вируса гриппа с низким pH делает доступными скрытые до этого гидрофобные участки. Эти области, носящие название *пептидов слияния*, затем напрямую встраиваются в липидный бислой мембраны-мишени. Таким образом, белки слияния временно становятся интегральными белками двух разных липидных слоев. Структурные перестройки белков слияния затем сближают и дестабилизируют липидные бислои, которые затем сливаются (см. рис. 13.19). Таким образом, вирусные белки слияния и белки SNARE по сходному механизму способствуют слиянию мембран.

Заключение

Направленный и селективный транспорт определенных мембранных компонентов из одного мембранного компартмента эукариотической клетки в другой поддерживает различия между этими компартментами. Транспортные везикулы, которые могут быть сферическими, трубчатыми или неправильной формы, отпочковываются от специализированных окаймленных участков донорных мембран. Образование каймы способствует сбору определенных мембранных и растворимых молекул груза для транспорта и обеспечения энергией процесса образования везикулы.

Существуют различные типы окаймленных пузырьков. Лучшие всего охарактеризованы клатриновые везикулы, которые опосредуют транспорт из плазматической мембраны и транс-сети Гольджи, и COPI- и COPII-везикулы, которые опосредуют транспорт между ЭР и цистернами Гольджи соответственно. В клатриновых пузырьках адаптерные белки связывают клатрин с мембраной везикулы и улавливают определенные молекулы груза для упаковки в везикулу. После отпочковывания оболочка быстро теряется, что позволяет везикуле слиться с соответствующей мембраной-мишенью.

Локальный синтез фосфолипидов создает сайты связывания, которые запускают сборку оболочки и отпочковывание везикул. Более того, мономерные GTPазы регулируют различные этапы везикулярного транспорта, включая

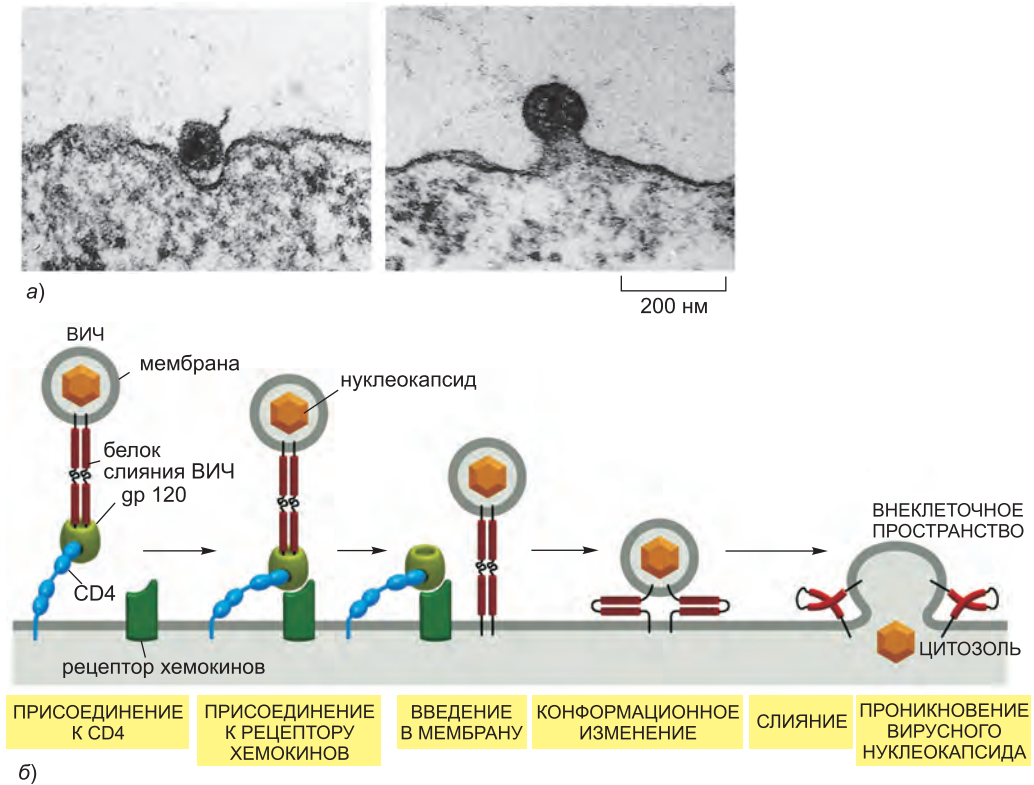
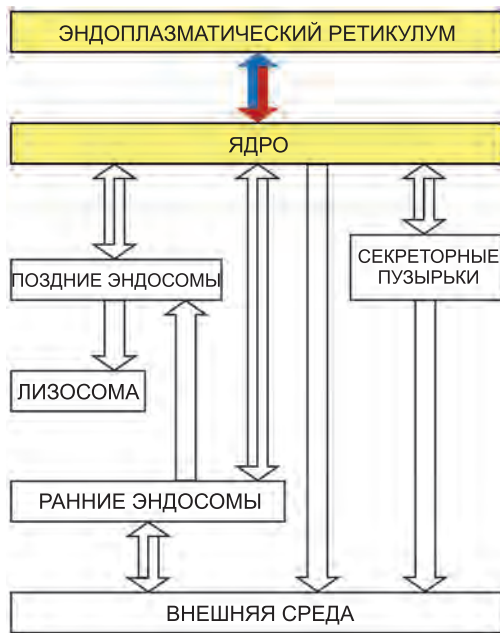


Рис. 13.19. Вход капсульных вирусов в клетку. (а) Электронные микрофотографии проникновения ВИЧ в клетку путем слияния его мембраны с плазматической мембраной клетки. (б) Модель процесса слияния. Сначала ВИЧ связывается с белком CD4 на поверхности клетки-мишени. Вирусный белок gp120, связанный с белком слияния ВИЧ, опосредует это взаимодействие. Второй поверхностный белок клетки-мишени, который в норме служит рецептором хемокинов (обсуждаемых в главах 24 и 25), начинает взаимодействовать с gp120. В результате этого взаимодействия белок слияния ВИЧ освобождается от gp120, и его спрятанный гидрофобный пептид слияния выходит наружу и встраивается в плазматическую мембрану клетки-мишени. Белок слияния, представляющий собой тример (не показано), временно заякоривается в форме интегрального белка в двух расположенных напротив друг друга мембранах. Затем белок слияния спонтанно перестраивается, сворачиваясь в плотно упакованный шестиспиральный тяз. Энергия, высвобождаемая в результате этой перестройки множества копий белка слияния, сближает мембраны и позволяет преодолеть высокий активационный барьер, который в норме препятствует слиянию мембран. Таким образом, белок слияния ВИЧ наподобие мышеловки содержит запас потенциальной энергии, которая высвобождается и используется для совершения механической работы. (а, из B. S. Stein et al., *Cell* 49: 659–668, 1987. С любезного разрешения Elsevier; б, адаптированный рисунок Wayne Hendrickson.)

отщипывание пузырьков и докинг. Рекрутирующие белки оболочки GTPазы, включая белки Sar1 и Arf, регулируют сборку и разборку оболочки. Большое семейство белков Rab служит GTPазами везикул. Белки Rab рекрутируются в транспортные пузырьки и мембраны-мишени. Сборка и разборка белков Rab и их эффекторов на специализированных мембранных доменах динамически контролируется связыванием и гидролизом GTP. Активные белки Rab рекрутируют эффекторы Rab: двигательные белки, которые транспортируют

везикулы по актиновым филаментам или микротрубочкам, и филаментные соединительные белки, которые следят за тем, чтобы везикулы доставляли свой груз только в правильный мембранный компартмент. Комплементарные белки *v*-SNARE на транспортном пузырьке и *t*-SNARE на мембране-мишени образуют стабильные транс-SNARE комплексы, которые притягивают мембраны друг к другу, в результате чего липидные бислои могут слиться.

13.2. Транспорт из ЭР через аппарат Гольджи



Как обсуждается в главе 12, чтобы новосинтезированный белок пошел по биосинтетическому регуляторному пути, он должен пересечь мембрану ЭР из цитозоля. В ходе последующего транспорта из ЭР в аппарат Гольджи и из аппарата Гольджи на поверхность клетки и далее этот белок последовательно модифицируется по мере прохождения через набор компартментов. В переносе из одного компартмента в другой участвует тонкое равновесие между прямым и обратным (ретроградным) транспортными путями. Некоторые транспортные везикулы отбирают молекулы груза и перемещают их в следующий по порядку компартмент, тогда как другие отыскивают «сбежавшие» белки и возвращают их в предыдущий компартмент, где они должны функционировать в норме. Таким образом, путь из ЭР в плазматиче-

скую мембрану включает в себя множество этапов сортировки, во время которых непрерывно происходит отбор мембранных и растворимых люминальных белков для упаковки в везикулы или фрагменты органелл, отпочковывающиеся от ЭР и аппарата Гольджи.

В данном разделе мы в основном будем рассматривать **аппарат Гольджи** (также носящий название **комплекса Гольджи**). Помимо синтеза углеводов, здесь также происходят основные этапы сортировки белков и их упаковка для дальнейшего транспорта. Клетка синтезирует множество полисахаридов в аппарате Гольджи, включая пектин и гемицеллюлозу клеточной стенки растений и большую часть глюкозамингликанов внеклеточного матрикса животных (см. главу 19). Аппарат Гольджи также лежит на пути выхода из ЭР, и значительная часть производимых в нем углеводов присоединяется в форме олигосахаридных боковых цепей ко многим белкам и липидам, которые попадают в него из ЭР. Некоторые из этих олигосахаридов служат маркерами, направляющими определенные белки в везикулы, которые затем транспортируют эти белки в лизосомы. Но большинство белков и липидов, после того как приобретают соответствующие олигосахариды в аппарате Гольджи, узнаются другими способами и направляются в транспортные везикулы, отправляющиеся в другие компартменты.

13.2.1. Белки покидают ЭР в составе окаймленных COPII транспортных везикул

Чтобы инициировать движение по биосинтетическому секреторному пути, белки, вошедшие в ЭР и предназначенные для переноса в аппарат Гольджи и дальше, сначала упаковываются в маленькие, покрытые COPII транспортные везикулы. Эти везикулы отпочковываются от специализированных участков ЭР, носящих название *участков выхода из ЭР*, на мембране которых отсутствуют связанные рибосомы. У большинства животных клеток участки выхода из ЭР распределены по всей сети ЭР.

Первоначально считали, что все белки, не присоединенные к ЭР, по умолчанию входят в транспортные пузырьки. Однако теперь стало ясно, что вход в покидающие ЭР везикулы обычно является селективным процессом. Многие мембранные белки активно рекрутируются в эти везикулы и концентрируются там. Предполагают, что эти белки груза несут на своей цитоплазматической поверхности сигналы выхода (транспорта), которые узнаются оболочкой COPII (**рис. 13.20**); эти компоненты оболочки служат рецепторами груза и рециркулируют обратно в ЭР после доставки своего груза в аппарат Гольджи. С другой стороны, растворимые белки груза люмена ЭР несут сигналы выхода, присоединяющиеся к трансмембранным рецепторам груза, которые, в свою очередь, связываются через сигналы выхода в своих цитоплазматических хвостах с компонентами оболочки COPII. Белки без сигнала

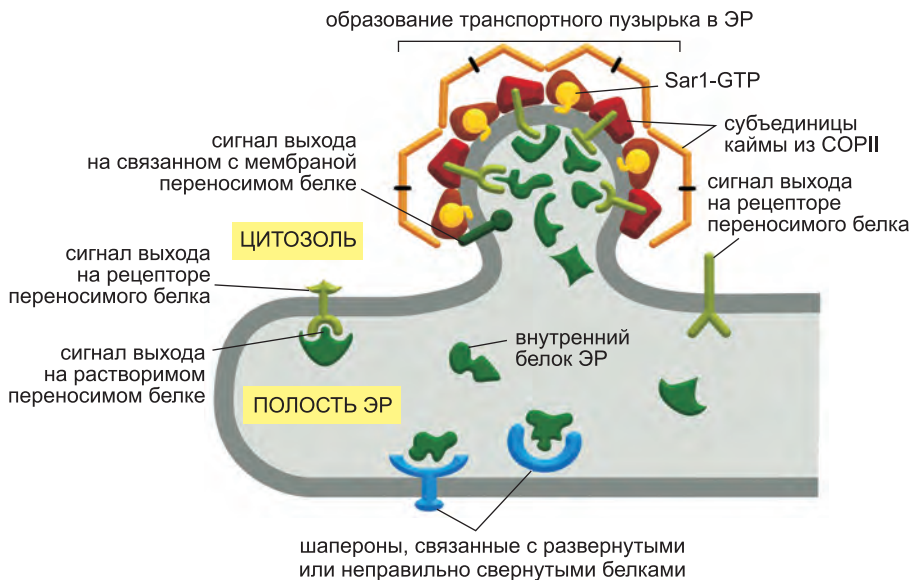


Рис. 13.20. Рекрутирование молекул груза в транспортные пузырьки ЭР. За счет прямого или косвенного связывания с оболочкой COPII мембранные и растворимые белки груза концентрируются в транспортных везикулах. Мембранные белки упаковываются в отпочковывающиеся транспортные везикулы благодаря взаимодействию сигналов выхода на их цитоплазматических «хвостах» с оболочкой COPII. Некоторые мембранные белки, попадающие в оболочку, служат рецепторами груза, связывая растворимые белки люмена и способствуя их упаковке в везикулы. Типичный транспортный пузырек диаметром 50 нм содержит около 200 мембранных белков, которые могут принадлежать ко множеству различных типов. Как показано на рисунке, несвернутые или не полностью собранные белки связываются с шаперонами и удерживаются в компартменте ЭР.

выхода также способны входить в транспортные пузырьки, но с меньшей скоростью, поэтому даже белки, в норме функционирующие в ЭР (так называемые *резидентные белки ЭР*), медленно утекают из ЭР и доставляются в аппарат Гольджи. Точно так же секреторные белки, синтезируемые в высоких концентрациях, могут покидать ЭР без помощи сигналов выхода или рецепторов груза.

Сигналы выхода, направляющие растворимые белки из ЭР для транспорта в аппарат Гольджи и далее, малоизучены. Некоторые трансмембранные белки, служащие рецепторами груза и упаковывающие определенные секреторные белки в окаймленные СОП2 пузырьки, представляют собой лектины, связывающиеся с олигосахаридами. Лектин ERGIC53, например, связывается с маннозой и, как предполагают, узнает сахар на двух секреторируемых факторах свертывания крови (факторах V и VIII) и, следовательно, упаковывает эти белки в транспортные везикулы в ЭР. Роль ERGIC53 в транспорте белков установлена потому, что у людей с отсутствием этого белка в результате наследуемой мутации в сыворотке крови наблюдается пониженный уровень факторов V и VIII, и, следовательно, у них сильнее кровотечения.

13.2.2. Только правильно свернутые и собранные белки могут покинуть ЭР

Чтобы покинуть ЭР, белки должны быть правильно свернуты, и, если они представляют субъединицы мультимерного белкового комплекса, в определенных случаях им нужно быть полностью собранными. Несвернутые или не полностью собранные белки остаются в ЭР, где они связываются с шаперонами (обсуждаемыми в главе 6), например *BiP* или *кальнексин*. Шапероны, возможно, могут прикрывать сигналы выхода или каким-то образом заякоривать белки в ЭР (рис. 13.21). Такие дефектные белки в конце концов транспортируются обратно в цитозоль, где они деградируются протеасомами (см. главы 6 и 12). Такой этап проверки

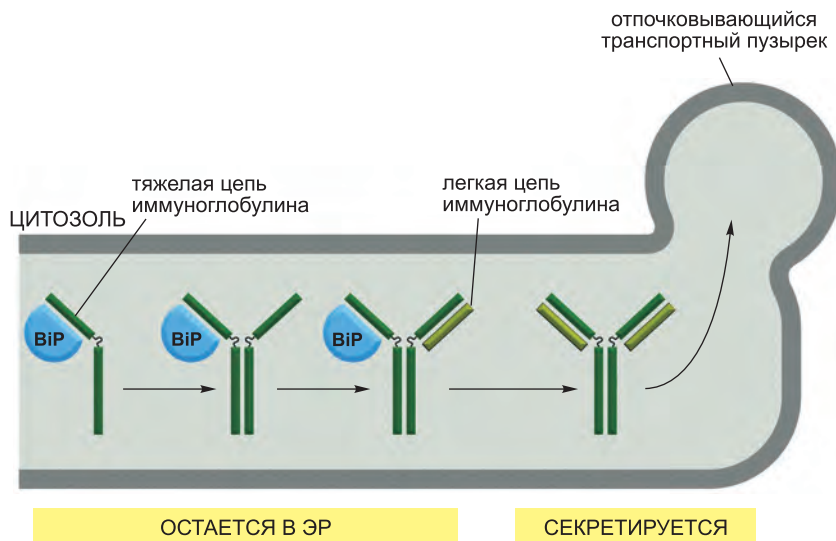


Рис. 13.21. Удержание не полностью собранных молекул антител в ЭР. Антитела состоят из двух тяжелых и двух легких цепей (см. главу 25), которые собираются в ЭР. Считается, что шаперон BiP связывается со всеми не до конца собранными молекулами антител и закрывает их сигнал выхода. Таким образом, только полностью собранные антитела покидают ЭР и секретируются.

качества препятствует дальнейшему транспорту неправильно свернутых или собранных белков, которые потенциально могли бы навредить функционированию нормальных белков. Необходимо заметить, что в ЭР производится удивительно большое количество коррекционных действий. Например, в норме более 90% новосинтезированных субъединиц рецептора Т-клеток (см. главу 25) деградирует до достижения ими клеточной поверхности, где они функционируют. Таким образом, клетки должны синтезировать избыточные количества многих белковых молекул для получения нескольких избранных, которые сворачиваются, собираются в комплекс и функционируют правильно.

Процесс непрерывной деградации части белков ЭР также служит системой раннего предупреждения иммунной системы о том, что клетка инфицирована вирусом. При помощи специализированного ABC-транспортера ЭР импортирует образовавшиеся в результате работы протеаз в протеасомах пептидные фрагменты вирусных белков. Чужеродные пептиды загружаются на белки МНС класса I в люмене ЭР и транспортируются к поверхности клетки. Затем Т-лимфоциты узнают пептиды как не принадлежащие организму антигены и убивают инфицированные клетки (см. главу 25).

Иногда, однако, у строгого механизма проверки качества бывают изъяны. Доминантные мутации, вызывающие муковисцидоз (кистозный фиброз), распространенную наследственную болезнь, приводят к синтезу немного неправильно свернутой формы белка плазматической мембраны, играющего важную роль в транспорте Cl^- . Несмотря на то что мутантный белок функционировал бы абсолютно правильно, если бы достиг плазматической мембраны, он остается в ЭР. Это тяжелое заболевание, таким образом, вызвано не инактивирующей белок мутацией, а тем, что активный белок отбраковывается до того, как он достигает плазматической мембраны.

13.2.3. Везикулярно-тубулярные кластеры опосредуют транспорт из ЭР в аппарат Гольджи

После того как транспортные везикулы отпочковались от сайтов выхода из ЭР и сбросили свою оболочку, они начинают сливаться друг с другом. Это слияние мембран, произошедших из одного компартмента, называется *гомотипическим слиянием*. При *гетеротипическом слиянии* мембрана, принадлежащая одному компартменту, сливается с мембраной другого компартмента. Как и в случае гетеротипического слияния, для гомотипического слияния необходим набор комплементарных белков SNARE. Однако в данном случае взаимодействие симметрично — обе мембраны предоставляют v-SNARE и t-SNARE (рис. 13.22).

Структуры, образующиеся при слиянии друг с другом вышедших из ЭР пузырьков, носят название *везикулярно-тубулярных кластеров*, поскольку в электронном микроскопе они выглядят изогнутыми (рис. 13.23, а). Эти кластеры образуют новый компартмент, отличающийся от ЭР и лишенный многих функционирующих в ЭР белков. Они постоянно образуются и служат транспортными контейнерами, переносящими вещество из ЭР в аппарат Гольджи. Кластеры живут относительно недолго, поскольку они быстро перемещаются вдоль микротрубочек аппарата Гольджи и сливаются с ним, доставляя свое содержимое (рис. 13.23, б).

После образования везикулярно-тубулярных кластеров от них начинают отпочковываться собственные транспортные пузырьки. В отличие от отщуривающихся от ЭР окаймленных COPII везикул, эти пузырьки покрыты COPI. Они

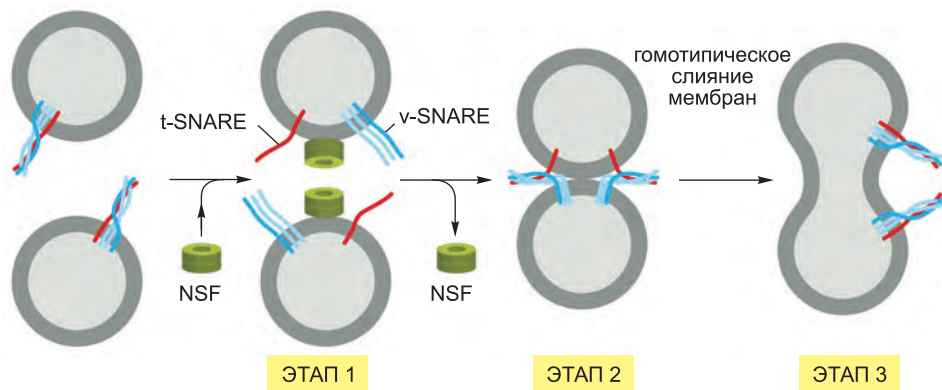


Рис. 13.22. Гомотипическое слияние мембран. На этапе 1 NSF разводит в разные стороны одинаковые пары белков v-SNARE и t-SNARE обеих мембран (см. рис. 13.18). На этапах 2 и 3 разделенные комплементарные SNARE взаимодействуют на соседних одинаковых мембранах, что приводит к слиянию мембран и образованию одного непрерывного компартмента, называемого везикулярно-тубулярным кластером. Затем кластер разрастается за счет последующих гомотипических слияний с пузырьками мембраны того же типа, несущими комплементарные SNARE. Гомотипическое слияние не ограничивается образованием везикулярно-тубулярных кластеров; в сходном процессе эндосомы сливаются с образованием более крупных эндосом. Белки Rab регулируют уровень гомотипического слияния и, следовательно, размер компартмента в клетке (не показано).

несут обратно в ЭР «сбежавшие» резидентные белки, а также такие белки, как рецепторы груза, которые участвовали в реакции отпочковывания в ЭР и теперь рециркулируют обратно. Этот процесс возвращения иллюстрирует совершенство механизмов контроля, регулирующих реакции сборки оболочки. Сборка окаймления COPI начинается всего лишь через секунды после потери оболочки COPII. Остается неизвестным, как контролируется такое переключение сборки оболочек.

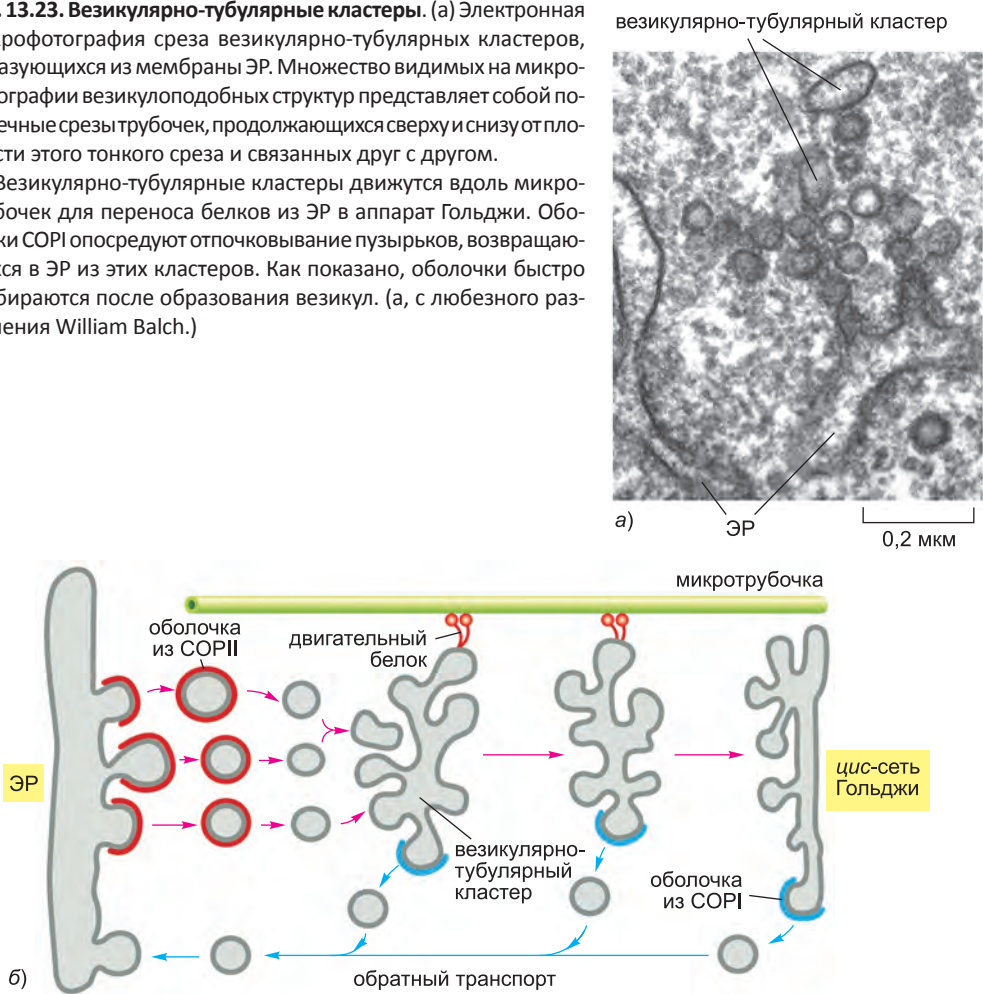
Возвратный (или *ретроградный*) *транспорт* продолжается по мере того, как везикулярные трубчатые кластеры продвигаются к аппарату Гольджи. Таким образом, кластеры непрерывно созревают, меняя свой состав в соответствии с тем, как определенные белки возвращаются в ЭР. Сходный процесс возврата продолжается в аппарате Гольджи после того, как везикулярные трубчатые кластеры доставляют свой груз.

13.2.4. В возвратном пути в ЭР используются сигналы сортировки

Обратный путь возврата «сбежавших» белков в ЭР зависит от *сигналов возврата в ЭР*. Резидентные белки ЭР, например, содержат сигналы, напрямую связывающиеся с оболочками COPI, и поэтому упаковываются в окаймленные COPI транспортные пузырьки для ретроградной доставки в ЭР. Лучшее всего охарактеризованный сигнал возврата этого типа состоит из двух лизинов, за которыми идут два любых других аминокислотных остатка, и располагается на С-конце мембранного белка ЭР. Он называется *последовательностью KKXX* в соответствии с однобуквенными обозначениями аминокислот.

Растворимые резидентные белки ЭР, например BiP, также на С-конце содержат короткий сигнал возврата, но он отличается от последовательности KKXX: это последовательность Lys-Asp-Gly-Leu или похожая на нее. Если этот сигнал

Рис. 13.23. Везикулярно-тубулярные кластеры. (а) Электронная микрофотография среза везикулярно-тубулярных кластеров, образующихся из мембраны ЭР. Множество видимых на микрофотографии везикулоподобных структур представляет собой поперечные срезы трубочек, продолжающихся сверху и снизу от плоскости этого тонкого среза и связанных друг с другом. (б) Везикулярно-тубулярные кластеры движутся вдоль микротрубочек для переноса белков из ЭР в аппарат Гольджи. Оболочки COPI опосредуют отпочковывание пузырьков, возвращающихся в ЭР из этих кластеров. Как показано, оболочки быстро разбираются после образования везикул. (а, с любезного разрешения William Balch.)



(известный как *последовательность KDEL*) методами генетической инженерии удалить с BiP, белок будет медленно секретироваться из клетки. Если сигнал перенести на белок, который в норме секретируется, он будет эффективно возвращаться в ЭР и накапливаться там.

В отличие от сигналов возврата мембранных белков ЭР, которые способны напрямую взаимодействовать с оболочкой COPI, растворимые белки ЭР должны связаться со специализированными рецепторными белками, например, рецептором KDEL, многопроходным трансмембранным белком, связывающим последовательность KDEL и упаковывающим любой несущий ее белок в окаймленные COPI ретроградные транспортные пузырьки (рис. 13.24). Для этого сам рецептор KDEL должен рециркулировать между ЭР и аппаратом Гольджи, и его сродство к последовательности KDEL должно различаться в этих двух компартментах. В везикулярно-тубулярных кластерах и аппарате Гольджи рецептор должен обладать высоким сродством к последовательности KDEL, чтобы быть способным улавливать «сбежавшие» растворимые резидентные белки ЭР, присутствующие

в низкой концентрации. Однако в ЭР сродство должно быть низким, чтобы он мог высвобождать свой груз, несмотря на очень высокую концентрацию в ЭР содержащих KDEL резидентных белков.

Как меняется сродство рецептора KDEL в зависимости от компартмента, в котором он находится? Ответ на этот вопрос неизвестен, но это может быть связано с разными ионными условиями и pH в разных компартментах, которые регулируются ионными транспортерами в мембране компартмента. Как мы обсудим позже, pH-чувствительные белок-белковые взаимодействия в клетке лежат в основе многих этапов сортировки.

Большинство мембранных белков, функционирующих на поверхности раздела между ЭР и аппаратом Гольджи, включая v- и t-SNARE и некоторые рецепторы груза, входят в ретроградный путь в ЭР. Рециркуляция некоторых из этих белков опосредуется сигналами, как только что описано, тогда как для других никаких специальных сигналов не нужно. Таким образом, если сигналы возврата увеличивают эффективность процесса возврата, некоторые белки случайно входят в отпочковывающиеся

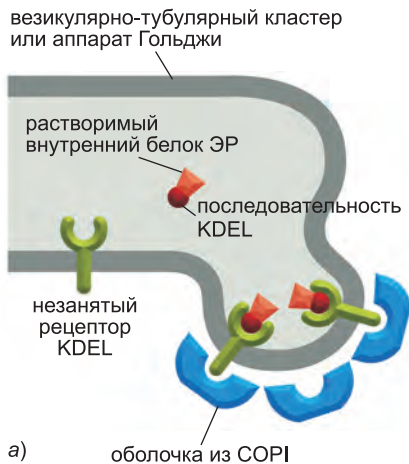
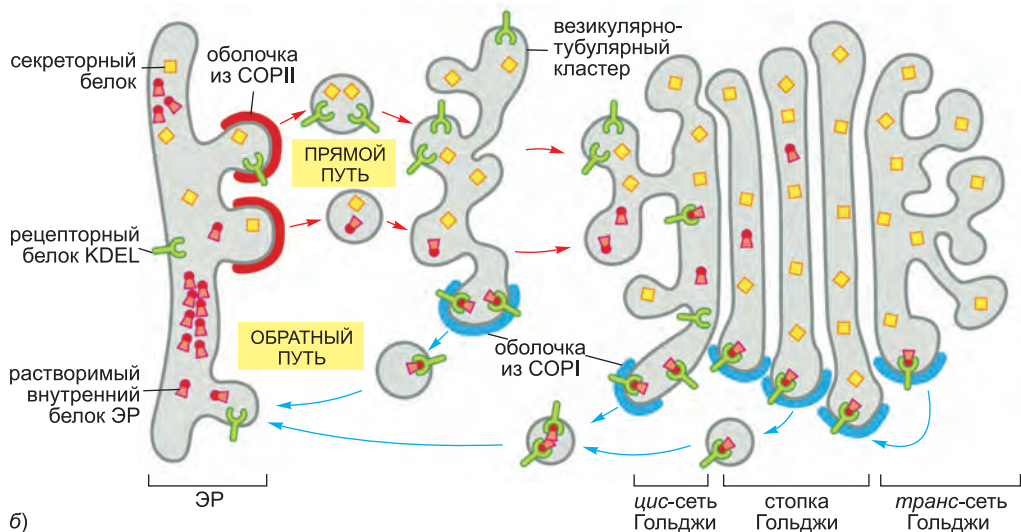


Рис. 13.24. Модель возврата растворимых резидентных белков ЭР. Резидентные белки, покидающие ЭР, возвращаются туда посредством везикулярного транспорта. (а) Рецептор KDEL, присутствующий в везикулярно-тубулярных кластерах и аппарате Гольджи, улавливает растворимые резидентные белки ЭР и переносит их в окаймленных COPI пузырьках обратно в ЭР. После связывания своего лиганда в этом окружении рецептор KDEL может изменить конформацию и этим ускорить свою рекрутизацию в отпочковывающиеся везикулы COPI. (б) Возврат белков ЭР начинается в везикулярно-тубулярных кластерах и продолжается во всех частях аппарата Гольджи. В условиях люмена ЭР резидентные белки ЭР диссоциируют от рецептора KDEL, который затем возвращается в аппарат Гольджи для повторного использования.



вающиеся везикулы, предназначенные для транспорта в ЭР, и возвращаются туда с меньшей скоростью. Многие ферменты Гольджи постоянно циркулируют между ЭР и Гольджи, но их скорость возврата в ЭР достаточно мала, чтобы большая часть белка находилась в аппарате Гольджи.

13.2.5. Многие белки селективно удерживаются в компартментах, в которых они функционируют

Возвратный путь KDEL только частично объясняет, как резидентные белки удерживаются в ЭР. Как и следовало ожидать, клетки, экспрессирующие генетически модифицированные резидентные белки ЭР, от которых экспериментально отщепили последовательность KDEL, начинают эти белки секретировать. Но скорость секреции значительно ниже, чем для нормального секреторного белка. По-видимому, механизм, не зависящий от сигналов KDEL, закоривает резидентные белки ЭР, и только те белки, которые избегают механизма удержания, улавливаются и доставляются обратно рецептором KDEL. Суть предложенного механизма удержания состоит в том, что резидентные белки ЭР связываются друг с другом, образуя комплексы, которые слишком велики для эффективного встраивания в транспортные пузырьки. Поскольку в ЭР резидентные белки присутствуют в очень высоких концентрациях (по оценкам, миллимолярных), для связывания большинства таких белков в комплексы будет достаточно взаимодействия даже с относительно низким сродством.

Агрегация функционирующих в одном компартменте белков, носящая название *кин-узнавания* (kin — родственник), является общим механизмом организации и удержания компартментом своих резидентных белков. Например, ферменты Гольджи, функционирующие совместно, также связываются друг с другом и, следовательно, не способны входить в транспортные пузырьки, покидающие аппарат Гольджи.

13.2.6. Аппарат Гольджи состоит из упорядоченного набора компартментов

Благодаря своим размерам и упорядоченной структуре аппарат Гольджи стал одной из первых органелл, описанных при помощи ранних световых микроскопов. Он состоит из набора уплощенных окруженных мембраной замкнутых компартментов, называемых цистернами, которые внешне немного напоминают стопку лавашей. Каждая стопка Гольджи обычно состоит из 4–6 цистерн (рис. 13.25), хотя у некоторых одноклеточных жгутиковых их может быть до 60. В животных клетках трубчатые соединения между аналогичными цистернами связывают множество стопок, образуя единый комплекс, который обычно располагается вблизи ядра клетки рядом с центросомой (рис. 13.26, а). Эта локализация зависит от микротрубочек. Если микротрубочки искусственно деполимеризовать, аппарат Гольджи преобразуется в отдельные стопки, распределенные по всей цитоплазме рядом с сайтами выхода из ЭР. В некоторых клетках, включая большинство растительных клеток, содержатся сотни отдельных стопок Гольджи, распределенных по всей цитоплазме (рис. 13.26, б).

Во время прохождения через аппарат Гольджи транспортируемые молекулы претерпевают упорядоченную серию ковалентных модификаций. Каждая стопка Гольджи имеет две отличные друг от друга стороны: *цис-сторону* (или входную сторону) и *транс-сторону* (или выходную сторону). Цис- и транс-стороны тесно

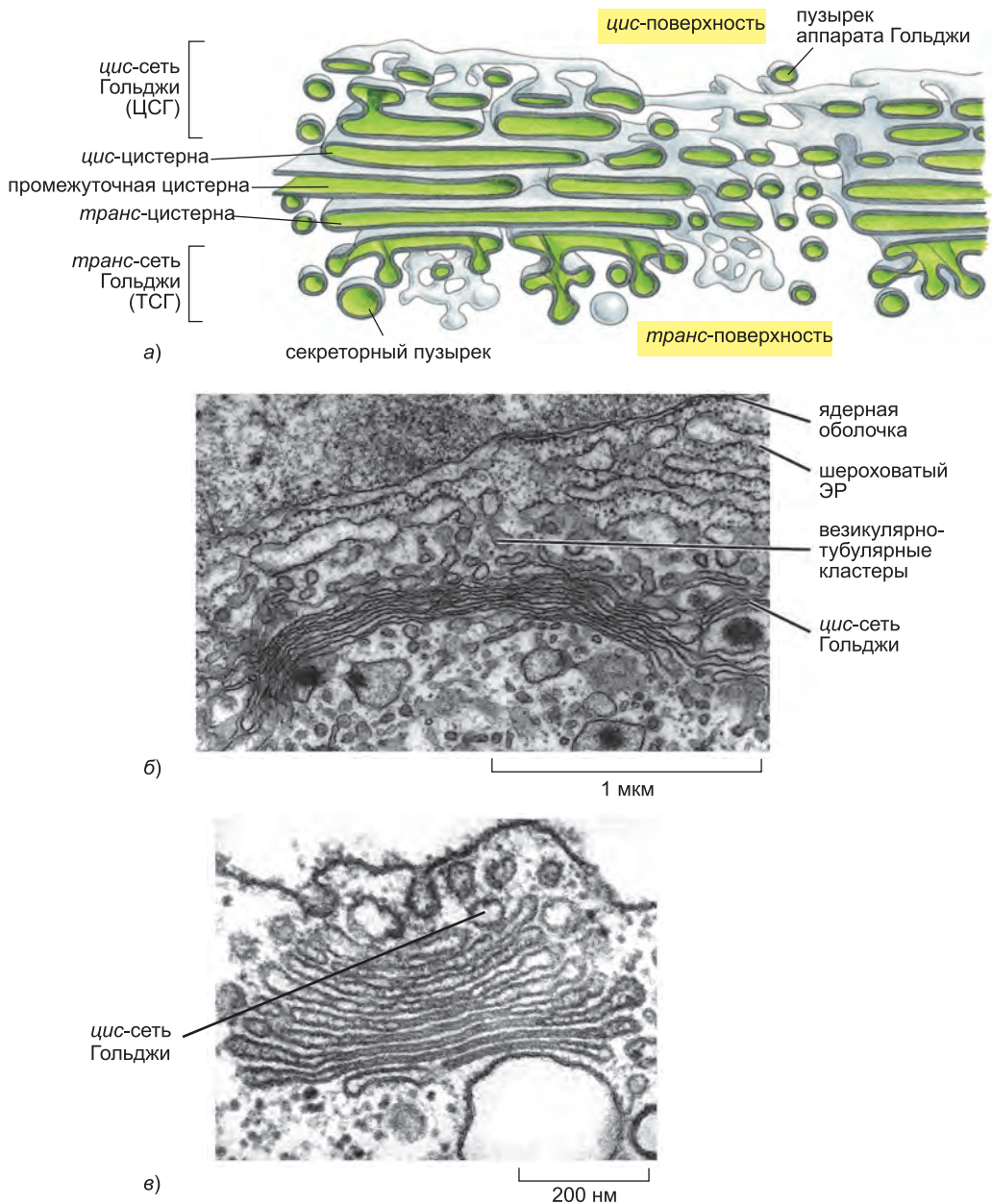
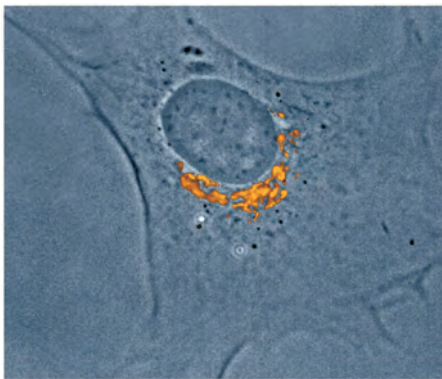


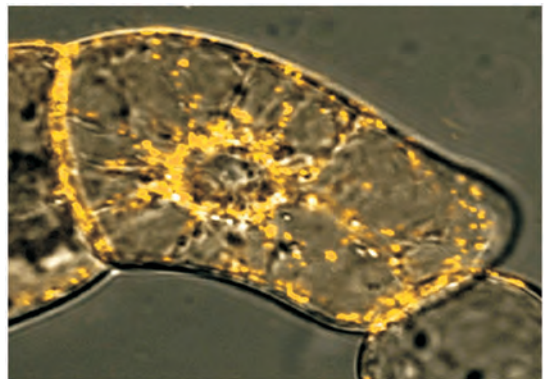
Рис. 13.25. Аппарат Гольджи. (а) Трехмерная реконструкция, основанная на электронных микрофотографиях аппарата Гольджи животной секреторной клетки. Цис-сторона стопки Гольджи расположена ближе всего к ЭР. (б) Электронная микрофотография тонкого среза, на которой хорошо выражена переходная зона между ЭР и аппаратом Гольджи в животной клетке. (в) Электронная микрофотография поперечного среза аппарата Гольджи растительной клетки (зеленая водоросль *Chlamydomonas*). В растительных клетках аппарат Гольджи обычно лучше выражен и сильнее отделен от других внутриклеточных мембран, чем в животной клетке. (Согласно A. Ramburg and Y. Clermont, *Eur. J. Cell Biol.* 51: 189–200, 1990. С любезного разрешения Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft (а), Brij J. Gupta (б) и George Palade (в).)

связаны со специальными компартментами, каждый из которых состоит из сети взаимосвязанных трубчатых и цистернальных структур: **цис-сети Гольджи (ЦСГ)** и **транс-сети Гольджи (ТСГ)** соответственно. ЦСГ — это набор слившихся везикулярно-тубулярных кластеров, приходящих из ЭР. Белки и липиды входят в *цис*-сеть Гольджи и выходят из *транс*-сети Гольджи, направляясь к клеточной поверхности или в другой компартмент. Обе сети играют важную роль в сортировке белков: белки, входящие в ЦСГ, могут двигаться дальше по аппарату Гольджи или вернуться в ЭР. Точно так же, белки, выходящие из ТСГ, идут дальше и сортируются в соответствии с их следующим пунктом назначения, которым могут быть лизосомы, секреторные везикулы или клеточная поверхность. Они также могут вернуться в более ранний компартмент.

Как описано в главе 12, единственный вид *N*-связанных олигосахаридов присоединяется в ЭР единым блоком ко многим белкам и затем отщепляется, пока белок все еще находится в ЭР. Олигосахаридные интермедиаты, образующиеся в результате реакций отщепления, помогают белкам свернуться и способствуют транспорту неправильно свернутых белков в цитозоль для деградации. Таким образом, они играют важную роль в контроле качества белков, выходящих из ЭР. После того, как эта функция ЭР выполнена, клетка может перестроить олигосахариды для выполнения новых функций. Это происходит в аппарате Гольджи, который синтезирует неоднородные олигосахаридные структуры зрелых белков. После поступления в ЦСГ белки проходят через *цис*-сеть Гольджи и затем входят в первый компартмент модификации (*цис*-цистерны Гольджи). Затем они движутся в следующий компартмент (средние цистерны) и наконец — в *транс*-цистерны, где гликозилирование завершается. Предполагают, что люмен *транс*-цистерн непрерывен с ТСГ, местом, где белки распределяются по разным транспортным наборам и отправляются в свои пункты назначения.



а)



б)

Рис. 13.26. Локализация аппарата Гольджи в животной и растительной клетках. (а) Аппарат Гольджи в культуре фибробластов, окрашенный флуоресцентным антителом, узнающим резидентный белок Гольджи (красный). Аппарат Гольджи поляризован и направлен в сторону, в которую ползла клетка до фиксации. (б) Аппарат Гольджи в растительной клетке, экспрессирующей химерный белок, состоящий из резидентного фермента Гольджи и зеленого флуоресцентного белка. Яркие *оранжевые* пятна (ложное окрашивание) — это стопки Гольджи. (С любезного разрешения John Henry and Mark McNiven (а) и Chris Hawes (б).)

Этапы процессинга олигосахаридов протекают в стопке Гольджи упорядоченно. В каждой цистерне содержится характерный избыток определенных модифицируемых белков. Белки модифицируются последовательно по мере прохождения от одной цистерны в другую по стопке, образующей многоступенчатую единицу процессинга. Может показаться, что такая компартментализация является излишней, поскольку каждый преобразующий олигосахарид фермент может принять гликопротеин в качестве субстрата только после того, как он был правильно модифицирован предыдущим ферментом. Тем не менее очевидно, что процессинг происходит не только в биохимической последовательности, но и в пространственной: ферменты, катализирующие ранние стадии модификации, сконцентрированы в цистернах с *цис*-стороны стопки Гольджи, тогда как ферменты, катализирующие более поздние этапы, сконцентрированы вблизи *транс*-стороны.

Исследователи обнаружили функциональные различия между *цис*-, *транс*- и средними цистернами аппарата Гольджи путем локализации ферментов, участвующих в процессинге *N*-связанных олигосахаридов в различных участках органеллы, методами физического фракционирования органеллы и мечения ферментов антителами на срезах в электронном микроскопе. Например, показано, что удаление остатков маннозы и добавление *N*-глюкозамина происходит в среднем компартменте, тогда как присоединение галактозы и сиаловой кислоты происходит в *транс*-компартменте и *транс*-сети Гольджи (рис. 13.27). На рис. 13.28 представлена функциональная компартментализация аппарата Гольджи.

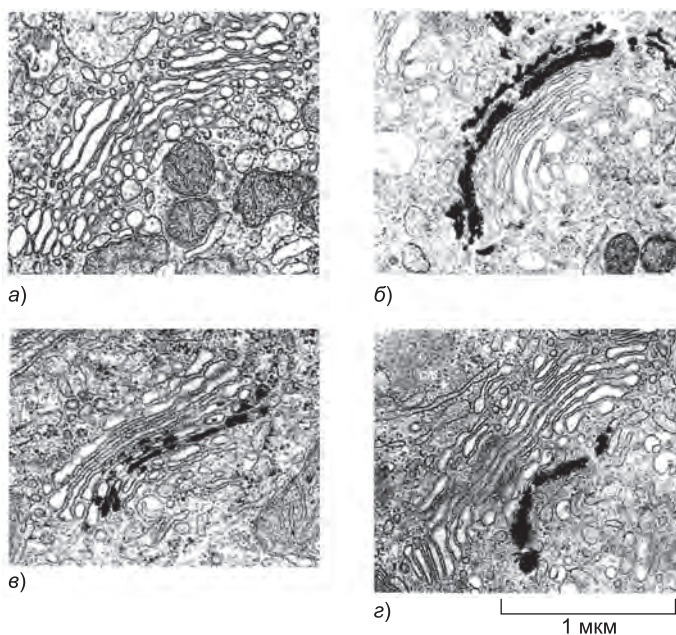


Рис. 13.27. Молекулярная компартментализация аппарата Гольджи. На наборе электронных микрофотографий аппарат Гольджи (а) не окрашен, (б) окрашен осмием, который восстанавливается, в основном, в цистернах *цис*-компартмента, и (в и г) окрашен для выявления локализации определенных ферментов. Нуклеозиддифосфатаза располагается в *транс*-цистернах Гольджи (в), а кислая фосфатаза — в *транс*-сети Гольджи (г). Обратите внимание, что обычно окрашивается более одной цистерны. Таким образом, предполагается, что ферментов очень много, но они не точно локализованы в определенной цистерне. (С любезного разрешения Daniel S. Friend.)

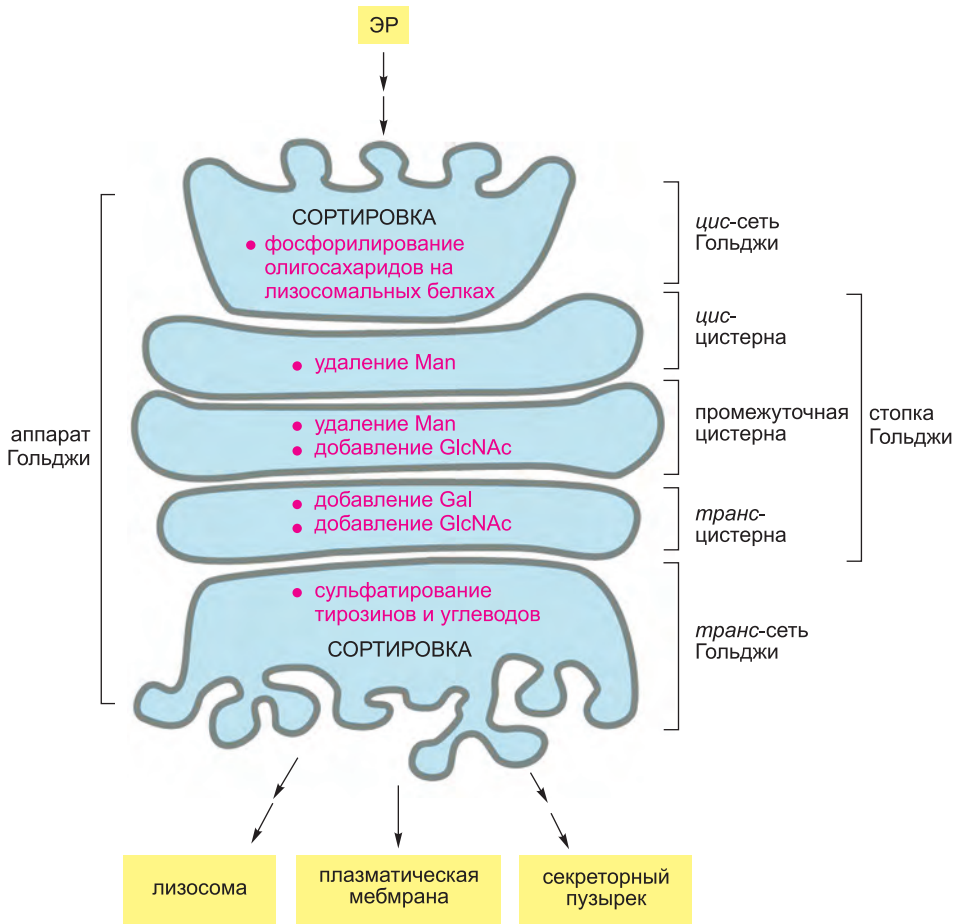


Рис. 13.28. Процессинг олигосахаридов в компартментах Гольджи. Локализация каждой стадии процессинга определена набором методов, включая биохимическое субфракционирование мембран аппарата Гольджи и электронную микроскопию после окрашивания антителами, специфичными к некоторым ферментам. Ферменты процессинга не специфичны к определенной цистерне, они распределены по стопке: ферменты ранних стадий присутствуют в основном в *цис*-цистернах Гольджи, а ферменты поздних стадий — в *транс*-цистернах.

Аппарат Гольджи особенно выражен в клетках, специализирующихся на секреции гликопротеинов, например, в бокаловидных клетках кишечного эпителия, которые секретируют в кишечник большое количество обогащенной полисахаридами слизи (**рис. 13.29**). В таких клетках на *транс*-стороне аппарата Гольджи расположены необычно крупные везикулы, обращенные к домену плазматической мембраны, с которого происходит секреция.

13.2.7. Олигосахаридные цепи модифицируются в аппарате Гольджи

Если люмен ЭР полон растворимых люминальных резидентных белков, то все резидентные белки аппарата Гольджи связаны с мембраной. Ферментативные реакции в аппарате Гольджи протекают исключительно на поверхности мембран.

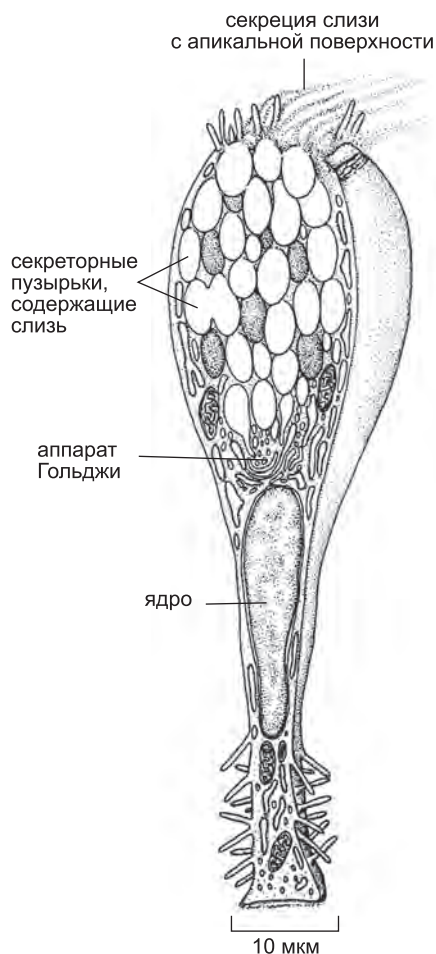


Рис. 13.29. Бокаловидная клетка тонкой кишки. Эта клетка специализируется на секреции слизи, смеси гликопротеинов и протеогликанов, синтезированных в ЭР и аппарате Гольджи. Как и все остальные эпителиальные клетки, бокаловидные клетки полярно ориентированы. Специальный апикальный домен плазматической мембраны обращен в просвет кишки, а базолатеральный домен — к базальной пластинке. Аппарат Гольджи также полярно ориентирован, что ускоряет высвобождение слизи путем экзоцитоза из апикального домена плазматической мембраны. (Согласно R. V. Krstic, Illustrated Encyclopedia of Human Histology. New York: Springer-Verlag, 1984. С любезного разрешения издательства Springer-Verlag.)

Все гликозидазы и гликозилтрансферазы Гольджи — односторонние трансмембранные белки, многие из которых организованы в мультиферментные комплексы. Таким образом, организация двух синтетических органелл биосинтетического секреторного пути, ЭР и аппарата Гольджи, фундаментально различна.

К гликопротеинам млекопитающих присоединяются два больших класса *N*-связанных олигосахаридов, **сложные олигосахариды** и **олигосахариды с высоким содержанием маннозы** (рис. 13.30). Иногда оба типа прикрепляются (в разных местах) к одной полипептидной цепи.

Сложные олигосахариды образуются, когда исходный присоединенный в ЭР *N*-связанный олигосахарид укорачивается и к нему добавляются новые сахара. Обога-

щенные маннозой олигосахариды укорачиваются, но новые сахара к ним в аппарате Гольджи не добавляются. Они содержат всего два *N*-ацетилглюкозамина и много остатков маннозы, число которых часто приближается к числу остатков, исходно присутствовавших в связанном с липидом олигосахариде-предшественнике, присоединенном в ЭР. Сложные олигосахариды могут содержать больше двух исходных *N*-ацетилглюкозаминов, а также различное число остатков галактозы и сиаловой кислоты и, в некоторых случаях, фукозы. Сиаловая кислота особенно важна, поскольку это единственный сахар в гликопротеинах, несущий отрицательный заряд. Останется ли углевод обогащенным маннозой или будет модифицирован, в значительной степени зависит от его положения в белке. Если олигосахарид доступен для ферментов процессинга в аппарате Гольджи, он с большой вероятностью будет переведен в сложную форму; если он недоступен, поскольку его сахара крепко связаны с поверхностью белка, он, скорее всего, останется в форме с высоким содержанием маннозы. Модификация, в ходе которой образуются сложные олигосахаридные цепи, идет по высокоупорядоченному пути, изображенному на рис. 13.31.

Помимо этих общих черт процессинга олигосахаридов во всех клетках, продукты модификации углеводов, протекающей в аппарате Гольджи, очень сложны.

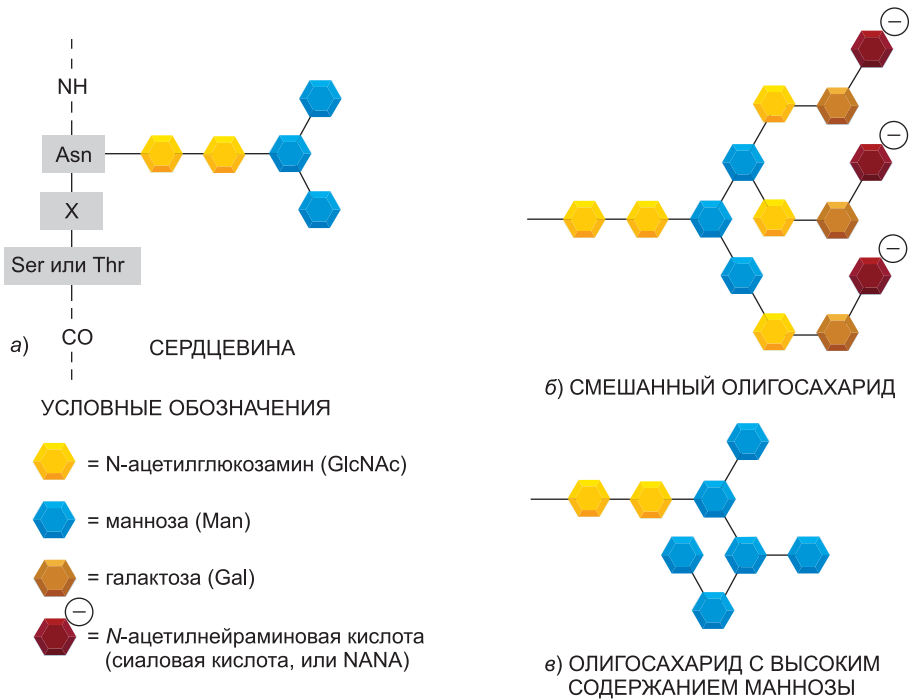


Рис. 13.30. Два основных класса аспарагин-связанных (*N*-связанных) олигосахаридов зрелых гликопротеинов млекопитающих. (а) Сложные олигосахариды и обогащенные маннозой олигосахариды обладают общей *сердцевиной*, унаследованной от исходного *N*-ацетилглюкозамина, добавленного в ЭР (см. рис. 12.50). Обычно она состоит из двух *N*-ацетилглюкозаминов (GlcNAc) и трех манноз (Man). (б) Каждый сложный олигосахарид состоит из *сердцевины* и *концевой области*, содержащей различное число копий особой трисахаридной единицы (*N*-ацетилглюкозамин-галактоза-сиаловая кислота), присоединенной к маннозной сердцевине. Часто терминальная область укорочена и содержит только GlcNAc и галактозу (Gal) или просто GlcNAc. Более того, к сердцевинному GlcNAc, связанному с аспарагином (Asn), может быть добавлен остаток фукозы. Таким образом, несмотря на то что этапы процессинга и последующего добавления сахаров строго упорядочены, сложные олигосахариды могут быть гетерогенными. Более того, хотя представленные на рисунке сложные олигосахариды имеют три ветви, также часто встречаются две или четыре ветви в зависимости от гликопротеина и клетки, в которой он синтезируется. (в) Олигосахариды с высоким содержанием маннозы не укорачиваются до сердцевинного участка и содержат дополнительные остатки маннозы. Также встречаются смешанные олигосахариды с одной ветвью Man и одной ветвью GlcNAc и Gal (не показаны).

Это привело к необходимости создания новой дисциплины — гликобиологии. Человеческий геном, например, кодирует сотни различных гликозилтрансфераз, экспрессия которых различается от клетки к клетке. Это приводит к широкому разнообразию гликозилированных форм одного и того же белка или липида в различных типах клеток и на различных стадиях дифференцировки, в зависимости от спектра ферментов, экспрессируемых клеткой. Модификации не ограничиваются *N*-связанными олигосахаридами, но также протекают на *O*-связанных сахарах, как мы обсудим дальше.

Показанные на (а) три аминокислоты составляют последовательность, узнаваемую ферментом олигосахарилтрансферазой, которая добавляет исходный оли-

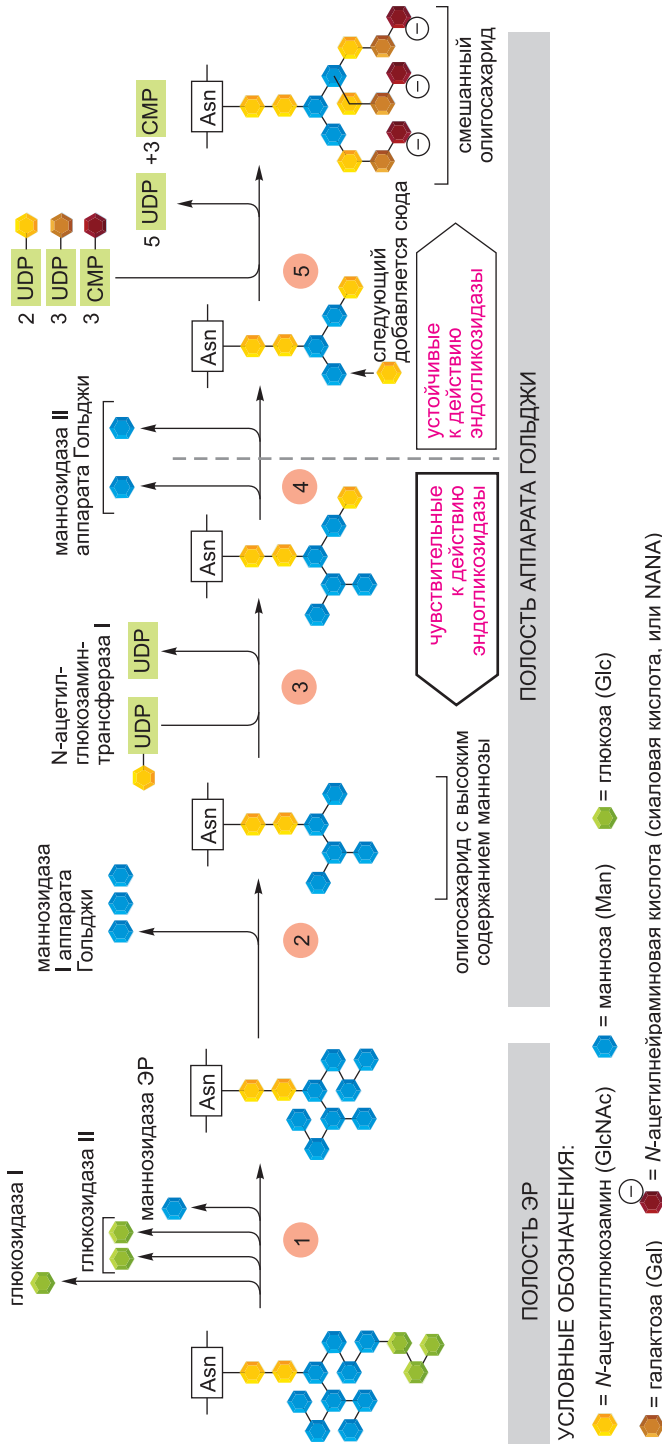


Рис. 13.31. Модификация олигосахаридов в ЭР и аппарате Гольджи. Путь процессинга высоко упорядочен, каждый последующий этап зависит от предыдущего. Этап 1: процессинг начинается в ЭР с удаления глюкозы с олигосахарида, исходно перенесенного на белок. Затем маннозидаза в мембране ЭР удаляет специфическую маннозу. Этап 2: остальные этапы протекают в стопке Гольджи, где маннозидаза I сначала удаляет еще три маннозы. Этап 3: затем N-ацетилглюкозаминтрансфераза I добавляет N-ацетилглюкозамин. Этап 4: маннозидаза II удаляет две дополнительные маннозы. В результате, отщипывается сердцевина с тремя маннозами, сохраняющимися в сложном олигосахариде. На этом этапе связь между двумя N-ацетилглюкозаминами в сердцевине становится устойчивой к действию высокоспецифичной эндоглюкозидазы (*Endo H*). Поскольку все более поздние структуры пути также устойчивы к *Endo H*, обработку этим ферментом широко используют для того, чтобы отличить сложные олигосахариды от олигосахаридов с высоким содержанием маннозы. Этап 5: наконец, как показано на рис. 13.30, добавляются дополнительные N-ацетилглюкозамины, галактозы и сиаловые кислоты. Эти конечные этапы синтеза сложных олигосахаридов протекают в цистернах аппарата Гольджи. Три типа ферментов гликозилтрансфераз работают последовательно, используя в качестве субстрата сахара, активированные посредством присоединения к указанному нуклеотиду. Мембраны цистерн Гольджи содержат специфические белки-переносчики, позволяющие каждому нуклеотидсахару войти в обмен на нуклеозидфосфаты, которые высвобождаются, после того как сахар присоединяется к белку на люминальной стороне.

госахарид к белку. Ser — серин; Thr — треонин, X — любая аминокислота, кроме пролина.

Обратите внимание, что в качестве биосинтетической органеллы аппарат Гольджи фундаментально отличается от ЭР: все сахара собираются в люмене из нуклеотидсахаров. С другой стороны, в ЭР *N*-связанные олигосахариды-предшественники собираются частично в цитозоле, частично — в люмене, и во всех люминальных реакциях в качестве субстратов выступают долихол-связанные сахара (см. рис. 12.52).

13.2.8. Протеогликаны собираются в аппарате Гольджи

Помимо изменений *N*-связанных олигосахаридов, происходящих с белками по мере прохождения через цистерны Гольджи на пути из ЭР в их конечный пункт назначения, многие белки также модифицируются другими способами. К гидроксильным группам некоторых белков добавляются сахара или определенные сериновые или треониновые боковые цепи. Такое **О-гликозилирование** (рис. 13.32), как и удлинение *N*-связанных олигосахаридных цепей, катализируется набором ферментов гликозилтрансфераз, которые используют нуклеотидсахара люмена аппарата Гольджи для последовательного добавления к белку остатков сахаров. Сначала присоединяется *N*-ацетилглюкозамин, а за ним — различное число дополнительных остатков сахаров, от нескольких до десятка и более.

Самого интенсивного О-гликозилирования в аппарате Гольджи удостоиваются *муцины*, гликопротеины слизистых выделений (см. рис. 13.29), и *сердцевинные белки протеогликанов*, которые модифицируются до **протеогликанов**. Как обсуждается в главе 19, при этом процессе происходит полимеризация одной или более *глюкозаминогликановой цепи* (длинного неразветвленного полимера, состоящего из повторяющихся дисахаридных единиц; см. рис. 19.58) через ксилозный линкер на серинах белка сердцевины. Многие протеогликаны секретируются и входят в со-

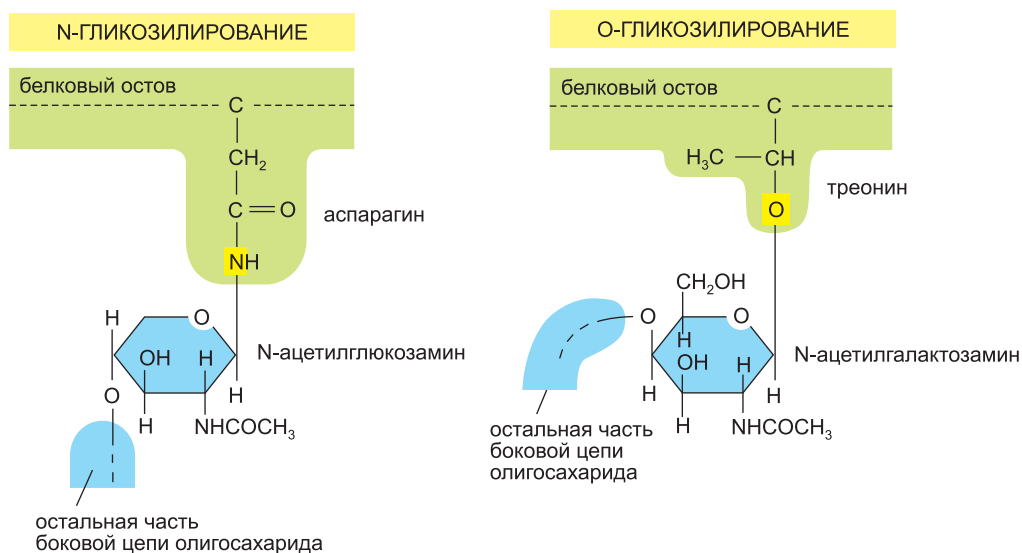


Рис. 13.32. *N*- и *O*-гликозилирование. В обоих случаях показан только один остаток сахара, напрямую присоединенный к белковой цепи.

став внеклеточного матрикса, тогда как другие остаются заякоренными на внешней поверхности плазматической мембраны. Еще один вид протеогликанов образует важный компонент слизистых веществ, например, слизи, секретируемой для образования защитной оболочки на поверхности многих видов эпителия.

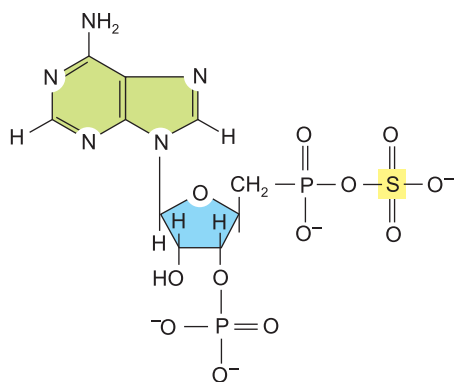
В аппарате Гольджи сахара в составе глюкозаминогликанов сразу после синтеза сильно сульфатируются, что добавляет значительную часть их характерно большого отрицательного заряда. Некоторые тирозины белков также сульфатируются вскоре после выхода из аппарата Гольджи. В обоих случаях сульфатация зависит от донора сульфата 3'-фосфоаденозино-5'-фосфосульфата (PAPS) (**рис. 13.33**), который транспортируется из цитозоля в люмен *транс*-сети Гольджи.

13.2.9. Зачем нужно гликозилирование?

Между сборкой олигосахаридов и синтезом других макромолекул, таких как ДНК, РНК и белки, существует важное различие. Если нуклеиновые кислоты и белки копируются с шаблона в повторяющейся последовательности идентичных шагов при помощи одних и тех же ферментов или наборов ферментов, то сложные углеводы на каждом этапе требуют разных ферментов, а каждый продукт узнается, как единственный субстрат для следующего фермента последовательности. Широкое разнообразие гликопротеинов и сложные пути, эволюционировавшие для их синтеза, указывают на то, что олигосахариды на гликопротеинах и гликофинголипидах выполняют очень важные функции.

Например, *N*-гликозилирование преобладает во всех эукариотах, включая дрожжи. *N*-связанные олигосахариды также в сходных формах встречаются в белках клеточной стенки архей, из чего можно заключить, что аппарат, необходимый для их синтеза, с эволюционной точки зрения появился очень давно. *N*-гликозилирование двумя путями способствует сворачиванию белков. Во-первых, оно напрямую делает интермедиаты фолдинга более растворимыми, препятствуя таким образом их агрегации. Во-вторых, последовательные модификации *N*-связанных олигосахаридов создают «глико-код», отмечающий протекание фолдинга белков и опосредующий связывание белка с шаперонами (см. главу 12) и лектинами, например, при направлении транспорта из ЭР в аппарат Гольджи. Как мы обсудим ниже, лектины также участвуют в сортировке белков в *транс*-сети Гольджи.

Поскольку гибкость цепи сахаров ограничена, даже маленький *N*-связанный



3'-фосфоаденозин-5'-фосфосульфат (PAPS)

олигосахарид, выступающий с поверхности гликопротеина (**рис. 13.34**), способен ограничить сближение других макромолекул с поверхностью белка. Таким образом, например, присутствие олигосахаридов делает гликопротеины более устойчивыми к перевариванию протеолитическими ферментами. Возможно, олигосахариды белков на поверхности клетки исходно служили предковой клетке защитной оболочкой. По сравнению с жесткой бактериальной клеточной стенкой достоинство

Рис. 13.33. Структура 3'-фосфоаденозино-5'-фосфосульфата (PAPS).

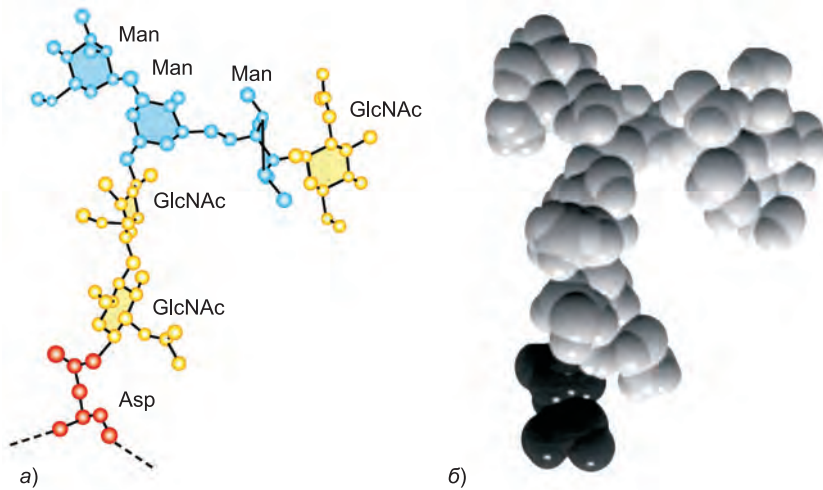


Рис. 13.34. Трехмерная структура небольшого *N*-связанного олигосахарида. Структура получена при помощи рентгеноструктурного анализа гликопротеина. Этот олигосахарид содержит всего 6 сахаров, тогда как в исходно переносимом на белок в ЭР *N*-связанном олигосахариде содержится 14 сахаров (см. рис. 12.50 и 12.51). (а) Скелетная модель, демонстрирующая все атомы, кроме водородов. (б) Пространственная модель; аспарагин темнее, чем остальные атомы. (б, с любезного разрешения Richard Feldmann.)

слизистой оболочки заключается в том, что она позволяет клетке менять форму и двигаться.

С тех пор углеводные цепи модифицировались для выполнения и других функций. Слизистые оболочки клеток легких и кишечника, например, защищают от многих патогенов. Узнавание углеводных цепей *лектинами* во внеклеточном пространстве играет важную роль во многих процессах развития и распознавания клетками друг друга: *селектины*, к примеру, представляют собой лектины, функционирующие во время адгезии клеток при миграции лимфоцитов (см. главу 19). Присутствие олигосахаридов способно модифицировать антигенные свойства белка, что делает гликозилирование важным фактором синтеза белков для фармакологических нужд.

Гликозилирование также может играть важную роль в регуляции. Сигнализация через поверхностный рецептор клетки Notch, например, определяет судьбу клетки в развитии. Notch — это трансмембранный белок, *O*-гликозилированный добавлением одной фукозы к нескольким серинам, треонинам и гидроксизинам. Некоторые типы клеток экспрессируют дополнительную гликозилтрансферазу, которая в аппарате Гольджи присоединяет *N*-ацетилглюкозамин к каждой из этих фукоз. Эта добавка изменяет специфичность рецептора Notch к активирующим его сигнальным пептидам на поверхности клетки.

13.2.10. Транспорт через аппарат Гольджи может протекать посредством везикулярного транспорта или созревания цистерн

До сих пор непонятно, как аппарат Гольджи приобретает и поддерживает свою поляризованную структуру и как молекулы мигрируют из одной цистерны в другую. Функциональные свидетельства, полученные при помощи транспорт-

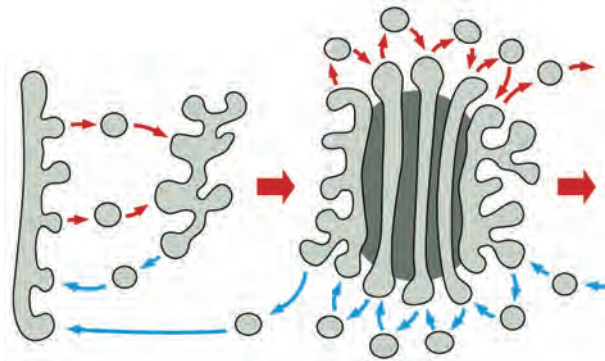
ных экспериментов *in vitro*, и обнаружение большого количества транспортных пузырьков вблизи цистерн Гольджи исходно привели к взгляду, что эти пузырьки транспортируют белки между цистернами, отпочковываясь от одной цистерны и сливаясь со следующей. Согласно **модели везикулярного транспорта** аппарат Гольджи представляет собой относительно стабильную структуру, его ферменты остаются на одном месте, тогда как транзитные молекулы движутся через цистерны последовательно в транспортных везикулах (**рис. 13.35, а**). Ретроградный поток пузырьков восстанавливает «сбежавшие» из ЭР и Гольджи белки и возвращает их в предыдущие компартменты. Направленный поток может быть достигнут, поскольку в продвигающиеся дальше везикулы обеспечивается селективный доступ молекул груза. Несмотря на то что продвигающиеся вперед и ретроградные пузырьки с большой вероятностью будут покрыты COPI, оболочки могут содержать различные адаптерные белки, которые обеспечивают селективность отбора молекул груза. Альтернативная возможность — транспортные везикулы, мигрирующие между цистернами Гольджи, совсем не направлены и просто случайным образом транспортируют груз туда-сюда. В этом случае направленный транспорт будет обеспечиваться непрерывным входом в *цис*-цистерны и выходом из *транс*-цистерн.

Другая гипотеза, известная как **модель созревания цистерн**, рассматривает аппарат Гольджи как динамическую структуру, в которой цистерны передвигаются сами по себе. Прибывающие из ЭР везикулярно-тубулярные кластеры сливаются друг с другом и становятся *цис*-сетью Гольджи. Согласно данной модели эта сеть затем постепенно созревает и становится *цис*-цистернами, средними цистернами и так далее. Таким образом, на *цис*-стороне стопки Гольджи будут непрерывно образовываться новые *цис*-цистерны, которые затем будут мигрировать через стопку по мере созревания (**рис. 13.35, б**). В пользу этой модели говорят микроскопические наблюдения, показывающие, что крупные структуры, например коллагеновые тяжи в фибробластах и чешуйки определенных водорослей, которые слишком велики, чтобы втиснуться в обычные транспортные пузырьки, постепенно продвигаются через стопку Гольджи.

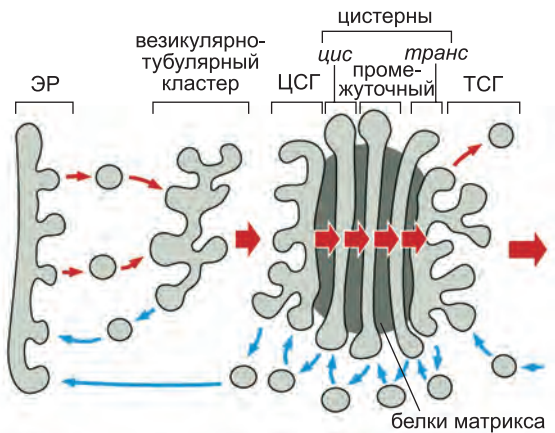
В модели созревания цистерн ретроградный поток объясняет характерное распределение ферментов Гольджи. Все содержимое, включая ферменты процессинга, принадлежащие раннему аппарату Гольджи, постепенно продвигается вперед вместе с созревающей цистерной. Но отпочковывающиеся окаймленные COPI пузырьки непрерывно собирают соответствующие ферменты и возвращают их в более ранние цистерны, где они функционируют. Таким образом, новообразованная *цис*-цистерна будет получать свой нормальный набор резидентных ферментов преимущественно из цистерны, следующей сразу за ней, и позднее передаст эти ферменты обратно в следующую образующуюся *цис*-цистерну.

Как мы обсудим позднее, когда цистерна продвигается вперед, чтобы стать частью *транс*-сети Гольджи, различные типы окаймленных пузырьков отпочковываются от нее до тех пор, пока эта сеть не исчезнет и следующая созревающая цистерна не займет ее место. Одновременно другие транспортные везикулы непрерывно возвращают в *транс*-сеть Гольджи мембрану из пост-Гольджи компартментов.

Модели везикулярного транспорта и созревания цистерн не исключают друг друга. В самом деле, исследования показывают, что транспорт может протекать по обоим механизмам: некоторый груз быстро продвигается вперед в транспортных везикулах, тогда как другой груз продвигается вперед медленнее, по мере того как аппарат Гольджи непрерывно обновляется через созревание цистерн.



а) МОДЕЛЬ ВЕЗИКУЛЯРНОГО ТРАНСПОРТА



б) МОДЕЛЬ СОЗРЕВАНИЯ В ЦИСТЕРНАХ АППАРАТА ГОЛЬДЖИ

Рис. 13.35. Две возможные модели, объясняющие организацию аппарата Гольджи и транспорт белков из одной цистерны в следующую. Существует вероятность, что транспорт через аппарат Гольджи в прямом направлении (красные стрелки) включает в себя элементы обеих моделей. (а) В модели везикулярного транспорта цистерны Гольджи представляют собой статичные органеллы, содержащие характерный набор резидентных ферментов. Прохождение молекул из цис в транс через Гольджи обеспечивается продвигающимися вперед транспортными пузырьками, отпочковывающимися от одной цистерны и сливающимися с другой. (б) Согласно альтернативной модели созревания цистерн каждая цистерна Гольджи созревает по мере продвижения наружу через стопку Гольджи. На каждом этапе резидентные белки Гольджи, переносимые вперед в цистерне, возвращаются обратно в более ранний компартмент в окаймленных COPI пузырьках. Например, когда новообразованная цистерна переходит в среднее положение, оставшиеся в ней *цис*-Гольджи ферменты будут выделены и ретроградно транспортированы в новые *цис*-цистерны позади. Точно так же средние ферменты будут получены посредством ретроградного транспорта из цистерн впереди. Таким образом, *цис*-цистерна будет созревать по мере продвижения наружу.

13.2.11. Белки матрикса Гольджи способствуют организации стопки

Уникальная архитектура аппарата Гольджи зависит как от микротрубоччатого скелета, который уже упоминался, так и от цитоплазматических белков матрикса Гольджи, образующих подпорки между соседними цистернами и придающих

стоппе Гольджи ее структурную целостность. Некоторые белки матрикса образуют длинные филаментные тяжи, которые, по-видимому, не дают транспортным везикулам Гольджи уйти далеко от органеллы. Когда клетка готовится к делению, митотические протеинкиназы фосфорилируют белки матрикса Гольджи, что приводит к фрагментации аппарата Гольджи и его рассеиванию по цитозолю. Затем фрагменты Гольджи равномерно расходятся по двум дочерним клеткам, где белки матрикса дефосфорилируются, и аппарат Гольджи собирается заново.

Удивительно, но белки матрикса Гольджи могут собираться в правильно локализованные стопки вблизи центромеры, даже когда мембранные белки Гольджи искусственно удерживают в ЭР. Это наблюдение указывает на то, что белки матрикса в большой степени ответственны как за структуру, так и за локализацию аппарата Гольджи в клетке.

Заключение

Правильно свернутые и собранные в ЭР белки упаковываются в окаймленные COPII транспортные пузырьки, отшнуровывающиеся от мембраны ЭР. Вскоре после этого везикулы теряют свою оболочку и сливаются друг с другом с образованием везикулярно-тубулярных кластеров. Затем кластеры движутся по микротрубочкам в аппарат Гольджи, где сливаются друг с другом с образованием цис-сети Гольджи. Любой резидентный белок ЭР, «сбежавший» из ЭР, возвращается обратно из везикулярно-тубулярных кластеров и аппарата Гольджи посредством ретроградного транспорта в COPI пузырьках.

Аппарат Гольджи, в отличие от ЭР, содержит множество нуклеотидсахаров, которые используются ферментами гликозилтрансферазами для реакций гликозилирования липидных и белковых молекул по мере их прохождения через аппарат Гольджи. Часто маннозы на N-связанных олигосахаридах, присоединяемые к белкам в ЭР, сначала удаляются, и добавляются другие сахара. Более того, аппарат Гольджи является сайтом протекания O-гликозилирования и добавления глюкозаминовых цепей к белкам сердцевины с образованием протеогликанов. Сульфатация сахаров в протеогликанах и определенных тирозинов на белках также происходит в поздних компартментах Гольджи.

Аппарат Гольджи принимает множество белков и липидов из ЭР и затем отправляет их в плазматическую мембрану, лизосомы и секреторные пузырьки. Аппарат Гольджи представляет собой поляризованную органеллу, состоящую из одной и более стопок дисковидных цистерн. Каждая стопка организована как набор по крайней мере трех функционально отличных друг от друга компартментов: цис-, средних и транс-цистерн. Цис- и транс-цистерны сообщаются со специальными станциями сортировки, носящими названия цис-сети Гольджи и транс-сети Гольджи соответственно. Белки и липиды движутся посредством везикулярного транспорта через стопку Гольджи в направлении от цис в транс. Это движение может объясняться везикулярным транспортом, постепенным созреванием цис-цистерн по мере их миграции по стопке или, что более вероятно, сочетанием этих механизмов. Предполагают, что непрерывный ретроградный везикулярный транспорт из более дистальных цистерн позволяет поддерживать концентрацию ферментов в цистернах, где они нужны. Законченные новые белки оказываются в транс-сети Гольджи, где происходит их упаковка в транспортные везикулы и отправка в специфические пункты назначения в клетке.

13.3. Транспорт из *транс*-сети Гольджи в лизосомы

Транс-сеть Гольджи сортирует все белки, проходящие через аппарат Гольджи (кроме тех, которые удерживаются там в качестве резидентных белков) в соответствии с их конечным пунктом назначения. Механизм сортировки очень хорошо изучен для белков, предназначенных в люмен лизосом, и в этом разделе мы рассмотрим этот селективный процесс транспорта. Мы начнем с краткого описания структуры и функций лизосом.

13.3.1. Лизосомы — это главный сайт внутриклеточного пищеварения

Лизосомы — это окруженные мембраной замкнутые компартменты, наполненные растворимыми гидролитическими ферментами, контролирующими внутриклеточное переваривание макромолекул.

Лизосомы содержат около 40 типов гидролитических ферментов, включая протеазы, нуклеазы, гликозидазы, липазы, фосфолипазы, фосфатазы и сульфатазы. Все эти ферменты — **кислые гидролазы**. Для оптимального функционирования они должны быть активированы протеолитическим расщеплением, и им требуется кислая среда, которую обеспечивают лизосомы, поддерживая внутренний pH в пределах 4,5–5,0. Благодаря такому размещению клетки дважды защищены от атаки собственной пищеварительной системы: мембрана лизосом не дает гидролитическим ферментам выйти в цитозоль, но даже если они туда попадут, то не смогут нанести большого вреда при pH цитозоля, составляющем примерно 7,2.

Как и другие внутриклеточные органеллы, лизосомы не только содержат особый набор ферментов, но и окружены уникальной мембраной. Большинство мембранных белков лизосом, например, необычно сильно гликозилированы, что помогает защитить их от лизосомальных протеаз люмена. Транспортные белки в лизосомальной мембране переносят конечные продукты расщепления макромолекул, например аминокислоты, сахара и нуклеотиды, в цитозоль, где клетка может их повторно использовать или выделить.

Вакуолярная H^+ -АТРаза в мембране лизосом использует энергию гидролиза АТФ для накачки H^+ в люмен, поддерживая внутри кислый pH (рис. 13.36). Лизосомальный H^+ -насос принадлежит семейству АТРАЗ *V-типа* и устроен так же, как АТРАЗы митохондрий и хлоропластов (АТРАЗы F-типа), которые превращают энергию запасенного градиента H^+ в АТФ (см. рис. 11.12). Однако, в отличие от этих ферментов, вакуолярная H^+ -АТРаза работает исключительно в обратном направлении, накачивая H^+ в органеллу. Сходные или идентичные АТРАЗы V-типа закисляют все эндоцитозные и экзоцитозные органеллы, включая лизосомы, эн-

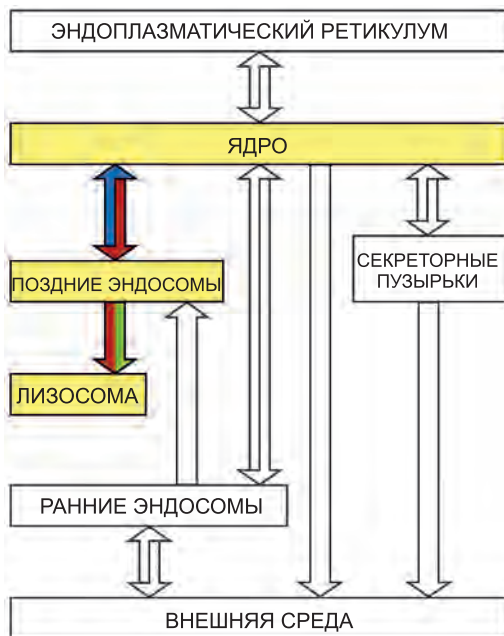




Рис. 13.36. Лизосомы. Кислые гидролазы — это гидролитические ферменты, активные в кислой среде. АТРаза V-типа в мембране лизосомы накачивает внутрь H^+ , поддерживая кислый pH люмена.

досомы, определенные компартменты аппарата Гольджи и транспортные и секреторные везикулы. Помимо создания среды с низким pH, подходящим для протекающих в люмене органеллы реакций, градиент H^+ служит источником энергии для транспорта малых метаболитов через мембрану органеллы.

13.3.2. Лизосомы неоднородны

Лизосомы обнаружили в процессе биохимического фракционирования клеточных экстрактов; только позднее их ясно увидели в электронный микроскоп. Несмотря на значительные различия в форме и размерах, окраши-

вание их специфическими антителами показало, что все лизосомы можно отнести к членам единого семейства органелл. Их также можно идентифицировать методами гистохимии, используя осадок, образующийся в результате воздействия кислой гидролазы на ее субстрат. Это позволяет определить, какие органеллы содержат гидролазу (**рис. 13.37**). Согласно этому критерию лизосомы содержатся во всех эукариотических клетках.

Неоднородность морфологии лизосом контрастирует с относительно однородной структурой большинства других клеточных органелл. Разнообразие отражает широкий спектр пищеварительных функций, которые опосредуют кислые гидролазы, включая расщепление внутри- и внеклеточных отходов, разрушение фагоцитированных микроорганизмов и производство питательных веществ клетки. Однако разнообразие морфологии лизосом также отражает то, как они формируются: поздние эндосомы содержат как вещества, полученные из плазматической мембраны, так и новосинтезированные лизосомальные гидролазы и, следовательно, уже обладают сходством с лизосомами. Поздние эндосомы сливаются с уже существующими лизосомами с образованием структур, иногда называемых *эндолизосомами*, которые затем сливаются друг с другом (**рис. 13.38**). Когда большая часть эндоцитированных веществ внутри эндолизосомы переварилась, и остались только устойчивые или медленно расщепляемые остатки, эти органеллы становятся «классическими» лизосомами. Они относительно плотные, круглые и маленькие, но могут вновь войти в цикл путем слияния с поздними эндосомами или эндолизосомами. Таким образом, между поздними эндосомами и лизосомами нет принципиальных различий: они одинаковы, за исключением того, что находятся на разных стадиях цикла созревания. По этой причине лизосомы иногда рассматривают как неоднородный набор различных органелл, общим свойством которых является высокое содержание гидролитических ферментов. В случае растений применить более узкое определение, чем это, еще сложнее, что мы обсудим дальше.

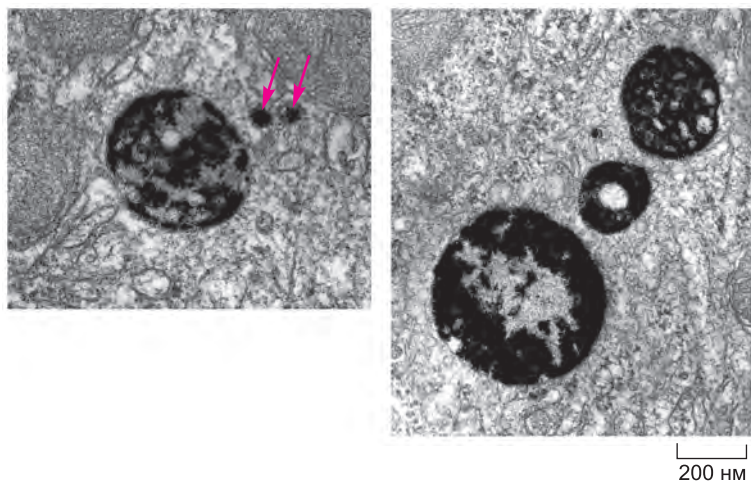


Рис. 13.37. Гистохимическая визуализация лизосом. На этих электронных микрофотографиях показаны два участка клетки, окрашенной для локализации кислой фосфатазы, маркерного фермента лизосом. Более крупные мембранные органеллы, содержащие плотный осадок фосфата свинца, это лизосомы. Их различная морфология отражает многообразие в количествах и природе веществ, которые они переваривают. Осадок образуется, когда клетки, фиксированные глутаральдегидом (для иммобилизации фермента), инкубируются с субстратом фосфатазы в присутствии ионов свинца. Красные стрелки на верхнем изображении указывают на две маленькие везикулы, которые, по-видимому, транспортируют кислые гидролазы из аппарата Гольджи.

13.3.3. Вакуоли растений и грибов — это удивительно многофункциональные лизосомы

Большинство клеток растений и грибов (включая дрожжи) содержат одну или несколько очень крупных, заполненных водой везикул, называющихся **вакуолями**. Обычно они заполняют более 30 % объема клетки, а в некоторых типах клеток — до 90 % (**рис. 13.39**). Вакуоли родственны лизосомам животных клеток и содержат множество гидролитических ферментов, но их функции удивительно разнообразны. Растительная вакуоль может служить органеллой запасаания питательных веществ и отходов клетки и компартментом деградации, что является экономным способом увеличения объема клетки (**рис. 13.40**), а также регулятором *тургорного давления* (осмотического давления, действующего изнутри на клеточную стенку и не даю-

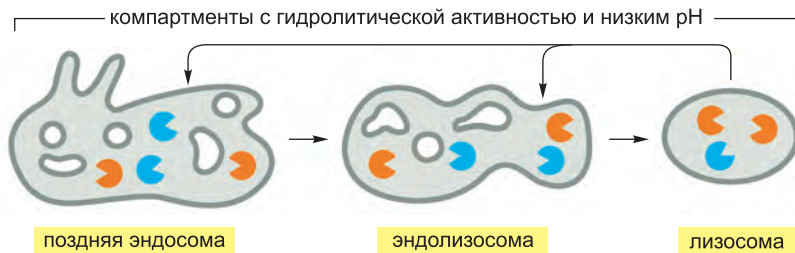


Рис. 13.38. Модель созревания лизосом. Неоднородность морфологии лизосом частично отражает различную природу веществ, доставляемых в органеллу, а также указанные здесь различные стадии цикла созревания.

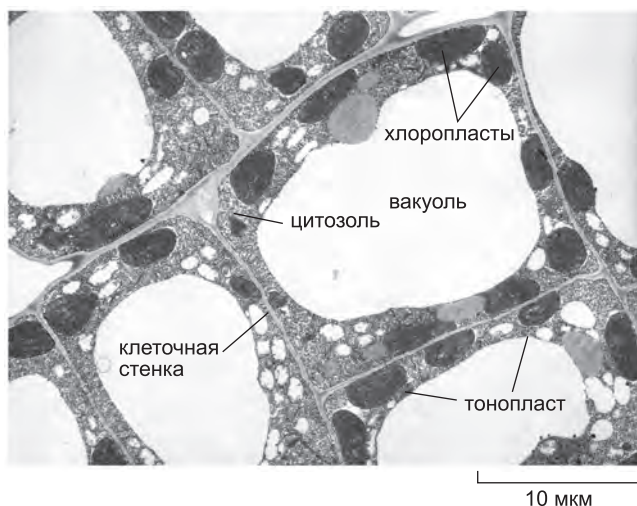


Рис. 13.39. Вакуоль растительной клетки. На этой электронной микрофотографии клеток молодого листа табака видно, что цитозоль представляет собой тонкий слой, содержащий хлоропласты и прижатый к клеточной стенке огромной вакуолью. Мембрана вакуоли называется тонопластом. (С любезного разрешения J. Burgess.)

щего клетке сжиматься). Одна и та же клетка может содержать разные вакуоли, выполняющие различные функции, например переваривание и запасаение.

Вакуоль играет важную роль в поддержании гомеостаза, позволяя растительной клетке выдерживать широкий спектр изменяющихся окружающих условий. Например, когда рН среды падает, поток H^+ в цитозоль, по крайней мере частично, уравнивается усилением транспорта H^+ в вакуоль, которая поддерживает постоянный рН цитозоля. Точно так же многие растительные клетки поддерживают практически постоянное тургорное давление, несмотря на значительные изменения тоничности жидкости в их ближайшем окружении. Им это удастся за счет изменения осмотического давления цитозоля и вакуоли: частично за счет регулируемого расщепления и повторного синтеза полимеров, например полифосфата, в вакуоли, и частично за счет изменения скорости транспорта сахаров, аминокислот и других метаболитов через плазматическую мембрану и мембрану вакуоли. Тургорное давление регулирует активность различных транспортеров в обеих мембранах и, следовательно, связанные с ними потоки.

Люди часто собирают вещества, запасенные в растительных вакуолях. Разнообразие этих веществ, в зависимости от вида, распространяется от резины до опиума и ароматических соединений чеснока. Многие запасенные продукты обладают метаболическими функциями. Белки, например, могут годами храниться в вакуолях запасяющих клеток многих семян, например гороха и бобов. Когда семя прорастает, эти белки гидролизуются, и образовавшиеся аминокислоты становятся пищей для развивающегося эмбриона. Пигменты антоцианы, хранящиеся в вакуолях, окрашивают лепестки многих цветов для привлечения насекомых-опылителей, а ядовитые молекулы, высвобождаемые из вакуолей, когда растение поедается или повреждено, создают защиту от хищников.

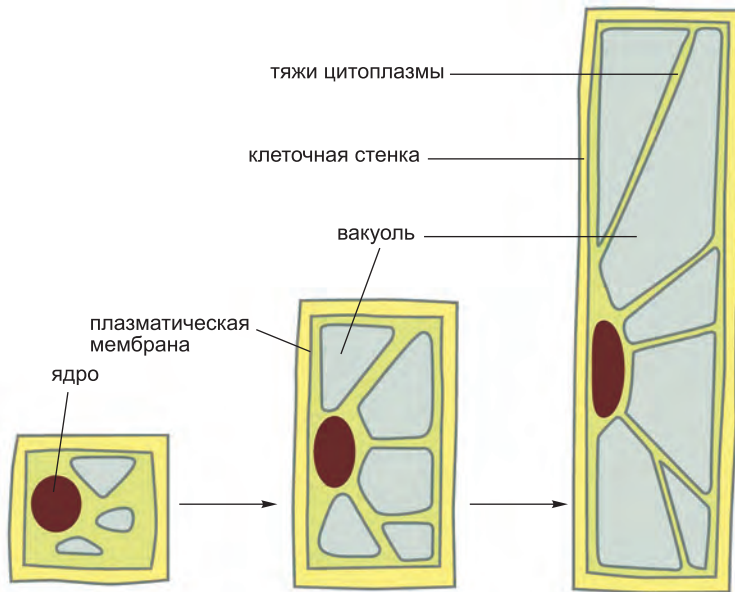


Рис. 13.40. Роль вакуоли в регуляции размера растительной клетки. Растительная клетка способна значительно увеличить свой объем без увеличения объема цитозоля. Локальное ослабление клеточной стенки ориентирует движимое тургором увеличение клетки, сопровождаемое накачкой воды в расширяющуюся вакуоль. Цитозоль, в конце концов, превращается в тонкий периферический слой, сообщающийся с областью ядра тяжами цитоплазмы, стабилизированными пучками актиновых филаментов (не показано).

13.3.4. Вещества доставляются в лизосомы различными путями

Лизосомы обычно служат местом, где сливается несколько потоков внутриклеточного транспорта. По пути из ЭР через аппарат Гольджи доставляется большинство пищеварительных ферментов, и по крайней мере по трем путям из различных источников в лизосомы поступают вещества для переваривания.

Лучше всего из этих путей деградации изучен путь, по которому движутся макромолекулы, захваченные из внеклеточной жидкости *эндоцитозом*. Как подробно обсуждалось выше, эндоцитированные молекулы сначала доставляются в везикулах в маленькие внутриклеточные органеллы неправильной формы — *ранние эндосомы*. В них поглощенные вещества впервые встречаются с лизосомальными гидролазами, доставляемыми в эндосомы из аппарата Гольджи. Некоторые эндоцитированные молекулы селективно улавливаются и рециркулируют в плазматическую мембрану, тогда как другие отправляются дальше в *поздние эндосомы*. Внутренняя среда поздних эндосом слегка закислена ($\text{pH} \sim 6$), и именно здесь начинается гидролитическое переваривание эндоцитированных молекул. Как отмечено выше, в зрелых лизосомах, образующихся в процессе созревания из поздних эндосом, внутренний pH еще ниже. По мере созревания лизосом белки эндосомальной мембраны селективно возвращаются в транспортных везикулах обратно в эндосомы или ТСГ.

Все типы клеток используют второй путь деградации в лизосомах для избавления от отслуживших свое частей самой клетки — этот процесс называется **аутофагией**. В клетках печени, например, время жизни типичной митохондрии со-

ставляет около 10 дней, и на электронных микрофотографиях нормальных клеток видны лизосомы, содержащие (и, по-видимому, переваривающие) митохондрии, а также другие органеллы. Предположительно, процесс начинается с окружения органеллы двойной мембраной неизвестного происхождения и образования *аутофагосомы*, которая затем сливается с лизосомой (или поздней эндосомой). Процесс строго регулируется, и определенные компоненты клетки могут быть помечены для лизосомального разрушения в ходе перестройки клетки. Например, гладкий ЭР, пролиферирующий в клетках печени при детоксикации в ответ на такие жирорастворимые лекарства, как фенobarбитал (см. главу 12), селективно разрушается аутофагией после удаления лекарства.

Точно так же другие ненужные органеллы, включая стареющие пероксисомы и митохондрии, могут быть селективно направлены на деградацию путем аутофагии. В условиях голодания значительная часть цитозоля неселективно захватывается в аутофагосомы. Метаболиты, образующиеся в результате переваривания захваченных веществ, помогают клетке пережить ограниченность внешних питательных ресурсов.

Помимо поддержания в равновесии базовых клеточных функций и переваривания устаревших частей клетки, аутофагия также важна для развития и здоровья. Она способствует перестройке дифференцирующихся клеток, избавляясь от ненужных более частей, и помогает защищаться от вторгающихся вирусов и бактерий. Аутофагия уникально функциональна в качестве механизма, способного удалить целые органеллы и крупные белковые агрегаты, с которыми не могут справиться другие механизмы и протеосомальная деградация.

Мы до сих пор очень мало знаем о том, какие события приводят к образованию аутофагосом или как процесс аутофагии регулируется и направляется на определенные органеллы. В дрожжевых и животных клетках идентифицировано более 25 различных белков, участвующих в этом процессе. Аутофагию можно разделить на четыре этапа: (1) зарождение ограничивающей мембраны и ее разрастание в серповидную структуру, захватывающую часть цитоплазмы; (2) замыкание аутофагосомы в окруженный двойной мембраной компартмент; (3) слияние нового компартмента с лизосомой и (4) переваривание внутренней мембраны аутофагосомы и ее содержимого (**рис. 13.41**). Нужно разгадать еще много тайн, включая идентификацию мембранной системы, из которой выходят образующие оболочку аутофагосомы везикулы, и механизм, по которому органеллы-мишени селективно аутофагируются.

Как мы обсудим позже, третий путь, по которому в лизосомы попадают вещества для деградации, встречается, как правило, в клетках, специализирующихся на фагоцитозе крупных частиц и микроорганизмов. Такие профессиональные фагоциты (макрофаги и нейтрофилы у позвоночных) захватывают объекты с образованием *фагосомы*, которая затем превращается в лизосому так же, как это происходит с аутофагосомой. На **рис. 13.42** приведены эти три пути.

13.3.5. Рецептор маннозо-6-фосфата узнает лизосомальные белки в транс-сети Гольджи

Теперь мы рассмотрим путь, по которому в лизосомы доставляются лизосомальные гидролазы и мембранные белки. Оба класса белков сначала котрансляционно транспортируются в шероховатый ЭР, а затем через аппарат Гольджи в ТСГ. Транс-

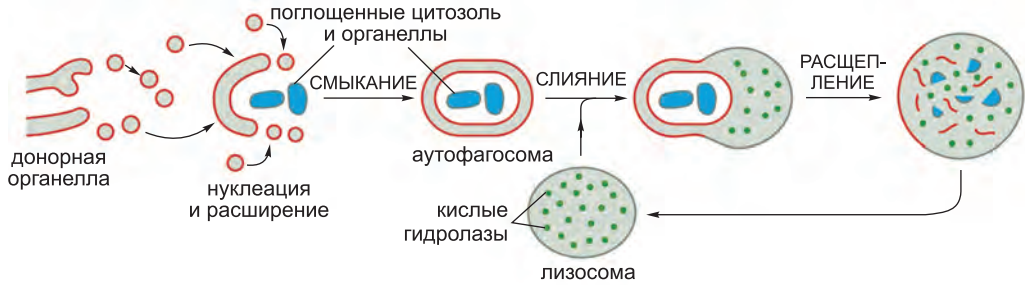


Рис. 13.41. Модель аутофагии. После зарождения в цитоплазме полумесяц аутофагосомальной мембраны разрастается путем слияния с его краями везикул неизвестного происхождения. В конце концов в результате слияния мембран происходит замыкание аутофагосомы, изолирующей часть цитоплазмы клетки в окруженном двойной мембраной пространстве. Затем аутофагосома сливается с лизосомой, содержащей кислые гидролазы, переваривающие ее содержимое.

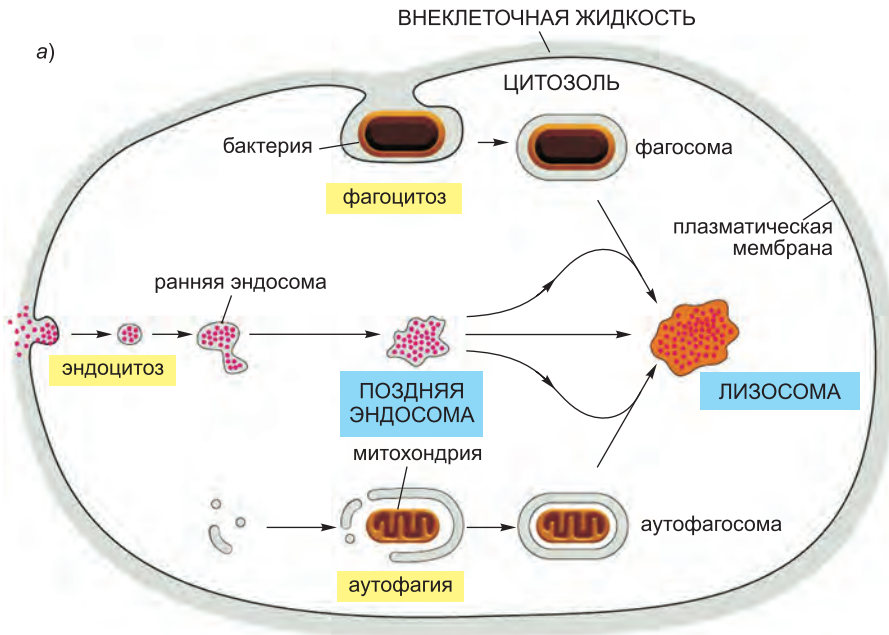


Рис. 13.42. Три пути к деградации в лизосомах. (а) Вещества в каждом пути происходят из различных источников. Обратите внимание, что аутофагосома окружена двойной мембраной. (б) Электронная микрофотография аутофагосомы, содержащей митохондрию и пероксисому. (б, фотография получена Daniel S. Friend, из D. W. Fawcett, A textbook of histology, 12th ed. New York: Chapman and Hall, 1994. С любезного разрешения издательства Kluwer.)



портные везикулы, доставляющие эти белки в эндосомы (откуда белки переносятся в лизосомы), отпочковываются от ТСГ. Везикулы улавливают лизосомальные белки и исключают многие другие белки, упаковывающиеся в другие везикулы для доставки в другие компартменты.

Как лизосомальные белки узнаются и отбираются в ТСГ с необходимой точностью? Мы знаем ответ для лизосомальных гидролаз. Они несут уникальный маркер в форме групп *маннозо-6-фосфата* (М6Р), которые добавляют исключительно к *N*-связанным олигосахаридам этих растворимых лизосомальных белков по мере их прохождения через люмен *цис*-сети Гольджи (**рис. 13.43**). Трансмембранные **белки-рецепторы М6Р**, расположенные в ТСГ, узнают группы М6Р. Рецепторные белки связываются с лизосомальными гидролазами на люминальной стороне мембраны и с адаптерными белками в собирающейся клатриновой оболочке на цитоплазматической стороне. Таким образом, они способствуют упаковке гидролаз в клатриновые пузырьки, отпочковывающиеся от ТСГ. Пузырьки сбрасывают свою оболочку и доставляют свое содержимое в ранние эндосомы.

13.3.6. Рецептор М6Р движется между определенными мембранами

Рецептор М6Р связывает свой специфический олигосахарид в ТСГ при pH 6,5–6,7 и высвобождает его при pH 6, что соответствует pH внутреннего пространства поздних эндосом. Таким образом, когда по мере созревания эндосом снижается pH, лизосомальные гидролазы диссоциируют от рецептора М6Р и в конце концов начинают переваривать вещества, доставляемые путем эндоцитоза. Кислая фосфатаза удаляет с маннозы фосфатную группу, разрушая сигнал сортировки и внося вклад в отстыковку лизосомальных гидролаз от рецептора М6Р. Высвободив связанные ферменты, рецепторы М6Р улавливаются окаймленные ретромером транспортные пузырьки, отпочковывающиеся от эндосом; рецепторы затем возвращаются в ТСГ для повторного использования (**рис. 13.44**). Для транспорта в обоих направлениях необходимы сигналы на цитоплазматическом хвосте рецептора М6Р, направляющие этот фермент в эндосому или обратно в аппарат Гольджи. Эти сигналы узнаются ретромерным комплексом (см. рис. 13.19), рекрутирующим рецепторы М6Р в везикулы в эндосомах. Рециркуляция рецептора М6Р напоминает описанную ранее рециркуляцию рецептора KDEL, хотя она и отличается по типу опосредующих транспорт окаймленных пузырьков.

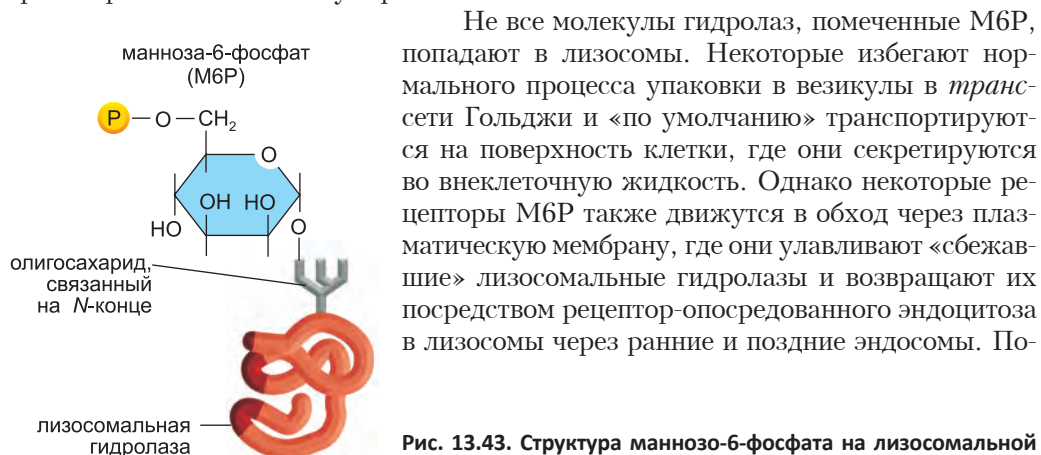


Рис. 13.43. Структура маннозо-6-фосфата на лизосомальной гидролазе.

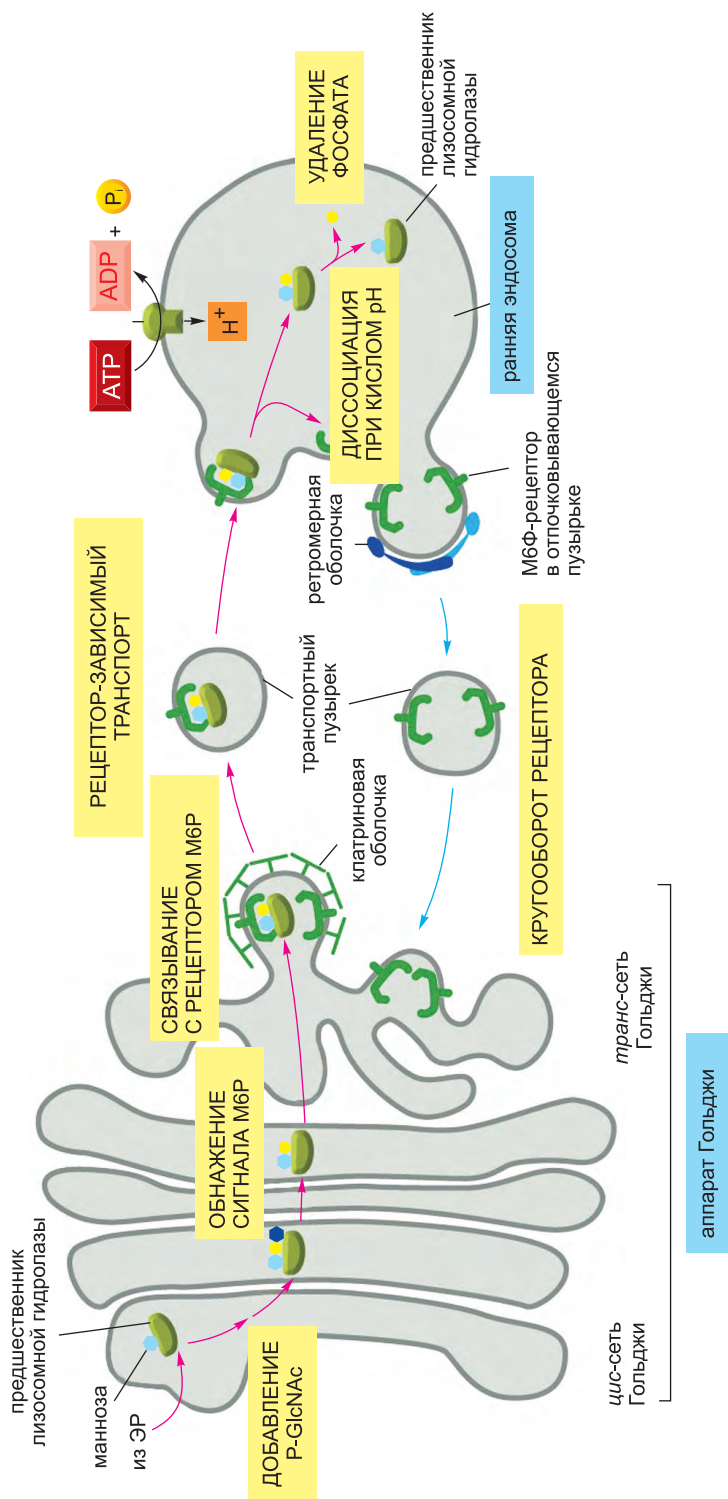


Рис. 13.44. Транспорт новосинтезированных лизосомальных гидролаз в лизосомы. Благодаря последовательному действию двух ферментов в цис- и транс-сети Гольджи к предшественникам лизосомальных белков присоединяется маннозо-6-фосфат (M6P) (см. рис. 13.45). Затем они отделяются от всех остальных типов белков в ТСГ за счет того, что мономерные адаптерные белки клатриновой оболочки связывают рецепторы M6P, которые, в свою очередь, связывают модифицированные лизосомальные гидролазы. Клатриновые везикулы отпочковываются от ТСГ, теряют свою оболочку и сливаются с поздними эндосомами. При пониженном pH эндосом гидролазы диссоциируют от рецепторов M6Ф, и пустые рецепторы рециркулируют в окаймленных ретромером пузырьках в аппарат Гольджи для последующих этапов транспорта. В эндосомах с манноз, присоединенных к гидролазам, удаляются фосфаты, что также препятствует возвращению гидролаз вместе с рецептором в аппарат Гольджи.

скольку лизосомальным гидролазам для работы требуется кислое окружение, они не могут причинить много вреда во внеклеточной жидкости, чей pH обычно составляет 7,4.

13.3.7. Сигнальный участок на полипептидной цепи гидролазы указывает, куда присоединять М6Р

Система сортировки, отделяющая лизосомальные гидролазы и отправляющая их в эндосомы, работает потому, что в аппарате Гольджи остатки М6Р присоединяются только к соответствующим гликопротеинам. Для этого необходимо специфическое узнавание гидролаз ферментами Гольджи, отвечающими за добавление М6Р. Поскольку все гликопротеины покидают ЭР, неся одинаковые цепи *N*-связанных олигосахаридов, сигнал добавления групп М6Р к олигосахаридам должен располагаться где-то в полипептидной цепи гидролазы. Эксперименты по генетической инженерии показали, что сигнал узнавания представляет собой кластер соседних аминокислот на поверхности каждого белка. Этот кластер называется *сигнальным участком*.

Реакцию присоединения М6Р к лизосомальным гидролазам катализируют два фермента, действующих последовательно. Первый — это GlcNAc-фосфотрансфераза в *цис*-сети Гольджи, которая специфически связывает гидролазы и добавляет GlcNAc-фосфат к одному или двум остаткам маннозы на каждой олигосахаридной цепи (**рис. 13.45**). Затем второй фермент в *транс*-сети Гольджи отщепляет остаток GlcNAc, оставляя новообразованный маркер М6Р. Поскольку большинство лизосомальных гидролаз содержит множество олигосахаридов, они приобретают много остатков М6Р. Следовательно, создается высокое сродство рецептора М6Р к маркеру.

13.3.8. Нарушения GlcNAc-фосфотрансферазы вызывают у людей лизосомальные болезни накопления

Генетические нарушения, затрагивающие одну или несколько лизосомальных гидролаз, вызывают несколько **лизосомальных болезней накопления** человека. Нарушения вызывают накопление в лизосомах непереваренных субстратов, что приводит к тяжелым патологическим последствиям, чаще всего в нервной системе. В большинстве случаев причиной служит мутация в структурном гене, кодирующем отдельную лизосомальную гидролазу. Это происходит, например, при *синдроме Хутлера*, когда фермент, необходимый для расщепления определенных типов глюкозаминогликановых цепей, нарушен или отсутствует. Однако наиболее тяжелой лизосомальной болезнью хранения является очень редкое заболевание, носящее название *болезни клеточных включений* (*I-клеточная болезнь*, от inclusion — включение). При этом заболевании отсутствуют почти все гидролитические ферменты лизосом или фибробластов, и их непереваренные субстраты накапливаются в лизосомах, что впоследствии приводит к образованию в клетках пациентов *включений*.

I-клеточная болезнь вызывается нарушением единственного гена и, как и большинство генетических синдромов недостаточности, является рецессивной, т.е. проявляется только у тех людей, у которых обе копии гена дефектны. У пациентов с болезнью клеточных включений все отсутствующие в лизосомах гидролазы находятся в крови. Поскольку гидролазы не могут быть правильно отсортиро-

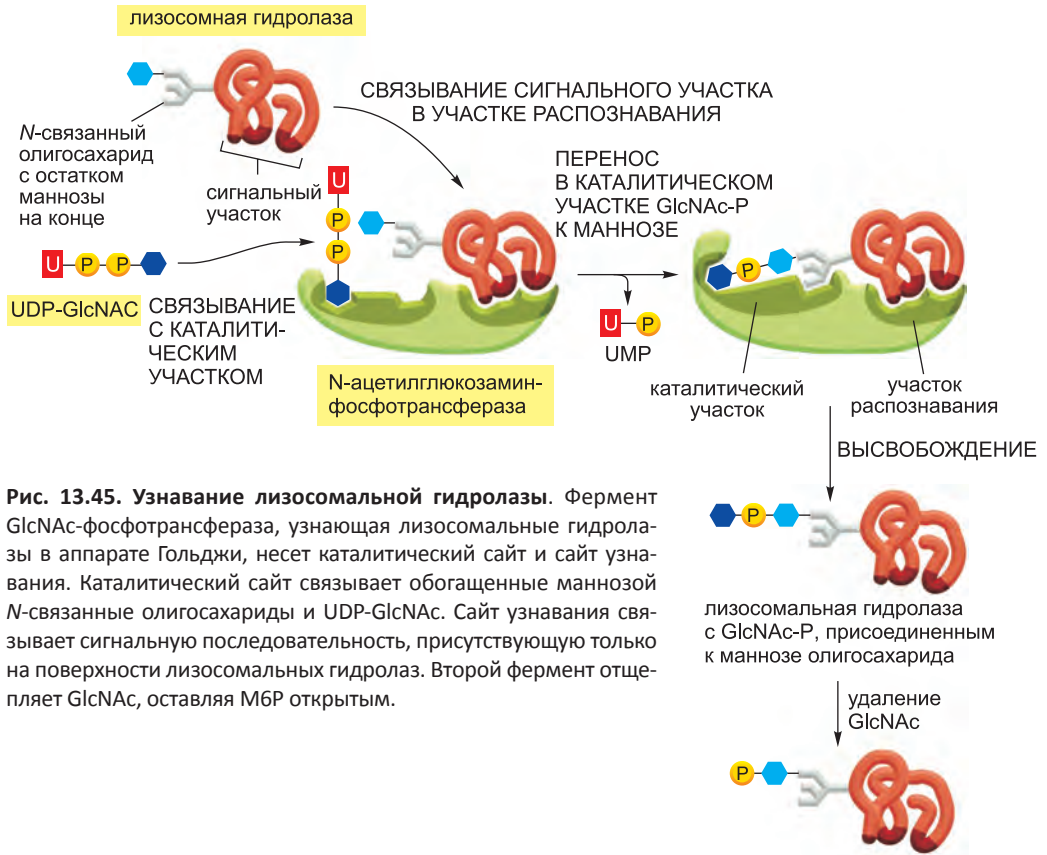


Рис. 13.45. Узнавание лизосомальной гидролазы. Фермент GlcNAc-фосфотрансфераза, узнающая лизосомальные гидролазы в аппарате Гольджи, несет каталитический сайт и сайт узнавания. Каталитический сайт связывает обогащенные маннозой N-связанные олигосахариды и UDP-GlcNAc. Сайт узнавания связывает сигнальную последовательность, присутствующую только на поверхности лизосомальных гидролаз. Второй фермент отщепляет GlcNAc, оставляя M6P открытым.

ваны в аппарате Гольджи, они секретируются, а не транспортируются в лизосомы. Ошибка сортировки выявляют дефектную или находящуюся в недостатке GlcNAc-фосфотрансферазу. Поскольку лизосомальные белки не фосфорилируются в *цис*-сети Гольджи, рецепторы M6P в ТСГ не отбирают их в специализированные транспортные везикулы. Вместо этого, лизосомальные гидролазы переносятся на поверхность клеток и по умолчанию секретируются.

При болезни клеточных включений лизосомы некоторых типов клеток, например гепатоцитов, содержат нормальный набор лизосомальных ферментов. Это указывает на то, что существует другой путь направления гидролаз в лизосомы, используемый в одних типах клеток, но не в других. Природа этого M6P-независимого пути неизвестна. Точно так же M6P-независимый путь во всех клетках отбирает в ТСГ мембранные белки лизосом для транспорта в поздние эндосомы, и поэтому эти белки при I-клеточной болезни нормальны. Эти мембранные белки выходят из ТСГ в клатриновых пузырьках, отличающихся от пузырьков, транспортирующих помеченные M6P гидролазы, и несут другие адаптерные белки.

Непонятно, почему клеткам требуется больше одного пути сортировки для сборки лизосом, хотя неудивительно, что для растворимых и мембраносвязанных лизосомальных белков работают разные механизмы, особенно если учесть, что эти мембранные белки, в отличие от рецепторов M6P, являются резидентными белками лизосом и не должны быть возвращены в ТСГ.

13.3.9. Некоторые лизосомы претерпевают экзоцитоз

Направление вещества в лизосомы не обязательно является концом пути. Лизосомальная секреция непереваренного содержимого позволяет всем клеткам избавляться от неперевариваемых отходов. Для большинства клеток это, видимо, является второстепенным механизмом, используемым только при стрессе. Однако некоторые типы клеток содержат специализированные лизосомы, приобретшие необходимую для слияния с плазматической мембраной машинерию. *Меланоциты* кожи, например, в лизосомах синтезируют и запасают пигменты. Такие пигмент-содержащие *меланосомы* высвобождают свой пигмент во внеклеточное пространство эпидермиса путем экзоцитоза. Затем пигмент захватывается кератиноцитами, что приводит к нормальной пигментации кожи. При некоторых генетических заболеваниях нарушения экзоцитоза меланосом блокируют процесс переноса, что приводит к гипопигментации (альбинизму).

Заключение

Лизосомы специализируются на внутриклеточном переваривании макромолекул. Они содержат уникальные мембранные белки и широкий спектр растворимых гидролитических ферментов, которые лучше всего работают при pH 5, т. е. при внутреннем pH лизосом. АТФ-зависимый H^+ -насос в мембране лизосом поддерживает низкий pH. Новосинтезированные лизосомальные белки переходят в люмен ЭР, транспортируются через аппарат Гольджи, а затем переносятся в клатриновых транспортных пузырьках из транс-сети Гольджи в поздние эндосомы.

Лизосомальные гидролазы содержат N-связанные олигосахариды, которые уникальным образом ковалентно модифицируются в цис-сети Гольджи таким образом, что их остатки маннозы фосфорилируются. Эти маннозо-6-фосфатные (М6Р) группы узнаются белком-рецептором М6Р, который отбирает гидролазы и упаковывает их в отпочковывающиеся транспортные везикулы, доставляющие свое содержимое в эндосомы. Рецепторы М6Р циркулируют между транс-сетью Гольджи и этими эндосомами. Низкий pH эндосом и удаление фосфата с группы М6Р вызывает диссоциацию лизосомальных гидролаз от рецепторов, что делает транспорт гидролаз однонаправленным. В отдельной транспортной системе доставки резидентных лизосомальных мембранных белков из транс-сети Гольджи используются клатриновые пузырьки.

13.4. Транспорт в клетку из плазматической мембраны: эндоцитоз

Пути, ведущие внутрь с поверхности клетки в лизосомы, начинаются с процесса **эндоцитоза**, с помощью которого клетки захватывают макромолекулы и диспергируют вещества, а в особых случаях даже целые клетки. В ходе этого процесса поглощаемое вещество постепенно окружается небольшим участком плазматической мембраны, которая сначала изгибается, а затем отшнуровывается с образованием *эндоцитозного пузырька*, содержащего поглощенное вещество или частицу. Различают два основных вида эндоцитоза в зависимости от размера образующихся эндоцитозных пузырьков. При *фагоцитозе* (от греч. «фагос» — пожирать и «цитос» — клетка) захватываются крупные частицы в составе больших пузырьков, нося-

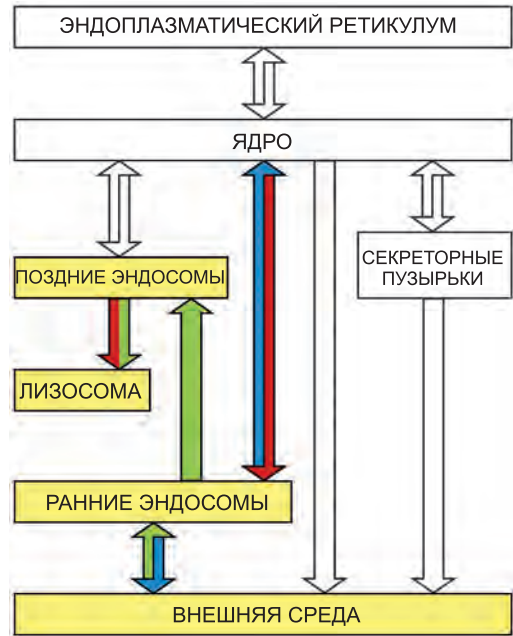
щих название *фагосом* (обычно > 250 нм в диаметре). При *пиноцитозе* (от греч. «пинос» — пить и «цитос» — клетка) поглощаются жидкости и растворенные вещества в маленьких *пиноцитозных пузырьках* (около 100 нм в диаметре). Большинство эукариотических клеток непрерывно поглощают жидкости и растворенные в них вещества путем пиноцитоза; крупные частицы наиболее эффективно захватываются специализированными фагоцитирующими клетками.

13.4.1. Специализированные фагоцитирующие клетки способны поглощать крупные частицы

Фагоцитоз — это особая форма эндоцитоза, при которой клетки используют крупные эндоцитозные пузырьки — **фагосомы** — для поглощения больших частиц, например микроорганизмов и мертвых клеток. У простейших фагоцитоз является одной из форм питания: крупные частицы, захваченные фагоцитозом, в конце концов оказываются в лизосомах, а продукты последующего процесса пищеварения выводятся в цитозоль и используются в качестве пищи. Однако в многоклеточных организмах только некоторые клетки способны столь эффективно поглощать такие крупные частицы. В кишечнике животных, например, частицы пищи расщепляются за счет внеклеточных процессов и клетки импортируют уже маленькие продукты гидролиза.

Назначение фагоцитоза у большинства животных заключается не в питании, и он протекает, в основном, в специализированных клетках, так называемых профессиональных фагоцитах. У млекопитающих выделяют два класса белых клеток крови, выполняющих роль *профессиональных фагоцитов*, — **макрофаги** и **нейтрофилы**. Эти клетки развиваются из гемопоэтических стволовых клеток (обсуждаемых в главе 23) и поглощают попадающие в организм микроорганизмы, защищая нас от инфекции. Макрофаги также играют важную роль в удалении старых клеток и клеток, погибших в результате апоптоза (см. главу 18). В количественном отношении избавление от старых и мертвых клеток является наиболее важной их функцией: например, наши макрофаги каждый день фагоцитируют более 10^{11} старых красных клеток крови.

Если эндоцитозные пузырьки, участвующие в пиноцитозе, малы и однородны по размеру и форме, то диаметр фагосом определяется размером поглощенной частицы, и они могут быть почти такими же большими, как сама фагоцитирующая клетка (рис. 13.46). Внутри клетки фагосомы сливаются с лизосомами, и захваченное вещество деградирует. Все неперевариваемые вещества останутся в лизосомах в форме *остаточных телец*, которые затем могут быть выделены клеткой путем экзоцитоза, как мы обсуждали ранее. Некоторые внутренние компоненты плазматической мембраны никогда не достигают лизосом, поскольку они забираются



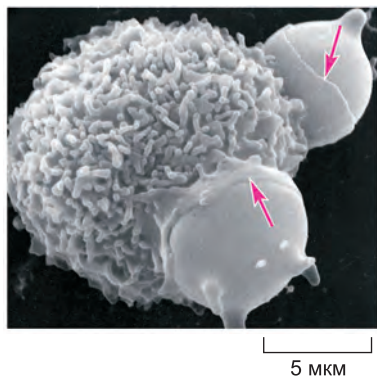


Рис. 13.46. Фагоцитоз макрофагом. Полученная сканирующим электронным микроскопом микрофотография мышинного макрофага, фагоцитирующего две химически модифицированные красные клетки крови. Красные стрелки указывают на два тонких отростка (псевдоподии) макрофага, которые петлей окружают эритроциты. (С любезного разрешения Jean Paul Revel.)

из фагосомы в транспортных пузырьках и возвращаются в плазматическую мембрану.

Перед фагоцитозом частицы должны связаться с поверхностью фагоцита. Однако не все связавшиеся частицы поглощаются. На поверхности фагоцитов расположено множество рецепторов,

которые функционально связаны с фагоцитирующим аппаратом клетки. Фагоцитоз является инициируемым процессом. Следовательно, для его протекания необходима активация рецепторов, передающих сигналы внутрь клетки и запускающих ответ. Пиноцитоз, наоборот, является конститутивным процессом. Он происходит постоянно, вне зависимости от нужд клетки. Наиболее охарактеризованными инициаторами фагоцитоза являются антитела, которые защищают нас путем связывания с поверхностью микроорганизмов с образованием оболочки, которая обнажает концевой участок каждой молекулы антител. Этот концевой участок называется Fc-фрагментом (от англ. *Fragment crystallizable* — фрагмент, способный к кристаллизации; см. главу 25). Оболочка антител узнается специфическими, расположенными на поверхности макрофагов и нейтрофилов *рецепторами Fc*, связывание с которыми заставляет фагоцитирующую клетку выпустить псевдоподии. Затем псевдоподии окружают частицу и сливаются своими кончиками с образованием фагосомы (рис. 13.47, а). Локальная полимеризация актина, инициируемая Rho-семейством GTPаз и активирующих их белков Rho-GEF (см. главы 15 и 16), определяет форму псевдоподий. Активная GTPаза Rho включает киназную активность локальных PI-киназ, и начальная полимеризация актина происходит в ответ на накопление в мембране PI(4,5)P₂ (см. рис. 13.11). Для замыкания фагосомы и захвата частицы происходит деполимеризация актина в его основании, по мере того как PI(4,5)P₂ подвергается действию PI 3-киназы, превращающей его в PI(3,4,5)P₃. PI(3,4,5)P₃ необходим для замыкания фагосомы и, возможно, также вносит вклад в перестройку актиновой сети, участвующей в инвагинации формирующейся фагосомы (рис. 13.47, б). Таким образом, упорядоченный синтез и поглощение специфических фосфоинозитидов направляют последовательные этапы образования фагосом.

Охарактеризовано еще несколько классов рецепторов, запускающих фагоцитоз. Некоторые из них узнают компоненты *комплементов*, которые совместно с антителами направляют микробов на разрушение (см. главу 24). Другие напрямую узнают олигосахариды на поверхности определенных микроорганизмов. Еще один класс узнает клетки, погибшие в результате апоптоза. У апоптотических клеток исчезает асимметрия распределения фосфолипидов плазматической мембраны. В результате отрицательно заряженный фосфатидилсерин, который в норме располагается в цитоплазматическом монослое липидного бислоя, оказывается снаружи клетки, где он способствует инициации фагоцитоза мертвой клетки.

Удивительно, но макрофаги также фагоцитируют разнообразные частицы не живого происхождения, например стекло или латексные шарики и асбестовые

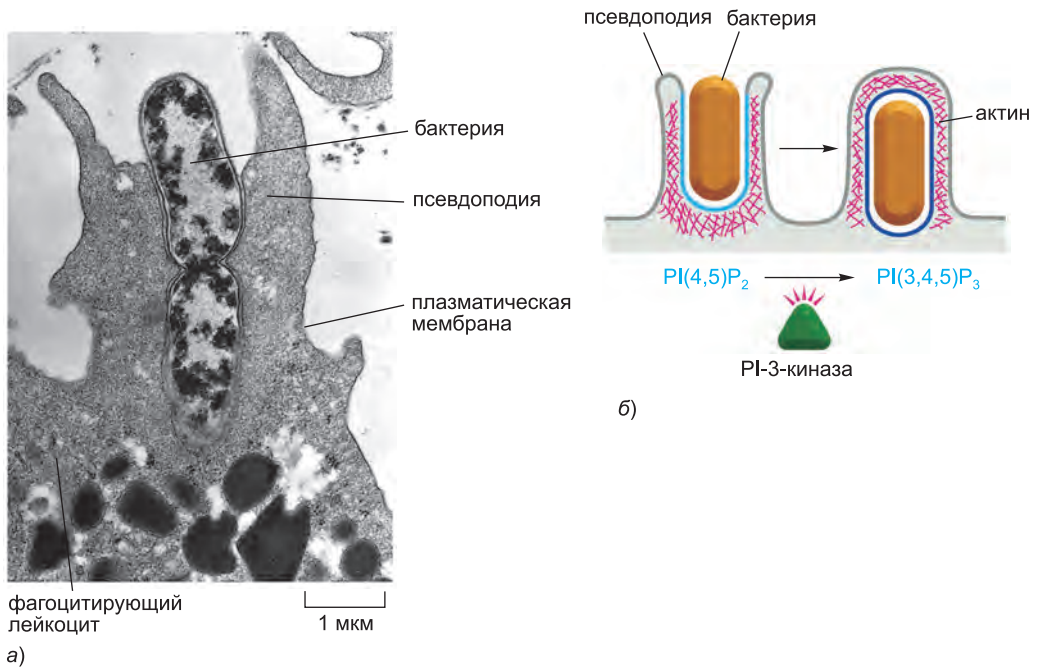


Рис. 13.47. Изменение формы плазматической мембраны нейтрофила в процессе фагоцитоза. (а) Электронная микрофотография нейтрофила, фагоцитирующего делящуюся бактерию. (б) Вытягивание псевдоподий и образование фagosомы происходят за счет полимеризации и перестройки актина, которые зависят от накопления в мембране формирующейся фagosомы специфических фосфоинозитидов. (а, фотография получена Dorothy F. Bainton, *Phagocytic mechanisms in Health and Disease*. New York: Intercontinental Medical Book Corporation, 1971.)

волокна, но при этом не фагоцитируют живые животные клетки. По-видимому, животные клетки несут сигнал «не ешь меня» в форме поверхностных белков, связывающихся с ингибиторными рецепторами на поверхности макрофагов. Ингибиторные рецепторы рекрутируют тирозинфосфатазы, которые служат антагонистами внутриклеточных процессов сигнализации, необходимых для инициации фагоцитоза. Таким образом, они локально ингибируют процесс фагоцитоза. Из всего вышесказанного можно заключить, что фагоцитоз, как и многие другие клеточные процессы, зависит от баланса между положительными сигналами, активирующими процесс, и негативными сигналами, его ингибирующими. Считается, что апоптотные клетки приобретают сигнал «съешь меня» (например, расположенный снаружи клетки фосфатидилсерин) и теряют сигнал «не ешь меня», что приводит к их быстрому фагоцитозу макрофагами.

13.4.2. Пиноцитозные пузырьки образуются на плазматической мембране из окаймленных ямок

Практически все эукариотические клетки непрерывно поглощают участки своей плазматической мембраны в форме маленьких пиноцитозных (эндоцитозных) пузырьков, которые затем возвращаются на поверхность клетки. Скорость, с которой происходит интернализация плазматической мембраны в таком процессе

пиноцитоза, варьирует от клетки к клетке, но обычно она удивительно велика. Макрофаг, например, поглощает за час 25 % объема своего жидкого содержимого. Это означает, что каждую минуту он поглощает 3 % своей плазматической мембраны, или 100% за полчаса. Фибробласты эндоцитируют с более низкой скоростью (1% их плазматической мембраны в минуту), тогда как у некоторых амёб этот процесс протекает еще быстрее. Поскольку площадь поверхности клетки и ее объем остаются неизменными, очевидно, что мембрана, удаляемая при эндоцитозе, в том же объеме добавляется к поверхности клетки в противоположно направленном процессе **экзоцитоза**. В этом смысле эндоцитоз и экзоцитоз являются взаимосвязанными процессами, вместе составляющими *эндоцитозно-экзоцитозный цикл*. Особенно плотное сопряжение между экзоцитозом и эндоцитозом свойственно специализированным структурам, характеризующимся высоким оборотом мембраны, например нейронным синапсом.

Эндоцитическая часть цикла часто начинается в **окаймленных клатриновых ямках**. Эти специализированные участки обычно занимают около 25% всей площади плазматической мембраны. Время жизни этих окаймленных ямок невелико: примерно через минуту после образования они выгибаются внутрь клетки и отшнуровываются в форме клатриновых пузырьков (**рис. 13.48**). По оценкам, за минуту плазматическую мембрану фибробластов в культуре покидает около 2500 клатриновых пузырьков. Окаймленные везикулы живут еще меньше, чем окаймленные ямки: через секунды после образования они теряют свою оболочку и могут слиться с ранними эндосомами. Поскольку в клатриновых пузырьках в процессе их инвагинации для образования окаймленных везикул оказывается внеклеточная жидкость, любое растворенное в ней вещество интернализуется. Этот процесс называется *эндоцитозом жидкой фазы*.

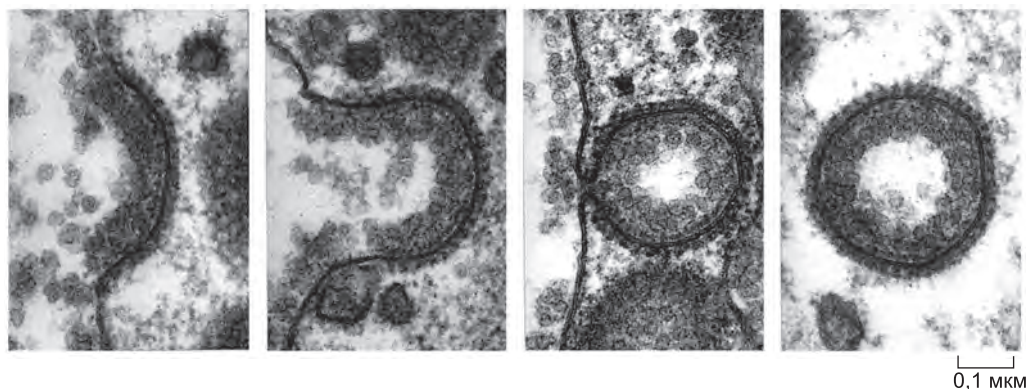


Рис. 13.48. Образование клатриновых пузырьков из плазматической мембраны. На этих электронных микрофотографиях показана вероятная последовательность событий образования окаймленного клатринового пузырька из окаймленной ямки. Изображенные на рисунке окаймленные клатриновые ямки и пузырьки крупнее, чем в клетке нормального размера. Они захватывают липопротеиновые частицы в очень крупный куриный ооцит для образования желтка. Липопротеиновые частицы, связанные с мембранными рецепторами, выглядят как плотный, размытый слой на внеклеточной поверхности плазматической мембраны, которая располагается на внутренней поверхности пузырька. (Из М. М. Perry and A. B. Gilbert, *J. Cell Sci.* 39: 257–272, 1979. С любезного разрешения The Company of Biologists.)

13.4.3. Не все пиноцитозные пузырьки окаймлены клатрином

Помимо клатриновых ямок и пузырьков, существуют другие, менее изученные механизмы формирования клетками пиноцитозных пузырьков. Один из этих путей инициируется в **кавеолах** (от лат. «маленькая пещера»), которые исходно обнаружены благодаря их способности транспортировать молекулы в клетках эндотелия, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных сосудов. Кавеолы присутствуют в плазматической мембране большинства типов клеток и в электронном микроскопе они выглядят как сильно инвагинированные углубления (**рис. 13.49**). Считается, что они образуются из мембранных микродоменов, или **липидных рафтов**, которые представляют собой обогащенные холестерином, гликофинголипидами и GPI-заякоренными белками участки плазматической мембраны (см. рис. 10.14). Основными структурными белками кавеол являются **кавеолины** — семейство необычных интегральных мембранных белков, которые встраивают гидрофобную петлю в мембрану с цитоплазматической стороны, но не пересекают ее.

В отличие от клатриновых, COP-I- и COP-II-везикул, кавеолы, по-видимому, инвагинируются и захватывают груз за счет липидного состава своей мембраны, а не сборки цитоплазматической белковой оболочки. Кавеолины, возможно, стабилизируют рафты, в которых располагаются определенные мембранные белки. Кавеолы отшнуровываются от плазматической мембраны при помощи динамина и доставляют свое содержимое либо в похожий на эндосому компартмент (*кавеосому*), либо в плазматическую мембрану на противоположном конце полярной клетки (в процессе, носящем название *трансцитоза*, который мы обсудим позже).

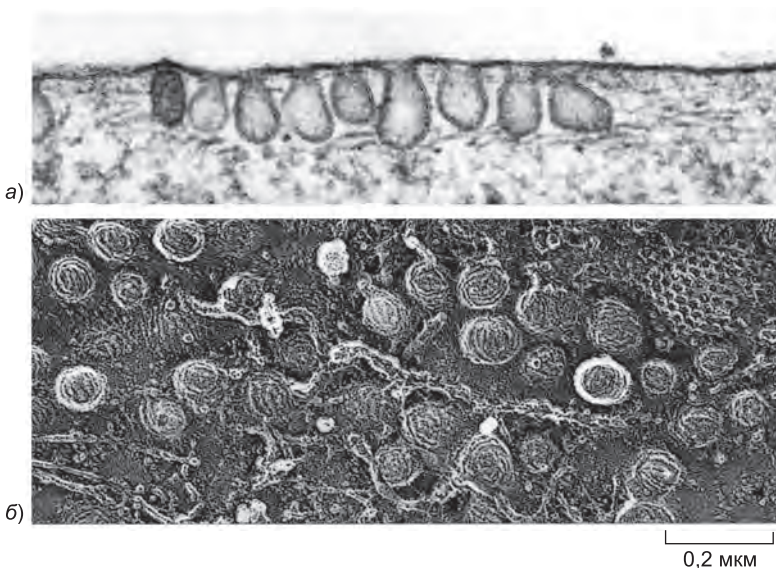


Рис. 13.49. Кавеолы в плазматической мембране фибробласта. (а) На этой электронной микрофотографии показана плазматическая мембрана с высоким содержанием кавеол. Обратите внимание, что не видно никакой цитоплазматической оболочки. (б) На этом полученном при помощи быстрой заморозки и глубокого травления изображении показана характерная, похожая на цветную капусту структура мембраны кавеол. Регулярность структуры, по-видимому, является результатом агрегации кавеолинов в мембране. Справа сверху также видна клатриновая ямка. (фотографии получены R. G. W. Anderson, из K. G. Rothberg et al., *Cell* 68: 673–682, 1992. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Поскольку кавеолы — это интегральные белки мембраны, они не диссоциируют с везикул после эндоцитоза; вместо этого, они доставляются в компартменты-мишени, где поддерживаются как самостоятельные мембранные домены. Некоторые вирусы животных, например SV40 и вирус папилломы (вызывающий бородавки), входят в клетки в пузырьках, произошедших из кавеол. Эти вирусы сначала доставляются в кавеомы, а оттуда в специализированных транспортных везикулах — в ЭР. Вирусный геном выходит через мембрану ЭР в цитозоль, откуда он импортируется в ядро для запуска цикла инфекции.

Эндоцитозные везикулы также могут отпочковываться от свободных от кавеол рафтов плазматической мембраны и доставлять свой груз в кавеомы. Молекулы, попадающие в клетку через кавеомы, избегают эндосом и лизосом и, следовательно, ограждены от низкого pH и лизосомальных гидролаз; неизвестно, как они движутся из кавеом в другие компартменты клетки.

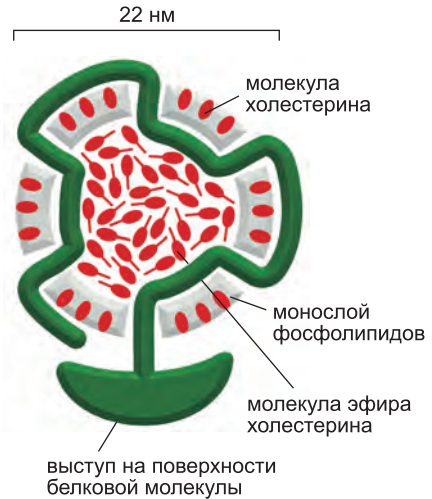
13.4.4. Для импорта определенных внеклеточных макромолекул клетки используют рецептор-опосредованный эндоцитоз

В большинстве животных клеток клатриновые ямки и пузырьки служат эффективным способом захвата определенных макромолекул из внеклеточной жидкости. В ходе этого процесса, носящего название **рецептор-опосредованного эндоцитоза**, макромолекулы связываются с комплементарными трансмембранными рецепторными белками, накапливаются в окаймленных ямках и затем входят в клетку в составе комплексов рецептор-макромолекула внутри клатриновых пузырьков (см. рис. 13.48). Поскольку лиганды селективно захватываются рецепторами, рецептор-опосредованный эндоцитоз служит селективным накапливающим механизмом, увеличивающим эффективность интернализации определенных лигандов более чем в сто раз. Таким образом, даже минорные компоненты внеклеточной жидкости могут быть специфически и в больших количествах захвачены из большого объема внеклеточной жидкости. Одним из наиболее изученных и физиологически важных примеров является процесс захвата клетками млекопитающих холестерина.

Многие клетки млекопитающих захватывают холестерин посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза и, таким образом, приобретают большую часть необходимого им для создания новой мембраны холестерина. Если захват блокирован, холестерин накапливается в крови и может участвовать в образовании в стенках кровеносных сосудов (артерий) *атеросклеротических бляшек* — скоплений липидов и фибриллярной ткани, способных вызывать инсульты и сердечные приступы за счет ограничения кровотока через артерии. В самом деле, именно изучение людей с сильной генетической предрасположенностью к *атеросклерозу* впервые позволило обнаружить механизм рецептор-опосредованного эндоцитоза.

Большая часть холестерина транспортируется в кровь в составе липидно-белковых частиц, известных как **липопротеины низкой плотности (LDL)** (рис. 13.50). Когда клетке требуется холестерин для синтеза мембраны, она синтезирует трансмембранные рецепторные белки к LDL и встраивает их в плазматическую мембрану. Оказавшись там, *рецепторы LDL* диффундируют до тех пор, пока не свяжутся с клатриновыми ямками, находящимися в процессе формирования (рис. 13.51, а). Поскольку окаймленные ямки постоянно отшнуровываются в форме окаймленных пузырьков, любые частицы LDL, связанные с рецепторами LDL в окаймленных ямках, быстро интернализуются в окаймленных пузырьках. После потери клатри-

Рис. 13.50. Частица липопротеинов низкой плотности (LDL). Каждая сферическая частица имеет массу 3×10^6 Да. Она содержит ядро из примерно 1500 молекул холестерина в составе сложных эфиров с длинноцепочечными жирными кислотами. Липидный монослой, состоящий из примерно 800 фосфолипидов и 500 незатерифицированных молекул холестерина, окружает ядро эфиров холестерина. Единственная молекула белка массой 500 кДа организует частицу и опосредует специфическое связывание LDL с их рецепторами на поверхности клетки.



новой оболочки везикулы доставляют свое содержимое в ранние эндосомы, расположенные на периферии клетки. Как только LDL и рецепторы LDL подвергаются воздействию низкого pH эндосом, LDL высвобождаются и доставляются через поздние эндосомы в лизосомы, где эфиры холестерина в частицах LDL гидролизуются до холестерина, который становится доступен клетке для синтеза новых мембран. Если в клетке накапливается слишком много свободного холестерина, клетка отключает его синтез и синтез рецепторов LDL и становится неспособной как синтезировать, так и импортировать холестерин.

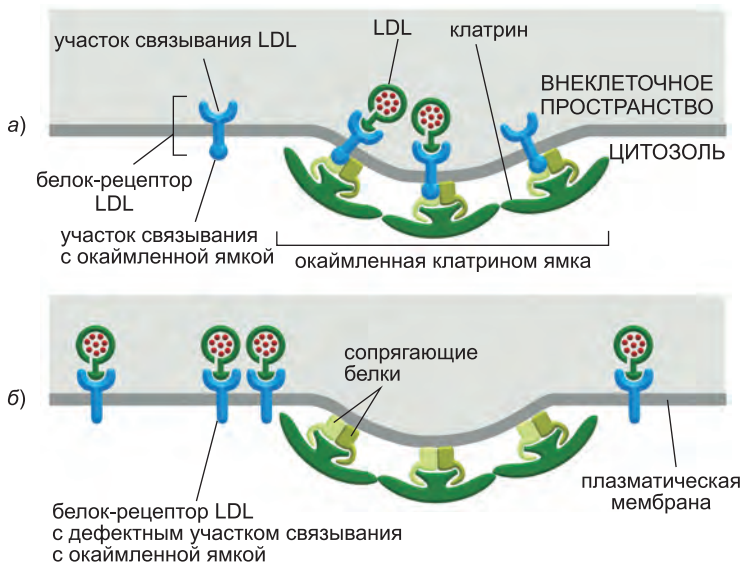


Рис. 13.51. Нормальные и мутантные рецепторы LDL. (а) Рецепторы LDL, связывающиеся с окаймленной ямкой в плазматической мембране нормальной клетки. Человеческий рецептор LDL — это однополовый гликопротеин, состоящий из 840 аминокислот, только 50 из которых располагаются на цитоплазматической стороне мембраны. (б) Мутантная клетка, в которой рецепторы LDL дефектны и лишены на цитоплазматической стороне сайта связывания адаптерных белков клатриновой оболочки. Такие клетки связывают LDL, но не способны поглощать их. В большинстве человеческих популяций 1 из 500 людей наследует один дефектный рецептор LDL и в результате имеет высокий риск сердечного приступа, вызванного атеросклерозом.

Этот регулируемый путь импорта холестерина нарушен у людей, унаследовавших дефектные гены, кодирующие рецепторы LDL. В результате высокая концентрация холестерина в крови вызывает у этих индивидуумов предрасположенность к раннему развитию атеросклероза. Многие, если они не принимают лекарства, снижающие уровень холестерина в крови, умирают в раннем возрасте от сердечных приступов, вызванных ишемической болезнью сердца. В некоторых случаях рецептор совсем отсутствует. В других рецептор дефектен — либо по внеклеточному сайту связывания LDL, либо по внутриклеточному сайту, прикрепляющему рецептор к оболочке клатриновой ямки (см. рис. 13.51, б). В последнем случае у человека присутствует нормальное число рецепторов LDL, но они не способны локализоваться в клатриновых ямках. Несмотря на то что LDL связываются с поверхностью мутантных клеток, они не интернализуются, что напрямую демонстрирует значение клатриновых ямок в рецептор-опосредованном эндоцитозе.

Известно более 25 различных рецепторов, участвующих в рецептор-опосредованном эндоцитозе различных типов молекул. По-видимому, они все используют клатрин-зависимые пути интернализации и направляются в окаймленные ямки сигналами на их цитоплазматических «хвостах», связывающимися с адаптерными белками в клатриновой оболочке. Многие из этих рецепторов, например рецептор LDL, входят в окаймленные ямки независимо от того, связаны ли они со своими специфическими лигандами. Другие входят в связанном состоянии, что указывает на необходимость лиганд-зависимого конформационного перехода для активации сигнальной последовательности, направляющей их в ямки. Поскольку большинство белков плазматической мембраны не способны накапливаться в клатриновых ямках, последние служат молекулярными фильтрами, собирающими в основном определенные мембранные белки (рецепторы).

Электронно-микроскопические исследования культур клеток, одновременно подвергнутых действию меченых лигандов, показали, что в одной окаймленной ямке могут скапливаться рецепторы различных типов, тогда как некоторые другие рецепторы накапливаются в различных клатриновых ямках. Плазматическая мембрана одной окаймленной ямки способна вместить до 1000 рецепторов смешанных типов. Несмотря на то что все комплексы рецептор-лиганд, использующие эндоцитозный путь, в конце концов, по-видимому, доставляются в один и тот же эндосомальный компартмент, последующая судьба эндоцитированных молекул бывает разной, что мы рассмотрим дальше.

13.4.5. Эндоцитированные вещества, не изъятые из эндосом, оказываются в лизосомах

Эндосомальные компартменты клеток могут быть очень сложными. Их можно увидеть в электронный микроскоп путем добавления во внеклеточный объем легко детектируемой индикаторной молекулы, например фермента пероксидазы. Затем клетки нужно инкубировать различные промежутки времени, в течение которых они эндоцитируют эту молекулу. Распределение индикатора после его захвата показывает, что эндосомальные компартменты представляют собой набор неоднородных, замкнутых мембранных трубочек, распространяющихся с периферии клетки в перинуклеарную область, где они часто сближаются с аппаратом Гольджи. В таких экспериментах по мечению легко различить два последовательных набора эндосом. Где-то через минуту индикаторная молекула оказывается в **ранних эндосомах** пря-

мо под плазматической мембраной. Через 5–15 минут она переносится в **поздние эндосомы**, расположенные вблизи аппарата Гольджи и ядра. Ранние и поздние эндосомы различаются по своему белковому составу. Например, переход из ранних эндосом в поздние сопровождается высвобождением Rab5 и связыванием Rab7.

Как отмечено ранее, вакуолярная H^+ -АТРаза в эндосомальной мембране, накачивающая H^+ из цитозоля в эндосомы, поддерживает кислый pH (~6) люмена эндосом. В общем случае поздние эндосомы сильнее закислены, чем ранние. Такой градиент кислой среды играет ключевую роль в функционировании этих органелл.

Мы уже видели, как эндоцитированные вещества смешиваются в ранних эндосомах с новосинтезированными кислыми гидролазами и в конце концов деградируют в лизосомах. Однако многие молекулы специфично направляются прочь от этого пути к разрушению. Вместо этого, они рециркулируют в транспортных пузырьках из ранних эндосом обратно в плазматическую мембрану. Только молекулы, которые не удаляются из эндосом таким способом, доставляются в лизосомы для деградации. Несмотря на то что переваривание может начаться в ранних эндосомах, многие гидролазы синтезируются и доставляются туда в форме протоферментов, носящих название *зимогенов*. Зимогены содержат на N-конце дополнительные ингибиторные домены, делающие гидролазы неактивными до тех пор, пока эти домены не будут протеолитически удалены. Гидролазы активируются, когда поздние эндосомы становятся эндолизосомами в результате слияния с уже существующими лизосомами, содержащими полный набор активных гидролаз, отщепляющих ингибиторные домены от новосинтезированных ферментов. Более того, pH в ранних эндосомах недостаточно низок для оптимальной активации лизосомальных гидролаз. Таким образом, клетки способны захватывать из ранних эндосом большую часть мембранных белков и возвращать их обратно в плазматическую мембрану.

13.4.6. Определенные белки возвращаются из ранних эндосом в плазматическую мембрану

Ранние эндосомы образуют компартмент, служащий основной сортировочной станцией эндоцитозного пути, так же как *цис*- и *транс*-сети Гольджи выполняют эту функцию в биосинтетическом секреторном пути. В слегка кислой среде ранней эндосомы многие интернализированные рецепторные белки меняют свою конформацию и высвобождают лиганды, как уже описано для рецепторов М6Р. Эти эндоцитированные лиганды, диссоциирующие от своих рецепторов в ранних эндосомах, обычно направляются на разрушение в лизосомах, наравне с другим растворимым содержимым эндосомы. Однако некоторые другие эндоцитированные лиганды остаются связанными с рецепторами и, следовательно, разделяют их судьбу.

Судьба рецепторов и оставшихся связанными с ними лигандов зависит от специфического типа рецептора. (1) Большинство рецепторов рециркулирует и возвращается в тот же домен плазматической мембраны, откуда они пришли; (2) некоторые отправляются в другой домен плазматической мембраны, опосредуя таким образом *трансцитоз*; (3) некоторые направляются в лизосомы, где происходит их деградация (**рис. 13.52**).

Рецептор LDL идет по первому пути. В ранней эндосоме он диссоциирует от своего лиганда, LDL, и возвращается обратно в плазматическую мембрану для повторного использования, а свободные LDL переносятся в лизосомы (**рис. 13.53**).

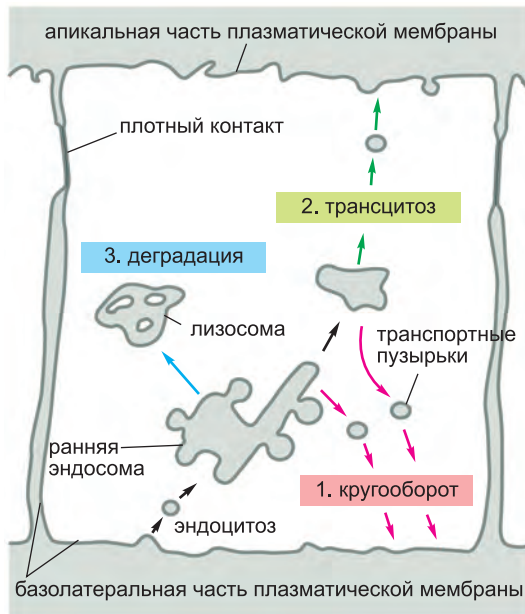


Рис. 13.52. Возможные судьбы эндоцитированных трансмембранных рецепторных белков.

Показаны три пути из эндосомального компартмента в эпителиальной клетке. Захваченные рецепторы возвращаются (1) в тот же домен плазматической мембраны, из которого они пришли (*рециркуляция*), или (2) в другой домен плазматической мембраны (*транцитоз*). (3) Рецепторы, которые специфически не улавливаются из эндосом, идут по пути из эндосомального компартмента в лизосомы, где они деградируют (*деградация*). Образование в эндосомальной мембране олигомерных агрегатов может быть одним из сигналов, направляющих рецепторы на путь деградации. Если лиганд, эндоцитированный вместе с рецептором, в кислой среде эндосом остается связанным, он идет по тому же пути, что и его рецептор; в противном случае он доставляется в лизосомы.

Рециркулирующие транспортные пузырьки отпочковываются от длинных, узких трубочек, отходящих от ранних

эндосом. Вероятно, геометрия этих трубочек способствует процессу сортировки: поскольку в трубочках площадь мембраны велика по сравнению с объемом, мембранные белки преобладают над растворимыми. Транспортные пузырьки, возвращающие вещество в плазматическую мембрану, начинают отпочковываться от трубочек, но трубчатые участки ранних эндосом также отщипываются и сливаются друг с другом с образованием *рециркулирующих эндосом*, служащих промежуточной станцией между ранними эндосомами и плазматической мембраной. Этот путь рециркуляции работает непрерывно, компенсируя постоянный эндоцитоз плазматической мембраны.

Путь рециркуляции **рецептора трансферрина** похож на путь рецептора LDL, но, в отличие от рецептора LDL, он также возвращает в плазматическую мембрану лиганд. Трансферрин — это растворимый белок, переносящий в крови железо. Поверхностные рецепторы трансферрина доставляют трансферрин вместе со связанным железом в ранние эндосомы путем рецептор-опосредованного эндоцитоза. Низкий pH эндосом заставляет трансферрин высвободить связанное железо, но сам белок (называющийся апотрансферрином) остается связанным с рецептором. Комплекс рецептор-апотрансферрин входит в трубчатые отростки ранней эндосомы и оттуда рециркулирует обратно в плазматическую мембрану (**рис. 13.54**). Когда апотрансферрин возвращается в нейтральный pH внеклеточной жидкости, он диссоциирует от своего рецептора и, следовательно, может опять связать железо и начать новый цикл. Таким образом, трансферрин перемещается между внеклеточной жидкостью и эндосомальным компартментом, избегая лизосом и доставляя железо, необходимое для роста и дифференциации, внутрь клетки.

Второй путь, по которому могут пойти эндоцитированные рецепторы из эндосом, свойственен многим сигнальным рецепторам, включая опиоидные рецепторы (см. рис. 13.54) и рецептор, связывающий *эпидермальный фактор роста* (*Epider-*

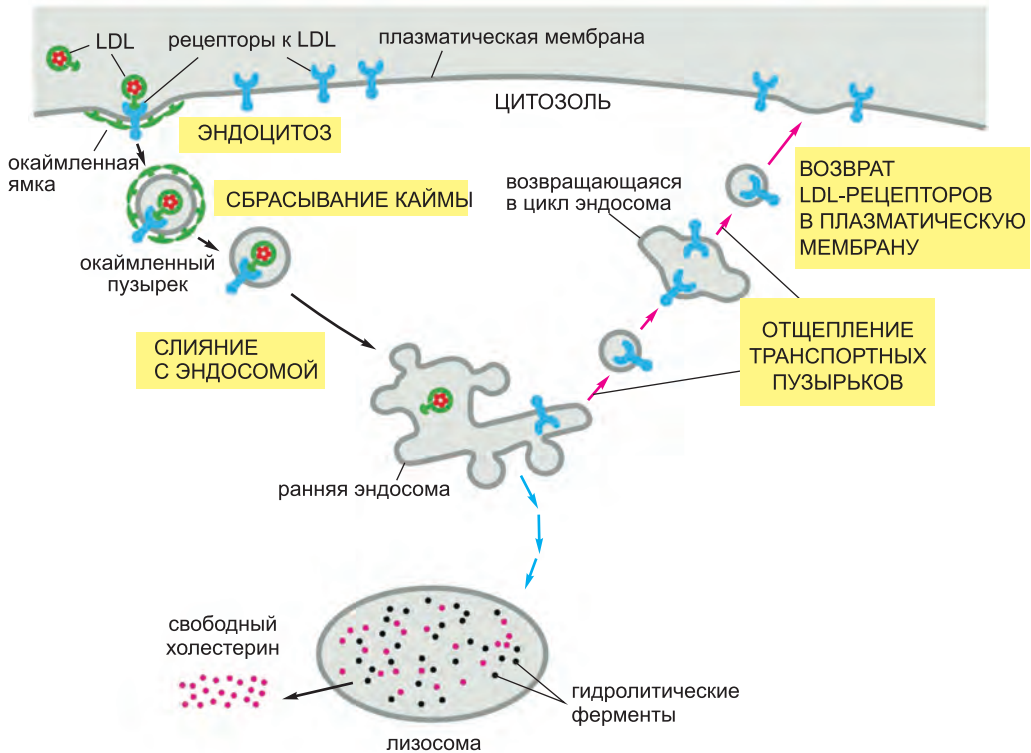


Рис. 13.53. Рецептор-опосредованный эндоцитоз LDL. Обратите внимание, что LDL диссоциируют от своих рецепторов в кислой среде ранних эндосом. Через несколько этапов (показанных на рис. 13.56) LDL оказываются в лизосомах, где они деградируют с высвобождением свободного холестерина. Рецепторы LDL, наоборот, возвращаются в плазматическую мембрану в клатриновых транспортных пузырьках, отпочковывающихся от трубчатой части ранней эндосомы, как показано. Для наглядности показан только один рецептор LDL, входящий в клетку и возвращающийся в плазматическую мембрану. Вне зависимости от того, занят он или нет, рецептор LDL обычно совершает одно путешествие в клетку и обратно в плазматическую мембрану каждые 10 минут, т. е. несколько сотен оборотов за 20-часовое время его жизни.

mal Growth Factor, *EGF*). *EGF* — это маленький внеклеточный сигнальный белок, стимулирующий деление эпидермальных и некоторых других клеток. В отличие от рецепторов LDL, рецепторы *EGF* накапливаются в клатриновых ямках только после связывания с *EGF*, и большинство из них не рециркулируют и деградируют в лизосомах вместе с поглощенным *EGF*. Таким образом, связывание *EGF* сначала активирует внутриклеточные пути сигнализации, а затем приводит к снижению концентрации рецепторов *EGF* на поверхности клетки. Этот процесс, уменьшающий последующую чувствительность к *EGF*, называется *даун-регуляцией* (см. рис. 15.29).

Клатрин-зависимый рецептор-опосредованный эндоцитоз строго регулируется. Сначала рецепторы ковалентно модифицируются маленьким белком убиквитином. Но, в отличие от *полиубиквитинирования*, при котором добавляется цепочка убиквитинов, обычно направляющая белок на деградацию в протеасомах (см. главу 6), при маркировании убиквитином для сортировки в клатрин-зависимый эндоцитозный путь к белку добавляется одна или несколько единичных молекул убиквитина. Этот

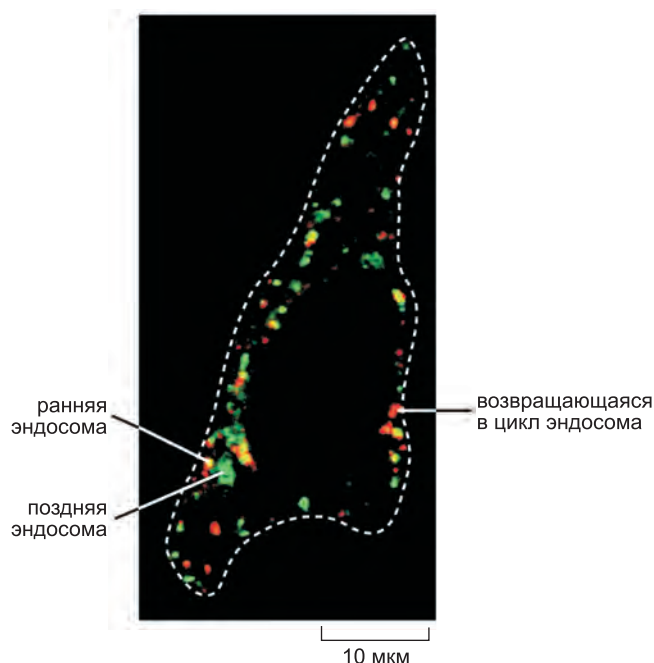


Рис. 13.54. Сортировка мембранных белков в эндоцитозном пути. Рецепторы трансферрина опосредуют захват железа и циркулируют между эндосомами и плазматической мембраной. С другой стороны, активированные опиоидные рецепторы даун-регулируются эндоцитозом и деградируют в лизосомах; они активируются опиатами, например морфином и героином, а также эндогенными пептидами энкефалинами и эндорфинами. Эндоцитоз обоих типов рецепторов начинается в клатриновых ямках. Затем рецепторы доставляются в ранние эндосомы, где их пути расходятся: рецепторы трансферрина отсортировываются в рециркулирующие эндосомы, а опиоидные рецепторы — в поздние эндосомы. На микрофотографии видны оба типа рецепторов, меченных разными флуоресцентными красителями, через 30 минут после эндоцитоза (рецепторы трансферрина помечены красным, опиоидные рецепторы — зеленым). Некоторые ранние эндосомы все еще содержат оба типа рецепторов и кажутся желтыми за счет перекрывания красного и зеленого цветов флуоресцентных красителей. Рециркулирующие и поздние эндосомы селективно обогащены либо трансферриновыми, либо опиоидными рецепторами соответственно и поэтому видны как зеленые и красные структуры. (С любезного разрешения Mark von Zastrow.)

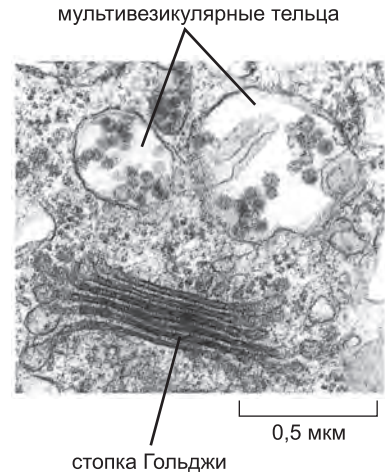
процесс называется *моноубиквитинированием* или *мультиубиквитинированием* соответственно. Убиквитин-связывающие белки узнают присоединенный убиквитин и способствуют направлению модифицированных рецепторов в клатриновые ямки. После доставки в эндосому другие убиквитин-связывающие белки узнают убиквитин и опосредуют этапы сортировки.

процесс называется *моноубиквитинированием* или *мультиубиквитинированием* соответственно. Убиквитин-связывающие белки узнают присоединенный убиквитин и способствуют направлению модифицированных рецепторов в клатриновые ямки. После доставки в эндосому другие убиквитин-связывающие белки узнают убиквитин и опосредуют этапы сортировки.

13.4.7. На пути в поздние эндосомы образуются мультивезикулярные тельца

Как отмечено ранее, многие эндоцитированные молекулы переносятся из раннего эндосомального компартмента в поздний. В ходе этого процесса ранние эндосомы медленно мигрируют вдоль микротрубочек вглубь клетки, по пути отщипывая мембранные трубочки и пузырьки, возвращающие вещество в плазматическую мембрану и ТСГ. Одновременно в мембране, окружающей мигрирующие эндосомы, образуются инвагинации, отпочковывающиеся с образованием внутренних везикул; такие эндосомы называются **мультивезикулярными тельцами** (рис. 13.55). Мультивезикулярные тельца в конце концов сливаются с поздним эндосомальным компартментом или друг с другом и становятся поздними эндосомами. В конце этого пути поздние эндосомы превращаются в эндолизосомы и лизосомы в результате их слияния с уже существующими лизосомами и постепенного закисления (рис. 13.56).

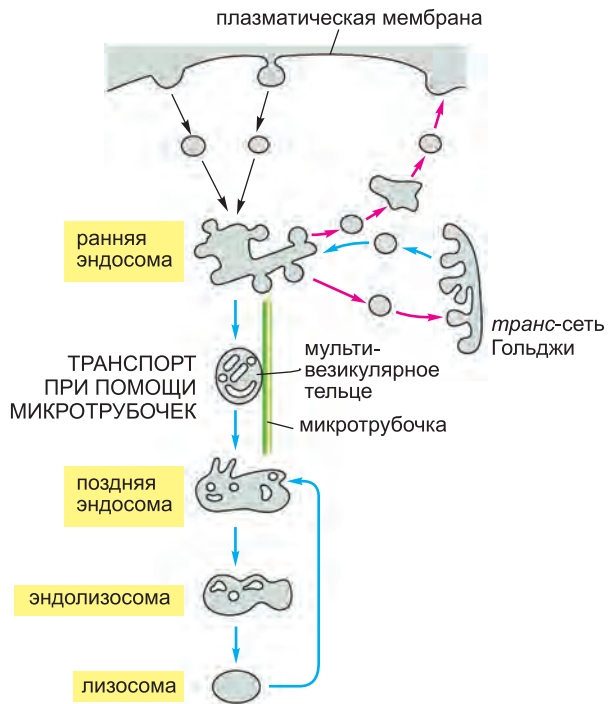
Рис. 13.55. Электронная микрофотография мультивезикулярного тельца в растительной клетке. Значительная часть внутренней мембраны будет доставлена в вакуоль, растительный эквивалент лизосомы, для деградации.



Мультивезикулярные тельца несут эндоцитированные мембранные белки, предназначенные для деградации. В качестве этапа процесса сортировки белков рецепторы, направленные на деградацию, например описанные ранее рецепторы EGF, селективно отбираются в инвагинации мембраны мультивезикулярных телец. Таким образом, рецепторы и любые крепко связанные с ними сигнальные белки становятся доступны гидролитическим ферментам, которые их расщепят (**рис. 13.57**). Помимо эндоцитированных мембранных белков, мультивезикулярные тельца содержат растворимые компоненты ранних эндосом, предназначенные в поздние эндосомы и для переваривания в лизосомах.

Сортировка во внутренние везикулы мультивезикулярных телец требует один или несколько убиквитиновых маркеров, которые добавляются к цитоплазматическим доменам мембранных белков. Эти маркеры сначала способствуют направлению белков в клатриновые пузырьки. После доставки в мембрану эндосомы убиквитиновые метки снова распознаются, в этот раз набором цитоплазматических белковых комплексов, носящих название *ESCRT-0, -I, -II* и *-III* (Endosomal Sorting Complex Required for Transport — эндосомальный комплекс сортировки, необходимый для транспорта). ESCRT связываются последовательно, передавая убиквитинированный груз от одного комплекса другому, и в конечном

Рис. 13.56. Этапы эндоцитозного пути из плазматической мембраны в лизосомы. Созревание ранних эндосом до поздних происходит через образование мультивезикулярных телец, содержащих большое количество инвагинаций мембраны и внутренних везикул (откуда и происходит их название). Мультивезикулярные тельца движутся внутрь клетки вдоль микротрубочек, непрерывно отпочковывая транспортные пузырьки, возвращающие компоненты в плазматическую мембрану. Они постепенно превращаются в поздние эндосомы за счет слияния с друг с другом или уже существующими поздними эндосомами. Поздние эндосомы перестают отправлять пузырьки в плазматическую мембрану.



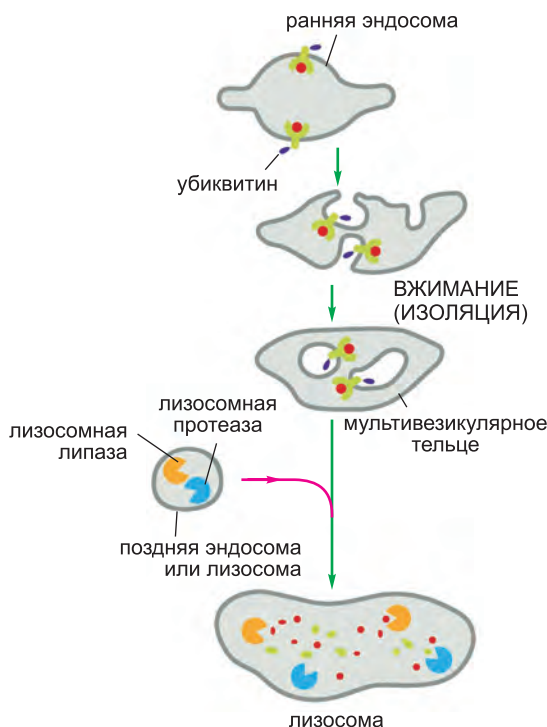


Рис. 13.57. Разделение эндоцитированных белков во внутренних мембранах мультивезикулярных телец. В конце концов, протеазы и липазы в лизосомах переваривают все образовавшиеся путем инвагинации внутренние мембраны мультивезикулярных телец. Процессы инвагинации необходимы для достижения полного переваривания эндоцитированных мембранных белков: поскольку внешняя мембрана мультивезикулярного тельца сливается с лизосомальной мембраной, лизосомальные гидролазы не способны переварить цитоплазматические домены эндоцитированных трансмембранных белков, например, показанного здесь рецептора EGF, если белок не локализован во внутренней везикуле.

счете опосредуют процесс сортировки во внутренние везикулы мультивезикулярных телец (рис. 13.58). Инвагинация мембраны в мультивезикулярные тельца также зависит от липидкиназы, фосфорилирующей фосфатидилинозитол с образованием PI(3)P, который служит дополнительным сайтом до-

кинга комплексов ESCRT; для связывания этих комплексов с эндосомальной мембраной необходимо присутствие PI(3)P и убиквитинированных белков груза. Вторая PI-киназа добавляет к PI(3)P еще одну фосфатную группу с образованием PI(3,5)P₂, необходимого для образования на мембране крупных мультимерных агрегатов ESCRT-III. Неизвестно, как сборка комплексов ESCRT-III способствует процессам инвагинации и отшнуровывания, в результате которых образуются внутренние мембраны, но сами ESCRT-III не являются частью инвагинаций мембраны.

Мутантным клеткам, в которых нарушена функция ESCRT, свойственны дефекты сигнализации. В таких клетках активированные рецепторы не могут даун-регулироваться эндоцитозом и упаковываться в мультивезикулярные тельца. В результате они опосредуют пролонгированную сигнализацию, что может привести к неконтролируемой пролиферации клеток и раку.

Аппарат комплексов ESCRT, опосредующий внутреннее отпочковывание эндосомальной мембраны с образованием мультивезикулярных телец, также используется ВИЧ, эболой и другими капсультными вирусами для отшнуровывания от плазматической мембраны во внеклеточное пространство. Эти процессы топологически эквивалентны, поскольку в обоих происходит отпочковывание в направлении от цитоплазматической поверхности мембраны (рис. 13.59).

13.4.8. Транцитоз переносит макромолекулы через пласты эпителиальных клеток

Некоторые рецепторы на поверхности поляризованных эпителиальных клеток переносят определенные молекулы из одного внеклеточного пространства в дру-

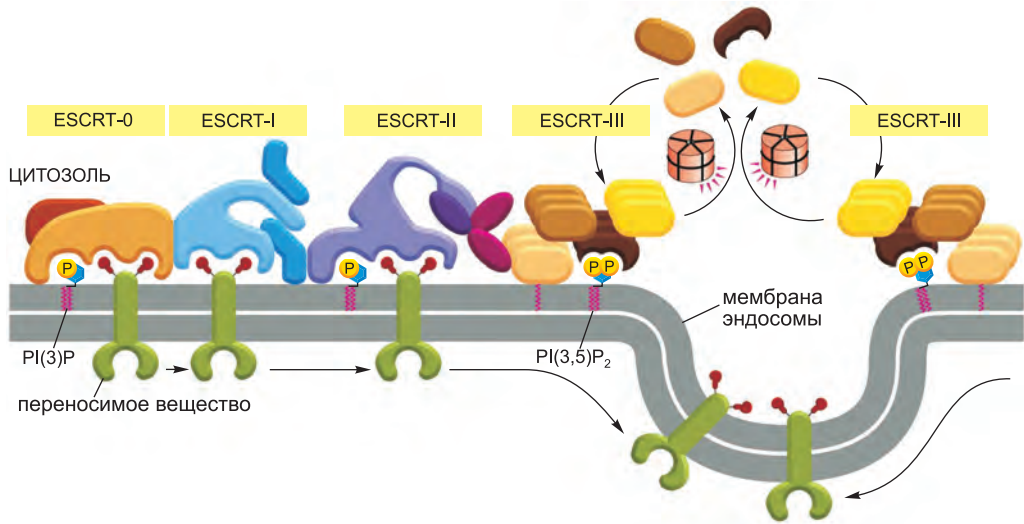


Рис. 13.58. Сортировка эндоцитированных мембранных белков во внутренние везикулы мультивезикулярного тельца. В ходе последовательных сложных событий связывания убиквитинированные белки груза переходят от одного комплекса ESCRT к другому. В конце концов они накапливаются в областях мембраны, отпочковывающихся в направлении от цитозоля в люмен эндосомы с образованием внутренних мембранных везикул мультивезикулярного тельца. Комплексы ESCRT растворимы в цитозоле и рекрутируются к мембране по мере надобности. Сначала ESCRT-0 связывает убиквитин, присоединенный к белку груза и головной группе PI(3)P. ESCRT-0 диссоциирует от мембраны, передавая убиквитинированный белок на комплекс ESCRT-I; затем ESCRT-I диссоциирует, передавая белок на комплекс ESCRT-II; наконец ESCRT-II диссоциирует, и на мембране собираются комплексы ESCRT-III. В отличие от ESCRT-0, -I и -II, ESCRT-III не связывается с убиквитинированным грузом напрямую. Вместо этого, он собирается в крупные мультимерные структуры, которые, по-видимому, удерживают молекулы груза в специализированных областях мембраны. Происходит инвагинация этих областей, и компоненты ESCRT остаются на поверхности эндосомы. Затем AAA-АТРаза (красные цилиндры) разбирает комплексы ESCRT-III для их последующего повторного использования.

ное путем **транскитоza** (рис. 13.60). Эти рецепторы эндоцитируются и затем идут по пути из эндосом в другой домен плазматической мембраны (см. рис. 13.52). Новорожденные крысы, например, получают антитела (защищающие их от инфекций) из материнского молока путем их транспорта через эпителий кишечника. Просвет кишечника закислен, и благодаря такому низкому pH антитела из молока связываются с рецепторами на апикальной (абсорбирующей) поверхности эпителиальных клеток кишечника. Эти комплексы рецептор-антитело интернализуются через клатриновые ямки и везикулы и доставляются в ранние эндосомы. Комплексы не распадаются и улавливаются в транспортные пузырьки, отпочковывающиеся от ранних эндосом и затем сливающиеся с базолатеральным доменом плазматической мембраны. Под действием нейтрального pH внеклеточной жидкости, омывающей базолатеральную поверхность клетки, антитела в конце концов диссоциируют от рецепторов и входят в кровь новорожденного.

Транскитозный путь из ранней эндосомы в плазматическую мембрану не является прямым. Рецепторы сначала переносятся из ранней эндосомы в промежуточный эндосомальный компартмент — описанную ранее **рециркулирующую эндосому**

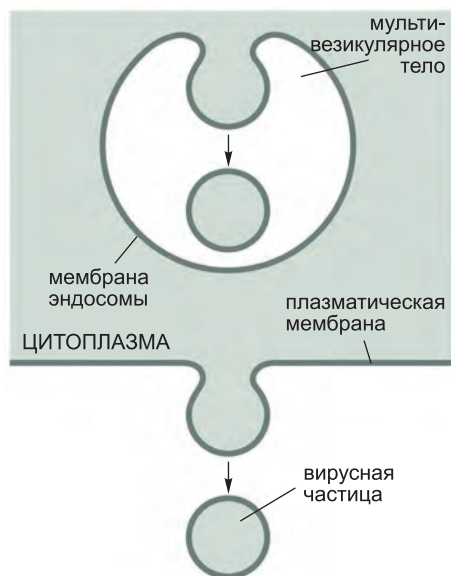


Рис. 13.59. Комплексы ESCRT при образовании мульти-везикулярных телец и отпочковывания вирусов. В двух топологически эквивалентных процессах, показанных стрелками, комплексы ESCRT преобразуют мембраны в пузырьки, отпочковывающиеся в направлении от цитозоля.

(см. рис. 13.60). Разнообразие путей, по которым путешествуют рецепторы из эндосом, указывает на то, что, помимо сайтов связывания лигандов и окаймленных ямок, многие рецепторы также несут сигналы сортировки. Эти сигналы направляют их в определенный тип транспортных пузырьков, покидающих эндосому и мигрирующих в соответствующую мембрану-мишень.

Уникальным свойством рециркулирующих эндосом является то, что клетки способны регулировать выход мембранных белков из компартмента. Таким образом, клетки

могут адаптировать поток белков через трансцитозный путь к своим needs. Несмотря на то что механизм еще плохо изучен, известно, что такая регуляция позволяет рециркулирующим эндосомам играть важную роль в регуляции концентрации определенных белков плазматической мембраны. Жировые и мышечные клетки, например, содержат большое число внутриклеточных пулов транспортеров глюкозы, отвечающих за перенос глюкозы через плазматическую мембрану внутрь клетки. Эти мембранные транспортные белки хранятся в специализированных рециркулирующих эндосомах до тех пор, пока гормон *инсулин* не начинает стимулировать клетку повысить уровень импорта глюкозы. В ответ на сигнал инсулина от рециркулирующих эндосом быстро отпочковываются транспортные пузырьки, доставляющие большое количество транспортеров глюкозы в плазматическую мембрану, что значительно увеличивает импорт глюкозы в клетку (рис. 13.61).

13.4.9. Эпителиальные клетки содержат два различных ранних эндосомальных компартмента, но один общий поздний эндосомальный компартмент

В поляризованных эпителиальных клетках эндоцитоз протекает как в *базолатеральном*, так и в *апикальном* домене плазматической мембраны. Эндоцитированное в любом из этих доменов вещество сначала входит в ранний эндосомальный компартмент, соответствующий данному домену. Такое распределение позволяет эндоцитированным рецепторам рециркулировать обратно в свой домен, если они не содержат сигналов сортировки, направляющих их по пути трансцитоза в другой домен. Эндоцитированные из своего домена плазматической мембраны молекулы, если они не возвращаются из ранних эндосом, в конце концов оказываются в позднем эндосомальном компартменте вблизи центра клетки и деградируют в лизосомах (рис. 13.62).

Будет ли клетка содержать несколько связанных или много независимых эндосомальных компартментов, по-видимому, зависит от типа клетки и ее физио-

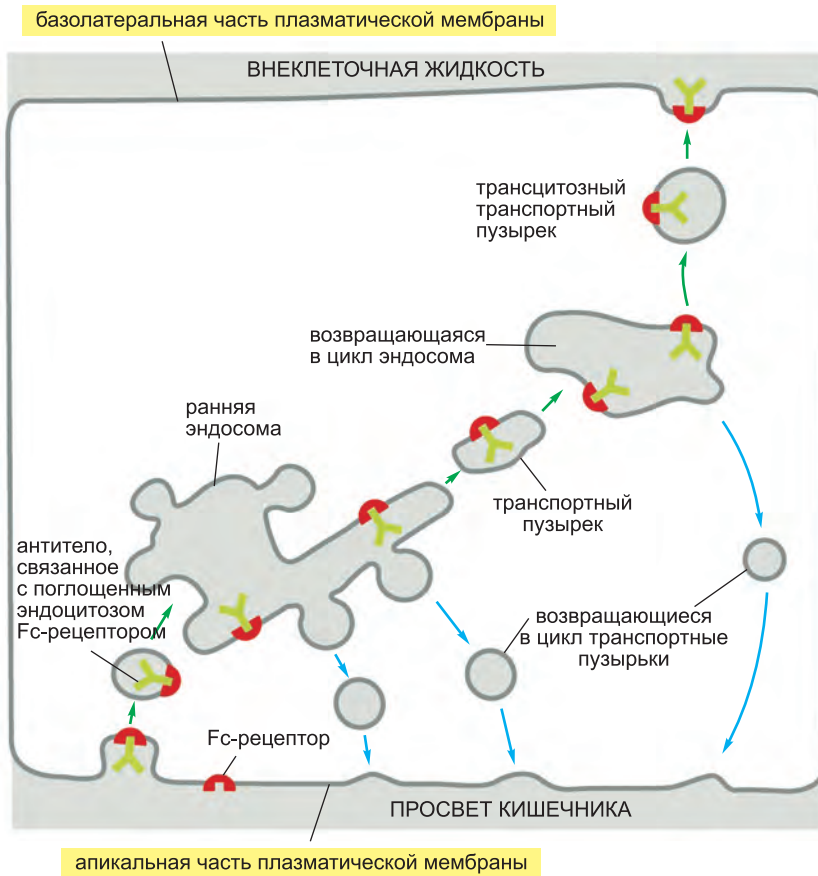


Рис. 13.60. Роль рециркулирующих эндосом в транцитозе. Рециркулирующие эндосомы служат сортировочной станцией транцитозного пути. В приведенном здесь примере рецептор антитела на эпителиальной клетке кишечника связывает антитело и эндоцитируется, доставляя в результате свой лиганд в базолатеральную плазматическую мембрану. Рецептор называется рецептором Fc, потому что он связывает Fc-фрагмент антитела (см. главу 25).

логического состояния. Как и многие другие мембранные органеллы, эндосомы одинакового типа легко сливаются друг с другом (пример рассмотренного ранее гомотипического слияния) с образованием крупных непрерывных эндосом.

Заключение

Клетки поглощают жидкости, молекулы и частицы посредством эндоцитоза, при котором локальные участки плазматической мембраны изгибаются и отщипываются с образованием эндоцитозных пузырьков. Многие эндоцитированные молекулы и частицы в конце концов оказываются в лизосомах, где происходит их деградация. Эндоцитоз протекает как конститутивно, так и в форме иницилируемого ответа на внеклеточные сигналы. Эндоцитоз в некоторых клетках настолько интенсивен, что каждый час интернализуется большая часть плазматической мембраны. Клетки сохраняют свои размеры, поскольку большинство эндоцитированных компонентов плазматической мем-

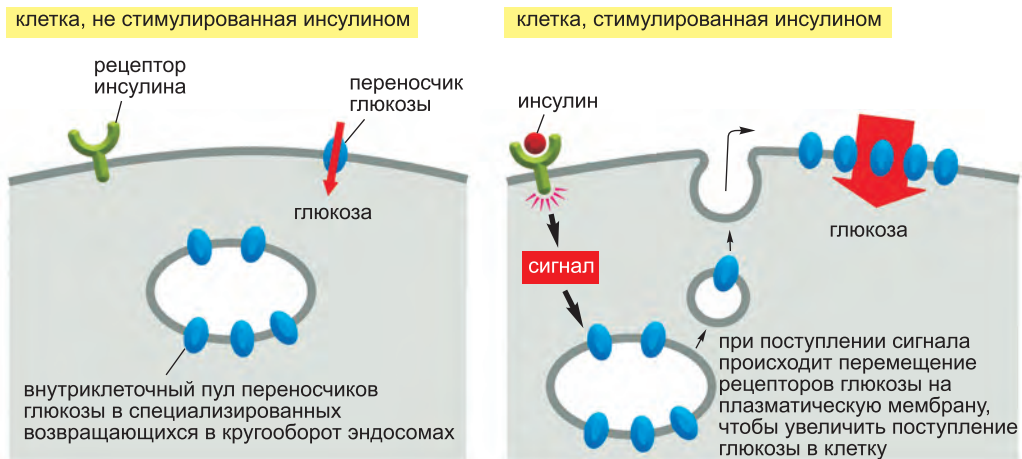


Рис. 13.61. Хранение белков плазматической мембраны в рециркулирующих эндосомах. Рециркулирующие эндосомы могут служить внутриклеточным пулом специализированных белков плазматической мембраны. Эти белки в случае необходимости могут быть быстро мобилизованы. В приведенном примере связывание инсулина со своим рецептором запускает внутриклеточный сигнальный путь, вызывающий быстрое встраивание переносчиков глюкозы в плазматическую мембрану жировой или мышечной клетки, что значительно увеличивает импорт глюкозы.

браны (белков и липидов) непрерывно возвращается на поверхность клетки путем экзоцитоза. Такой крупномасштабный эндо-экзоцитозный цикл в значительной степени опосредуется клатриновыми ямками и везикулами.

Многие поверхностные рецепторы клеток, связывающие определенные внеклеточные макромолекулы, маркируются убиквитином, который направляет их в клатриновые ямки. В результате эти рецепторы и их лиганды эффективно интернализируются в составе клатриновых везикул. Этот процесс называют рецептор-опосредованным эндоцитозом. Окаймленные пузырьки быстро теряют свою клатриновую оболочку и сливаются с ранними эндосомами.

Большинство лигандов диссоциирует от своих рецепторов в кислой среде эндосом и в конце концов оказывается в лизосомах, а большинство рецепторов рециркулирует в составе транспортных пузырьков обратно на поверхность клетки для повторного использования. Но комплексы рецептор-лиганд могут пойти из эндосомального компартмента по другим путям. В некоторых случаях рецептор и лиганд вместе деградируют в лизосомах, что приводит к даун-регуляции рецептора; в этих случаях меченные убиквитином рецепторы рекрутируют различные комплексы ESCRT, которые способствуют инвагинации и отщипыванию эндосомальных мембранных пузырьков с образованием мультивезикулярных тел. В других случаях рецептор с лигандом переносятся в другой домен плазматической мембраны, что приводит к высвобождению лиганда на поверхности клетки, отличающейся от той, откуда он произошел. Этот процесс называется транцитозом. В транцитозном пути участвуют рециркулирующие эндосомы, в которых могут храниться эндоцитированные белки плазматической мембраны, до тех пор пока не понадобятся.

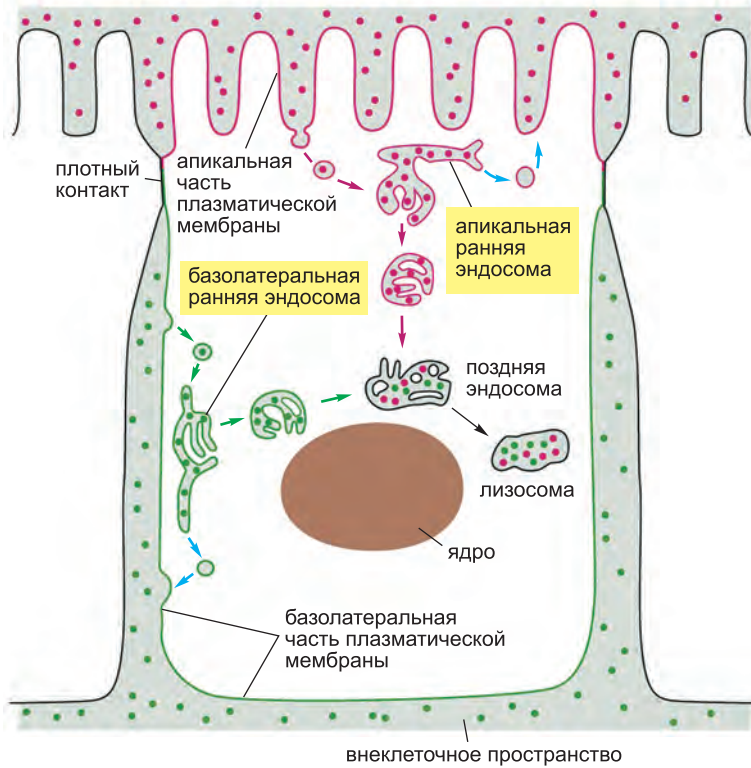
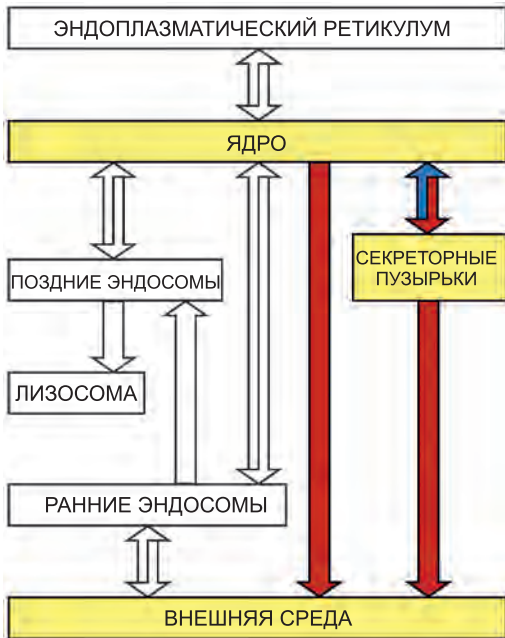


Рис. 13.62. Два различных ранних эндосомальных компартмента эпителиальной клетки. Базолатеральный и апикальный домены плазматической мембраны сообщаются с разными ранними эндосомальными компартментами. Однако эндоцитированные молекулы из обоих доменов, не содержащие сигналов рециркуляции или транцитоза, встречаются в общем позднем эндосомальном компартменте, а затем перевариваются в лизосомах.

13.5. Транспорт из *транс*-сети Гольджи во внеклеточное пространство: экзоцитоз

Рассмотрев внутреннюю систему переваривания клетки и различные типы входного мембранного транспорта, сходящиеся в лизосомах, вернемся к аппарату Гольджи и исследуем секреторные пути, ведущие во внеклеточное пространство. Транспортные везикулы, предназначенные в плазматическую мембрану, в норме ровным потоком покидают ТСГ в форме трубочек неправильной формы. Мембранные белки и липиды этих везикул служат новыми компонентами плазматической мембраны, а растворимые белки внутри везикул секретируются во внеклеточное пространство. Слияние пузырьков с плазматической мембраной называется **экзоцитозом**. Например, в ходе этого процесса клетки синтезируют и секретируют большинство протеогликанов и гликопротеинов *внеклеточного матрикса* (см. главу 19).

Этот **конститутивный секреторный путь**, работающий непрерывно, необходим всем клеткам. Однако у специализированных секреторных клеток есть второй секреторный путь, при котором растворимые белки и другие соединения сна-



чала хранятся в *секреторных пузырьках* для последующего высвобождения. Это **регулируемый секреторный путь**, встречающийся, как правило, в клетках, специализирующихся на быстрой секреции необходимых в данный момент продуктов, например гормонов, нейромедиаторов или пищеварительных ферментов (**рис. 13.63**). В данном разделе мы рассмотрим роль аппарата Гольджи в обоих секреторных путях и сравним два механизма секреции.

13.5.1. Многие белки и липиды автоматически переносятся из аппарата Гольджи на поверхность клетки

Клетка, способная к регулируемой секреции, перед отправкой белков из *транс*-сети Гольджи должна разделить их по крайней мере на три класса:

предназначенные в лизосомы (через эндосомы), в секреторные везикулы и для немедленного транспорта на поверхность клетки (**рис. 13.64**). Мы уже говорили о том, что белки, которым суждено оказаться в лизосомах, маркируются для упаковки в специфические пузырьки (в случае лизосомальных гидролаз — маннозо-6-фосфатом). Считается, что сходные сигналы направляют *секреторные белки* в секреторные пузырьки. Неселективный конститутивный секреторный путь транспортирует большинство остальных белков прямо на поверхность клетки. Поскольку для того чтобы попасть на этот путь белкам не требуется определенного сигнала, его также называют **путем по умолчанию**. Таким образом, в неполяризованной клетке, например в белой клетке крови или фибробласте, любой расположенный в люмене аппарата Гольджи белок, если он специфически не возвращается в ЭР, не удерживается в качестве резидентного белка аппарата Гольджи или не отбирается для регулируемой секреции или в лизосомы, автоматически переносится по конститутивному пути на поверхность клетки. В поляризованных клетках, где различные продукты должны доставляться в различные домены клеточной поверхности, судьбы белков, как мы увидим, сложнее.

13.5.2. Секреторные пузырьки отпочковываются от *транс*-сети Гольджи

Клетки, специализирующиеся на быстрой секреции некоторых своих продуктов по первому требованию, накапливают и запасают эти продукты в **секреторных пузырьках** (часто называемых *секреторными гранулами*, или *пузырьками с плотной сердцевиной*, поскольку в электронном микроскопе их содержимое кажется электронно-плотным). Секреторные везикулы образуются из *транс*-сети Гольджи и высвобождают свое содержимое во внеклеточное пространство путем экзоцитоза в ответ на специфические сигналы. Секретированный продукт может быть малой

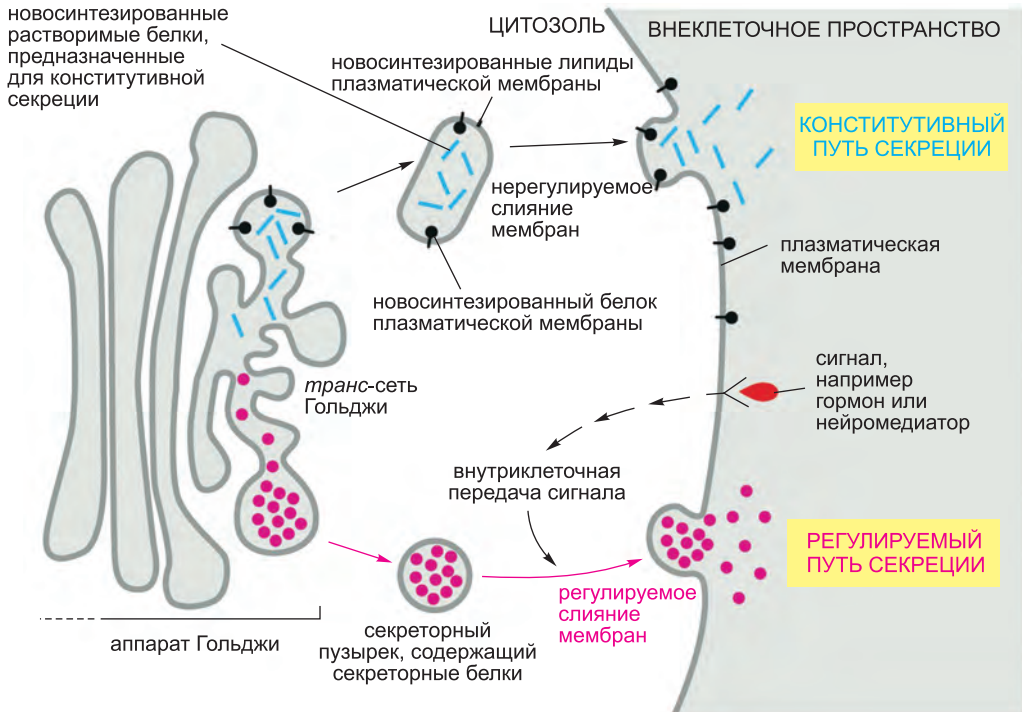


Рис. 13.63. Конститутивный и регулируемый секреторные пути. Два пути расходятся в *транс*-сети Гольджи. Конститутивный секреторный путь работает во всех клетках. Многие растворимые белки непрерывно секретируются из клетки по этому пути, который также снабжает плазматическую мембрану новосинтезированными липидами и белками. Специализированные секреторные клетки также обладают регулируемым секреторным путем, по которому определенные белки *транс*-сети Гольджи направляются в секреторные пузырьки, накапливающие и запасающие белки до тех пор, пока внеклеточный сигнал не инициирует их секрецию. Регулируемая секреция малых молекул, например гистамина и нейромедиаторов, протекает сходным образом; эти молекулы активно транспортируются в цитозоль в ранее сформированных секреторных везикулах. Там они часто образуют комплексы со специфическими макромолекулами (в случае гистамина — с протеогликанами), что позволяет хранить их в высокой концентрации без повышения осмотического давления.

молекулой (к примеру, как гистамин) или белком (например, гормоном или пищеварительным ферментом).

Белки, предназначенные для секреторных пузырьков (называющиеся *секреторными белками*), упаковываются в соответствующие везикулы в *транс*-сети Гольджи при помощи механизма, в котором, по-видимому, задействована селективная агрегация секреторных белков. Скопления агрегированного электронно-плотного вещества можно обнаружить в люмене *транс*-сети Гольджи при помощи электронного микроскопа. Сигнал, направляющий секреторные белки в такие агрегаты, неизвестен, но предполагается, что он состоит из сигнальных участков, единых для белков этого класса. Когда ген, кодирующий секреторный белок, искусственно экспрессируется в секреторной клетке, которая в норме не производит этот белок, чужеродный белок правильно упаковывается в секреторный пузырек. Это наблюдение указывает на то, что, хотя белки, экспрессируемые и упаковы-

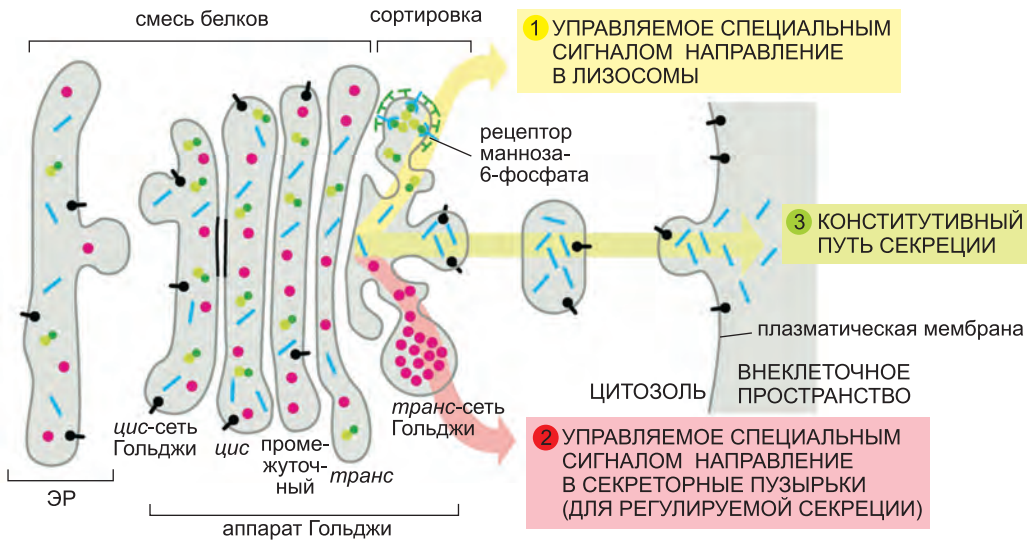


Рис. 13.64. Три наиболее изученных пути сортировки белков в транс-сети Гольджи. (1) Белки с маннозо-6-фосфатным (М6Р) маркером направляются в лизосомы (через эндосомы) в составе клатриновых пузырьков (см. рис. 13.44). (2) Белки с сигналами, направляющими их в секреторные пузырьки, накапливаются в этих пузырьках в рамках регулируемого секреторного пути, свойственного только специализированным клеткам. (3) В неполяризованных клетках белки без особых маркеров доставляются по конститутивному секреторному пути на поверхность клетки. Однако в поляризованных клетках, например клетках эпителия, секреторируемые белки и белки плазматической мембраны селективно направляются либо в апикальный, либо в базолатеральный домен плазматической мембраны. Следовательно, специфический сигнал должен опосредовать по крайней мере один из этих двух путей (см. ниже).

ваемые в секреторные пузырьки каждой клеткой, различаются, все они содержат одинаковые сигналы сортировки, которые нормально функционируют даже в случае, если белок синтезируется в клетке, которой он не свойственен.

Неясно, как агрегаты секреторных белков отделяются для упаковки в секреторные пузырьки. Секреторные пузырьки несут в своей мембране уникальные белки, некоторые из которых служат рецепторами агрегированных белков в транс-сети Гольджи. Однако агрегаты слишком велики для того, чтобы каждая молекула секреторного белка связывалась со своим собственным рецептором груза, как происходит в случае транспорта лизосомальных ферментов. Захват агрегатов в секреторные везикулы может, таким образом, походить на захват частиц при фагоцитозе на поверхности клеток, когда плазматическая мембрана замыкается вокруг крупных структур.

Исходно большинство мембранных секреторных пузырьков, покидающих транс-сеть Гольджи, свободно окружают кластеры агрегированных секреторных белков. С морфологической точки зрения эти **незрелые секреторные пузырьки** напоминают расширенные транс-цистерны Гольджи, отпочковавшиеся от стопки Гольджи. По мере своего созревания пузырьки начинают сливаться друг с другом, а их содержимое концентрируется (рис. 13.65, а). Это происходит, по-видимому, за счет непрерывного возвращения мембраны обратно в поздние эндосомы и ТСГ и постепенного закисления люмена пузырьков, приводящего к возрастанию концентрации АТФ-зависимых H^+ -насосов в мембране. Вспомните, что АТФазы V-типа

закисляют все эндоцитозные и экзоцитозные органеллы (см. рис. 13.36). Уровень концентрирования белков в ходе образования и созревания секреторных пузырьков является лишь одним из этапов увеличения их концентрации в 200–400 раз, после того как они покидают ЭР. Секреторные и мембранные белки концентрируются

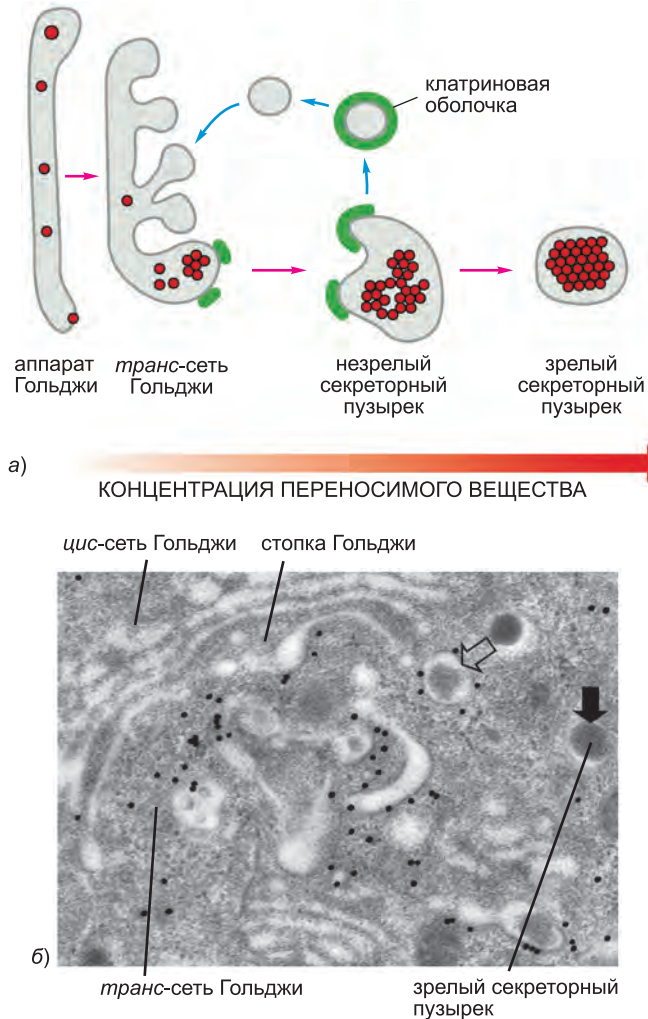


Рис. 13.65. Образование секреторных пузырьков. (а) Существует два механизма изоляции и концентрирования секреторных белков в секреторных пузырьках. Во-первых, в ионной среде *транс*-сети Гольджи белки агрегируют; зачастую агрегаты становятся более конденсированными по мере созревания везикул и закисления их люмена. Во-вторых, клатриновые пузырьки возвращают в ТСГ лишнее мембранное и люминальное содержимое незрелых секреторных пузырьков по мере их созревания. (б) На этой электронной микрофотографии показаны секреторные пузырьки, образующиеся из *транс*-сети Гольджи в секретирующих инсулин β -клетках поджелудочной железы. Для локализации молекул клатрина использовались антитела, присоединенные к частицам золота (черные точки). Незрелые секреторные везикулы (прозрачная стрелка), содержащие белок-предшественник инсулина (проинсулин), несут на поверхности участки клатрина. Клатриновые оболочки не видны на зрелых секреторных пузырьках с высококонденсированной сердцевинкой (закрашенная стрелка). (С любезного разрешения Lelio Orci.)

по мере их продвижения из ЭР через аппарат Гольджи за счет не затрагивающего их интенсивного ретроградного транспорта, опосредованного окаймленными СОР1 везикулами (см. рис. 13.24).

Рециркуляция мембраны важна для возврата компонентов Гольджи в аппарат Гольджи, а также для увеличения концентрации содержимого секреторных пузырьков. Везикулы, опосредующие этот возврат, зарождаются в клатриновых ямках на поверхности незрелых секреторных пузырьков. Иногда их видно даже на отпочковывающихся секреторных пузырьках, которые еще не отделились от стопки Гольджи (см. рис. 13.65, б).

Поскольку конечные зрелые секреторные пузырьки очень плотно заполнены содержимым, секреторная клетка способна после инициации экзоцитоза быстро выделять большое количество вещества (рис. 13.66).

13.5.3. Часто белки в процессе образования секреторных пузырьков протеолитически модифицируются

Концентрирование — это не единственный процесс, которому подвергаются секреторные белки по мере созревания секреторных пузырьков. Многие полипептидные гормоны, нейропептиды и секретируемые гидролитические ферменты синтезируются в форме неактивных белков-предшественников. Протеолиз необходим для освобождения этих активных молекул от этих предшественников. Расщепление

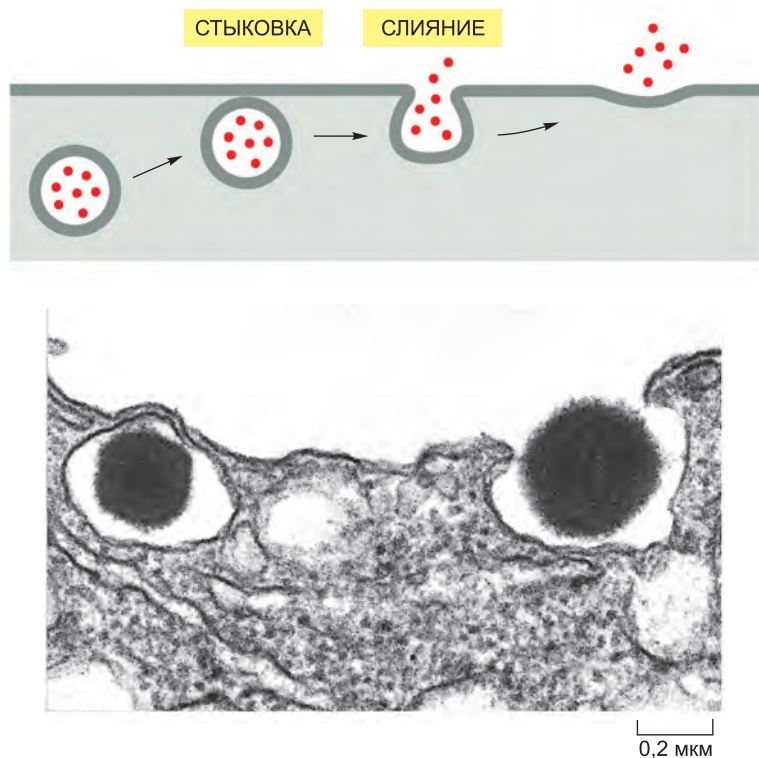


Рис. 13.66. Экзоцитоз секреторных пузырьков. На электронной микрофотографии показано высвобождение инсулина из секреторного пузырька β -клетки поджелудочной железы. (Из L. Orci, J.-D. Vassalli and A. Perrelet, *Sci. Am.* 256: 85–94, 1998. С любезного разрешения Scientific American.)

начинается в *транс*-сети Гольджи и продолжается в секреторных пузырьках и иногда во внеклеточной жидкости после секреции. Например, многие секреторные белки несут на N-конце *пропептид*, который отщепляется с образованием зрелого белка. Таким образом, эти белки синтезируются в форме *пре-про-белков*, и их *пре-пептид* представляет собой сигнальный пептид ЭР, который отщепляется ранее в шероховатом ЭР (см. рис. 12.38). В других случаях пептидные сигнальные молекулы синтезируются в форме *полибелков*, содержащих множественные копии одной и той же аминокислотной последовательности. В еще более сложных случаях разнообразные пептидные сигнальные молекулы синтезируются в составе единого полибелка, который служит предшественником нескольких разных конечных продуктов, отщепляющихся по отдельности от исходной полипептидной цепи. Один и тот же полибелок может быть подвергнут процессингу разными способами с образованием различных пептидов в разных типах клеток (рис. 13.67).

Почему протеолитический процессинг так часто встречается в секреторном пути? Некоторые синтезируемые таким образом пептиды, например энкефалины (состоящие из пяти аминокислот нейропептиды, чья активность сходна с активностью морфина), очевидно, слишком коротки в своей естественной форме для котрансляционного транспорта в люмен ЭР или включения необходимого для упаковки в секреторные пузырьки сигнала. Более того, в случае секреторных гидролитических ферментов и любых других белков, активность которых внутри клетки может нанести вред, задержка активации белка до достижения им секреторного пузырька или его секреции, очевидно, является необходимостью: она не позволяет им преждевременно активироваться внутри клетки, в которой они синтезированы.

13.5.4. Секреторные везикулы ждут вблизи плазматической мембраны до тех пор, пока не им поступит сигнал высвободить свое содержимое

После загрузки содержимого секреторная везикула должна достигнуть сайта секреции, который в некоторых клетках располагается далеко от аппарата Гольджи. Самым ярким примером являются нервные клетки. Секреторные белки, например

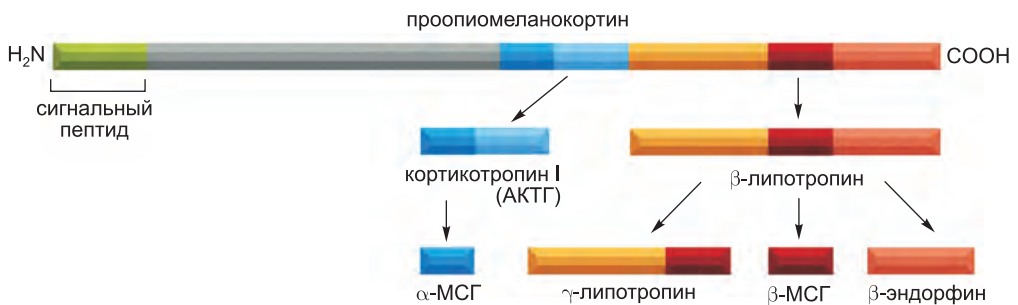


Рис. 13.67. Альтернативные пути процессинга прогормона проопиомеланокортина. Начальное расщепление производится протеазами, делающими разрезы вблизи пар положительно заряженных аминокислот (Lys-Arg, Lys-Lys, Arg-Lys, Arg-Arg). Затем последующие реакции расщепления приводят к образованию конечных секретируемых продуктов. Различные типы клеток синтезируют отдельные белки процессинга в различных концентрациях, поэтому расщепление одного прогормона-предшественника приводит к образованию различных пептидных гормонов. В передней доле гипофиза, например, из проопиомеланокортина образуются только кортикотропин (АКТГ) и β-липотропин, а в средней доле образуются в основном α-меланоцитстимулирующий гормон (α-МСГ), γ-липотропин, β-МСГ и β-эндорфин.

пептидные нейромедиаторы (нейропептиды), которые должны быть высвобождены из нервных окончаний аксона, синтезируются и упаковываются в теле клетки, где расположены рибосомы, ЭР и аппарат Гольджи. Затем они должны пройти по аксону до нервного окончания — это расстояние может составлять больше метра. Как обсуждается в главе 16, двигательные белки толкают пузырьки вдоль микротрубочек, чья однородная ориентация определяет движение пузырьков в правильном направлении. Микротрубочки также направляют везикулы на поверхность клетки при конститутивном экзоцитозе.

Если везикулы, содержащие вещества для конститутивного высвобождения, сливаются с плазматической мембраной сразу после того, как достигнут ее, то секреторные пузырьки в регулируемом пути ждут вблизи мембраны сигнала к секреции, и только после этого происходит слияние. Сигнал часто представляет собой химический мессенджер (переносчик), например, гормон, связывающийся с рецепторами на поверхности клетки. В результате активации рецепторов генерируются внутриклеточные сигналы, которые часто включают в себя увеличение концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле. В нервных окончаниях исходным сигналом экзоцитоза обычно служит электрическое возбуждение (потенциал действия), инициируемое химическими медиаторами, связывающимися с поверхностью клетки в другом месте. Когда потенциал действия достигает нервных окончаний, он вызывает вход Ca^{2+} через потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы. Связывание ионов Ca^{2+} со специфическими сенсорами запускает слияние секреторных везикул (носящих название синаптических пузырьков) с плазматической мембраной и высвобождение их содержимого во внеклеточное пространство (см. рис. 11.35).

Скорость высвобождения нейромедиатора (порядка миллисекунд) указывает на то, что белки, опосредующие реакцию слияния, не претерпевают сложных многоступенчатых перестроек. После того как везикулы состыковались с пресинаптической плазматической мембраной, происходит их подготовка к быстрому слиянию. Может произойти частичное спаривание белков SNARE, но их спирали не образуют окончательный четырехспиральный комплекс, необходимый для слияния (см. рис. 13.18). Предполагают, что другие белки не позволяют SNARE завершить реакцию слияния до тех пор, пока вход Ca^{2+} в цитозоль не снимет это ингибирование. В типичном синапсе только несколько состыковавшихся пузырьков готовы к экзоцитозу. Одновременное использование всего нескольких пузырьков позволяет синапсам «выстреливать» в быстрой последовательности. После слияния и высвобождения содержимого одних везикул, на их замену приходят другие.

13.5.5. Регулируемый экзоцитоз может быть локальным ответом плазматической мембраны и расположенной под ней цитоплазмы

Гистамин — это маленькая молекула, секретируемая *тучными клетками*. Она высвобождается в регулируемом пути в ответ на связывание специфических лигандов с рецепторами на поверхности тучных клеток (см. рис. 25.27). Гистамин вызывает множество неприятных симптомов, сопровождающих аллергические реакции, например зуд и чихание. Когда тучные клетки инкубируют с жидкостью, содержащей растворимый стимулятор, по всей поверхности клеток происходит массовый экзоцитоз (рис. 13.68). Но если стимулирующий лиганд искусственно присоединить к твердым гранулам, то есть заставить его взаимодействовать только с ограниченной областью поверхности тучных клеток, экзоцитоз происходит только в области контакта с гранулой (рис. 13.69).

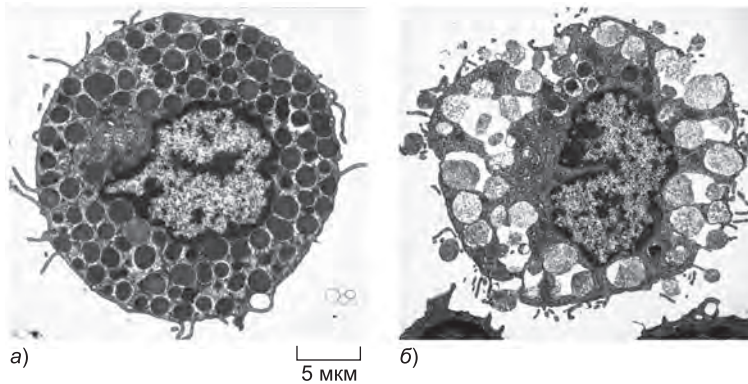


Рис. 13.68. Электронные микрофотографии экзоцитоза в тучных клетках крысы. (а) Нестимулированная тучная клетка. (б) Эта клетка была активирована растворимым внеклеточным стимулятором для секреции запасенного в ней гистамина. Темные пузырьки содержат гистамин, а светлые уже его высвободили. Вещество, остающееся в опустошенных везикулах, состоит из сети протеогликанов, с которыми связывается запасенный гистамин. После слияния секреторного пузырька с плазматической мембраной его мембрана часто служит мишенью для слияния следующего секреторного пузырька. Таким образом, клетка на (б) содержит несколько крупных впадин, высланных слившимися мембранами множества опустошенных секреторных пузырьков, которые теперь непрерывно связаны с плазматической мембраной. Эта непрерывность не всегда видна на сделанных в одной плоскости срезах клетки. (Из D. Lawson, C. Fewtrell, B. Gomperts and M. Raff, *J. Exp. Med.* 142: 391–402, 1975. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

Этот эксперимент показывает, что отдельные участки плазматической мембраны способны при регулируемом экзоцитозе функционировать независимо. В результате тучная клетка, в отличие от нервной клетки, не отвечает на сигнал как целое; активация рецепторов, внутриклеточные сигналы и последующий экзоцитоз локализованы в определенной возбуждаемой области клетки. Точно так же локальный экзоцитоз позволяет лимфоцитам-киллерам доставлять белки, запускающие клеточную гибель, к одной конкретной инфицированной клетке-мишени без подвергания опасности нормальные соседние клетки (см. рис. 25.46).

13.5.6. Компоненты мембраны секреторных пузырьков быстро удаляются из плазматической мембраны

Когда секреторный пузырек сливается с плазматической мембраной, его содержимое выделяется из клетки посредством экзоцитоза, а его мембрана становится частью плазматической мембраны. Несмотря на то что этот процесс должен значительно увеличить площадь поверхности плазматической мембраны, это происходит лишь временно, поскольку мембранные компоненты удаляются с поверхности эндоцитозом почти так же быстро, как они добавляются экзоцитозом. Этот процесс напоминает рассмотренный ранее эндо-экзоцитозный цикл. После удаления из плазматической мембраны белки мембраны секреторного пузырька либо рециркулируют, либо направляются в лизосомы для деградации. Площадь мембраны секреторных пузырьков, временно добавляемая к плазматической мембране, может быть огромной: при стимуляции секреции ацинарной клетки поджелудочной железы, выделяющей пищеварительные ферменты для доставки в просвет кишечника, около 900 мкм² везикулярной мембраны вставляется в апикальную плазматическую мембрану (чья площадь — всего 30 мкм²).

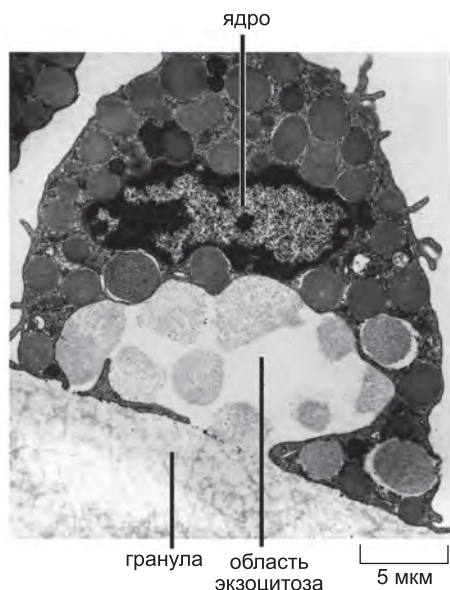


Рис. 13.69. Экзоцитоз как локальный ответ. На этой электронной микрофотографии показана тучная клетка, активированная для секреции гистамина стимулятором, связанным с твердой гранулой. Экзоцитоз происходит только в контактирующей с гранулой области клетки. (D. Lawson, C. Fewtrell and M. Raff, *J. Cell Biol.* 79: 394–400, 1978. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

Регуляция мембранного транспорта, таким образом, играет важную роль в поддержании постоянства состава различных мембран клетки. Чтобы сохранить неизменный размер всех мембранных компартментов секреторного и эндоцитозного путей необходима точная регуляция равновесия между входными и выходными потоками мембран. Для роста клеток необходимо, чтобы прямой поток превышал ретроградный и площадь мембраны могла увеличиться. Для поддержа-

ния постоянного размера клеток прямой и ретроградный потоки должны быть равны. Мы до сих пор очень мало знаем о механизмах, координирующих эти потоки.

13.5.7. Некоторые регулируемые события экзоцитоза направлены на увеличение плазматической мембраны

Важной задачей регулируемого экзоцитоза является доставка в случае необходимости мембраны для увеличения площади поверхности плазматической мембраны клетки. Великолепным примером служит разрастание плазматической мембраны, происходящее при целлюляризации мушиного зародыша, который исходно представляет собой единственную клетку, содержащую около 6000 окруженных одной плазматической мембраной ядер. За несколько десятков минут зародыш превращается в такое же число клеток. Для процесса целлюляризации требуется большое количество новой плазматической мембраны, которая добавляется посредством тонко регулируемого слияния везикул. В результате образуются плазматические мембраны, окружающие отдельные клетки. Сходные процессы везикулярного слияния требуются для увеличения плазматической мембраны в бороздах дробления других животных и растительных клеток в ходе *цитокинеза*, процесса, благодаря которому две дочерние клетки расходятся после митоза (см. главу 17).

На плазматической мембране многих клеток за время их жизни образуется множество маленьких разрывов, особенно в условиях механического растяжения. В удивительном процессе, в котором, по-видимому, участвуют гомотипическое слияние везикул и экзоцитоз, из локально доступных мембранных источников, например лизосом, быстро синтезируются временные заплатки. Помимо создания аварийного барьера против утечек, заплатка также способствует снижению натяжения мембраны в поврежденной области, позволяя «нормальному» бислою восстановить целостность мембраны и запечатать разрыв. При заживлении ран слияние и экзоцитоз везикул запускаются внезапным увеличением концентрации Ca^{2+} , которого много

во внеклеточном пространстве и который стремительно входит в клетку сразу после ее повреждения. На [рисунке 13.70](#) приведены три примера увеличения площади плазматической мембраны благодаря регулируемому экзоцитозу.



Рис. 13.70. Три примера регулируемого экзоцитоза, приводящего к разрастанию плазматической мембраны. (а, б) Считается, что везикулы, сливающиеся с плазматической мембраной в ходе цитокinesis и фагоцитоза, происходят из эндосом, тогда как (в) везикулы, участвующие в восстановлении повреждений, выходят из лизосом. Восстановление плазматической мембраны очень важно в клетках, подвергаемых действию механического растяжения, например в мышечных клетках.

13.5.8. Поляризованные клетки направляют белки из *транс-сети* Гольджи в соответствующий домен плазматической мембраны

Большинство клеток в составе тканей поляризованы и несут два (иногда больше) отличных друг от друга домена плазматической мембраны, служащих мишенями двух различных типов везикул. Встает вопрос, как организована доставка мембраны из аппарата Гольджи и как происходит сохранение различий между доменами клеточной поверхности. Типичная эпителиальная клетка содержит *апикальный домен*, обращенный во внутреннюю полость или во внешнюю среду и часто характеризующийся наличием таких специализированных структур, как реснички или щеточная каемка микроворсинок; и *базолатеральный домен*, покрывающий всю остальную клетку. Два домена отделены друг от друга кольцом плотных соединений (см. рис. 19.24), которые не позволяют липидам и белкам (внешнего монослоя бислоя) диффундировать между доменами. В результате молекулярный состав доменов различается.

Нервные клетки служат другим примером поляризованных клеток. Плазматическая мембрана аксона и нервных окончаний приспособлена для сигнализации другим клеткам, тогда как плазматическая мембрана тела клетки и дендритов специализируется на получении сигналов от других клеток. Домены имеют различный белковый состав. Исследования белкового транспорта в культуре нервных клеток показали, что в отношении везикулярного транспорта из *транс-сети* Гольджи на поверхность клетки плазматическая мембрана тела клетки и дендритов напоминает базолатеральную мембрану поляризованной эпителиальной клетки, а плазматическая мембрана аксона и нервных окончаний напоминает апикальный домен такой клетки ([рис. 13.71](#)). Таким образом, некоторые белки, направляющиеся в определенный домен эпителиальной клетки, также направляются в соответствующий домен нервной клетки.

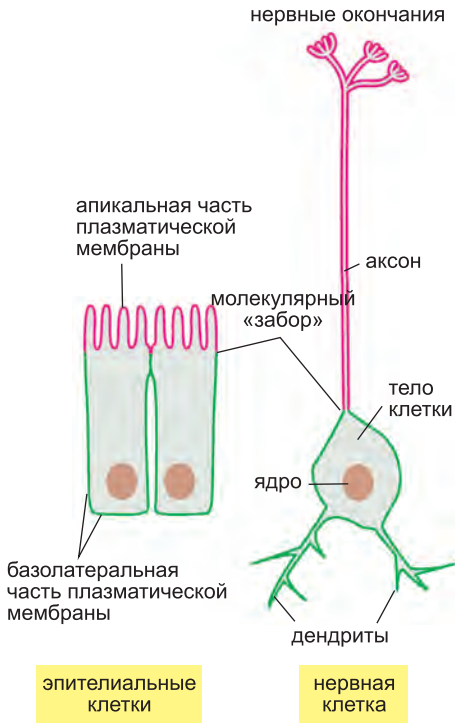


Рис. 13.71. Сравнение двух типов поляризованных клеток. В отношении механизмов направления белков плазматическая мембрана тела нервной клетки и дендритов похожа на базолатеральный домен плазматической мембраны поляризованной эпителиальной клетки, тогда как плазматическая мембрана аксона и нервных окончаний напоминает апикальный домен эпителиальной клетки. Разные мембранные домены нервных и эпителиальных клеток отделены друг от друга молекулярным «забором», состоящим из сети крепко связанных с нижележащим актиновым цитоскелетом мембранных белков. Этот барьер, в эпителиальных клетках называющийся плотным соединением, а в нервных клетках — аксональным холмиком, не дает мембранным белкам диффундировать между доменами.

13.5.9. Различные механизмы селективно направляют мембранные белки и липиды в соответствующие домены плазматической мембраны

В принципе, различия между доменами плазматической мембраны не должны зависеть от направленной доставки соответствующих мембранных компонентов. Вместо

этого, мембранные компоненты могут быть доставлены в любую область клеточной поверхности, а затем селективно стабилизироваться в одних областях и селективно уничтожаться в других. Несмотря на то что такая стратегия случайной доставки, с последующим удерживанием или удалением компонентов в некоторых случаях используется, доставка часто специфически предназначается для определенного мембранного домена. Эпителиальные клетки часто секретируют один набор продуктов, например пищеварительные ферменты и слизь в клетках, выстилающих кишечник, на своей апикальной стороне и другой набор, например компоненты базальной пластинки, на базолатеральной поверхности. Таким образом, у клеток есть пути направления везикул, несущих различный груз, в различные домены плазматической мембраны.

Исследования поляризованных эпителиальных клеток в культуре показали, что белки, предназначенные в разные домены, транспортируются из ЭР вместе и только в ТСГ разделяются и упаковываются в секреторные или транспортные пузырьки, направляющиеся в соответствующий домен плазматической мембраны (**рис. 13.72**).

Апикальная плазматическая мембрана большинства эпителиальных клеток обогащена гликофинголипидами, которые защищают поверхность от повреждения — например, от действия пищеварительных ферментов и низкого pH в кишечнике и желудке соответственно. Более того, белки плазматической мембраны, связанные с липидным бислоем гликозилфосфатидилинозитольным (GPI) якорем (см. главу 12), также преимущественно содержатся в апикальном домене. Если методами рекомбинантных ДНК присоединить GPI-якорь к белку, который в норме доставляется на базолатеральную поверхность, он будет доставляться в апикальный домен.

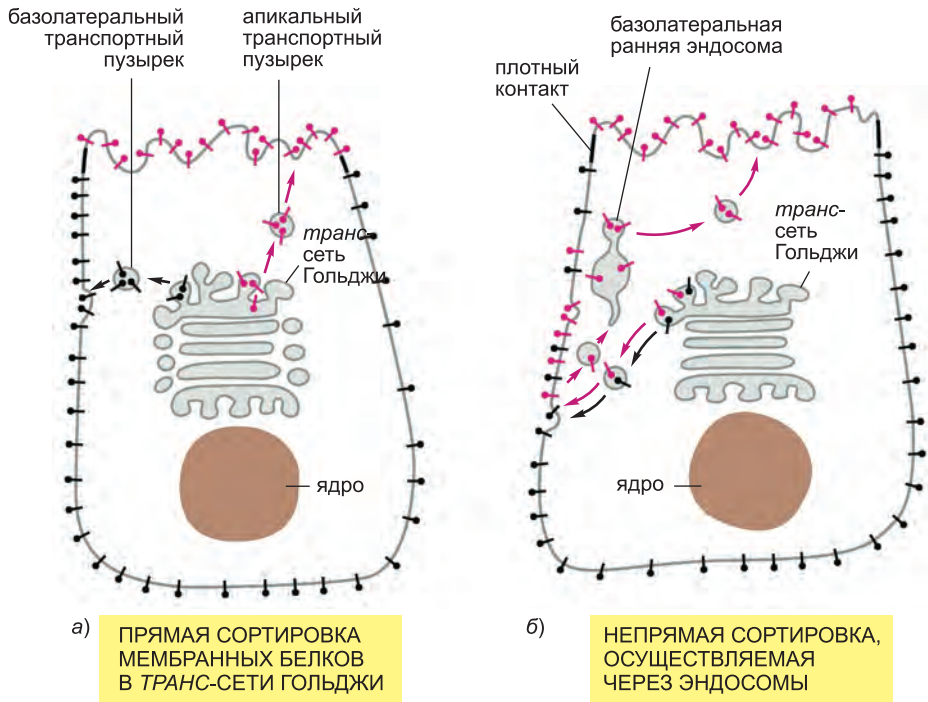


Рис. 13.72. Два пути сортировки мембранных белков в поляризованной эпителиальной клетке. Новосинтезированные белки могут достичь своего домена плазматической мембраны по (а) прямому специфическому пути или (б) непрямому пути. В непрямом пути белок захватывается посредством эндоцитоза из неправильного домена плазматической мембраны и затем транспортируется в правильный домен в составе ранних эндосом, то есть посредством транскитоза. Непрямой путь используется в гепатоцитах печени для доставки белков в апикальный домен клеток, выстилающих желчные протоки. Однако в других случаях используется прямой путь, например, в описанном в тексте зависимом от липидных рафтов механизме эпителиальных клеток.

Предполагается, что GPI-связанные белки направляются в апикальную мембрану, потому что они взаимодействуют с гликофинголипидами в липидных рафтах, образующихся в мембране ТСГ. Как обсуждается в главе 10, липидные рафты образуются в ТСГ и плазматической мембране, когда гликофинголипиды и холестерин самопроизвольно образуют мини-агрегаты (см. рис. 10.14). Отобрав уникальный набор молекул груза, рафт затем отпочковывается от *транс*-сети Гольджи в составе транспортных пузырьков, предназначенных в апикальную плазматическую мембрану. Таким образом, липидные домены также могут участвовать в сортировке белков в ТСГ. Это процесс похож на распределение некоторых мембранных белков по специализированным доменам в кавеолах плазматической мембраны.

Мембранные белки, предназначенные для доставки в базолатеральную мембрану, содержат в своем цитоплазматическом «хвосте» сигналы сортировки. В соответствующем структурном окружении эти белки узнаются белками оболочки, упаковывающими их в соответствующие транспортные везикулы в ТСГ. Базолатеральные сигналы, узнающиеся в ТСГ, также функционируют в эндосомах для направления белков обратно в базолатеральную плазматическую мембрану после их эндоцитоза.

13.5.10. Синаптические пузырьки могут напрямую образовываться из эндоцитозных пузырьков

Нервные клетки (и некоторые эндокринные клетки) содержат два типа секреторных везикул. Как и все секреторные клетки, эти клетки обычным образом упаковывают белки и пептиды в секреторные пузырьки с плотной сердцевинкой для высвобождения в регулируемом секреторном пути. Однако они используют другой специализированный класс очень маленьких (~50 нм в диаметре) секреторных везикул, носящих название **синаптических пузырьков**. Эти пузырьки образуются особым образом. В нервных клетках синаптические пузырьки содержат маленькие молекулы нейромедиаторов, например: ацетилхолин, глутамат, глицин и γ -аминомасляную кислоту (GABA), которые опосредуют быструю передачу сигнала от клетки к клетке в химических синапсах. Как обсуждалось ранее, когда потенциал действия достигает нервного окончания, он запускает высвобождение пузырьками своего содержимого за долю миллисекунды. Некоторые нейроны посылают 1000 сигналов в секунду, каждый раз выделяя нейромедиатор. Такое быстрое высвобождение возможно, потому что пузырьки располагаются вблизи плазматической мембраны и готовы к слиянию, которое произойдет только когда потенциал действия вызовет вход Ca^{2+} в нервное окончание.

Лишь малая часть синаптических пузырьков нервного окончания сливается с плазматической мембраной в ответ на каждый потенциал действия. Но для того чтобы нервное окончание быстро реагировало, пузырьки должны очень быстро заново наполняться после их опустошения. Таким образом, большинство синаптических пузырьков образуется не из мембраны Гольджи в теле нервной клетки, а в результате локальной рециркуляции из плазматической мембраны нервного окончания. Считают, что компоненты мембраны синаптических пузырьков сначала доставляются в плазматическую мембрану по конститутивному секреторному пути, а затем возвращаются оттуда эндоцитозом. Но вместо того чтобы сливаться с эндосомами, большинство эндоцитозных везикул немедленно заполняется нейромедиаторами с образованием синаптических пузырьков.

Мембранные компоненты синаптических пузырьков включают в себя транспортеры, переносящие опосредующий быструю синаптическую передачу сигнала нейромедиатор из цитозоля, где он синтезируется. После загрузки нейромедиатором везикулы возвращаются к плазматической мембране, где они ждут до тех пор, пока клетка не будет стимулирована. После высвобождения нейромедиатора мембранные компоненты пузырьков в эндоцитозных везикулах возвращаются внутрь клетки и повторно используются (**рис. 13.73**).

Поскольку синаптических пузырьков много и они относительно однородны по форме, их можно выделить в большом количестве. Благодаря этому они являются наиболее полно охарактеризованными органеллами клетки. Точный количественный протеомный анализ позволил идентифицировать компоненты синаптических пузырьков (**рис. 13.74**).

Заключение

Клетки способны секретировать молекулы посредством экзоцитоза либо по конститутивному, либо по регулируемому пути. Если регулируемый путь работает только в специализированных секреторных клетках, то конститутивный путь свойственен всем эукариотическим клеткам и характеризуется

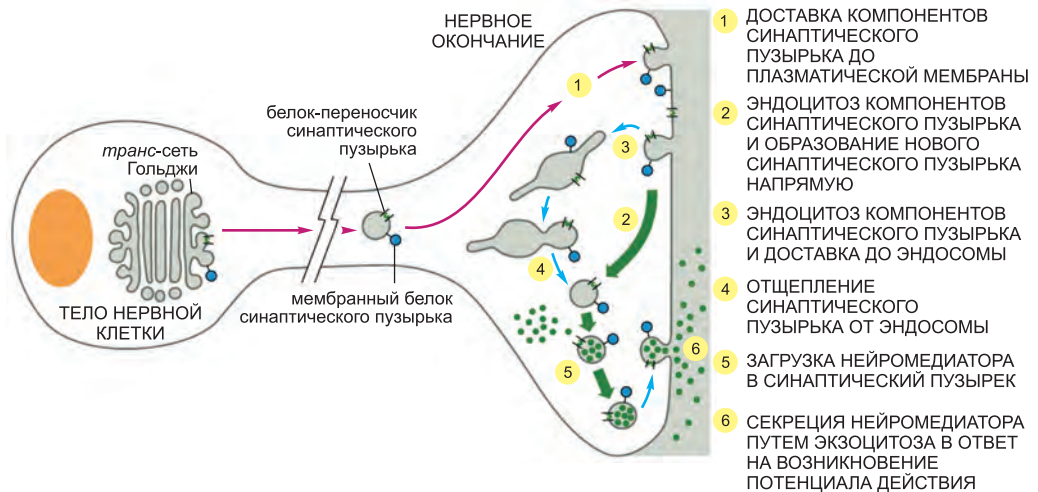


Рис. 13.73. Образование синаптического пузырька. Эти очень маленькие однородные пузырьки содержатся только в нервных клетках и некоторых эндокринных клетках, где они хранят и секретируют малые молекулы нейромедиаторов. Импорт нейромедиатора напрямую в маленькие эндоцитозные пузырьки, образующиеся из плазматической мембраны, опосредуется мембранными белками-переносчиками, работающими как антипорты и зависящими от градиента H^+ , поддерживаемого протонными насосами в мембране пузырьков.

непрерывным везикулярным транспортом из ТСГ в плазматическую мембрану. В регулируемом пути молекулы хранятся либо в секреторных пузырьках, либо в синаптических пузырьках, которые не сливаются с мембраной для высвобождения своего содержимого до тех пор, пока не получат соответствующий сигнал. Секреторные пузырьки, содержащие белки для секреции, отпочковываются от ТСГ. Секреторные белки концентрируются в процессе образования и созревания секреторных пузырьков. Синаптические пузырьки, встречающиеся только в нервных клетках и некоторых эндокринных клетках, образуются из эндоцитозных пузырьков и эндосом и опосредуют регулируемую секрецию малых молекул нейромедиаторов.

Белки доставляются из ТСГ в плазматическую мембрану по конститутивному пути, за исключением белков, которые направляются в другие пути или удерживаются в аппарате Гольджи. В поляризованных клетках транспортные пути из ТСГ в плазматическую мембрану работают селективно, что обеспечивает доставку различных наборов мембранных белков, секреторных белков и липидов в разные домены плазматической мембраны.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

13.1. Когда везикула сливается с мембраной-мишенью, друг с другом всегда сливаются цитоплазматические монослои бислоев этих компартментов. То же самое происходит с монослоями, не взаимодействующими с цитозолем.

13.2. Существует одно необходимое условие выхода белка из ЭР: он должен быть правильно свернут.

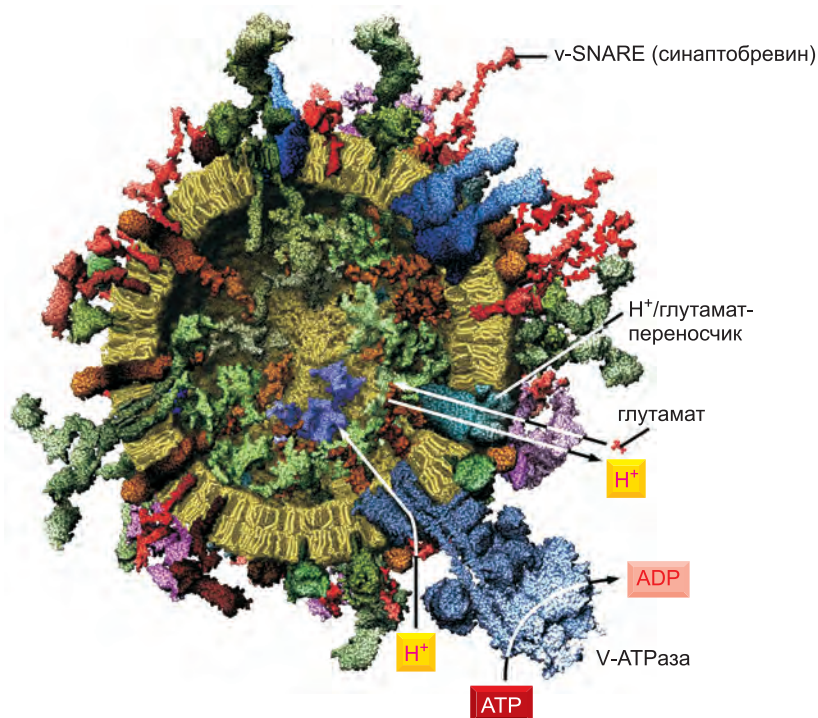


Рис. 13.74. Модель синаптического пузырька в масштабе. На рисунке показан срез через синаптический пузырек. Белки и липиды изображены в масштабе в соответствии с их известной стехиометрией и известной или приблизительной структурой. Показано только около 70% мембранных белков, по оценкам, присутствующих в мембране. Таким образом, полная модель выглядела бы еще более густонаселенной, чем представленная здесь. Мембрана каждого синаптического пузырька содержит 7 000 молекул фосфолипидов, 5 700 молекул холестерина и около 50 молекул различных интегральных мембранных белков, которые значительно различаются по относительному содержанию и все вместе вносят примерно 600 трансмембранных α -спиралей. Среди белков пузырька преобладает v-SNARE синаптобrevин (~70 копий/пузырек). За счет своей филаментной структуры он выступает из плотного переплетения цитоплазматических доменов белков, которые практически полностью покрывают поверхность везикулы. V-АТРаза, которая использует гидролиз АТФ для накачки H^+ в люмен, наоборот, присутствует в 1–2 копиях на пузырек. Градиент H^+ обеспечивает энергией импорт нейромедиаторов антипортом H^+ /нейромедиатор, который нагружает каждый пузырек 1 800 молекулами нейромедиатора, например глутамата, один из которых показан в масштабе. (Адаптировано из S. Takamori et al., *Cell*, 127: 831–846, 2006. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

13.3. Олигосахаридные цепи всех гликопротеинов и гликолипидов внутриклеточных мембран всегда обращены на люминальную сторону, а белков плазматической мембраны — во внеклеточное пространство.

13.4. Во время транцитоза везикулы, образующиеся из окаймленных ямок на апикальной поверхности, сливаются с плазматической мембраной на базолатеральной поверхности. Таким образом, молекулы транспортируются через эпителий.

Решите следующие задачи

13.5. Почему в неделящихся клетках, например клетках печени, поток мембран между компартментами должен быть сбалансирован таким образом, чтобы

возвратный поток был равен прямому? Стоит ли ожидать такого же равновесия в активно делящихся эпителиальных клетках кишечника?

13.6. Дрожжи, как и многие другие организмы, синтезируют один тип тяжелой цепи клатрина и один тип легкой цепи; таким образом, они синтезируют один тип клатриновой оболочки. Тогда каким образом единственная клатриновая оболочка может использоваться в трех различных путях транспорта (из Гольджи в поздние эндосомы, из плазматической мембраны в ранние эндосомы и из незрелых секреторных пузырьков в Гольджи), в каждом из которых участвуют различные специализированные белки груза?

13.7. Как получается так, что комплементарные пары специфических белков SNARE уникальным образом маркируют везикулы и их мембраны-мишени? После слияния везикул мембрана-мишень будет содержать смесь t-SNARE и v-SNARE. Сначала эти белки будут крепко связаны друг с другом, но NSF может их развести и заново активировать. Что, по-вашему мнению, не дает мембранам накапливать белки v-SNARE в равном или большем количестве, чем белки t-SNARE?

13.8. Вирусы — это окончательные «уборщики», что является естественным последствием малого размера их генома. Где только возможно, они используют аппарат клетки для обеспечения собственной репродукции. Многие вирусы окружены мембранной оболочкой. Эти так называемые оболочечные вирусы попадают в цитозоль в результате слияния с мембраной клетки. Почему все эти вирусы кодируют свой собственный белок слияния, а не используют один из клеточных SNARE?

13.9. Для слияния везикулы и мембраны-мишени их липидные бислои должны сблизиться на расстояние 1,5 нм. Только после этого они смогут объединиться (рис. Q13.1). Пусть области двух мембран в сайте слияния представляют собой дуги окружности диаметром 1,5 нм. Рассчитайте количество молекул воды, которые останутся между мембранами. (Концентрация воды составляет 55,5 М, а объем цилиндра равен $\pi r^2 h$.) Предположив, что головка типичного фосфолипида занимает площадь 0,2 нм², сколько фосфолипидов будет находиться в каждом из монослоев в сайте слияния? Достаточно ли там молекул воды для связывания с гидрофильными головками такого числа фосфолипидов? (По оценкам, с каждой головной группой фосфолипида на поверхности мембраны одновременно связано 10–12 молекул воды.)

13.10. Белки SNARE — это комплементарные партнеры, опосредующие слияние мембран везикул и их мембран-мишеней. Таким образом, везикула с определенным видом v-SNARE будет сливаться только с мембраной, несущей комплементарный t-SNARE. Однако в некоторых случаях происходит слияние одинаковых мембран (гомотиписческое слияние). Например, когда происходит почкование дрожжевой клетки,

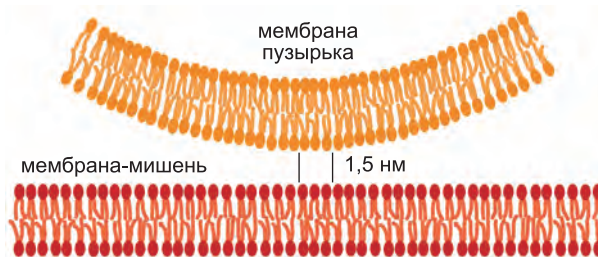


Рис. Q13.1. Сближение везикулы и мембраны-мишени при подготовке к слиянию (задача 13.9).

пузырьки из вакуоли материнской клетки мигрируют в почку и сливаются друг с другом с образованием новой вакуоли. Эти везикулы несут как v-SNARE, так и t-SNARE. Являются ли оба типа белков необходимыми для гомотипического слияния?

Для проверки вашей гипотезы, вы разработали остроумный опыт по слиянию вакуолярных пузырьков. Вы подготовили везикулы из двух разных мутантных штаммов дрожжей: штамм Б несет дефектный ген вакуолярной щелочной фосфатазы (Раза); штамм А дефективен по протеазе, переводящей предшественник щелочной фосфатазы (pro-Раза) в активную форму (Раза) (рис. Q13.2, а). Ни в одном из штаммов нет активной щелочной фосфатазы, но при смешивании экстрактов этих штаммов слияние везикул приводит к появлению активной щелочной фосфатазы, которую можно легко детектировать (рис. Q13.2).

Затем вы удалили гены вакуолярных v-SNARE, t-SNARE или обоих белков в каждом из штаммов. Вы приготовили вакуолярные пузырьки и проверили их на способность сливаться, измеряя активность щелочной фосфатазы (рис. Q13.2, б).

Что полученные данные говорят о требованиях, касающихся v-SNARE и t-SNARE при слиянии вакуолярных пузырьков? Имеет ли значение, какой тип SNARE в какой везикуле находится?

13.11. Если бы вы удалили сигнал возврата в ЭР белка дисульфидизомеразы (PDI), которая в норме является растворимым резидентным белком люмена ЭР, где бы в результате оказалась модифицированная PDI?

13.12. Рецептор KDEL должен путешествовать между ЭР и аппаратом Гольджи, чтобы выполнять свою функцию удержания растворимых белков ЭР в люмене ЭР. В каком компартменте рецептор KDEL крепче связывает свои лиганды? В каком слабее? Что лежит в основе разницы в его сродстве с лигандами в разных компартментах? Если бы вы разрабатывали эту систему, в каком компартменте вы бы поддерживали наибольшую концентрацию рецептора KDEL? Стали бы вы утверждать, что рецептор KDEL, являющийся трансмембранным белком, несет сигнал возврата в ЭР?

13.13. Как низкий pH лизосом защищает клетку от лизосомальных ферментов в случае повреждения лизосом?

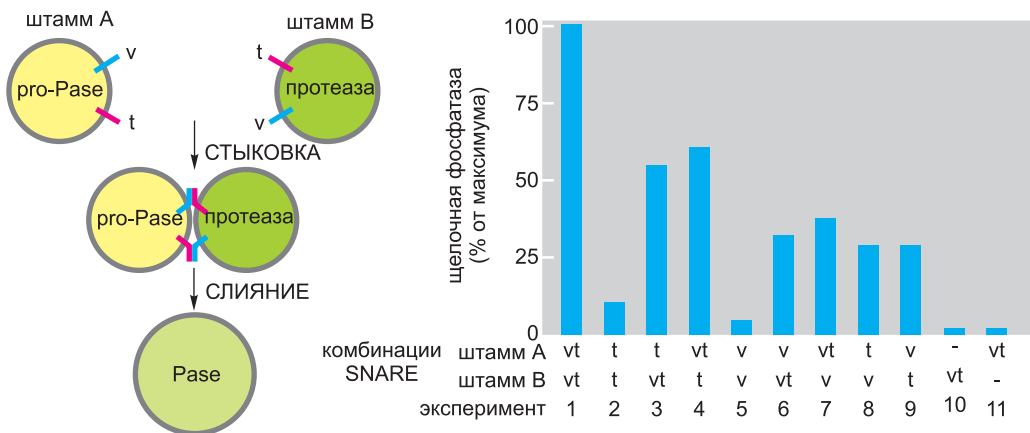


Рис. Q13.2. Требования к SNARE при слиянии мембран (задача 13.10). (а) Схема измерения слияния вакуолярных пузырьков. (б) Результаты слияния пузырьков с различными сочетаниями v-SNARE и t-SNARE. SNARE везикул двух штаммов обозначены через v (v-SNARE) и t (t-SNARE).

13.14. Меланосомы — это специализированные лизосомы, хранящие пигменты, которые в конце концов будут высвобождены путем экзоцитоза. Различные клетки, например клетки кожи и волос, захватывают пигмент, который определяет их характерную окраску. Мутантные мыши с нарушением меланосом часто имеют бледную или необычную окраску шкурки. Одна из таких светлоокрашенных мышей, мышь *Mocha* (рис. Q13.3), несет дефектный ген одной из субъединиц адаптерного белкового комплекса AP3, который связывается с окаймленными пузырьками, отпочковывающимися от *транс*-сети Гольджи. Как потеря AP3 может привести к дефекту меланосом?

13.15. Пациенты с синдромами Хантера или Хурлера редко достигают полового созревания. У этих больных за счет отсутствия определенных лизосомальных ферментов в лизосомах накапливаются глюкозамингликаны, которые не могут деградировать. При слиянии клеток, больных этими синдромами, глюкозамингликаны правильно деградируют, что указывает на то, что в клетках отсутствуют разные лизосомальные ферменты. Даже при совместном культивировании клеток они исправляют дефекты друг друга. Еще удивительнее то, что среда, в которой выращивались клетки Хурлера, исправляет дефект в клетках Хантера (и наоборот). Коррекционные факторы инактивируются обработкой протеазами, периодатом, разрушающим углеводы, и щелочной фосфатазой, удаляющей фосфаты.

а. Что, по-вашему мнению, служит коррекционными факторами? Начав с клеток пациента-донора, опишите путь, по которому эти факторы достигают среды и входят в реципиентные клетки для исправления дефекта лизосом.

б. Как вы думаете, почему обработка протеазами, периодатом и щелочной фосфатазой инактивирует коррекционные факторы?

в. Будет ли сходная коррекционная схема работать для мутантных цитоплазматических ферментов?

13.16. Макрофаг за полчаса поглощает путем эндоцитоза 100 % своей плазматической мембраны. Какова скорость возврата мембраны путем экзоцитоза?

13.17. Клетки поглощают внеклеточные молекулы посредством рецепторопосредованного эндоцитоза и эндоцитоза жидкой фазы. В классической статье проведено сравнение этих двух путей. Человеческие клетки инкубировали разные



нормальная мышь

мышь *Mocha*

Рис. Q13.3. Нормальная мышь и мышь *Mocha* (задача 13.14). Помимо бледной окраски, для мышей *Mocha* характерно нарушение чувства равновесия. (С любезного разрешения Margit Burmeister.)

промежутки времени в среде с разной концентрацией меченного ^{125}I эпидермального фактора роста (EGF) для измерения рецептор-опосредованного эндоцитоза или пероксидазы хрена (HRP) для измерения эндоцитоза жидкой фазы. EGF и HRP обнаруживались в маленьких везикулах с внутренним радиусом 20 нм. Поглощение HRP было линейным (рис. Q13.4, а), а поглощение EGF сначала происходило линейно, но затем, при высоких концентрациях, достигало плато (рис. Q13.4, б).

а. Объясните, почему формы кривых на рисунке Q13.4 различаются для HRP и EGF.

б. По рис. Q13.4 оцените различия в скоростях поглощения HRP и EGF, когда оба фермента присутствуют в концентрации 40 нМ. Какой будет разница при концентрации 40 мкМ?

в. Рассчитайте среднее число молекул HRP, поглощаемых одним эндоцитозным пузырьком (радиус равен 20 нм), когда среда содержит 40 мкМ HRP. [Объем сферы равен $(4/3)\pi r^3$.]

г. Ученые, поставившие этот эксперимент, написали: «Данные расчеты ясно показывают, как клетки поглощают EGF посредством эндоцитоза, почти полностью исключая при этом внеклеточную жидкость.» Что они, по-вашему мнению, имели в виду?

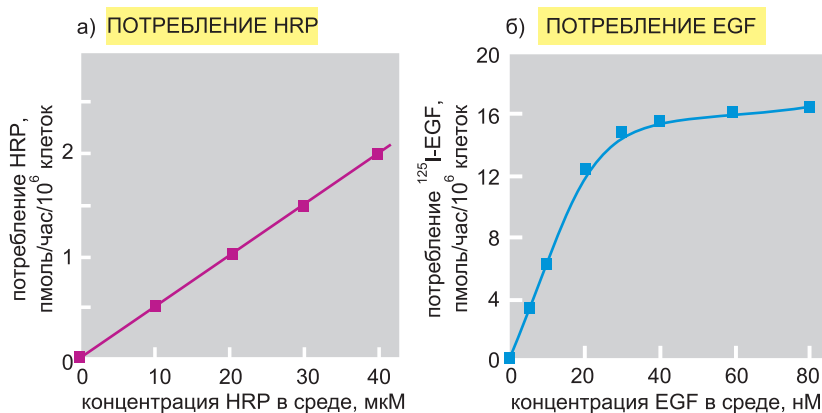


Рис. Q13.4. Поглощение HRP и EGF как функция от их концентрации в среде (задача 13.17).

Список литературы

Общая

Bonifacino J.S. & Glick B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* 116: 153–66.

Mellman I. & Warren G. (2000) The road taken: past and future foundations of membrane traffic. *Cell* 100: 99–112.

Pelham H. R. (1999) The Croonian Lecture 1999. Intracellular membrane traffic: getting proteins sorted. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354: 1471–1478.

Rothman J.E. & Wieland F.T. (1996) Protein sorting by transport vesicles. *Science* 272: 227–234.

Schekman R. W. (1994) Regulation of membrane traffic in the secretory pathway. *Harvey Lect.* 90: 41–57.

Молекулярные механизмы и поддержание разнообразия компартментов

Di Paolo G. & De Camilli P. (2006) Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature* 443: 651–657.

Grosshans B. L., Ortiz D. & Novick P. (2006) Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 11821–11827.

Gurkan C., Stagg S. M. & Balch W. E. (2006) The COPII cage: unifying principles of vesicle coat assembly. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 727–738.

Jahn R. & Scheller R. H. (2006) SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 631–643.

Kirchhausen T. (2000) Three ways to make a vesicle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 187–198.

McNew J. A., Parlati F., Sollner T. & Rothman J. E. (2000) Compartmental specificity of cellular membrane fusion encoded in SNARE proteins. *Nature* 407: 153–159.

Pfeffer S. R. (1999) Transport-vesicle targeting: tethers before SNAREs. *Nature Cell Biol.* 1: E17–E22.

Robinson M. S. & Bonifacino J. S. (2001) Adaptor-related proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 444–453.

Seaman M. N. (2005) Recycle your receptors with retromer. *Trends Cell Biol.* 15: 68–75.

Springer S., Spang A. & Schekman R. W. (1999) A primer on vesicle budding. *Cell* 97: 145–148.

Транспорт из ЭР через аппарат Гольджи

Bannykh S. I., Nishimura N. & Balch W. E. (1998) Getting into the Golgi. *Trends Cell Biol.* 8: 21–25.

Ellgaard L. & Helenius A. (2003) Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 181–191.

Farquhar M. G. & Palade G. E. (1998) The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends Cell Biol.* 8: 2–10.

Glick B. S. (2000) Organization of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12: 450–456.

Ladinsky M. S., Mastrorade D. N. et al. (1999) Golgi structure in three dimensions: functional insights from the normal rat kidney cell. *J. Cell Biol.* 144:1135–1149.

Lee M. C., Miller E. A., Goldberg J. et al. (2004) Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20: 87–123.

Pelham H. R. & Rothman J. E. (2000) The debate about transport in the Golgi — two sides of the same coin? *Cell* 102: 713–719.

Warren G. & Malhotra V. (1998) The organisation of the Golgi apparatus. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10: 493–498.

Wells L. & Hart G. W. (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett.* 546: 154–158.

Zeuschner D., Geerts W. J. & Klumperman J. (2006) Immuno-electron tomography of ER exit sites reveals the existence of free COPII-coated transport carriers. *Nature Cell Biol.* 8: 377–383.

Транспорт из транс-сети Гольджи в лизосомы

Andrews N.W. (2000) Regulated secretion of conventional lysosomes. *Trends Cell Biol.* 10: 316–321.

de Duve C. (2005) The lysosome turns fifty. *Nature Cell Biol.* 7:847–849.

Kornfeld S. & Mellman I. (1989) The biogenesis of lysosomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 5: 483–525.

Levine B. & Klionsky D.J. (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* 6: 463–477.

Noda T., Suzuki K. & Ohsumi Y. (2002) Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure. *Trends Cell Biol.* 12: 231–235.

Futerman A.H. & van Meer G. (2004) The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 554–565.

Peters C. & von Figura K. (1994) Biogenesis of lysosomal membranes. *FFSS Lett.* 346: 108–114.

Rouille Y., Rohn W. & Hoflack B. (2000) Targeting of lysosomal proteins. *Semin. Cell Dev. Biol.* 11: 165–171.

Транспорт в клетку из плазматической мембраны: эндоцитоз

Anderson R.G. (1998) The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 199–225.

Bonifacino J.S. & Traub L.M. (2003) Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 395–447.

Brown M.S. & Goldstein J.L. (1986) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34–47.

Conner S.D. & Schmid S.L. (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37–44.

Gruenberg J. & Stenmark H. (2004) The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 317–323.

Hicke L. (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin. *Cell* 106:527–530.

Katzmann D.J., Odorizzi G. & Emr S. (2002) Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 893–905.

Maxfield F.R. & McGraw T.E. (2004) Endocytic recycling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 121–132.

Mellman I. (1996) Endocytosis and molecular sorting. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 12: 575–625.

Pelkmans L. & Helenius A. (2003) Insider information: what viruses tell us about endocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 414–422.

Tjelle T.E., Lovdal T. et al. (2000) Phagosome dynamics and function. *Bio. Essays* 22: 255–263.

Yeung T., Ozdamar B. & Grinstein S. (2006) Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18: 429–437.

Транспорт из транс-сети Гольджи во внеклеточное пространство: экзоцитоз

Burgess T.L. & Kelly R.B. (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3: 243–293.

Dietrich C., Volovyk Z. N. & Jacobson K. (2001) Partitioning of Thy-1, GM1, and cross-linked phospholipid analogs into lipid rafts reconstituted in supported model membrane monolayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10642–10647.

Martin T. F. (1997) Stages of regulated exocytosis. *Trends Cell Biol.* 7: 271–276.

Mostov K., Su T. et al. (2003) Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nature Cell Biol.* 5: 287–293.

Murthy V. N. & De Camilli P. (2003) Cell biology of the presynaptic terminal. *Annu. Rev. Neurosci.* 26: 701–728.

Schuck S. & Simons K. (2004) Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J. Cell Sci.* 117(Pt 25): 5955–5964.

Simons K. & Ikonen E. (1997) Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569–572.

Sudhof T. C. (2004) The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev. Neurosci.* 27: 509–547.

Tooze S. A. (1998) Biogenesis of secretory granules in the trans-Golgi network of neuroendocrine and endocrine cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1404: 231–244.

Traub L. M. & Kornfeld S. (1997) The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9: 527–533.

Преобразование энергии: митохондрии и хлоропласты

Энергия частичного окисления высокоэнергетических молекул углеводов посредством протекающих в цитозоле реакций используется для синтеза АТР, энергетической валюты клеток (см. главу 2). Но очень рано в истории жизни возник значительно более эффективный метод получения энергии. Для этого процесса требуется мембрана, и он позволяет получать энергию из широкого спектра источников. Например, он играет центральную роль в преобразовании энергии света в энергию химических связей в фотосинтезе, а также при аэробном дыхании, благодаря которому мы способны использовать кислород для синтеза большого количества АТР из питательных молекул.

Прокариоты используют для синтеза АТР свою плазматическую мембрану. Но плазматическая мембрана эукариотических клеток зарезервирована для транспортных процессов, описанных в главе 11. Вместо этого, эукариоты используют для синтеза большей части своего АТР специализированные мембраны внутри *энергопреобразующих органелл*. Такими замкнутыми мембранными органеллами являются **митохондрии**, присутствующие в клетках всех эукариотических организмов (включая грибы, животных, растения, водоросли и простейших), и **пластиды**, в особенности хлоропласты, которые встречаются только у растений и водорослей. На электронных микрофотографиях наиболее ярким морфологическим признаком митохондрий и хлоропластов является обилие в них внутренних мембран. Эти внутренние мембраны служат физической основой для сложного набора электрон-транспортных процессов, в результате которых синтезируется большая часть АТР клетки.

Общий процесс получения энергии для биологических нужд, используемый митохондриями, хлоропластами и прокариотами, называется **хемиосмотическим сопряжением**. Такое название отражает связь между химическими реакциями образования связей, в результате которых синтезируется АТР («хеми»), и мембранотранспортными процессами («осмо»). Процесс сопряжения протекает в две связанные между собой стадии, в каждой из которых принимают участие встроенные в мембрану белковые комплексы:

Стадия 1. Высокоэнергетические электроны (возникшие в результате окисления молекул пищи, действия солнечного света или из других источников, которые мы обсудим позже) путешествуют по цепи электронных переносчиков, встроенных в мембрану. В результате переноса электронов высвобождается энергия, используемая для перекачки протонов (H^+ , полученных из содержащейся в клетках в избытке воды) через мембрану и создания *электрохимического протонного*

градиента. В главе 11 мы говорили о том, что ионный градиент через мембрану — одна из форм запасаения энергии, которую можно использовать для совершения полезной работы при переносе ионов обратно через мембрану по электрохимическому градиенту.

Стадия 2. H^+ движутся по своему электрохимическому градиенту через белковую машину, носящую название *АТФ-синтазы* и катализирующую требующий затрат энергии синтез АТФ из АДФ и неорганического фосфата (P_i). Этот присутствующий повсюду фермент играет роль турбины, позволяющей градиенту протонов служить движущей силой синтеза АТФ (**рис. 14.1**).

Электрохимический протонный градиент обеспечивает работу других мембранных белковых машин (**рис. 14.2**). У эукариот специальные белки сопрягают ток H^+ по градиенту с транспортом специфических метаболитов через мембраны органелл. У бактерий электрохимический протонный градиент предоставляет энергию не только для синтеза АТФ и транспортных процессов: в качестве запасенной энергии он напрямую используется для быстрого вращения бактериального жгутика, то есть обеспечивает передвижение организма.

Весь набор белков мембраны и малых молекул, в упорядоченной последовательности участвующих в переносе электронов, называется **электрон-транспортной цепью**. Механизм электронного транспорта аналогичен механизму работы электрической ячейки, в которой через набор электрических насосов течет ток. Однако

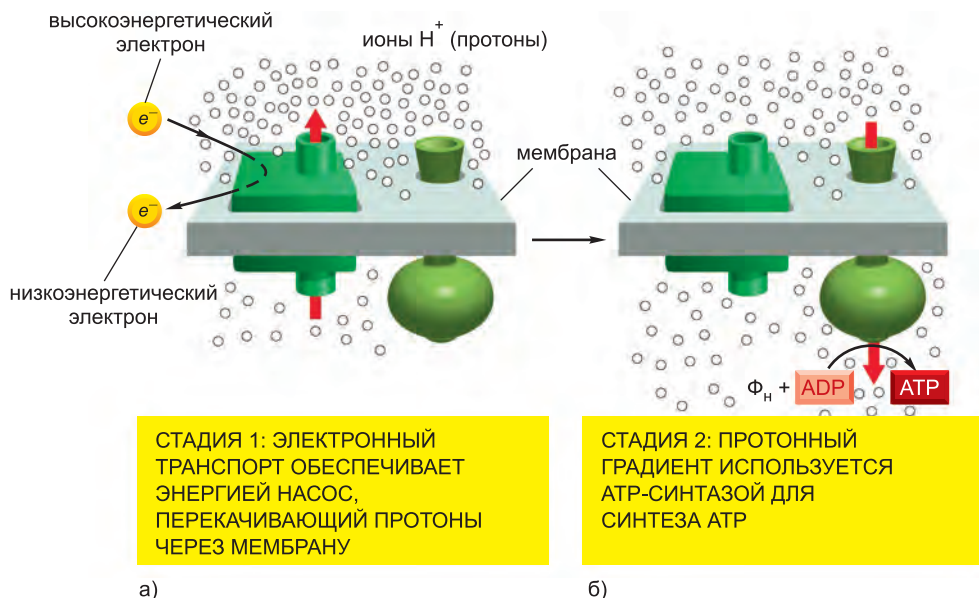


Рис. 14.1. Получение энергии для жизни. (а) Для хемиосмоса требуются мембрана, в которую встроены белок-насос и АТФ-синтаза, и источник высокоэнергетических электронов (e^-). Показанные протоны (H^+) доступны из молекул воды. Насос использует энергию переноса электронов (детали процесса здесь не показаны) для накачки протонов и создания электрохимического протонного градиента через мембрану. (б) Протонный градиент является способом запасаения энергии, которая может впоследствии быть использована для синтеза АТФ ферментом АТФ-синтазой. Красной стрелкой показано направление движения протонов на каждом этапе.

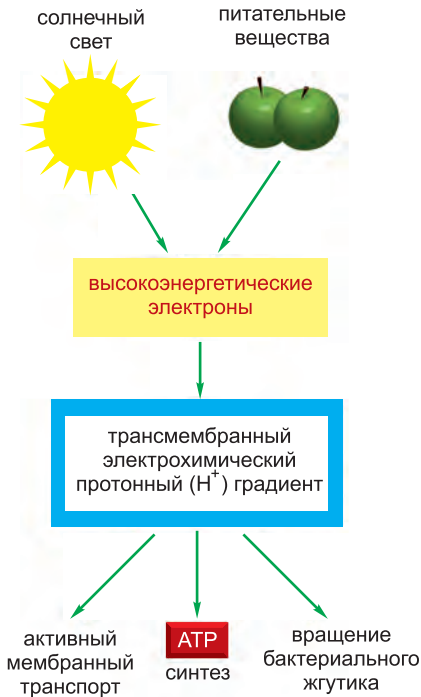


Рис. 14.2. Хемиосмотическое сопряжение. Энергия света или окисления молекул пищи сначала используется для создания электрохимического протонного градиента через мембрану. Этот градиент служит для запасаения энергии, используемой для энергозатратных реакций в митохондриях, хлоропластах и бактериях.

в биологических системах электроны переносятся не по проводам, а посредством диффундирующих молекул, которые подбирают электроны в одном месте и доставляют их в другое. В митохондриях первым таким электронным переносчиком служит NAD^+ , который принимает два электрона (и один H^+) и становится NADH — малой водорастворимой молекулой, которая транспортирует электроны из сайтов деградации питательных веществ во внутреннюю мембрану митохондрий.

На **рис. 14.3** представлено сравнение электрон-транспортных процессов в митохондриях, которые преобразуют энергию химических источников, с процессами, протекающими в хлоропластах, которые преобразуют энергию

солнечного света. В митохондрии электроны, которые высвободились из молекулы углевода в процессе ее деградации до CO_2 , переносятся через мембрану по цепи электронных переносчиков с восстановлением газообразного кислорода (O_2) до воды. Свободная энергия, высвобождаемая по мере движения электронов по этому пути из высокоэнергетического состояния в низкоэнергетическое, обеспечивает работу набора из трех H^+ -насосов во внутренней митохондриальной мембране. Третий из этих H^+ -насосов катализирует перенос электронов на O_2 (см. рис. 14.3, а).

Несмотря на то что хлоропласты можно описать сходным образом, и несколько из их белков похожи на митохондриальные, хлоропластная мембрана содержит несколько важных компонентов, отсутствующих в митохондриальной мембране. В первую очередь это *фотосистемы*, в которых зеленый пигмент хлорофилл улавливает энергию света и использует ее для переноса электронов. Это похоже на то, как фотоэлементы в солнечных батареях поглощают световую энергию, которая затем направляется на создание электрического тока. Создаваемая фотосистемами хлоропластов движущая электроны сила направлена в противоположную сторону по сравнению с митохондриями: электроны захватываются из воды с образованием O_2 и отдаются на CO_2 (посредством NADPH , соединения, родственного NADH) для синтеза углеводов. Таким образом, в хлоропластах образуются O_2 и углеводы, тогда как в митохондриях они поглощаются (см. рис. 14.3, б).

Считают, что энергопреобразующие органеллы эукариот эволюционировали из прокариот, которые захватили примитивные эукариотические клетки и стали жить с ними в симбиозе (см. главу 12). Эта гипотеза объясняет, почему митохондрии и хлоропласты содержат собственную ДНК, кодирующую некоторые их белки. За время, прошедшее с тех пор, как они были впервые захвачены клеткой-

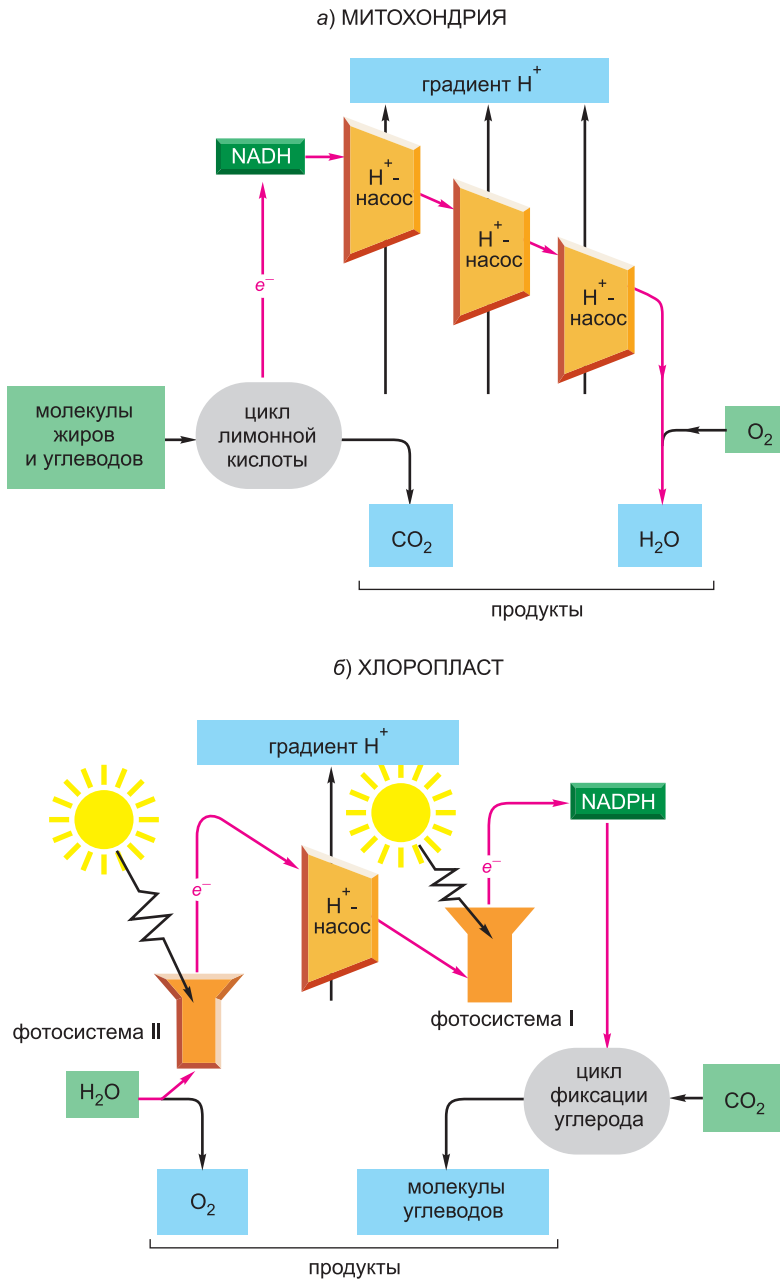


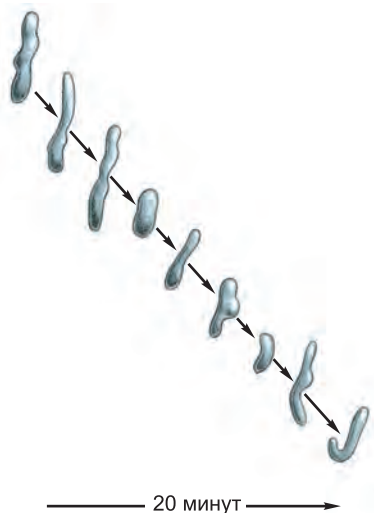
Рис. 14.3. Электрон-транспортные процессы. (а) Митохондрия преобразует энергию химических источников. (б) Хлоропласт преобразует энергию света. Исходные вещества показаны *зеленым*, продукты — *синим*, путь транспорта электронов показан *красными стрелками*. Все белковые комплексы (*оранжевые*) встроены в мембрану. Обратите внимание, что движущая сила электронов, создаваемая двумя хлоропластными фотосистемами, позволяет переносу электронов идти от H₂O к углеводам. Это *противоположное направление* по сравнению с энергетически выгодным переносом электронов в митохондриях. Таким образом, тогда как в митохондриях молекулы углеводов и O₂ служат исходными веществами, в хлоропластах они являются продуктами.

хозяином, эти органеллы потеряли большую часть своего генома и стали зависимы от белков, кодируемых генами ядра, синтезируемых в цитозоле и импортируемых затем в органеллу. С другой стороны, клетка-хозяин также стала зависеть от этих органелл для получения необходимого для биосинтеза АТФ, накачки ионов и движения; более того, в хлоропластах и митохондриях протекают некоторые реакции, без которых клетка в целом также не способна выжить.

14.1. Митохондрия

Митохондрии занимают значительную часть объема цитоплазмы эукариотических клеток. Они сыграли ключевую роль в эволюции сложных животных. Без митохондрий современные животные клетки должны были бы зависеть от анаэробного гликолиза для синтеза всего своего АТФ. Когда в процессе гликолиза глюкоза превращается в пируват, высвобождается лишь небольшая часть всей свободной энергии, потенциально доступной из окисления глюкозы. В митохондриях метаболизм сахаров завершается: пируват импортируется в митохондрии и окисляется O_2 до CO_2 и H_2O . Благодаря этому синтезируется в 15 раз больше АТФ, чем при гликолизе.

Митохондрии обычно изображают как жесткие, вытянутые цилиндры диаметром 0,5–1 мкм, внешне напоминающие бактерии. Однако замедленная микросъемка живых клеток показывает, что митохондрии представляют собой удивительно подвижные и пластичные органеллы, постоянно меняющие свою форму (рис. 14.4). Они способны сливаться друг с другом и снова фрагментироваться. При движении по цитоплазме они, по-видимому, зачастую связаны с микротрубочками (рис. 14.5), что может определять уникальную ориентацию и распределение митохондрий в разных типах клеток. Таким образом, в некоторых клетках митохондрии образуют длинные подвижные нити или цепи. В других клетках они фиксированы в определенном положении и синтезируют АТФ в той части клетки, где он особенно активно расходуется, например, они могут быть упакованы между прилегающими миофибриллами в клетке сердечной мышцы или плотно обернуты вокруг жгутика сперматозоида (рис. 14.6).



Митохондрии достаточно велики для того, чтобы их можно было увидеть в световой микроскоп, и впервые их обнаружили в XIX веке. Однако прогресс в понимании их функции зависел от методов выделения митохондрий, разработанных в 1948 году. По техническим причинам многие биохимические исследования проводили на митохондриях, выделенных из печени; каждая клетка печени содержит 1000–2000 митохондрий, которые в общей сложности занимают одну пятую клеточного объема.

Рис. 14.4. Пластичность митохондрий. При наблюдении отдельной митохондрии в живой клетке часто наблюдаются быстрые изменения ее формы.

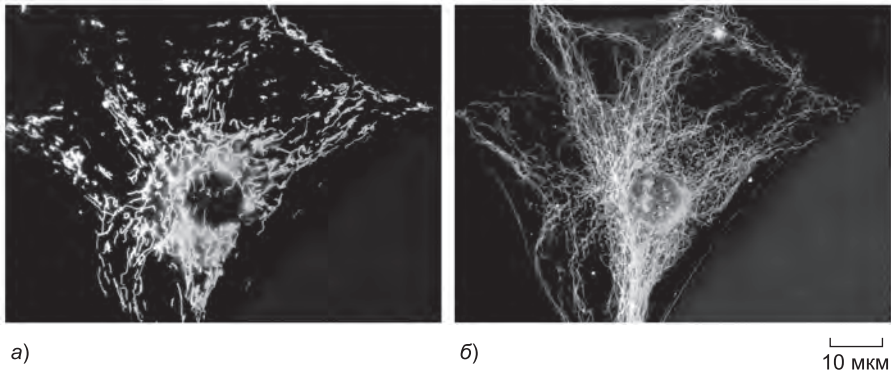


Рис. 14.5. Взаимоотношения между митохондриями и микротрубочками. (а) Световая микрофотография цепей удлиненных митондрий в культуре живых клеток млекопитающего. Эти клетки окрашены флуоресцентным красителем (родамином 123), который специфически связывается с митохондриями живых клеток. (б) Иммунофлуоресцентная микрофотография той же клетки, окрашенной (после фиксации) связывающими микротрубочки флуоресцентными антителами. Обратите внимание, что митохондрии располагаются вдоль микротрубочек. (С любезного разрешения Lan Bo Chen.)

14.1.1. Митохондрия содержит внешнюю мембрану, внутреннюю мембрану и два внутренних компартмента

Митохондрии окружены двумя высокоспециализированными мембранами, каждая из которых выполняет разные функции. Вместе они создают два отделенных друг от друга митохондриальных компартмента: внутренний **матрикс** и значительное более узкое **межмембранное пространство**. Если выделенные митохондрии мягко разрушить и фракционировать на разные компоненты (**рис. 14.7**), можно

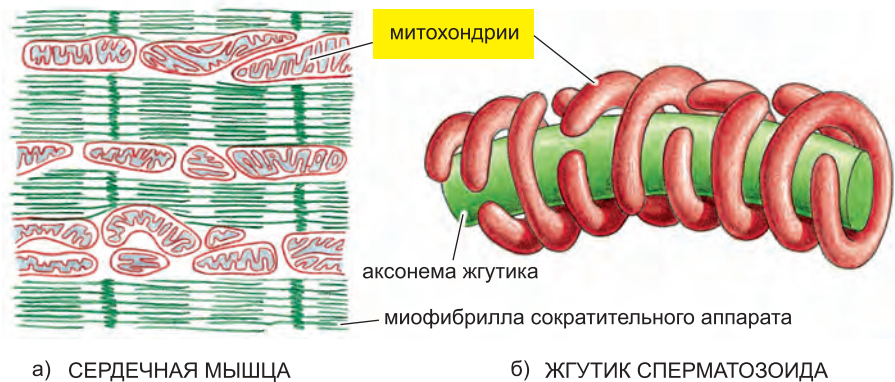


Рис. 14.6. Локализация митондрий вблизи областей высокого потребления АТФ в сердечной мышце и жгутике сперматозоида. Сердечная мышца (а) стенки желудка является наиболее активно работающей мышцей в теле, и ее непрерывное сокращение требует надежного источника энергии. В ней ограничено запасаение энергии, и ей приходится зависеть от постоянной подачи АТФ многочисленными митохондриями, расположенными вблизи сокращающихся миофибрилл (см. **стр. 1031**). В процессе развития жгутика сперматозоида (б) микротрубочки спирально оборачиваются вокруг аксонемы, что, по-видимому, способствует локализации митондрий в «хвосте»; затем эти микротрубочки исчезают, и митондрии сливаются друг с другом с образованием представленной здесь структуры.

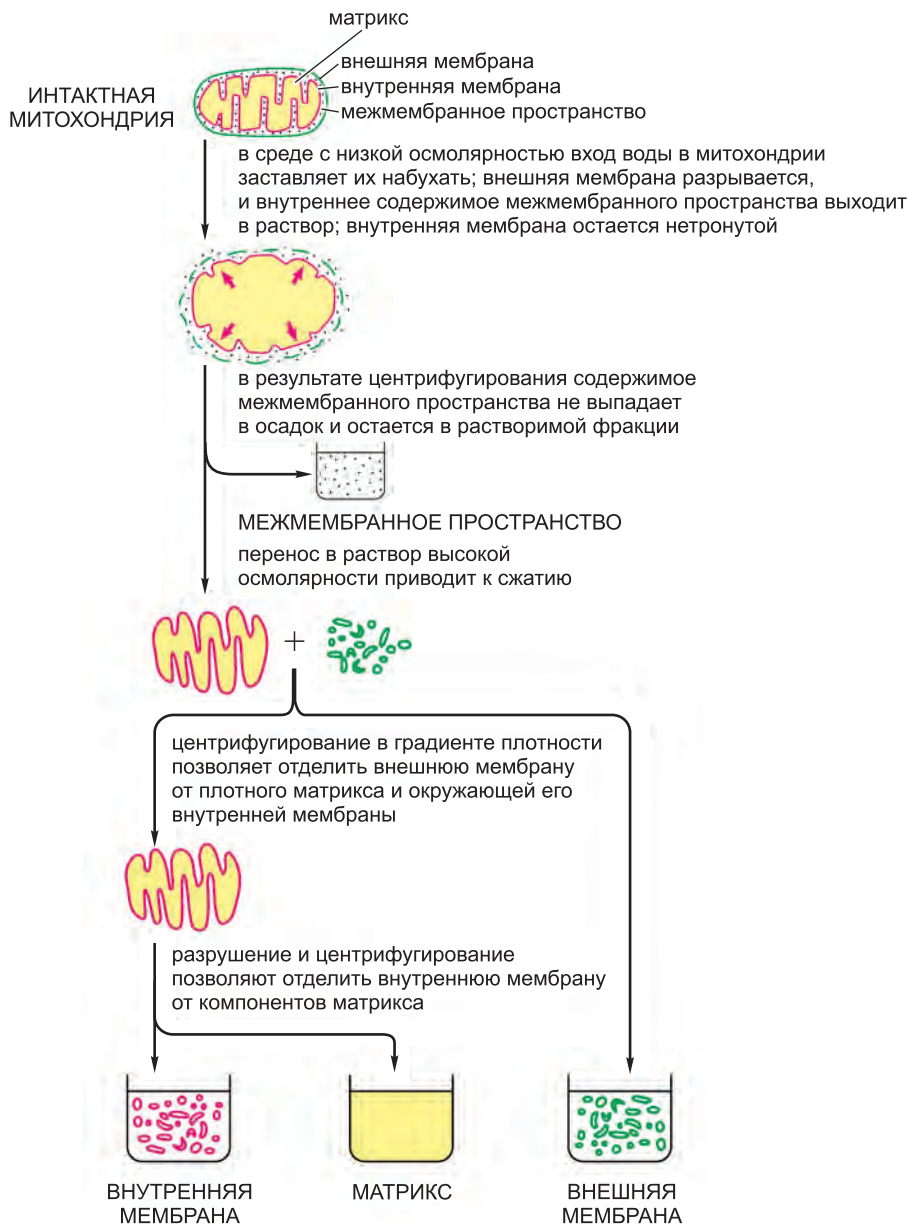


Рис. 14.7. Биохимическое фракционирование на отдельные компоненты выделенных митохондрий.

Данные методы сделали возможными исследования многочисленных белков каждого митохондриального компартмента. Показанный здесь метод позволил одновременно обрабатывать большое число органелл. В нем используется тот факт, что в растворе с низкой осмотической силой вода входит в митохондрии и значительно увеличивает объем матрикса (*желтый*). Кресты внутренней мембраны расправляются, чтобы справиться с расширением, но внешняя мембрана, которая не несет складок, разрывается, высвобождая структуру, состоящую только из внутренней мембраны и матрикса.

определить биохимический состав каждой из мембран и окруженных ими пространств. Все они содержат разные наборы белков. Большая часть из этой 1000 или около того митохондриальных белков кодируется в ядре и импортируется в митохондрию из цитоплазмы специализированными белками-транслоказами внешней (TOM — Translocase of the Outer Membrane, транслоказа внешней мембраны) и внутренней (TIM — Translocase of the Innner Membrane, транслоказа внутренней мембраны) мембран (см. главу 12).

Во **внешней мембране** содержится множество молекул *поринов*, транспортных белков, образующих в липидном бислое широкие водные каналы (см. главу 11). Таким образом, эта мембрана похожа на сито и проницаема для всех молекул массой до 5000 дальтон, включая небольшие белки. Такие молекулы могут проникать в межмембранное пространство, но большинство из них не способно пройти через непроницаемую внутреннюю мембрану. Таким образом, тогда как межмембранное пространство химически эквивалентно цитозоллю применительно к содержащимся в нем малым молекулам, матрикс содержит только специально отобранный набор этих молекул.

Как мы подробно обсудим ниже, основной рабочей частью митохондрии является матрикс и окружающая его **внутренняя мембрана**. Внутренняя мембрана высоко специализирована. Ее липидному бислою свойственно высокое содержание «двойных» фосфолипидов *кардиолипидов*, которые содержат четыре жирные кислоты, а не две, и усиливают непроницаемость мембраны по отношению к ионам (см. рис. 14.65). Эта мембрана также несет различные транспортные белки, которые делают ее селективно проницаемой для тех малых молекул, которые метаболизируются располагающимися в матриксе митохондриальными ферментами или требуются для их работы. В число ферментов матрикса входят ферменты метаболизма пирувата и жирных кислот с образованием ацетил-КоА и ферменты окисления ацетил-КоА в *цикле лимонной кислоты*. Конечными продуктами этого окисления являются CO_2 , который выделяется из клетки в качестве побочного продукта, и NADH, который служит основным источником электронов для переноса вдоль **дыхательной цепи** — электрон-транспортной цепи митохондрий. Ферменты дыхательной цепи встроены во внутреннюю митохондриальную мембрану и играют ключевую роль в процессе *окислительного фосфорилирования*, в результате которого синтезируется большая часть АТФ животных клеток.

Как показано на **рис. 14.8**, внутренняя мембрана обычно сильно изогнута и образует множество выступающих в матрикс складок, известных как **кристы**. Эти складки значительно увеличивают площадь внутренней мембраны. Например, в клетках печени они составляют до одной третьей площади всех клеточных мембран. Число крист в митохондриях сердечной мышцы в три раза больше, чем в митохондрии клетки печени, что, предположительно, объясняется большими затратами АТФ клетками сердца. Также существуют значительные отличия между митохондриальными ферментами в различных типах клеток. В этой главе мы большей частью не будем обращать внимания на эти различия и сосредоточимся на признаках, свойственных всем митохондриям.

14.1.2. В цикле лимонной кислоты образуются высокоэнергетические электроны

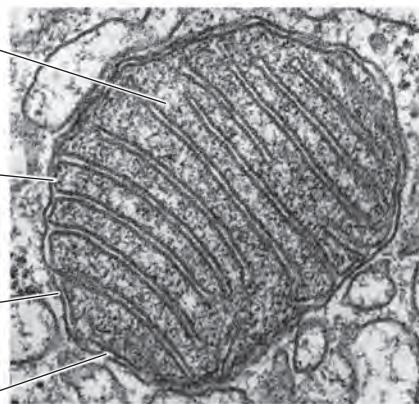
В качестве топлива митохондрии способны использовать пируват и жирные кислоты. Пируват получается из глюкозы и других сахаров, а жирные кислоты —

Матрикс. Это большое внутреннее пространство содержит концентрированную смесь сотен ферментов, включая ферменты, необходимые для окисления пирувата и жирных кислот и цикла лимонной кислоты. Матрикс также содержит несколько идентичных копий митохондриальной ДНК, специальные митохондриальные рибосомы, тРНК и различные ферменты экспрессии митохондриальных генов.

Внутренняя мембрана. Внутренняя мембрана образует многочисленные складки — кристы, которые значительно увеличивают общую площадь поверхности. Ферменты внутренней мембраны по функциям можно разделить на три группы: (1) ферменты окислительных реакций электрон-транспортной цепи; (2) АТР-синтаза, синтезирующая АТР в матриксе; (3) транспортные белки, обеспечивающие обмен метаболитов между матриксом и межмембранным пространством. АТР-синтазе для работы нужен градиент H^+ на мембране, поэтому мембрана должна быть проницаема для ионов и большинства малых заряженных молекул.

Внешняя мембрана. Поскольку внешняя мембрана несет крупный каналообразующий белок (порин, VDAC), она проницаема для всех молекул массой 5 000 Да и меньше. Также в этой мембране содержатся ферменты митохондриального синтеза липидов, ферменты, превращающие липидные субстраты в соединения, которые впоследствии могут быть метаболизированы в матриксе, рецепторы импорта митохондриальных белков и ферментативную систему деления и слияния органеллы.

Межмембранное пространство. Здесь располагается несколько ферментов, использующих выходящий из матрикса АТР для фосфорилирования других нуклеотидов.



100 nm



300 nm

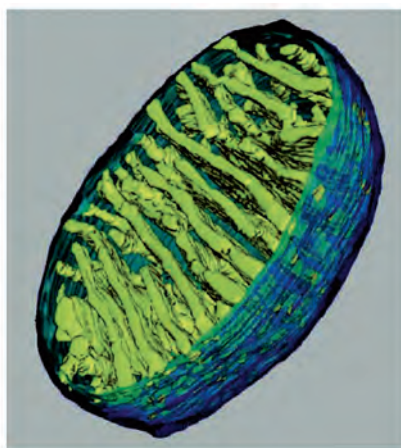


Рис. 14.8. Структура митохондрии. По оценкам, в печени 67 % всех митохондриальных белков содержится в матриксе, 21 % — во внутренней мембране, 6 % — во внешней мембране, и 6 % — в межмембранном пространстве. Как отмечено ниже, каждая из этих четырех областей содержит специализированные наборы белков, выполняющих определенные функции. (Большая микрофотография напечатана с любезного разрешения Daniel S. Friend; малая микрофотография и трехмерная реконструкция — из T. G. Frey, C. W. Renken and G. A. Perkins, *Biochim. Biophys. Acta* 1555: 196–203, 2002. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

из жиров. Эти молекулы транспортируются через внутреннюю митохондриальную мембрану и превращаются ферментами митохондриального матрикса в ключевой интермедиат метаболизма *ацетил-КоА*. Затем ацетильные группы ацетил-КоА окисляются в матриксе в **цикле лимонной кислоты**, описанном в главе 2. В цикле углеродные атомы ацетил-КоА превращаются в CO_2 , который клетка выделяет в ка-

честве побочного продукта. Самой важной функцией окисления является получение высокоэнергетических электронов в составе активированных молекул-переносчиков NADH и FADH_2 (рис. 14.9). Затем эти высокоэнергетические электроны переносятся во внутреннюю митохондриальную мембрану, где они входят в электрон-транспортную цепь; потеря электронов NADH и FADH_2 также регенерирует NAD^+ и FAD, которые необходимы для непрерывного окислительного метаболизма. На рис. 14.10 схематически представлена вся последовательность реакций.

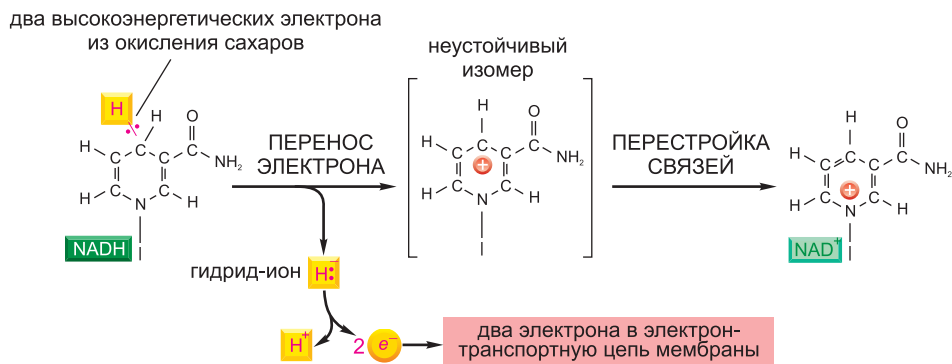


Рис. 14.9. Как NADH передает электроны. На схеме высокоэнергетические электроны представлены как две красные точки на желтом атоме водорода. Гидрид-ион (H^- , атом водорода с дополнительным электроном) удаляется с NADH и превращается в протон и два высокоэнергетических электрона: $\text{H}^- \rightarrow \text{H}^+ + 2\text{e}^-$. Показано только кольцо, несущее электроны в высокоэнергетической связи; полную структуру и превращение NAD^+ обратно в NADH см. на рис. 2.60, где изображена структура близкородственного NADPH. Электроны сходным образом переносятся FADH_2 , структура которого показана на рис. 2.83.

14.1.3. Хемиосмотический процесс преобразует энергию окисления в АТФ

Несмотря на то что цикл лимонной кислоты считается частью аэробного метаболизма, в нем не используется кислород. Молекулярный кислород O_2 напрямую поглощается только в финальных катаболических реакциях, протекающих во внутренней митохондриальной мембране. Почти вся энергия, доступная из сжигания углеводов, жиров и других пищевых молекул на ранних стадиях их окисления, сначала запасается в форме высокоэнергетических электронов, отрываемых от субстратов NAD^+ и FAD. Эти электроны, переносимые NADH и FADH_2 , затем присоединяются к O_2 посредством дыхательной цепи во внутренней митохондриальной мембране. Внутренняя мембрана использует большое количество высвобожденной энергии для синтеза АТФ из $\text{ADP} + \text{P}_i$. Поэтому термин **окислительное фосфорилирование** используется только для описания заключительных реакций (рис. 14.11).

Как было отмечено ранее, образование АТФ путем окислительного фосфорилирования в дыхательной цепи зависит от хемиосмотического процесса. В 1961 г., когда этот механизм впервые предложили, была решена одна из главных загадок клеточной биологии. Однако идея была настолько оригинальной, что потребовалось еще несколько лет, прежде чем собрали достаточно доказательств и эта теория стала общепринятой.

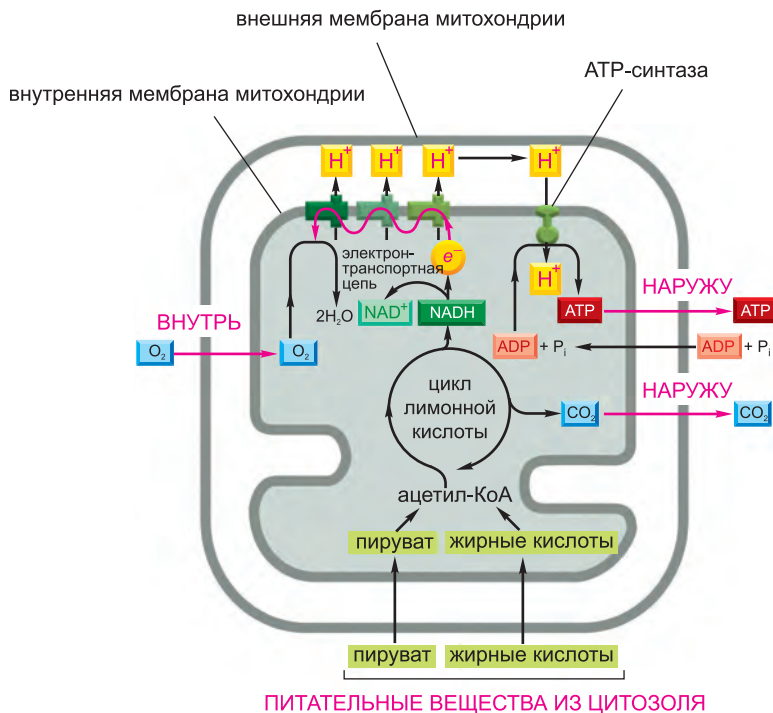


Рис. 14.10. Общая схема энергетического метаболизма митохондрии. Пируват и жирные кислоты входят в митохондрию (внизу) и расщепляются до ацетил-КоА. Затем ацетил-КоА претерпевает превращения в цикле лимонной кислоты, что приводит к восстановлению NAD^+ до NADH (и FAD до FADH_2 , не показано). В процессе окислительного фосфорилирования высокоэнергетические электроны NADH (и FADH_2) передаются на кислород (O_2) по электрон-транспортной цепи во внутренней мембране. Этот электронный транспорт создает протонный градиент через внутреннюю мембрану, который служит движущей силой синтеза ATP ATP-синтазой (см. рис. 14.1). Синтезированный в цитозоле NADH также передает электроны в дыхательную цепь (не показано). Поскольку NADH не способен пройти через внутреннюю мембрану митохондрий, перенос электрона от NADH цитозоля должен происходить косвенно через несколько систем «шунтов», транспортирующих другое восстановленное соединение в митохондрию; после окисления это соединение возвращается в цитозоль, где оно снова восстанавливается NADH (смотри также рис. 14.32).

В оставшейся части раздела мы кратко опишем типы реакций, делающих окислительное фосфорилирование возможным, а детали дыхательной цепи рассмотрим позже.

14.1.4. NADH переносит свои электроны на кислород через три крупных ферментных комплекса

Несмотря на то что в дыхательной цепи энергия собирается посредством отличного от других катаболических реакций механизма, принцип остается тем же. Энергетически выгодная реакция $\text{H}_2 + 1/2 \times \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ протекает в несколько маленьких стадий, поэтому большая часть высвобождаемой энергии может быть запасена, и не выделяется в окружающую среду в форме тепла. Атомы водорода сначала разделяются на протоны и электроны. Электроны транспортируются по нескольким переносчикам во внутренней мембране митохондрий. Через несколько стадий протоны и электроны временно вновь соединяются. Но только в конце

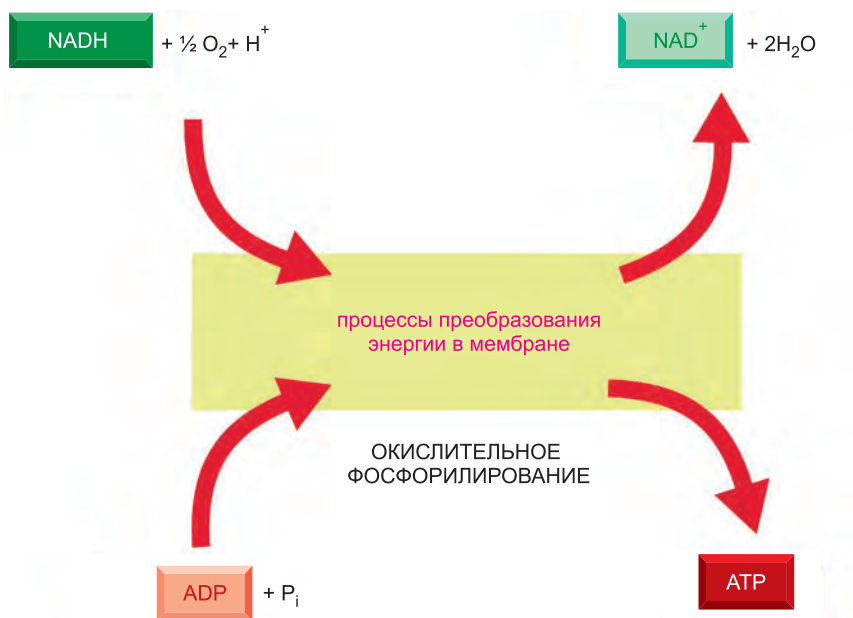


Рис. 14.11. Преобразование энергии, катализируемое митохондриями. В процессе окислительного фосфорилирования внутренняя мембрана митохондрий служит для превращения одной формы энергии химической связи в другую, преобразуя значительную часть энергии NADH (и FADH_2) в энергию фосфатной связи ATP.

электрон-транспортной цепи протоны возвращаются окончательно, когда они используются для нейтрализации отрицательных зарядов, появляющихся в результате добавления электронов к молекуле кислорода (рис. 14.12).

Процесс электронного транспорта начинается с удаления гидрид-иона с NADH (с образованием NAD^+) и превращения его в протон и два электрона ($\text{H}^- \rightarrow \text{H}^+ + 2e^-$). Два электрона передаются на первый из более чем 15-ти различных переносчиков дыхательной цепи. Сначала энергия электронов очень велика, но она постепенно теряется по мере транспорта по цепи. В основном, электроны переходят с одного иона металла на другой, каждый из которых крепко связан с белковой молекулой, изменяющей сродство электрона к металлу (подробно этот вопрос рассматривается ниже). Большинство участвующих в процессе белков объединено в три крупных *ферментных комплекса дыхательной цепи*, каждый из которых содержит трансмембранные белки, крепко удерживающие комплекс во внутренней митохондриальной мембране. Каждый следующий комплекс цепи имеет большее сродство к электрону, чем предыдущий, и электроны последовательно передаются от одного комплекса на другой до тех пор, пока не окажутся на кислороде, сродство которого к электронам наиболее велико.

14.1.5. По мере движения электронов по дыхательной цепи энергия запасается в форме электрохимического протонного градиента через внутреннюю мембрану

Окислительное фосфорилирование возможно благодаря связи переносчиков электрона с белковыми молекулами. Белки направляют последовательное движе-

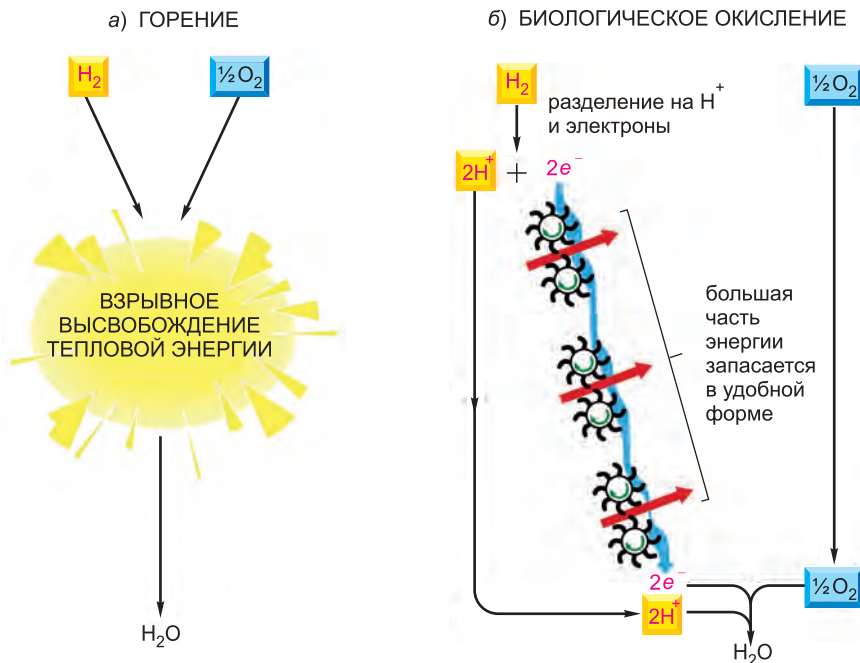


Рис. 14.12. Сравнение биологического окисления с горением. (а) При простом сжигании кислорода большая часть энергии просто выделяется в форме тепла. (б) При биологическом окислении большая часть энергии запасается в полезной для клетки форме посредством электрон-транспортной цепи внутренней мембраны митохондрий (дыхательной цепи). Оставшуюся часть энергии окисления митохондрии выделяют в виде тепла. На самом деле протоны и электроны, которые на рисунке выделяются из H_2 , отщепляются от атомов водорода, ковалентно связанных с молекулами NADH и $FADH_2$.

ние электронов вдоль дыхательной цепи от одного комплекса к другому. Перенос электронов сопряжен с ориентированным захватом и высвобождением H^+ и аллостерическими изменениями энергопреобразующих белковых насосов. В конечном результате H^+ перекачиваются через внутреннюю мембрану — из матрикса в межмембранное пространство — за счет энергетически выгодного потока электронов. Это движение H^+ приводит к двум важным последствиям:

1. Оно создает градиент рН через внутреннюю митохондриальную мембрану, при этом рН в матриксе больше, чем в цитозоле, где он обычно около 7. (Поскольку малые молекулы свободно проходят через внешнюю мембрану митохондрий, рН в межмембранном пространстве такой же, как в цитозоле.)

2. Оно создает градиент электрического напряжения (*мембранный потенциал*) через внутреннюю митохондриальную мембрану, которая при этом внутри отрицательна, а снаружи положительна (в результате суммарного выходного потока положительных ионов).

Градиент рН (ΔpH) «тянет» H^+ обратно в матрикс, усиливая влияние мембранного потенциала (ΔV), который способствует вхождению положительных ионов в матрикс и выходу из него отрицательных. Вместе ΔpH и ΔV составляют **электрохимический протонный градиент** (рис. 14.13). Электрохимический протонный градиент создает **протондвижущую силу**, которая измеряется в милливольты (мВ).

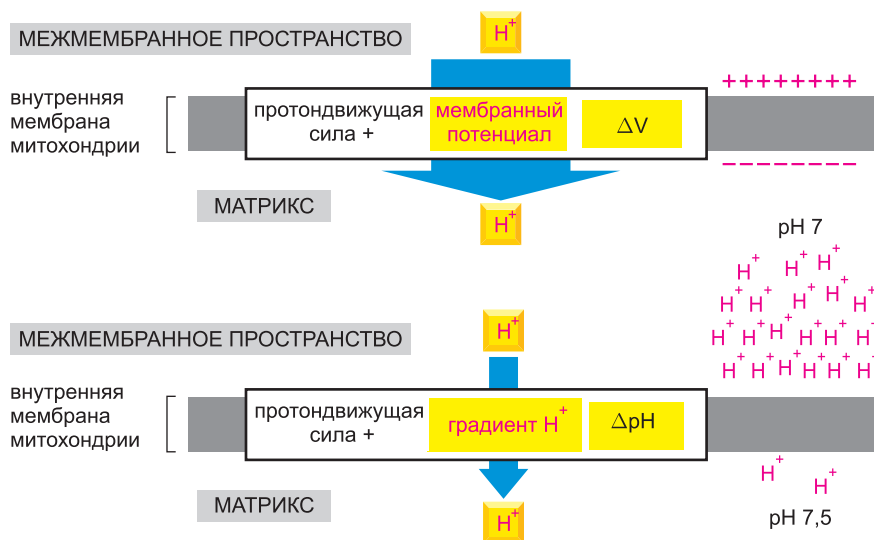


Рис. 14.13. Две составляющие электрохимического протонного градиента. Суммарная протондвижущая сила через внутреннюю митохондриальную мембрану складывается из большой силы, возникающей за счет мембранного потенциала (традиционно обозначаемого специалистами $\Delta\psi$, но в тексте обозначаемого ΔV), и меньшей силы, создаваемой градиентом H^+ (ΔpH). Обе силы направлены на перенос H^+ в матрикс.

В обычной клетке протондвижущая сила через внутреннюю мембрану дышащей митохондрии составляет от 180 до 190 мВ (внутри отрицательная). Она складывается из мембранного потенциала, который составляет от 160 до 170 мВ, и градиента рН, составляющего от 0,3 до 0,5 единиц рН (действие ΔpH , равного 1 единице рН, эквивалентно мембранному потенциалу, равному примерно 60 мВ).

14.1.6. Протонный градиент служит движущей силой синтеза АТФ

Электрохимический протонный градиент через внутреннюю митохондриальную мембрану служит движущей силой синтеза АТФ в ключевом процессе окислительного фосфорилирования (рис. 14.14). Это возможно благодаря упомянутому выше мембраносвязанному ферменту **АТФ-синтазе**. Этот фермент создает гидрофильный проход через внутреннюю мембрану митохондрий, позволяющий протонам двигаться по электрохимическому градиенту. По мере того как эти ионы проходят через АТФ-синтазу, они используются в качестве движущей силы для протекания энергетически невыгодной реакции между АДФ и P_i , в результате которой синтезируется АТФ (см. рис. 2.27). АТФ-синтаза — древний белок; он встречается в митохондриях животных клеток, хлоропластах растений и водорослей и плазматической мембране бактерий и архей.

На рис. 14.15 показана структура АТФ-синтазы. Ее также называют F_0F_1 -АТФазой. Она представляет собой мультисубъединичный белок массой более 500 тысяч дальтон, работающий путем роторного катализа. Большая часть фермента, похожая на шляпку гриба и состоящая из кольца из 6 субъединиц, выступает в матрикс митохондрии. Длинная субъединица b удерживает эту «шляпку», связывая ее с группой трансмембранных белков, образующих «статор» в мембране. Этот статор контактирует с «ротором», состоящим из кольца из 10–14 одинаковых

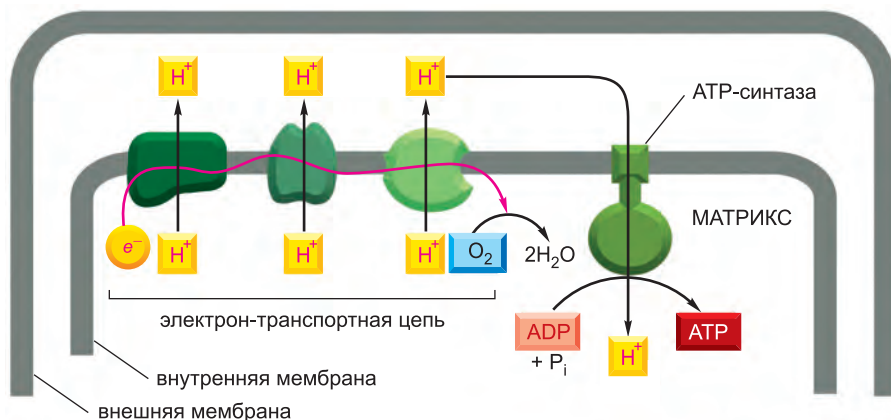


Рис. 14.14. Общий механизм окислительного фосфорилирования. По мере движения высокоэнергетического электрона по электрон-транспортной цепи часть высвобожденной энергии используется для обеспечения работы трех ферментных комплексов дыхательной цепи, откачивающих H^+ из матрикса. В результате создаваемый ими электрохимический протонный градиент через внутреннюю мембрану способствует обратному движению H^+ через АТФ-синтазу, трансмембранный белковый комплекс, использующий энергию переноса H^+ для синтеза АТФ из АДФ и P_i в матриксе.

трансмембранных белковых субъединиц. Когда протоны проходят через узкий канал, образованный контактом ротора и статора, их движение вызывает вращение кольца ротора. Это вращение также поворачивает связанную с ротором «ножку» (синяя на рис. 14.15, б), которая, таким образом, быстро поворачивается внутри «шляпки». В результате энергия движения протонов по градиенту преобразуется в механическую энергию трения двух белков друг об друга: вращающиеся белки «ножки» толкают неподвижное кольцо белков «шляпки».

Три из шести субъединиц головки содержат сайты связывания АДФ и неорганического фосфата. В них образуется АТФ за счет преобразования механической энергии в энергию химической связи посредством создаваемого вращающейся «ножкой» изменения конформации белка. Таким образом, АТФ-синтаза способна синтезировать более 100 молекул АТФ в секунду и 3 молекулы за один поворот. Число транслоцирующих протоны субъединиц ротора различается в разных АТФ-синтазах, и именно оно определяет, сколько протонов должны пройти через эту удивительную машину для синтеза одной молекулы АТФ (ее «передаточное отношение», которое обычно бывает нецелым числом между 3 и 5).

14.1.7. Протонный градиент служит движущей силой сопряженного транспорта через внутреннюю мембрану

Электрохимический градиент протонов служит движущей силой не только для синтеза АТФ. В митохондриях многие заряженные малые молекулы, например пируват, АДФ и P_i , закачиваются в матрикс из цитозоля, тогда как другие, например АТФ, должны переноситься в противоположном направлении. Связывающие эти молекулы транспортеры способны сопрягать транспорт с энергетически выгодным током H^+ в матрикс митохондрий. Например, таким образом пируват и неорганический фосфат (P_i) котранспортируются внутрь вместе с H^+ по мере его движения в матрикс.

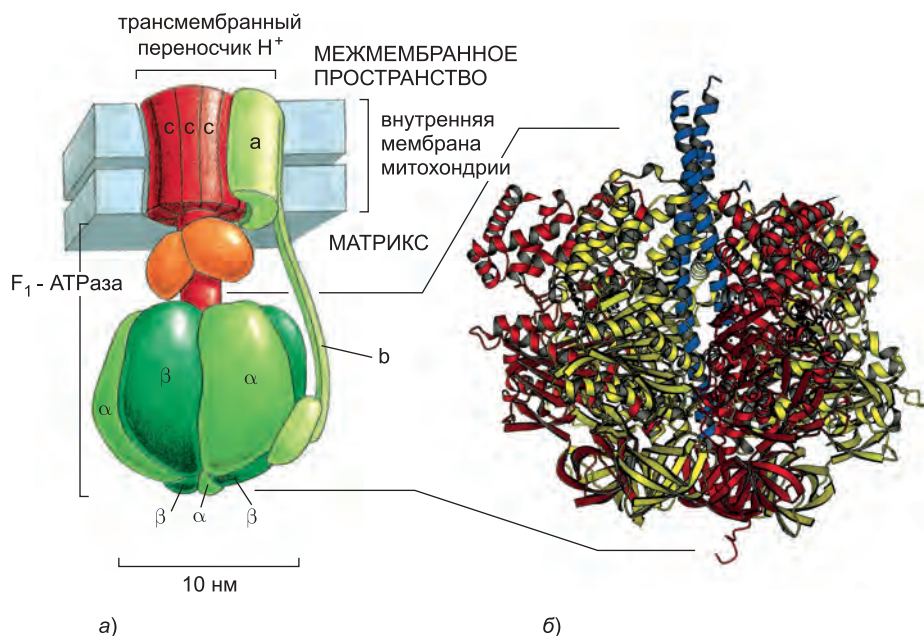


Рис. 14.15. АТФ-синтаза. (а) Фермент состоит из головной части, носящей название F_1 -АТРаза, и трансмембранного переносчика H^+ , носящего название F_0 . Как показано, F_1 и F_0 состоят из нескольких субъединиц. Вращающаяся ножка присоединена к ротору (красный), образованному расположенным в мембране кольцом из 10–14 с-субъединиц. Статор (зеленый) образован трансмембранными субъединицами а, связанными с другими образующими «ручку» субъединицами. Эта «ручка» связывает статор с кольцом субъединиц 3α и 3β , формирующим головку, которая также не может вращаться. (б) Трехмерная структура F_1 -АТРаза, расшифрованная при помощи рентгеновской кристаллографии. Эта часть АТФ-синтазы получила название благодаря своей способности катализировать обратную реакцию, а именно гидролиз АТФ до АДФ и P_i , если ее отделить от трансмембранной части. (б, рисунок John Walker, из J. P. Abrahams et al., *Nature* 370: 621–628, 1994. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

АДФ и АТФ транспортируются одновременно в противоположных направлениях одним белком-переносчиком. Поскольку у молекулы АТФ на один отрицательный заряд больше, чем у АДФ, каждый обмен нуклеотидов приводит к удалению из митохондрии одного отрицательного заряда. Таким образом, разность потенциалов через мембрану является движущей силой котранспорта АДФ и АТФ (рис. 14.16).

Мы видели, как в эукариотических клетках электрохимический градиент протонов через внутреннюю мембрану митохондрий используется для синтеза АТФ и транспорта метаболитов через мембрану. У бактерий сходный градиент через плазматическую мембрану также используется в качестве движущей силы этих двух типов процессов. У подвижных бактерий градиент также обеспечивает энергией быстрое вращение бактериального жгутика, проталкивающее бактерию вперед (рис. 14.17).

14.1.8. За счет протонного градиента образуется большая часть АТФ клетки

Как было отмечено выше, при гликолизе суммарно образуется 2 молекулы АТФ на одну молекулу глюкозы, и это составляет суммарный выход энергии про-

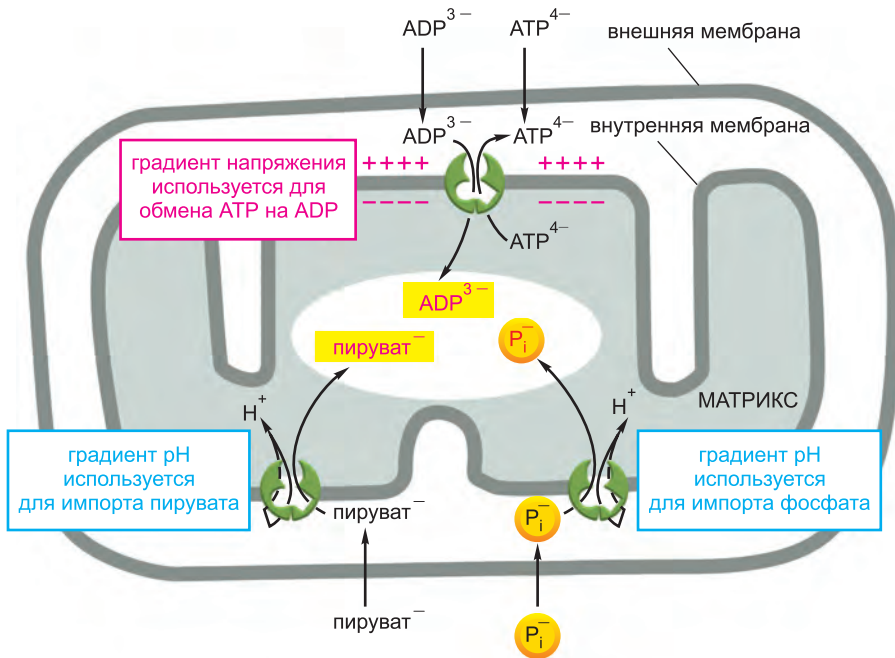


Рис. 14.16. Некоторые процессы активного транспорта, движущей силой которых служит электрохимический градиент протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану. Пируват, неорганический фосфат (P_i) и АДФ переносятся в матрикс, тогда как АТФ откачивается из него. Для сравнения с мембранным потенциалом, который внутри отрицателен, указан заряд каждой из транспортируемых молекул. Внешняя мембрана проницаема для всех этих соединений. Активный транспорт молекул через мембрану белками-переносчиками обсуждается в главе 11.

цесса брожения, протекающего в отсутствие O_2 (см. главу 2). В ходе окислительного фосфорилирования каждая пара электронов, передаваемая на образованный в митохондриях $NADH$, дает энергию на синтез примерно 2,5 молекул АТФ (после вычитания энергии, необходимой для транспорта АТФ в цитозоль). За счет окислительного фосфорилирования также образуется 1,5 молекул АТФ на каждую электронную пару $FADH_2$ или молекул $NADH$, образованных в результате гликолиза в цитозоле. Из выхода продуктов гликолиза и цикла лимонной кислоты, приведенных в [таблице 14.1, а](#), можно рассчитать, что полное окисление одной молекулы глюкозы, начиная с гликолиза и заканчивая окислительным фосфорилированием, дает суммарно около 30 АТФ.

В заключение отметим, что большая часть АТФ, синтезированного в результате окисления глюкозы в животных клетках, образуется при участии хемиосмотических механизмов в митохондриальной мембране. Благодаря окислительному фосфорилированию в митохондриях также синтезируется большое количество АТФ из $NADH$ и $FADH_2$, полученных в результате окисления жиров ([таблица 14.1, б](#); см. также [рис. 2.81](#)).

14.1.9. Митохондрии поддерживают в клетке высокое соотношение АТФ:АДФ

Благодаря белку-переносчику внутренней митохондриальной мембраны, обменивающему АТФ на АДФ, молекулы АДФ, образующиеся в результате гидролиза

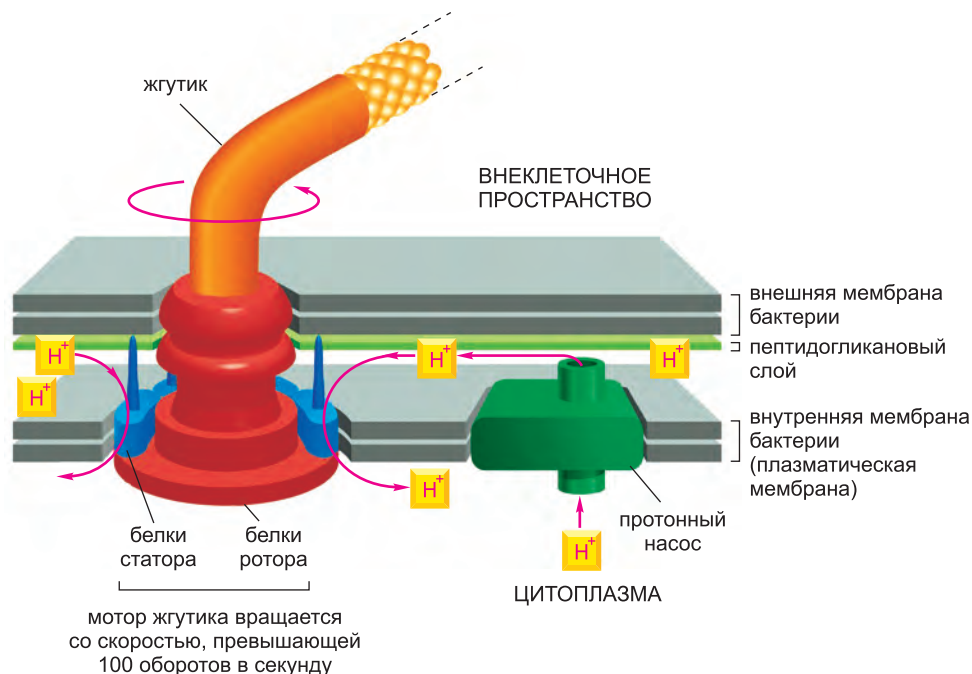


Рис. 14.17. Вращение бактериального жгутика за счет тока H^+ . Жгутик присоединен к набору белковых колец (красные), которые встроены во внутреннюю и внешнюю мембраны и вращаются вместе со жгутиком. Вращение обеспечивается потоком протонов через внешнее кольцо белков (статор); этот механизм напоминает работу АТФ-синтазы.

АТФ в цитозоле, быстро входят в митохондрию для «перезарядки», а молекулы АТФ, синтезирующиеся в матриксе митохондрий при окислительном фосфорилировании, быстро откачиваются в цитозоль, где они утилизируются. В среднем молекула АТФ в человеческом организме выходит из митохондрии и возвращается в нее (в форме

Таблица 14.1. Выходы продуктов окисления сахаров и жиров

а. Суммарный выход продуктов окисления одной молекулы глюкозы	
В цитозоле (гликолиз)	$1 \text{ глюкоза} \rightarrow 2 \text{ пируват} + 2 \text{ NADH} + 2 \text{ ATP}$
В митохондриях (пируватдегидрогеназа и цикл лимонной кислоты)	$2 \text{ пируват} \rightarrow 2 \text{ ацетил-KoA} + 2 \text{ FADH}_2$ $2 \text{ ацетил-KoA} \rightarrow 6 \text{ NADH} + 2 \text{ FADH}_2 + 2 \text{ GTP}$
Суммарный выход в митохондриях	
	$2 \text{ пируват} \rightarrow 8 \text{ NADH} + 2 \text{ FADH}_2 + 2 \text{ GTP}$
б. Суммарный выход продуктов окисления одной молекулы пальмитоил-KoA (активированной жирной пальмитиновой кислоты)	
В митохондриях (окисление жирных кислот и цикл лимонной кислоты)	$1 \text{ пальмитоил-KoA} \rightarrow 8 \text{ ацетил-KoA} + 7 \text{ NADH} + 7 \text{ FADH}_2$ $8 \text{ ацетил-KoA} \rightarrow 24 \text{ NADH} + 8 \text{ FADH}_2 + 8 \text{ GTP}$
Суммарный выход в митохондриях	
	$1 \text{ пальмитоил-KoA} \rightarrow 31 \text{ NADH} + 15 \text{ FADH}_2 + 8 \text{ GTP}$

ADP) для восстановления чаще чем раз в минуту, и клетка поддерживает концентрацию АТР в 10 раз большую, чем концентрация АДФ.

Как обсуждалось в главе 2, биосинтетические ферменты часто катализируют энергетически невыгодные реакции путем их сопряжения с энергетически выгодным гидролизом АТР (см. рис. 2.59). Таким образом, пул АТР используется для обеспечения энергией клеточных процессов, так же как аккумулятор используется для питания электрических двигателей. Если заблокировать активность митохондрий, уровень АТР упадет, и клеточный аккумулятор разрядится; в конце концов, энергетически невыгодные реакции перестанут протекать, и клетка погибнет. Яд цианид, блокирующий электронный транспорт во внутренней мембране митохондрий, действует именно таким образом.

Может показаться, что клеточные процессы остановятся, только когда концентрация АТР достигнет нуля; но на самом деле жизнь более требовательна: она зависит от поддержания клеткой концентрации АТР, значительно превышающей концентрации АДФ и P_i . Для того чтобы объяснить это явление, нам необходимо рассмотреть несколько простейших принципов термодинамики.

14.1.10. Большая отрицательная величина ΔG гидролиза АТР делает АТР полезным клетке

В главе 2 мы ввели понятие свободной энергии G . Изменение свободной энергии реакции, ΔG , определяет, будет ли реакция протекать в клетке. На **странице 76** мы показали, что ΔG данной реакции может быть представлено как сумма двух слагаемых: первое, носящее название изменение стандартной свободной энергии, ΔG° , зависит от свойств взаимодействующих молекул; второе зависит от их концентраций. Для простой реакции $A \rightarrow B$:

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[B]}{[A]},$$

где $[A]$ и $[B]$ — концентрации A и B , а \ln — натуральный логарифм. Таким образом, ΔG° — это справочная величина, которая равна ΔG в случае, если концентрации A и B равны ($\ln 1 = 0$).

В главе 2 АТР описан как основная «активированная несущая энергию молекула» в клетке. Большое, выгодное изменение свободной энергии (большое отрицательное ΔG) при ее гидролизе используется посредством *сопряжения реакций*, для обеспечения энергией других химических реакций, которые в противном случае не пойдут (см. **стр. 79–87**). При гидролизе АТР образуется два продукта — АДФ и неорганический фосфат (P_i); таким образом, гидролиз АТР относится к типу $A \rightarrow B + C$, для которого, как описано на **рис. 14.18**, справедливо соотношение

$$\Delta G = \Delta G^\circ + RT \ln \frac{[B][C]}{[A]}.$$

Когда АТР гидролизруется до АДФ и P_i в нормальных для клетки условиях, изменение свободной энергии составляет примерно от -11 до -13 ккал/моль (от -46 до -54 кДж/моль). Это очень выгодное ΔG зависит от высокой концентрации АТР в клетке по сравнению с концентрациями АДФ и P_i . Когда концентрации АТР,

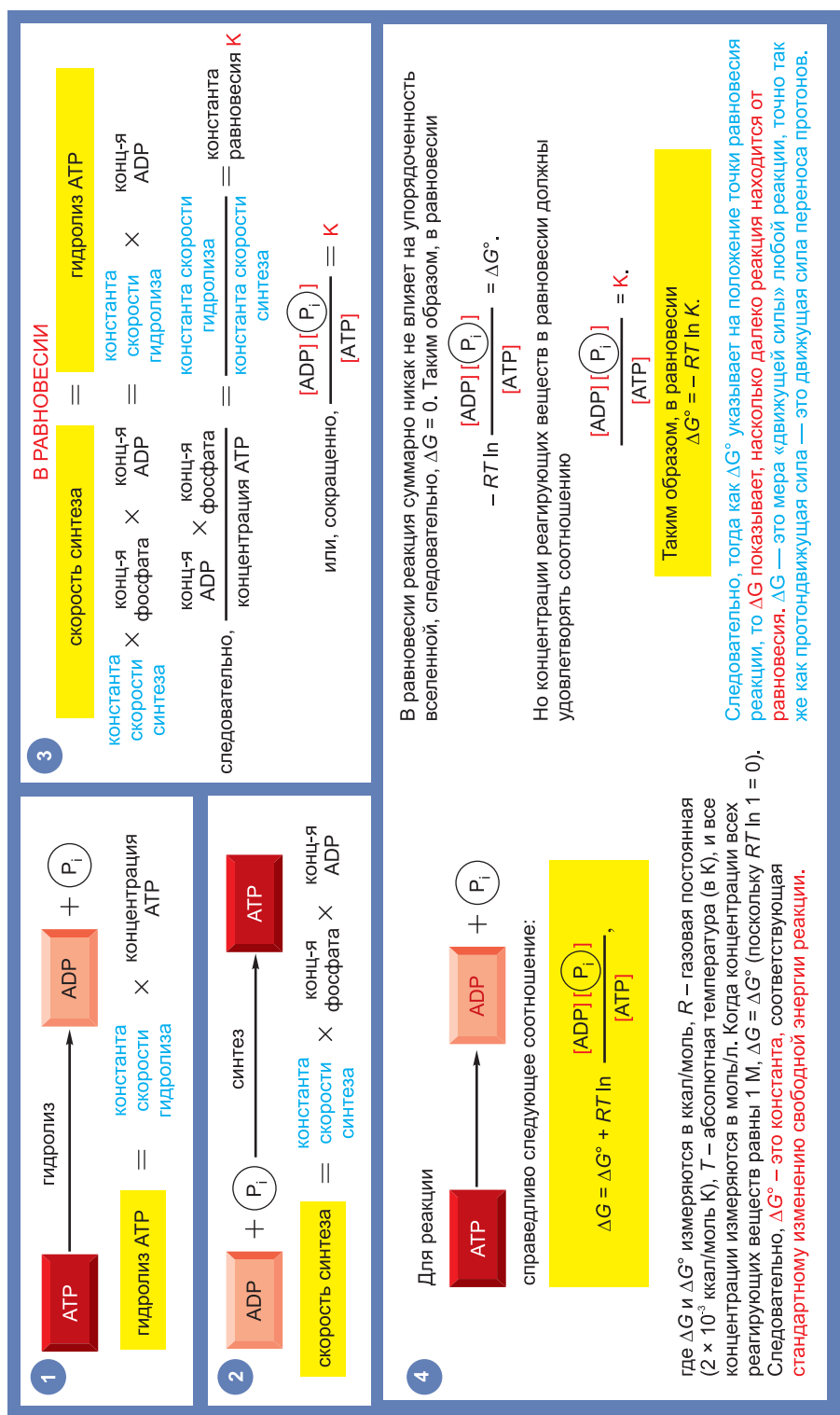


Рис. 14.18. Базовые соотношения между изменением свободной энергии и равновесием реакции гидролиза АТР. Константы скорости в рамках 1 и 2 определяются экспериментально путем измерения накопления продукта как функции от времени. Показанная здесь константа равновесия K имеет размерность моль/л (см. обсуждение свободной энергии в приложении 2.7, **стр. 118–119**, а константы равновесия — на рис. 3.43).

ADP и P_i одинаковы и равны 1 моль/л (так называемые стандартные условия), ΔG гидролиза АТФ совпадает с изменением стандартной свободной энергии ΔG° , которое составляет всего $-7,3$ ккал/моль ($-30,5$ кДж/моль). Если концентрация АТФ значительно ниже, чем концентрации ADP и P_i , ΔG становится равным нулю. При этом скорость объединения ADP и P_i с образованием АТФ будет равна скорости распада АТФ на ADP и P_i . Другими словами, когда $\Delta G = 0$, реакция находится в *равновесии* (см. рис. 14.18).

Именно ΔG , а не ΔG° , определяет, насколько далеко реакция находится от равновесия, и может ли она быть использована в качестве движущей силы других реакций. Поскольку эффективное превращение ADP в АТФ в митохондриях поддерживает высокую концентрацию АТФ по сравнению с ADP и P_i , реакция гидролиза АТФ в клетках находится вдали от равновесия, и, соответственно, ΔG сильно отрицательно. Без такого значительного нарушения равновесия гидролиз АТФ не мог бы использоваться для смещения равновесия других реакций в клетках; например, многие биосинтетические реакции протекали бы в обратном направлении при низкой концентрации АТФ.

14.1.11. АТФ-синтаза может работать в обратном направлении для гидролиза АТФ и накачки H^+

Помимо использования тока H^+ по электрохимическому протонному градиенту для синтеза АТФ, АТФ-синтаза также может работать в обратном направлении: она способна использовать энергию гидролиза АТФ для накачки протонов через внутреннюю митохондриальную мембрану (рис. 14.19). Таким образом, она представляет собой *обратимую сопрягающую систему*, преобразующую друг в друга энергии электрохимического протонного градиента и химических связей. Направление ее работы в каждый момент времени зависит от равновесия между крутизной электрохимического протонного градиента и локального ΔG гидролиза АТФ, как мы объясним ниже.

Точное число протонов, необходимое для синтеза одной молекулы АТФ, зависит от числа субъединиц в кольце трансмембранных белков, образующих основание ротора (см. рис. 14.15). Однако, для того чтобы проиллюстрировать принцип, предположим, что одна молекула АТФ синтезируется АТФ-синтазой при прохождении через нее 3 протонов. В данном случае будет ли АТФ-синтаза работать в направлении синтеза АТФ или его гидролиза, зависит от точного соотношения между выгодным изменением свободной энергии при переносе трех протонов через мембрану в матрикс, ΔG_{3H^+} (которое меньше нуля), и невыгодным изменением свободной энергии *синтеза* АТФ в матриксе, $\Delta G_{\text{синтез АТФ}}$ (которое больше нуля). Выше мы сказали, что величина $\Delta G_{\text{синтез АТФ}}$ зависит от точных концентраций трех реагирующих веществ: АТФ, ADP и P_i в матриксе митохондрий (см. рис. 14.18). Величина ΔG_{3H^+} , с другой стороны, прямо пропорциональна величине протондвижущей силы через внутреннюю митохондриальную мембрану. Следующий пример объяснит, как соотношение между этими двумя изменениями свободной энергии влияет на АТФ-синтазу.

В подписи к рисунку 14.19 сказано, что единственный H^+ , переходящий в матрикс по электрохимическому градиенту в 200 мВ, высвобождает 4,6 ккал/моль (19,2 кДж/моль) свободной энергии, а движение трех протонов высвобождает в три раза больше свободной энергии ($\Delta G_{3H^+} = -13,8$ ккал/моль; 57,7 кДж/моль). Таким образом, если протондвижущая сила остается на постоянном уровне 200 мВ,

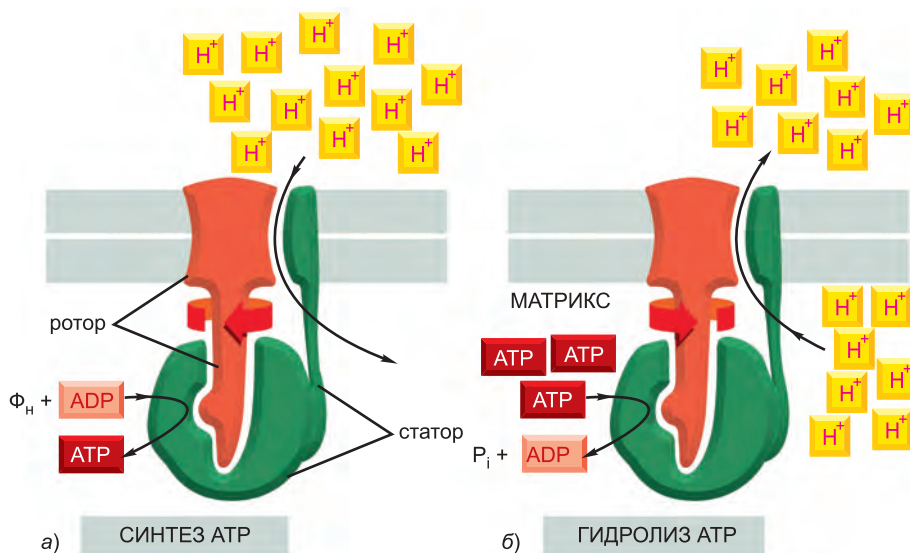


Рис. 14.19. АТФ-синтаза — это обратимая сопрягающая система, способная преобразовывать энергию электрохимического протонного градиента в энергию химических связей, и наоборот. АТФ-синтаза может либо (а) синтезировать АТФ за счет протондвижущей силы, либо (б) накачивать протоны против их электрохимического градиента за счет гидролиза АТФ. Направление работы в каждый момент времени зависит от суммарного изменения свободной энергии (ΔG) сопряженных процессов транслокации H^+ через мембрану и синтеза АТФ из АДФ и P_i . Измерения крутящего момента АТФ-синтазы при гидролизе АТФ показало, что синтаза способна качать протоны в 60 раз эффективнее, чем дизельный двигатель той же массы. Изменение свободной энергии (ΔG) гидролиза АТФ зависит от концентраций трех реагирующих веществ: АТФ, АДФ и P_i (см. рис. 14.18); ΔG синтеза АТФ является отрицательной по отношению к ней величиной. ΔG переноса протона через мембрану пропорциональна протондвижущей силе. Коэффициентом пересчета между ними служит фарадей. Таким образом, $\Delta G_{H^+} = -0,023$ (протондвижущей силы), где ΔG_{H^+} выражается в ккал/моль, а протондвижущая сила — в мВ. При электрохимическом протонном градиенте (протондвижущей силе), равном 200 мВ, $\Delta G_{H^+} = -4,6$ ккал/моль ($-19,2$ кДж/моль).

АТФ-синтаза синтезирует АТФ до тех пор, пока соотношение АТФ к АДФ и P_i не достигнет величины, при которой $\Delta G_{\text{синтез АТФ}}$ равно $+13,8$ ккал/моль ($57,7$ кДж/моль; здесь $\Delta G_{\text{синтез АТФ}} + \Delta G_{3H^+} = 0$). После этого суммарный синтез или гидролиз АТФ АТФ-синтазой становится равным нулю.

Предположим, что в результате протекания требующих затраты энергии реакций в цитозоле вдруг произошел гидролиз большого количества АТФ, и соотношение АТФ:АДФ в матриксе упало. Теперь большая величина $\Delta G_{\text{синтез АТФ}}$ уменьшится (см. рис. 14.18), и АТФ-синтаза снова начнет синтезировать АТФ, для того чтобы восстановить первоначальное соотношение АТФ:АДФ. С другой стороны, если протондвижущая сила вдруг уменьшится и будет постоянно равна 160 мВ, ΔG_{3H^+} станет равно $-11,0$ ккал/моль (-46 кДж/моль). В результате АТФ-синтаза начнет гидролизовать часть АТФ матрикса до тех пор, пока не будет достигнуто новое равновесное соотношение АТФ, АДФ и P_i (при котором $\Delta G_{\text{синтез АТФ}} = +11,0$ ккал/моль, или $+46$ кДж/моль), и так далее.

У многих бактерий АТФ-синтаза постоянно меняет направление работы при переключении между аэробным и анаэробным метаболизмом, как мы увидим ниже. А мор-

фологически очень похожие на АТР-синтазу АТРазы V-типа, закисляющие органеллы, в норме работают в обратном направлении (см. рис. 13.36). Другие мембранные транспортные белки, сопрягающие трансмембранный перенос иона с синтезом или гидролизом АТР, также обратимы. Например, описанные в главе 11 Na^+/K^+ -насос и Ca^{2+} -насос в норме гидролизуют АТР и используют высвобожденную энергию для транспорта определенных ионов через мембрану. Однако, если такой насос поместить в условия патологически крутого градиента транспортируемого им иона, он будет работать в обратном направлении, синтезируя АТР, а не гидролизую его. Таким образом, АТР-синтаза ни в коей мере не является уникальным белком в отношении способности напрямую преобразовывать электрохимическую энергию, запасенную в трансмембранном ионном градиенте, в энергию фосфатной связи АТР.

Заключение

В митохондриях протекает основная часть клеточных окислительных процессов и синтезируется большая часть АТР животной клетки. Митохондрия окружена двумя концентрическими мембранами, и реакции протекают, как правило, во внутреннем пространстве (матриксе) и окружающей его внутренней мембране. Матрикс содержит большой набор ферментов, включая ферменты, превращающие пируват и жирные кислоты в ацетил-КоА, и ферменты, окисляющие ацетил-КоА до CO_2 в цикле лимонной кислоты. В этих реакциях окисления образуется большое количество NADH (и FADH_2). Затем в расположенной во внутренней митохондриальной мембране электрон-транспортной цепи (дыхательной цепи) используется энергия, полученная благодаря объединению молекулярного кислорода с переносимыми NADH и FADH_2 реакционно-способными электронами.

Дыхательная цепь использует энергию, выделенную при электронном транспорте, для откачки H^+ из матрикса и создания трансмембранного электрохимического протонного (H^+) градиента, который складывается из мембранного потенциала и разности рН. При движении H^+ обратно в матрикс (через внутреннюю мембрану) выделяется много энергии, которая служит для синтеза АТР в матриксе удивительной белковой машиной АТР-синтазой, обратимой системой, сопрягающей ток протонов и синтез или гидролиз АТР. Трансмембранный электрохимический градиент также служит движущей силой транспорта некоторых метаболитов через внутреннюю митохондриальную мембрану, включая эффективный обмен АТР на АДФ между митохондрией и цитозолем, поддерживающий пул АТР в активном состоянии. В результате высокое соотношение между АТР и продуктами его гидролиза делает изменение свободной энергии гидролиза АТР очень выгодным. Таким образом, реакция гидролиза АТР служит движущей силой многих энергозатратных процессов клетки.

14.2. Электрон-транспортные цепи и протонные насосы

Мы рассмотрели общие принципы того, как митохондрии используют электронный транспорт для создания электрохимического протонного градиента. Теперь обратимся к механизму, лежащему в основе этого мембранного процесса преобразования энергии. Сделав это, мы также достигнем большей цели. В начале этой главы мы подчеркнули, что в митохондриях, хлоропластах, археях и бактериях действуют очень сходные хемиосмотические механизмы. В самом деле, эти меха-

низмы лежат в основе функционирования почти всех живых организмов, включая анаэробов, которые получают всю свою энергию за счет переноса электрона между двумя неорганическими молекулами.

Целью данного раздела является объяснить, как при электрон-транспортных процессах возможна перекачка протонов через мембрану. Мы начнем с некоторых основных принципов, от которых зависит данный процесс.

14.2.1. Протоны необыкновенно легко транспортировать

Хотя протоны похожи на другие положительные ионы, например Na^+ и K^+ , применительно к тому, что для их переноса через мембрану требуются белки, в некоторых отношениях они уникальны. Атомы водорода — наиболее распространенный тип атомов в живых организмах; они в избытке содержатся не только в углеродных биологических молекулах, но и в окружающих молекулах воды. Протоны воды очень подвижны и непрерывно «бегают» по объединенной водородными связями сети молекул воды, быстро диссоциируя от одной молекулы воды и связываясь с соседней, как показано на [рис. 14.20, а](#). Считается, что протоны проходят через белковый насос, встроенный в липидный бислой, сходным образом: они переносятся от одной боковой цепи аминокислоты на другую в специальном канале белка.

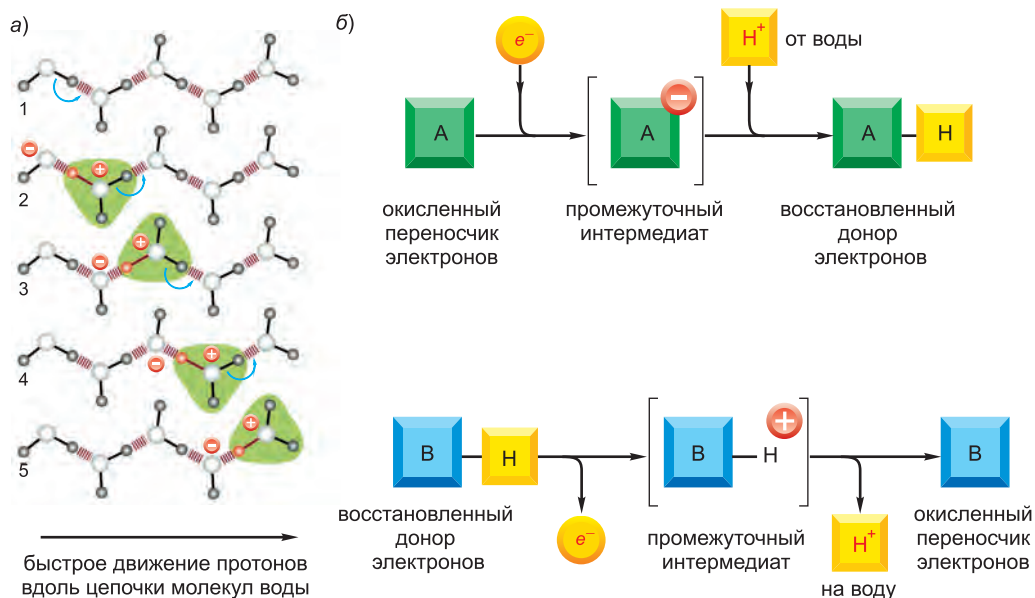


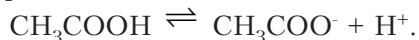
Рис. 14.20. Как протоны ведут себя в воде. (а) Протоны очень быстро перемещаются по цепи связанных водородными связями молекул воды. На схеме переходы протонов показаны синими стрелками, а ион гидроксония — зеленым облаком. В главе 2 написано, что протоны сами по себе встречаются редко; обычно они связаны с молекулой воды в форме иона гидроксония H_3O^+ . При нейтральном pH (pH 7.0) концентрация ионов гидроксония составляет 10^{-7} М. Однако для наглядности мы обычно говорим, что концентрация H^+ равна 10^{-7} М (см. приложение 2.2, [стр. 108–109](#)). (б) Перенос электрона может привести к переносу целого атома водорода, поскольку внутри клетки протоны легко забираются от молекул воды или донируются на них. В данном примере молекула А при восстановлении принимает электрон и протон, а молекула В при окислении теряет электрон и протон.

Протоны также уникальны в связи с электронным транспортом. Если молекула восстанавливается за счет приобретения электрона, электрон (e^-) придает ей дополнительный отрицательный заряд. Во многих случаях добавление протона (H^+) воды быстро нейтрализует этот заряд, и поэтому суммарный результат восстановления заключается в переносе целого атома водорода, $H^+ + e^-$ (рис. 14.20, б). Точно так же при окислении молекулы удаленный атом водорода может легко диссоциировать на составляющие его электрон и протон. Это позволяет электрону перейти на молекулу-акцептор, а протон уходит в воду. Таким образом, в мембране, где электроны передаются по электрон-транспортной цепи, перекачка протонов с одной стороны мембраны на другую относительно проста. Для этого переносчик электронов должен быть определенным образом упакован в мембране: он должен захватывать протон с одной стороны при получении электрона и высвобождать его с другой, когда электрон переходит на следующий переносчик цепи (рис. 14.21).

14.2.2. Окислительно-восстановительный потенциал — это мера сродства к электрону

В биохимических реакциях электрон, удаленный с одной молекулы, всегда переходит на другую, т.е. когда одна молекула окисляется, другая восстанавливается. Как и в случае любой другой химической реакции, способность таких **окислительно-восстановительных реакций** (или **редокс-реакций**) протекать самопроизвольно зависит от изменения свободной энергии (ΔG) переноса электрона, которая, в свою очередь, зависит от относительного сродства двух молекул к электрону.

Поскольку перенос электрона обеспечивает большую часть энергии живых существ, стоит потратить время на понимание его принципов. Как обсуждалось в главе 2, кислоты и основания отдают и принимают протоны (см. приложение 2.2, **стр. 108–109**). Кислоты и основания существуют в сопряженных парах кислота-основание, в которых кислота легко превращается в основание при потере протона. Например, уксусная кислота CH_3COOH переходит в сопряженное основание CH_3COO^- в следующей реакции:



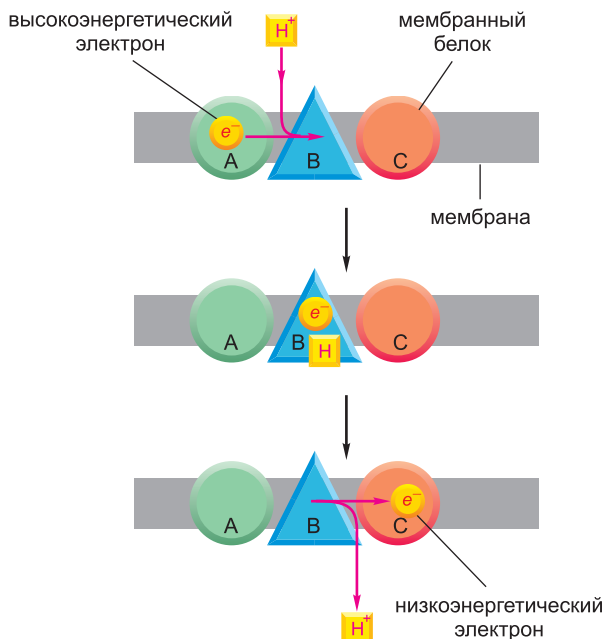
Точно так же такие пары соединений, как $NADH$ и NAD^+ , называются **окислительно-восстановительными** (или **редокс-)** **парами**, поскольку $NADH$ превращается в NAD^+ после потери электрона в реакции



$NADH$ — это сильный донор электронов: поскольку его электроны удерживаются высокоэнергетической связью, изменение свободной энергии при их передаче многим молекулам является выгодным (см. рис. 14.9). Образовать высокоэнергетическую связь сложно. Поэтому его редокс-партнер NAD^+ по необходимости является слабым акцептором.

Мы можем экспериментально измерить способность любой окислительно-восстановительной пары переносить электроны. Все, что для этого требуется, это создать электрическую цепь, соединяющую эквимольную (1 : 1) смесь окислительно-восстановительной пары с другой окислительно-восстановительной парой, выбранной в качестве стандарта сравнения, и измерить разницу потенциалов между ними (**приложение 14.1, стр. 830**). Эта разность потенциалов и есть **окислительно-восстановительный (редокс-) потенциал**; по определению, электроны самопроизвольно переходят с такой редокс-пары, как $NADH/NAD^+$, с низким окислительно-

Рис. 14.21. Как можно перекачать протоны через мембрану. Когда электрон движется по встроенной в липидную бислойную мембрану электрон-транспортной цепи, он может на каждом этапе связывать и высвобождать протон. На данной схеме электронный переносчик В при принятии электрона от переносчика А также захватывает протон с одной стороны мембраны; он высвобождает протон с другой стороны, когда отдает электрон на переносчик С



восстановительным потенциалом (низким сродством к электрону) на такую редокс-пару, как O_2/H_2O , с высоким окислительно-восстановительным потенциалом (высоким сродством к электрону). Таким образом, NADH — это подходящая молекула для передачи электронов в дыхательную цепь,

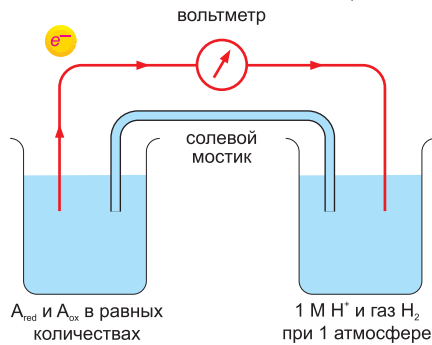
тогда как O_2 хорошо работает в качестве «слива» для электронов в конце цепи. Как объясняется в приложении 14.1, разница между окислительно-восстановительными потенциалами, $\Delta E_0'$, напрямую служит мерой изменения стандартной свободной энергии ΔG° в случае переноса электрона с одной молекулы на другую.

14.2.3. Перенос электрона высвобождает большое количество энергии

Как мы только что обсудили, пары соединений с наиболее отрицательными окислительно-восстановительными потенциалами обладают наименьшим сродством к электрону и, следовательно, содержат переносчики с наибольшей способностью отдавать электрон. И наоборот, пары с наиболее положительными редокс-потенциалами имеют наибольшее сродство к электрону и, соответственно, содержат переносчики с наибольшей способностью принимать электрон. Эквимоллярная смесь NADH и NAD^+ имеет редокс-потенциал -320 мВ, то есть NADH стремится отдать электрон; эквимоллярная смесь H_2O и $\times 1/2O_2$ имеет редокс-потенциал $+820$ мВ, то есть O_2 стремится принять электрон. Разница окислительно-восстановительных потенциалов составляет $1,14$ вольт (1140 мВ); это значит, что перенос электрона с NADH на O_2 в таких стандартных условиях очень выгоден, $\Delta G^\circ = -26,2$ ккал/моль (-110 кДж/моль), или в два раза больше, если с одной молекулы NADH переносится два электрона (см. приложение 14.1). Если сравнить это изменение свободной энергии с изменением свободной энергии при образовании фосфоангидридных связей в АТФ, где $\Delta G^\circ = -7,3$ ккал/моль ($-30,5$ кДж/моль; см. рис. 2.75), то окажется, что при окислении одной молекулы NADH высвобождается более чем достаточно энергии для синтеза нескольких молекул АТФ из АДФ и P_i .

В живых системах определенно могли бы эволюционировать ферменты, позволяющие NADH напрямую передавать электроны на O_2 с образованием воды

КАК ИЗМЕРЯЮТ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛЫ



Один сосуд (слева) содержит вещество А в эквимольной смеси восстановленной ($A_{\text{ред}}$) и окисленной ($A_{\text{ок}}$) форм, которые вместе составляют окислительно-восстановительную пару. Второй сосуд содержит стандарт сравнения, так называемый водородный электрод ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightleftharpoons \text{H}_2$), чей редокс-потенциал по международному соглашению принят равным нулю. (Между сосудами создается солевой мостик из концентрированного раствора KCl, который позволяет ионам K^+ и Cl^- свободно двигаться между сосудами, что необходимо для нейтрализации зарядов в сосудах при токе электронов между ними.) Металлический провод (красный) создает путь для электронов без сопротивления, а вольтметр измеряет окислительно-восстановительный потенциал вещества А. Если электроны переходят с $A_{\text{ред}}$ на H^+ , как показано на рисунке, то считается, что окислительно-восстановительная пара, образованная веществом А, имеет отрицательный редокс-потенциал. Если же электроны, наоборот, идут от H_2 на $A_{\text{ок}}$, то потенциал редокс-пары положителен.

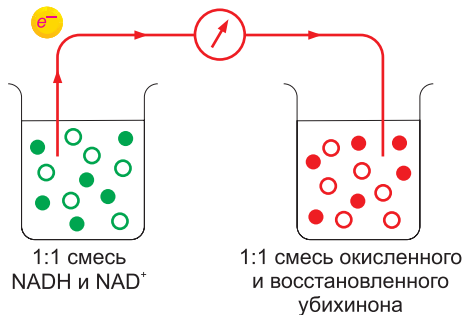
НЕКОТОРЫЕ СТАНДАРТНЫЕ РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛЫ ПРИ pH 7

Окислительно-восстановительный потенциал обозначается E . В стандартных условиях, когда концентрация всех реагирующих веществ, включая H^+ , равна 1 М, можно определить стандартный редокс-потенциал, обозначаемый E° . Поскольку биологические реакции протекают при $\text{pH} = 7$, биологи используют другое стандартное состояние, при котором $A_{\text{ред}} = A_{\text{ок}}$ и $\text{H}^+ = 10^{-7}$ М. Такой стандартный окислительно-восстановительный потенциал обозначается E'_0 . Здесь приведено несколько примеров, связанных с окислительным фосфорилированием.

Окислительно-восстановительные реакции	Окислительно-восстановительный потенциал, E'_0
$\text{NADH} \rightleftharpoons \text{NAD}^+ + \text{H}^+ + 2\text{e}^-$	-320 мВ
восстан. убинон \rightleftharpoons окисл. убинон + $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	+30 мВ
восстан. цитохром $c \rightleftharpoons$ окисл. цитохром $c + \text{e}^-$	+230 мВ
$\text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \frac{1}{2}\text{O}_2 + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$	+820 мВ

РАСЧЕТ ΔG° ПО РЕДОКС-ПОТЕНЦИАЛАМ

$$\Delta E'_0 = E'_0(\text{акцептор}) - E'_0(\text{донор}) = +350 \text{ мВ}$$



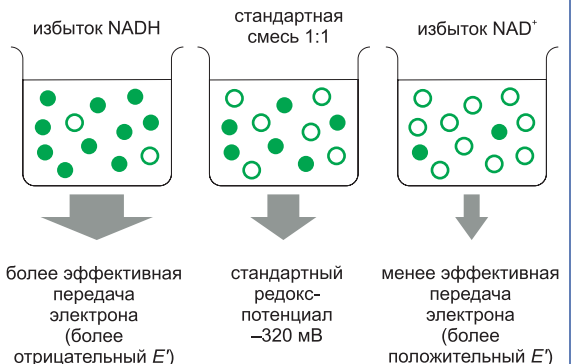
$$\Delta G^\circ = -8 \text{ ккал/моль}$$

$\Delta G^\circ = -n(0,023)\Delta E'_0$, где n – число электронов, перенесенных через изменение окислительно-восстановительного потенциала, равного $\Delta E'_0$ милливольт (мВ)

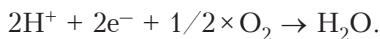
Пример: перенос одного электрона с NADH на убинон имеет выгодное ΔG° , равное -8,0 ккал/моль (-1,9 кДж/моль), тогда как перенос одного электрона с убинона на кислород имеет еще более выгодное ΔG° , равное -18,2 ккал/моль (-4,35 кДж/моль). ΔG° переноса одного электрона с NADH на кислород представляет собой сумму этих двух величин и равно -26,2 ккал/моль.

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ

Реальное изменение свободной энергии реакции ΔG зависит от концентрации реагирующих веществ и обычно отличается от изменения стандартной свободной энергии ΔG° . Стандартные окислительно-восстановительные потенциалы измеряются для 1:1 смеси редокс-пары. Например, стандартный редокс-потенциал -320 мВ соответствует эквимольной смеси NADH и NAD^+ . Но когда NADH в избытке по отношению к NAD^+ , перенос электрона от NADH на акцептор электронов становится более выгодным. Таким образом, окислительно-восстановительный потенциал, как и ΔG электронного транспорта, становится более отрицательным.



в реакции



Но из-за огромного падения свободной энергии эта реакция протекала бы с практически взрывной силой, и почти вся энергия уходила бы в тепло. В клетках эта реакция протекает постепенно: высокоэнергетические электроны передаются с NADH на O_2 через множество электронных переносчиков в электрон-транспортной цепи. Каждый последующий переносчик в цепи связывает электроны сильнее, чем предыдущий, поэтому энергетически выгодная реакция $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- + 1/2 \times \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}$ протекает во много маленьких этапов. Такой последовательный процесс позволяет клетке запастись почти половину высвобождаемой энергии.

14.2.4. Методы спектроскопии позволили идентифицировать многие электронные переносчики дыхательной цепи

Многие электронные переносчики дыхательной цепи поглощают видимый свет и меняют цвет при окислении или восстановлении. В общем случае все они обладают достаточно уникальными спектром поглощения и реакционной способностью, чтобы их было возможно наблюдать спектроскопически даже в неочищенных смесях. Благодаря этому данные компоненты выделили задолго до того, как стали известны их функции. Так, **цитохромы** открыли в 1925 г. как вещества, претерпевающие быстрое окисление и восстановление в таких разных организмах, как бактерии, дрожжи и насекомые. Наблюдая клетки и ткани в спектроскоп, исследователи идентифицировали три типа цитохромов, отличающихся спектрами поглощения, и обозначали их буквами *a*, *b* и *c*. Эта номенклатура сохранилась, хотя в настоящее время известно, что клетки содержат несколько цитохромов каждого типа, и эта классификация не несет функционального смысла.

Цитохромы составляют семейство окрашенных белков, несущих связанный гем, чей атом железа переходит из трехвалентного состояния Fe^{3+} в двухвалентное Fe^{2+} при присоединении электрона. Гем состоит из *порфиринового кольца* и связанного с ним атома железа, удерживаемого четырьмя атомами азота, расположенными в вершинах квадрата (рис. 14.22). Сходные порфириновые кольца определяют красный цвет крови и зеленый цвет листьев, где они связаны соответственно с железом в гемоглобине и магнием в хлорофилле.

В *железо-серных белках*, втором крупном семействе электронных переносчиков,

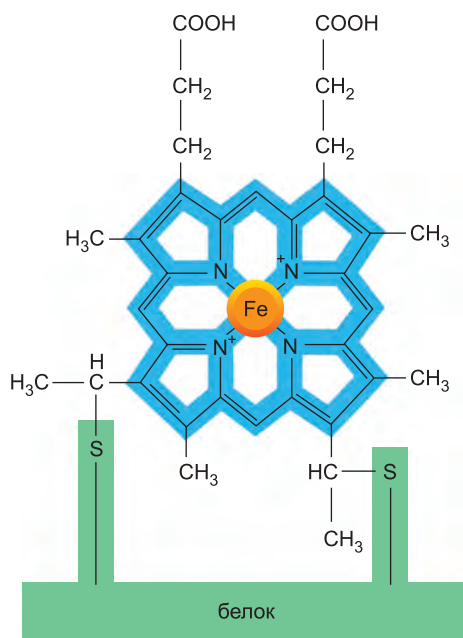


Рис. 14.22. Структура гема, ковалентно связанного с цитохромом с. Порфириновое кольцо показано голубым. В дыхательной цепи содержится пять разных цитохромов. Поскольку гемы в различных цитохромах имеют немного разную структуру и по-разному удерживаются в белках, родство цитохромов к электрону также различается.

два или четыре атома железа связаны с равным числом атомов серы и боковыми цепями остатков цистеина, формируя **железо-серный кластер** белка (рис. 14.23). В дыхательной цепи железо-серных кластеров больше, чем цитохромов. Но для их спектроскопического обнаружения необходима спектроскопия электронного парамагнитного резонанса ЭПР, и они хуже охарактеризованы. Как и цитохромы, эти белки переносят один электрон.

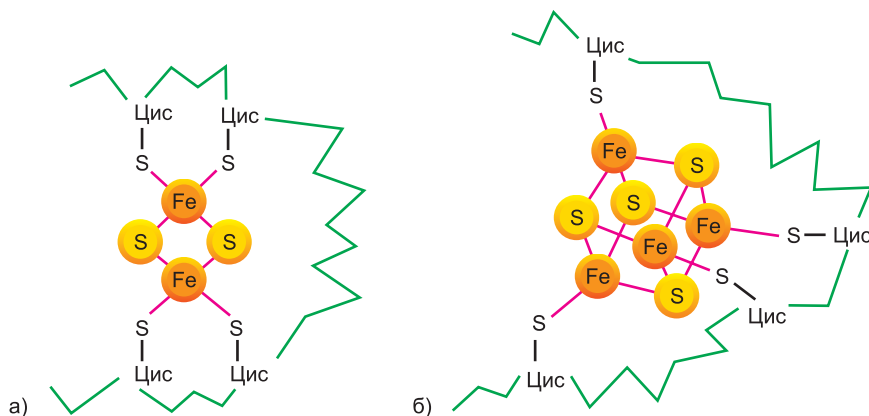


Рис. 14.23. Структуры двух типов железо-серных кластеров. (а) Кластер 2Fe2S-типа. (б) Кластер 4Fe4S-типа. Несмотря на то что железо-серные кластеры содержат несколько атомов железа, они способны переносить только один электрон. В дыхательной цепи содержится более семи различных железо-серных кластеров.

Самый простой переносчик электронов в дыхательной цепи (и единственный, который не является хотя бы частично белком) — это хинон (носящий название *убихинона*, или *кофермента Q*). **Хинон (Q)** — это маленькая гидрофобная молекула, которая способна свободно передвигаться по липидному бислою и может принимать и отдавать как один, так и два электрона; при восстановлении он захватывает из среды один протон на каждый переносимый электрон (рис. 14.24).

Помимо шести различных связанных с цитохромами гемов, более семи железо-серных кластеров и убихинона, с белками дыхательной цепи на пути от NADH до кислорода также в качестве переносчиков электронов связаны два атома меди и флавин. В общей сложности в этом пути участвует более 60 белков.

Как и следовало ожидать, по мере движения электрона по дыхательной цепи сродство этих переносчиков к электрону увеличивается (как и окислительно-восстановительные потенциалы). Редокс-потенциалы в течение эволюции были четко отлажены за счет связывания каждого электронного переносчика в определенном белковом окружении, которое способно изменить нормальное сродство соединения к электрону. Однако поскольку железо-серные кластеры обладают относительно низким сродством к электронам, они преобладают на ранних этапах дыхательной цепи; цитохромы же, наоборот, чаще встречаются ниже по цепи, где требуется большее сродство.

Порядок электронных переносчиков в цепи определен сложными спектроскопическими измерениями (рис. 14.25), и многие белки сначала выделены и охарактеризованы как отдельные полипептиды. Важным прорывом в понимании дыхательной цепи стало более позднее открытие, заключавшееся в том, что большая часть белков входит в состав трех крупных ферментных комплексов.

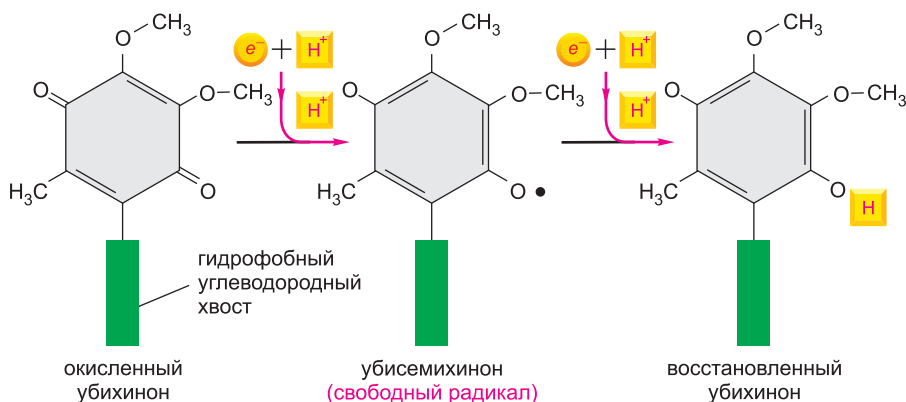


Рис. 14.24. Хинонные переносчики электронов. Убиноин в дыхательной цепи захватывает из водной среды один H^+ на каждый принятый электрон, и он может переносить один или два электрона в составе атомов водорода (желтые). Когда восстановленный убиноин передает электроны следующему переносчику в цепи, эти протоны высвобождаются. Длинный гидрофобный хвост не дает убиноину покинуть мембрану и состоит, в зависимости от организма, из 6–10 пятиуглеродных изопреновых единиц. Соответствующим электронным переносчиком в фотосинтетических мембранах растений является пластохинон, структура которого практически идентична убиноину. Для простоты в этой главе мы будем называть убиноин и пластохинон просто хинонами (Q).

14.2.5. Дыхательная цепь содержит три крупных встроенных во внутреннюю мембрану ферментных комплекса

Мембранные белки сложно очистить в интактном состоянии, поскольку они нерастворимы в воде, и некоторые солубилизирующие их детергенты способны разрушить нормальные белок-белковые взаимодействия. Однако в начале 60-х

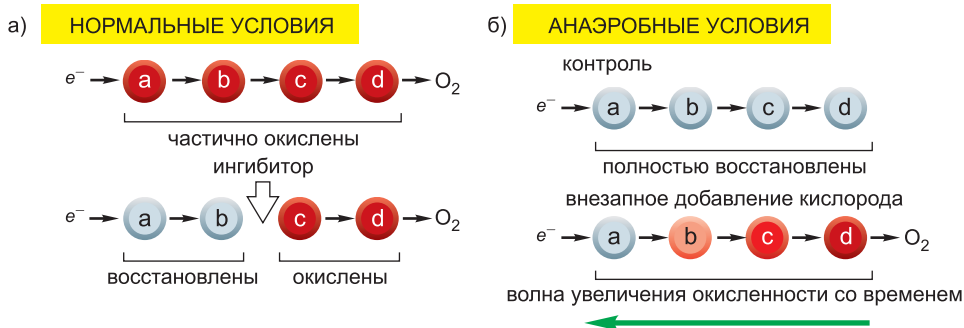


Рис. 14.25. Методы, используемые для определения пути электронов вдоль электрон-транспортной цепи. Уровень окисленности электронных переносчиков a, b, c и d непрерывно отслеживается путем наблюдения их спектров, которые различаются для окисленной и восстановленной форм. На схеме более темным красным цветом показан повышенный уровень окисленности. (a) В нормальных условиях при достаточном количестве кислорода все переносчики частично окислены. Добавление специфического ингибитора приводит к тому, что более поздние переносчики становятся более окисленными (красные), а более ранние – восстановленными. (б) В отсутствие кислорода все переносчики полностью восстановлены (серые). Внезапное добавление кислорода переводит переносчики в частично окисленную форму с задержкой, которая больше для более ранних переносчиков.

гг. XX века ученые обнаружили, что относительно мягкие ионные детергенты, например, дезоксихолат, способны сольбилизовать определенные компоненты внутренней митохондриальной мембраны в их нативной форме. Это позволило идентифицировать и очистить три крупных мембраносвязанных ферментных комплекса дыхательной цепи на пути от NADH до кислорода. Каждый из этих выделенных комплексов может быть встроен в липидные бислои везикулы, где он будет качать протоны через бислой при прохождении по нему электронов. В митохондрии эти три комплекса ассиметрично ориентированы во внутренней мембране и связаны вместе в группу зависимых от электронного транспорта H^+ -насосов, откачивающих протоны из матрикса (рис. 14.26):

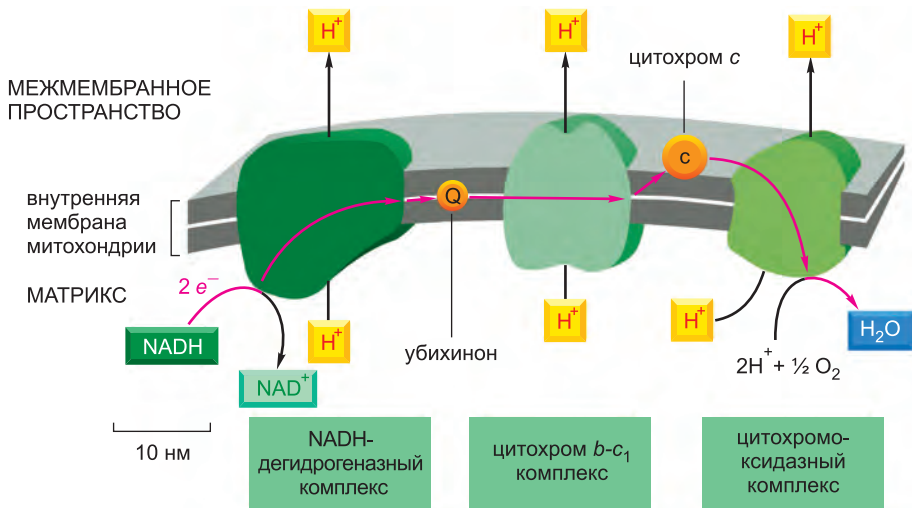


Рис. 14.26. Путь электрона через три ферментных комплекса дыхательной цепи. Показаны примерные размер и форма каждого комплекса. В ходе переноса электронов с NADH на кислород (красные линии) убинон и цитохром c служат подвижными переносчиками, транспортирующими электрон от одного комплекса к другому. Как показано, протоны перекачиваются через мембрану всеми тремя ферментными комплексами.

1. **NADH-дегидрогеназный комплекс** (известный как комплекс I) — это самый большой ферментный комплекс дыхательной цепи, содержащий более 40 полипептидных цепей. Он принимает электроны с NADH и передает их через флавин и по крайней мере семь железо-серных кластеров на убинон. Затем убинон переносит электроны на второй дыхательный ферментный комплекс, цитохром $b-c_1$ комплекс;

2. **Цитохром $b-c_1$ комплекс** содержит по крайней мере 11 различных полипептидных цепей и функционирует как димер. Каждый мономер содержит три гема, связанных с цитохромами и железо-серным белком. Комплекс принимает электроны с убинона и передает их на цитохром c , который переносит электрон на цитохромоксидазный комплекс;

3. **Цитохромоксидазный комплекс** также функционирует как димер; каждый мономер содержит 13 различных полипептидных цепей, включая два цитохрома

и два атома меди. Комплекс принимает по одному электрону от цитохрома *c* и передает их одновременно по четыре на кислород.

Цитохромы, железо-серные кластеры и атомы меди могут одновременно переносить только один электрон. Однако NADH отдает два электрона, а каждая молекула O_2 должна принять четыре для образования воды. В электрон-транспортной цепи есть несколько участков, где происходит накопление и рассеивание электронов и где координируются эти изменения в числе электронов. Основным таким участком является цитохромоксидаза.

14.2.6. Железо-медный кластер цитохромоксидазы катализирует эффективное восстановление O_2

Поскольку кислород обладает высоким сродством к электронам, при его восстановлении до воды выделяется большое количество свободной энергии. Таким образом, эволюция клеточного дыхания, при котором O_2 превращается в воду, позволила организмам получать значительно больше энергии, чем это возможно при анаэробном метаболизме. Предположительно, именно поэтому все высшие организмы дышат. Однако способность биологических систем использовать таким образом O_2 требует очень сложной химии. Мы способны выносить O_2 во вдыхаемом нами воздухе потому, что ему сложно захватить первый электрон; это свойство позволило клеткам контролировать начальную реакцию посредством ферментативного катализа. Но как только молекула O_2 получила один электрон и образовала супероксид-радикал (O_2^-), она становится опасно реакционно-способной и быстро захватывает еще три электрона отовсюду, откуда может их достать. Клетка может использовать O_2 для дыхания только потому, что цитохромоксидаза удерживает кислород в специальном двуметаллическом кластере, где он зажат между связанным с гемом атомом железа и атомом меди до тех пор, пока не получит все четыре электрона. Только после этого два атома молекулы кислорода могут быть безопасно высвобождены в форме молекул воды (рис. 14.27).

Цитохромоксидазная реакция составляет около 90% всех реакций захвата кислорода в клетке. Таким образом, этот белковый комплекс необходим для всей аэробной жизни. Цианид и азид очень ядовиты, потому что крепко связываются с цитохромоксидазными комплексами клетки и останавливают электронный транспорт, значительно снижая синтез АТФ.

Несмотря на то что у млекопитающих цитохромоксидаза содержит 13 различных белковых субъединиц, большинство из них, по-видимому, играет вспомогательную роль, способствуя регуляции активности или сборке трех субъединиц, составляющих ядро фермента. Полная структура этого крупного белкового комплекса расшифрована при помощи рентгеновской кристаллографии, как показано на рис. 14.28. Структуры в атомном разрешении, а также механистические исследования влияния направленных мутаций, введенных в фермент посредством генетической инженерии дрожжевых и бактериальных ферментов, позволили подробно изучить механизм работы этой слаженной белковой машины.

14.2.7. Перенос электрона во внутренней митохондриальной мембране происходит путем туннелирования при случайных столкновениях

Два компонента, переносящих электроны между тремя основными ферментными комплексами дыхательной цепи, — убихинон и цитохром *c* — быстро диф-

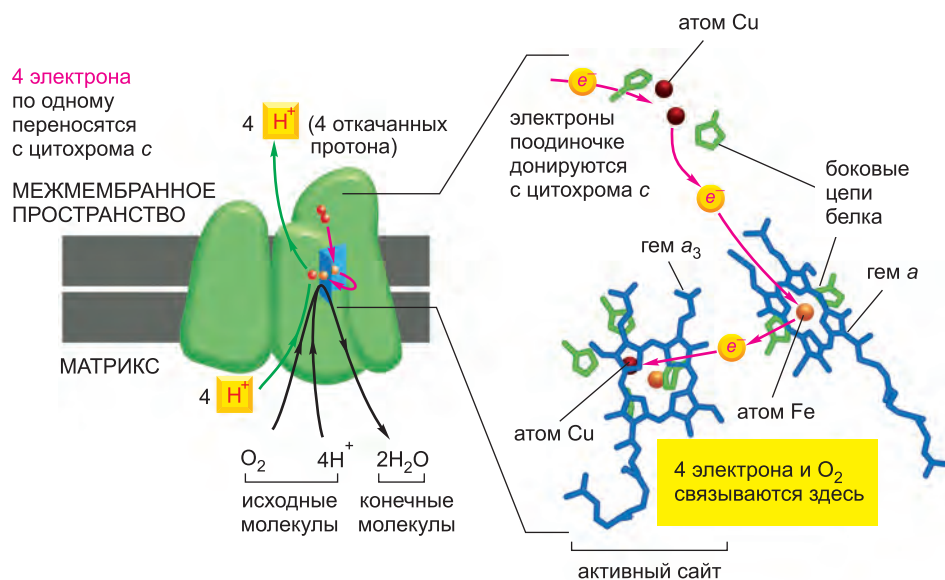


Рис. 14.27. Реакция O_2 с электронами в цитохромоксидазе. Как показано, атом железа в геме a служит местом задержки электрона; это гем переносит четыре электрона на молекулу O_2 , удерживаемую в активном сайте двуметаллического кластера, который образован другим связанным с гемом железом (в геме a_3) и расположен напротив атома меди. Обратите внимание, что на каждую молекулу O_2 , вступающую в реакцию $4e^- + 4H^+ + O_2 \rightarrow 2H_2O$, из матрикса откачивается четыре протона.

фундируют в плоскости внутренней митохондриальной мембраны. Наблюдаемые скорости электронного транспорта (всякий комплекс отдает и получает электрон каждые 5–20 миллисекунд) можно объяснить предполагаемой скоростью случайных столкновений между этими подвижными переносчиками и медленнее диффундирующими ферментными комплексами.

Направленный перенос электронов по дыхательной цепи обеспечивают исключительно специфичные функциональные взаимодействия между компонентами цепи: каждый переносчик электронов способен взаимодействовать без коротких замыканий только со смежным переносчиком в последовательности, изображенной на рис. 14.26.

В биологических системах электроны движутся между переносящими их молекулами не только за счет движения вдоль ковалентных связей в пределах молекулы, но и перепрыгивая на расстояние до 2 нм. Такое перемещение происходит путем «туннелирования» электронов, квантово-механического процесса, играющего ключевую роль в рассматриваемых нами процессах. Электрическая изоляция предупреждает короткие замыкания, которые могли бы происходить при столкновении электронного переносчика с низким редокс-потенциалом с переносчиком с высоким редокс-потенциалом. По-видимому, эта изоляция создается за счет того, что электрон переносится достаточно глубоко внутри белка; в результате, туннельные взаимодействия с неподходящим партнером невозможны.

Далее мы обсудим, как изменение редокс-потенциала от одного переносчика к другому используется для откачки протонов из матрикса митохондрий.

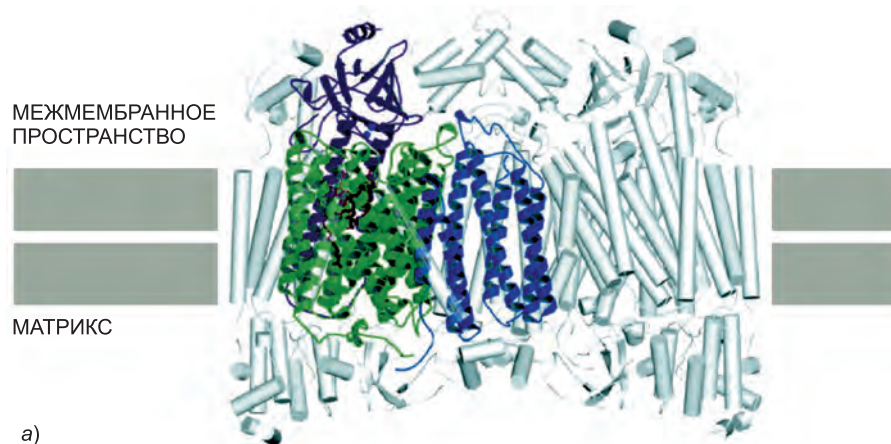
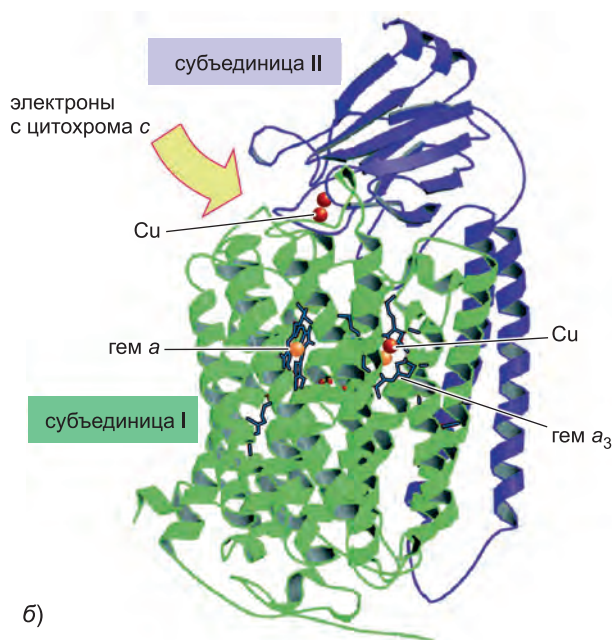


Рис. 14.28. Молекулярная структура цитохромоксидазы. Этот белок представляет собой димер, образованный состоящими из 13 различных белковых субъединиц мономерами (масса мономера составляет 204 кДа). Три окрашенные субъединицы кодируются митохондриальным геномом, и они составляют функциональное ядро фермента. По мере того как электроны движутся по ферменту на пути к связанной молекуле O_2 , они заставляют белок переносить протоны через мембрану (см. рис. 14.27). (а) Показан весь белок, расположенный во внутренней митохондриальной мембране. (б) Переносчики электронов локализованы в субъединицах I и II, как показано.



14.2.8. Значительное падение редокс-потенциала вдоль каждого из трех дыхательных ферментных комплексов дает энергию для откачки H^+

Ранее мы рассмотрели, как окислительно-восстановительный потенциал отражает сродство к электрону (см. **стр. 76**). На **рис. 14.29** схематически представлено изменение редокс-потенциалов вдоль дыхательной цепи. Потенциалы падают в три этапа на трех основных ферментативных комплексах. Разница окислительно-восстановительных потенциалов между любыми двумя электронными переносчиками прямо пропорциональна свободной энергии, высвобождаемой при переносе электрона между ними. Каждый ферментный комплекс преобразует энергию путем использования части этого изменения свободной энергии для откачки H^+ через внутреннюю мембрану, создавая

таким образом электрохимический протонный градиент, по мере того как электроны проходят через комплекс. Это преобразование можно наглядно продемонстрировать, если выделить все ферментные комплексы и по отдельности встроить их в липосомы: если добавить подходящий электронный донор и акцептор, электроны проходят по комплексу, и протоны переносятся через мембрану липосомы.

Обратите внимание, что NADH — не единственный источник электронов дыхательной цепи. Флавин FADH_2 также синтезируется при окислении жирных кислот (см. рис. 2.81) и в цикле лимонной кислоты (см. рис. 2.82). Его два электрона передаются напрямую на убихинон без участия NADH-дегидрогеназы; таким образом, они приводят к откачке меньшего числа протонов, чем два электрона NADH.

14.2.9. Перекачка H^+ в трех основных ферментных комплексах происходит по разным механизмам

Некоторые дыхательные комплексы перекачивают через внутреннюю митохондриальную мембрану один H^+ на электрон, тогда как другие перекачивают два. Механизмы, посредством которых электронный транспорт сопрягается с перекачкой H^+ , различаются у разных ферментных комплексов. В цитохромном b - c_1 комплексе, очевидно, играют роль хиноны. Как упоминалось ранее, хинон захватывает один

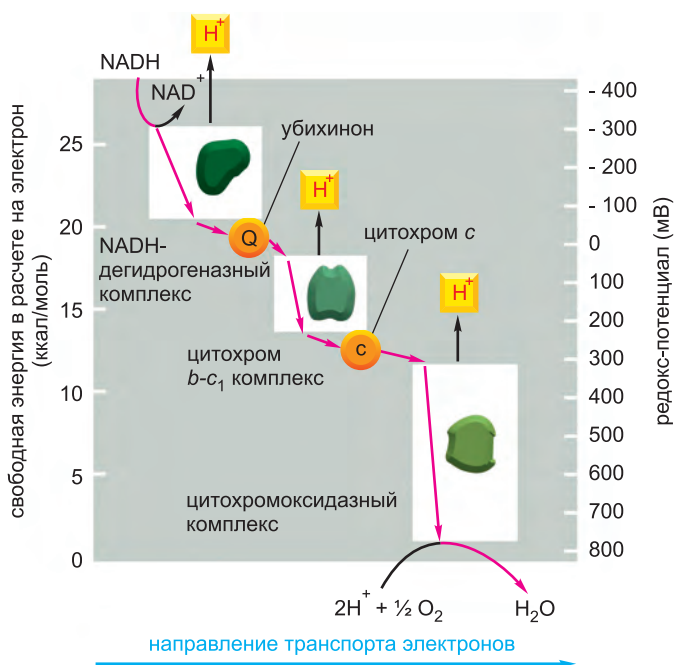


Рис. 14.29. Изменение редокс-потенциала в электрон-транспортной цепи митохондрий. Редокс-потенциал (обозначенный $\Delta E_0'$) увеличивается по мере тока электронов по дыхательной цепи к кислороду. Изменение стандартной свободной энергии ΔG° для переноса двух электронов, донированных молекулой NADH, может быть определено при помощи расположенной слева оси ординат ($\Delta G = -n(0,023) \Delta E_0'$, где n — число электронов, перенесенных через разность потенциалов, равную $\Delta E_0'$ мВ). Электроны движутся по дыхательному ферментному комплексу по цепочке электронных переносчиков. Часть изменения свободной энергии, как показано, используется для перекачки H^+ через внутреннюю мембрану митохондрий. NADH-дегидрогеназа и цитохром b - c_1 комплекс откачивают по два протона на электрон, тогда как цитохромоксидаза только один.

H^+ из водного окружения на каждый переносимый электрон, и высвобождает его при передаче электрона (см. рис. 14.24). Поскольку убихинон свободно перемещается по липидному бислою, он может получать электроны вблизи внутренней поверхности мембраны и донировать их на цитохромный $b-c_1$ комплекс вблизи внешней поверхности, перенося таким образом через бислой один H^+ на каждый электрон. Однако цитохромный $b-c_1$ комплекс откачивает два протона на электрон. Сложная последовательность электронных переносов, делающая возможным такое поведение, до сих пор исследуется на атомном уровне, чему способствует полная структура цитохромного $b-c_1$ комплекса, расшифрованная методом рентгеновской кристаллографии (рис. 14.30).

Электронный транспорт вызывает аллостерические изменения белковой конформации, которые также способны откачивать протоны, как происходит, когда H^+ перекачивается при гидролизе АТФ работающей в обратном направлении АТФ-синтазой. В случае NADH-дегидрогеназного комплекса и цитохромоксидазного комплекса электронный транспорт, по-видимому, вызывает последовательные аллостерические изменения конформации за счет изменения редокс-состояния компонентов комплексов. Конформационные перестройки, в свою очередь, заставляют белок перекачивать H^+ через внутреннюю мембрану митохондрий. Для такого типа переноса H^+ требуется по крайней мере три различные конформации белка; общий механизм представлен на рисунке 14.31.

Теперь, когда мы обсудили механистические основы электронного транспорта и перекачки протонов, мы можем перейти к рассмотрению регуляции дыхательной цепи, то есть того, как достигается ее оптимальная работа в клетке.

14.2.10. H^+ -ионофоры разобщают электронный транспорт и синтез АТФ

Начиная с 40-х гг. XX века было известно несколько соединений, например 2,4-динитрофенол, которые действуют как *разобщители*, то есть разобщают электронный транспорт и синтез АТФ. Добавление этих низкомолекулярных органических соединений в клетку останавливает синтез АТФ митохондриями, не блокируя при этом захват кислорода. В присутствии разобщителя электронный транспорт и перекачка H^+ продолжают идти с высокой скоростью, но градиента H^+ не создается. Объяснение этого эффекта простое и изящное: разобщители — это жирорастворимые слабые кислоты, которые действуют как диффундирующие переносчики H^+ в липидном бислое (H^+ -ионофоры) и создают путь для тока H^+ через внутреннюю митохондриальную мембрану, обходящий АТФ-синтазу стороной. В результате такого короткого замыкания протондвижущая сила полностью диссипирует, и АТФ не может синтезироваться.

14.2.11. Дыхательный контроль обычно ограничивает поток электронов через цепь

Добавление разобщителя, например динитрофенола, к клеткам вызывает увеличение скорости электронного транспорта, что ведет к усилению поглощения кислорода, отражающего существование **дыхательного контроля**. Считают, что контроль действует посредством прямого ингибиторного влияния электрохимического протонного градиента на скорость электронного транспорта. Когда разобщитель снимает градиент, электронный транспорт может свободно протекать

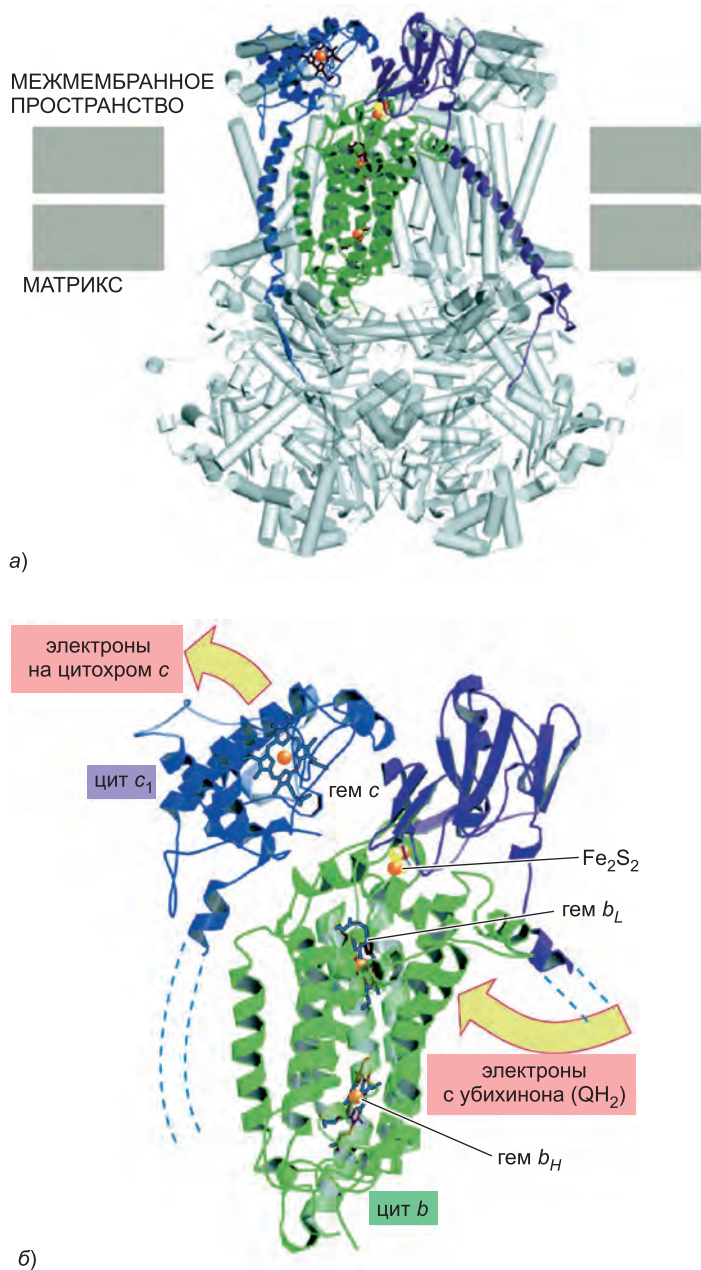


Рис. 14.30. Атомная структура цитохрома $b-c_1$. Этот белок представляет собой димер. У млекопитающих мономер массой 240 кДа состоит из 11 различных белков. Три окрашенных белка составляют функциональное ядро фермента: цитохром b (зеленый), цитохром c_1 (синий) и белок Риск, несущий железосерный кластер (фиолетовый). (а) Взаимодействие этих белков в двух мономерах. (б) Электронные переносчики и места входа и выхода электронов. Донированные убахиноном электроны сначала идут по сложному пути реакций переноса электронов и протонов в белковом комплексе, что увеличивает запасание свободной энергии. Этот процесс, при котором часть электронов возвращается обратно в пул хинонов, называется Q-циклом.

на максимальной скорости. По мере увеличения градиента электронный транспорт затрудняется, и процесс замедляется. Более того, если на внутренней мембране искусственно создать необычно большой электрохимический протонный градиент, нормальный электронный транспорт полностью останавливается, и на некоторых участках дыхательной цепи можно наблюдать *обратный транспорт электронов*. Это наблюдение указывает на то, что дыхательный контроль отражает простое равновесие между изменением свободной энергии связанного с электронным транспортом переноса протонов и изменением свободной энергии электронного транспорта, то есть величина электрохимического протонного градиента влияет как на скорость, так и на направление электронного транспорта. Точно так же она влияет на направление работы АТФ-синтазы (см. рис. 14.19).

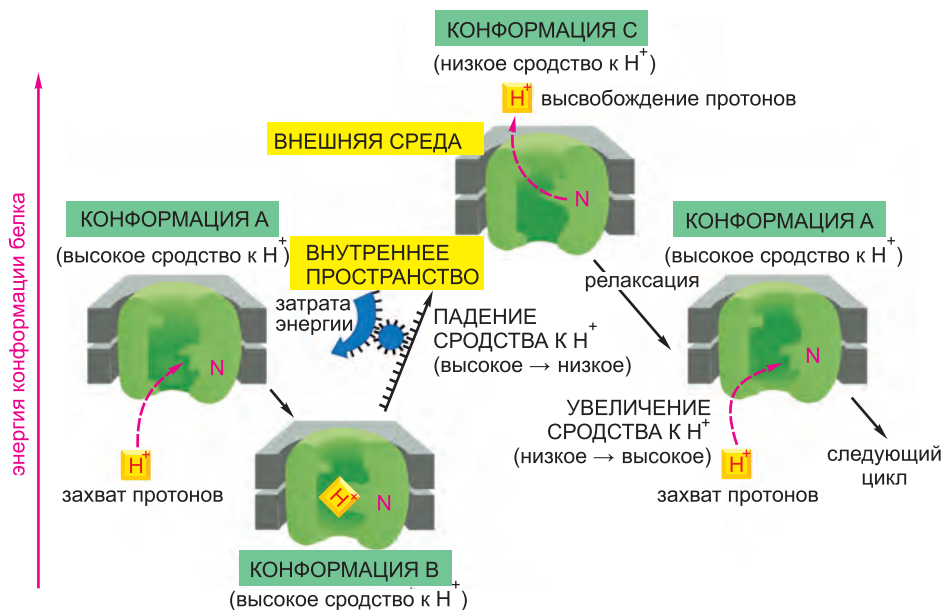


Рис. 14.31. Общая модель перекачки H^+ . Данная модель перекачки H^+ трансмембранным белком основана на механизмах, которые, как считается, используются NADH-дегидрогеназой и цитохромоксидазой, а также светозависимым прокариотическим протонным насосом бактериородопсином. Белок проходит цикл из трех конформаций: А, В и С. Разное положение белковых конформаций по вертикали отражает тот факт, что они обладают разной энергией. В конформации А белок обладает высоким сродством к H^+ , что заставляет его захватывать H^+ с внутренней стороны мембраны. В конформации С сродство белка к H^+ мало, поэтому он высвобождает H^+ во внешнюю среду. Переход из конформации В в конформацию С, вызывающий высвобождение H^+ , энергетически невыгоден и происходит только за счет аллостерического сопряжения с энергетически выгодной реакцией, протекающей в другом месте белка (синяя стрелка). Два других конформационных перехода, $A \rightarrow B$ и $C \rightarrow A$, приводят к состояниям с меньшей энергией и происходят самопроизвольно. Поскольку в целом в цикле $A \rightarrow B \rightarrow C \rightarrow A$ высвобождается свободная энергия, H^+ откачиваются из внутренней среды (матрикса митохондрий) во внешнюю (межмембранное пространство митохондрий). В случае NADH-дегидрогеназы и цитохромоксидазы энергию, необходимую для перехода $B \rightarrow C$, дает электронный транспорт, тогда как в случае бактериородопсина движущей силой служит свет (см. рис. 10.33). Другие протонные насосы получают энергию за счет гидролиза АТФ. Но всегда для направленного процесса перекачки требуются по крайней мере три различные конформации, точно так же как по крайней мере три конформации требуются для создания белка, способного двигаться по филаменту в одном направлении (см. рис. 3.77).

Дыхательный контроль является лишь частью сложной взаимосвязанной системы обратных связей, координирующей скорости гликолиза, расщепления жирных кислот, цикла лимонной кислоты и электронного транспорта. Скорости всех этих процессов связаны с соотношением АТФ:АДФ, и возрастают, когда усиленная утилизация АТФ приводит к падению этого соотношения. АТФ-синтаза во внутренней мембране митохондрий, например, работает быстрее при увеличении концентрации ее субстратов АДФ и P_i . Когда она ускоряется, фермент позволяет большему числу H^+ проникать в матрикс, и, следовательно, электрохимический протонный градиент быстрее диссипирует. Падение градиента, в свою очередь, усиливает скорость электронного транспорта.

Сходные механизмы, включая ингибирование нескольких ключевых ферментов молекулой АТФ, направлены на регуляцию скоростей синтеза и распада NADH дыхательной цепью, и так далее. Результатом этих разнообразных процессов контроля является в 5–10 раз более быстрое, чем в покое, окисление организмом жиров и сахаров во время тяжелой физической нагрузки.

14.2.12. Природные разобщители превращают митохондрии бурого жира в производящие тепло машины

В некоторых специализированных жировых клетках митохондриальное дыхание в норме не сопряжено с синтезом АТФ. В этих клетках, известных как клетки бурого жира, большая часть энергии окисления диссипирует в тепло, а не переводится в АТФ. Внутренние мембраны крупных митохондрий этих клеток содержат специальный транспортный белок, так называемый разобщающий белок, который позволяет протонам двигаться по электрохимическому градиенту без участия АТФ-синтазы. Разобщающий белок включается, когда необходимо производство тепла. В результате клетки быстро окисляют запасы жира и производят больше тепла, чем АТФ. Ткани, содержащие бурый жир, служат «грелками», способствуя просыпанию находящихся в спячке животных и защищая чувствительные участки тела новорожденных младенцев от холода.

14.2.13. Митохондрии играют множество ключевых ролей в метаболизме клетки

Клетки большей частью состоят из макромолекул, которые постоянно требуют восстановления или замены по мере старения клетки. Даже у нерастущих клеток и организмов разлагающиеся молекулы должны быть заменены посредством биосинтеза. В данной главе мы делаем ударение на ключевую роль митохондрий в синтезе АТФ, необходимого клеткам для поддержания себя как высокоорганизованных единиц во Вселенной, всегда стремящейся к увеличению беспорядка (см. главу 2). Однако, помимо АТФ, биосинтез в цитозоле требует постоянного притока восстановительной способности в форме NADPH и углеродных скелетов. В большинстве описаний биосинтеза такого типа говорится, что необходимые углеродные скелеты напрямую приходят из расщепления сахаров, тогда как NADPH синтезируется в цитозоле в побочном пути расщепления сахаров (в пентозофосфатном цикле — альтернативе гликолізу). Но в условиях, когда питательных веществ много и доступно много АТФ, митохондрии также поставляют как углеродные скелеты, так и NADPH, необходимые для роста клетки. Для этого в матриксе митохондрий в цикле лимонной кислоты синтезируется дополнительный цитрат, который транс-

портируется по градиенту концентрации в цитозоль и метаболизируется для производства NADPH и углеродных скелетов для биосинтеза. Таким образом, например, в ходе ответа клетки на сигналы роста в цитозоле из экспортированного из митохондрий цитрата синтезируется большое количество ацетил-КоА, что ускоряет синтез жирных кислот и стеролов, необходимых для сборки новых мембран.

Митохондрии также играют ключевую роль в буферизации окислительно-восстановительного потенциала цитозоля. Клеткам необходим постоянный приток акцептора электронов NAD^+ для одной из центральных реакций гликолиза, в которой происходит превращение глицеральдегид-3-фосфата в 1,3-бисфосфоглицерат (см. рис. 2.72). В процессе NAD^+ превращается в NADH, и NAD^+ должен быть регенерирован путем переноса высокоэнергетических электронов NADH на другой акцептор.

Электроны NADH, в конце концов, послужат для окислительного фосфорилирования в митохондриях. Но внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для NADH. Таким образом, электроны передаются от NADH на меньшие молекулы в цитозоле, которые способны проходить через внутреннюю митохондриальную мембрану. Оказавшись в матриксе, эти малые молекулы передают электроны на NAD^+ с образованием митохондриального NADH, после чего они возвращаются в цитозоль для повторного использования. Эта так называемая система шунтирования отсутствует в некоторых специализированных клетках, например, в мышцах полета насекомых, которые производят особенно большое количество АТФ путем аэробного гликолиза. Здесь высокоэнергетические электроны глицеральдегид-3-фосфата передаются напрямую на внешнюю поверхность внутренней митохондриальной мембраны, что позволяет им быстрее войти в электрон-транспортную цепь, но с потерей некоторого количества полезной энергии.

В условиях голодания белки нашего организма расщепляются на аминокислоты, и аминокислоты импортируются в митохондрии и окисляются с образованием NADH для синтеза АТФ. Таким образом, митохондрии выполняют множество важных функций поддержания клеточного метаболизма, являясь местом протекания разнообразных реакций в различных условиях (рис. 14.32).

14.2.14. Бактерии также используют хемиосмотические механизмы для получения энергии

Бактерии используют удивительно разнообразные источники энергии. Некоторые, как животные клетки — аэробы: они синтезируют АТФ из сахаров, окисляемых до CO_2 и H_2O в гликолизе, цикле лимонной кислоты и дыхательной цепи плазматической мембраны, сходной с электрон-транспортной цепью внутренней мембраны митохондрий. Другие являются строгими анаэробами, получая энергию либо только в гликолизе (путем брожения), либо из электрон-транспортной цепи, в которой конечным акцептором электронов служит отличная от кислорода молекула. Альтернативным электронным акцептором может быть, например, соединение азота (нитрат или нитрит), серы (сульфат или сульфит) или углерода (фумарат или карбонат). Набор переносчиков электронов в плазматической мембране, похожий на набор переносчиков митохондриальной дыхательной цепи, передает электроны на эти акцепторы.

Несмотря на разнообразие бактерий, их плазматическая мембрана в большинстве случаев содержит АТФ-синтазу, очень похожую на митохондриальную.

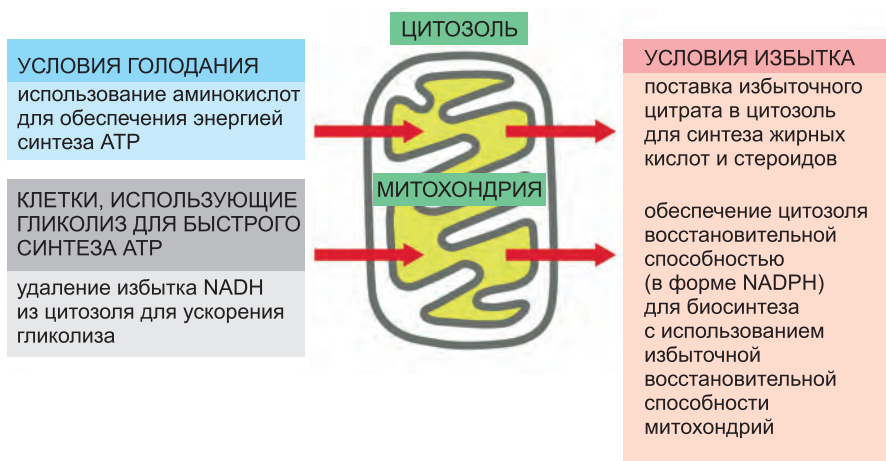


Рис. 14.32. Ключевые функции митохондрий в клеточном метаболизме, помимо синтеза АТФ. В митохондриях протекает множество основных метаболических реакций, приведенных здесь. Поэтому нельзя говорить о митохондриях только как о клеточных «печах», окисляющих пируват и жирные кислоты для обеспечения окислительного фосфорилирования.

У бактерий, использующих для получения энергии электрон-транспортную цепь, происходит откачка H^+ из клетки, и таким образом создается протондвижущая сила через плазматическую мембрану, заставляющая АТФ-синтазу синтезировать АТФ. В других бактериях АТФ-синтаза работает в обратном направлении, используя синтезированный в гликолизе АТФ для закачки H^+ и создания протонного градиента через мембрану. АТФ, используемая в этом процессе, образуется в результате процесса брожения (рассматриваемого в главе 2).

Таким образом, большинство бактерий, включая строгих анаэробов, поддерживает протонный градиент через плазматическую мембрану. Он может использоваться для работы жгутикового мотора и откачки из бактерии Na^+ при помощи Na^+/H^+ -антипорта, замещающего Na^+/K^+ -насос эукариотических клеток. Этот градиент также используется для активного входящего транспорта питательных веществ, например большей части аминокислот и многих сахаров: каждое соединение затаскивается в клетку вместе с одним или несколькими протонами через специфический симпорт (**рис. 14.33**). В животных клетках, наоборот, большая часть входящего транспорта через плазматическую мембрану протекает за счет градиента Na^+ (большая концентрация Na^+ снаружи, низкая — внутри), создаваемого Na^+/K^+ -насосом.

Некоторые необычные бактерии приспособились к обитанию в очень кислых средах, но им все равно необходимо поддерживать физиологический pH цитоплазмы. В случае этих клеток любой попытке создания электрохимического градиента H^+ будет противостоять неправильно направленный большой концентрационный градиент H^+ (концентрация H^+ выше снаружи, чем внутри). Предполагается, что поэтому некоторые бактерии заменяют H^+ на Na^+ во всех хемиосмотических механизмах. Дыхательная цепь откачивает Na^+ из клетки, и Na^+ -зависимая АТФ-синтаза синтезирует АТФ. Существование таких бактерий говорит о том, что принцип хемиосмоса более фундаментален, чем протондвижущая сила, на которой он обычно основывается.

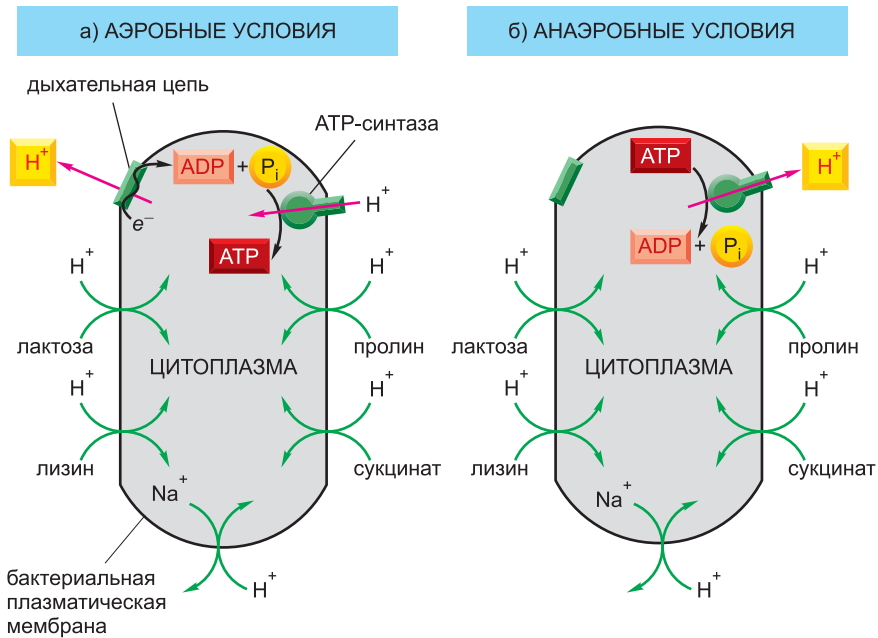


Рис. 14.33. Значение H^+ -зависимого транспорта для бактерий. Создаваемая на плазматической мембране протондвижущая сила закачивает питательные вещества в клетки и откачивает Na^+ . (а) В аэробных бактериях дыхательная цепь создает электрохимический протонный градиент через плазматическую мембрану; этот градиент затем используется как для транспорта в клетку некоторых питательных веществ, так и для синтеза АТФ (б) Та же бактерия, растущая в анаэробных условиях, получает АТФ в гликолизе. Затем АТФ-синтаза гидролизует некоторую часть АТФ для создания электрохимического протонного градиента, необходимого для протекания транспортных процессов, зависящих от дыхательной цепи на (а).

Заключение

Дыхательная цепь, встроенная во внутреннюю мембрану митохондрий, содержит три дыхательных ферментных комплекса, через которые проходят электроны на пути от $NADH$ к O_2 . Если любой из этих комплексов выделить и встроить в искусственную липидную везикулу, он будет качать H^+ при транспорте через него электронов. В этих комплексах электроны проходят по цепочке связанных с белком электронных переносчиков, включающих в себя гемы и железо-серные центры. Энергия, высвобождаемая по мере того, как электроны переходят на все более низкие энергетические уровни, используется для аллостерических перестроек ферментных комплексов, что способствует переносу протонов. Электроны переносятся между ферментными комплексами подвижными электронными переносчиками убихиноном и цитохромом с, замыкающими электрон-транспортную цепь. Электрон идет по следующему пути: $NADH \rightarrow NADH$ -дегидрогеназный комплекс \rightarrow убихинон \rightarrow цитохромный b-c₁ комплекс \rightarrow цитохром с \rightarrow цитохромоксидазный комплекс \rightarrow молекулярный кислород (O_2).

Сопряжение энергетически выгодного транспорта электронов с откачкой H^+ из матрикса создает электрохимический протонный градиент. Этот градиент используется для синтеза АТФ АТФ-синтазой, через которую H^+ возвращаются

обратно в матрикс. Тот факт, что АТФ-синтаза присутствует повсеместно в митохондриях, хлоропластах и прокариотах, говорит о центральной роли хемиосмотических процессов в клетке.

14.3. Хлоропласты и фотосинтез

Все животные и большинство микроорганизмов зависят от постоянного поглощения большого количества органических соединений из внешней среды. Эти соединения обеспечивают клетку как углеродными скелетами для биосинтеза, так и метаболической энергией для протекания клеточных процессов. Вероятно, первые организмы на примитивной Земле имели доступ к огромному количеству органических соединений, возникших в результате геохимических процессов, но, очевидно, большая их часть была переработана миллиарды лет назад. С тех пор почти все органические вещества, требующиеся живым клеткам, синтезировали *фотосинтетические организмы*, включая разнообразные фотосинтетические бактерии.

Наиболее сложными фотосинтетическими бактериями являются цианобактерии, которым необходим минимум питательных веществ. Они используют электроны воды и энергию света для превращения атмосферного CO_2 в органические соединения — этот процесс носит название *фиксации углерода*. В процессе расщепления воды [в полной реакции $n\text{H}_2\text{O} + n\text{CO}_2 \rightarrow (\text{CH}_2\text{O})_n + n\text{O}_2$] они также выделяют в атмосферу кислород, необходимый для окислительного фосфорилирования. Как мы рассмотрим в этом разделе, считают, что эволюция цианобактерий из более примитивных фотосинтетических бактерий сделала возможным развитие аэробных живых существ.

У растений и водорослей, которые появились много позже, фотосинтез протекает в специализированных внутриклеточных органеллах — **хлоропластах**. В дневные часы в хлоропластах происходит фотосинтез. Фотосинтетические клетки используют непосредственные продукты фотосинтеза NADPH и АТФ для синтеза многих органических молекул. У растений в их число входят низкомолекулярные сахара (обычно сахароза), которые клетка экспортирует для обеспечения метаболических нужд многочисленных нефотосинтетических клеток организма.

Биохимические и генетические исследования указывают на то, что предками хлоропластов были кислородобразующие фотосинтетические бактерии, которые эндоцитировали эукариотические клетки и жили с ними в симбиозе. Широко распространено мнение, что митохондрии также развились из эндоцитированных бактерий. Многочисленные различия между хлоропластами и митохондриями, по-видимому, можно объяснить различными бактериальными предками этих органелл, а также последующей эволюционной дивергенцией. Несмотря на это, фундаментальные механизмы светозависимого синтеза АТФ в хлоропластах похожи на описанные выше механизмы зависимого от дыхания синтеза АТФ в митохондриях.

14.3.1. Хлоропласт является одним из членов семейства пластид

Хлоропласты — наиболее важные представители семейства органелл **пластид**. Пластиды присутствуют во всех живых растительных клетках, каждый тип клеток несет свой собственный характерный компартмент. Все пластиды имеют определенные общие свойства. В частности, все пластиды данного вида растений несут множественные копии одного и того же относительно небольшого генома. Также все пластиды окружены оболочкой, состоящей из двух concentрических мембран.

Как обсуждалось в главе 12 (см. рис. 12.3), все пластиды развиваются из *пропластид*, маленьких органелл незрелых клеток растительной меристемы (рис. 14.34, а). Пропластиды развиваются в соответствии с нуждами каждой дифференцированной клетки, и конечный тип во многом определяется ядерным геномом. Если лист растет в темноте, его пропластиды разрастаются и превращаются в *этиопласты*, которые внутри несут набор полукристаллических мембран и желтый предшественник хлорофилла, а не сам хлорофилл. Если этот лист затем подвергнуть действию света, этиопласты быстро разовьются в хлоропласты, переведя предшественник хлорофилла в хлорофилл и синтезировав новые мембранные пигменты, фотосинтетические ферменты и компоненты электрон-транспортной цепи.

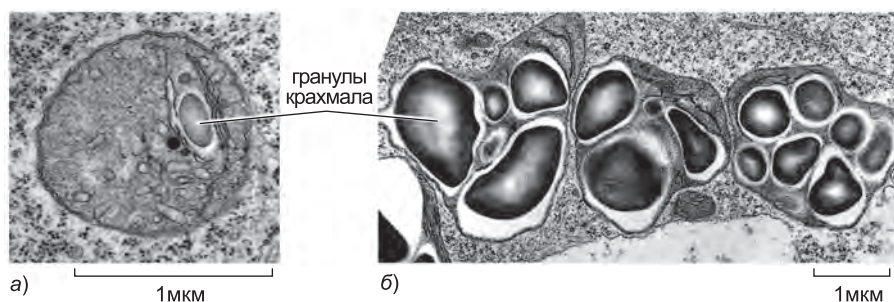


Рис. 14.34. Разнообразие пластид. (а) Пропластид из клетки кончика корня бобового растения. Обратите внимание на двойную мембрану; из внутренней мембраны также образовалось небольшое количество внутренних мембран. (б) Три амилопласта (разновидности лейкопластов), или запасующие крахмал пластиды, в корневом кончике сои. (Из V. Gunning and M. Steer, *Plant Cell Biology: Structure and Function*. Sudbury, MA: Jones & Bartlett, 1996.)

Лейкопласты — это пластиды, присутствующие во многих эпидермальных и внутренних тканях, которые не становятся зелеными и фотосинтезирующими. Лейкопласты — это не просто большие пропластиды. Распространенным типом лейкопластов являются *амилопласты* (рис. 14.34, б), которые накапливают полисахарид крахмал в запасующих тканях — он служит источником сахаров в будущем. В некоторых растениях, например в картофеле, амилопласты способны достигать размеров средней животной клетки.

Пластиды служат не только для фотосинтеза и запасаания питательных веществ. Растения также используют свои пластиды для компартментализации промежуточного метаболизма. Синтез пуринов и пиримидинов, большей части аминокислот и всех жирных кислот протекает в пластидах, тогда как в животных клетках эти соединения синтезируются в цитозоле.

14.3.2. Хлоропласты похожи на митохондрии, но обладают дополнительным компартментом

Хлоропласты используют хемиосмотические механизмы для преобразования энергии почти таким же образом, как митохондрии. Несмотря на то что они значительно крупнее (рис. 14.35, а), они устроены по сходному принципу. У них есть проницаемая внешняя мембрана, значительно менее проницаемая внутренняя мембрана, в которую встроены мембранные транспортные белки, и расположенное

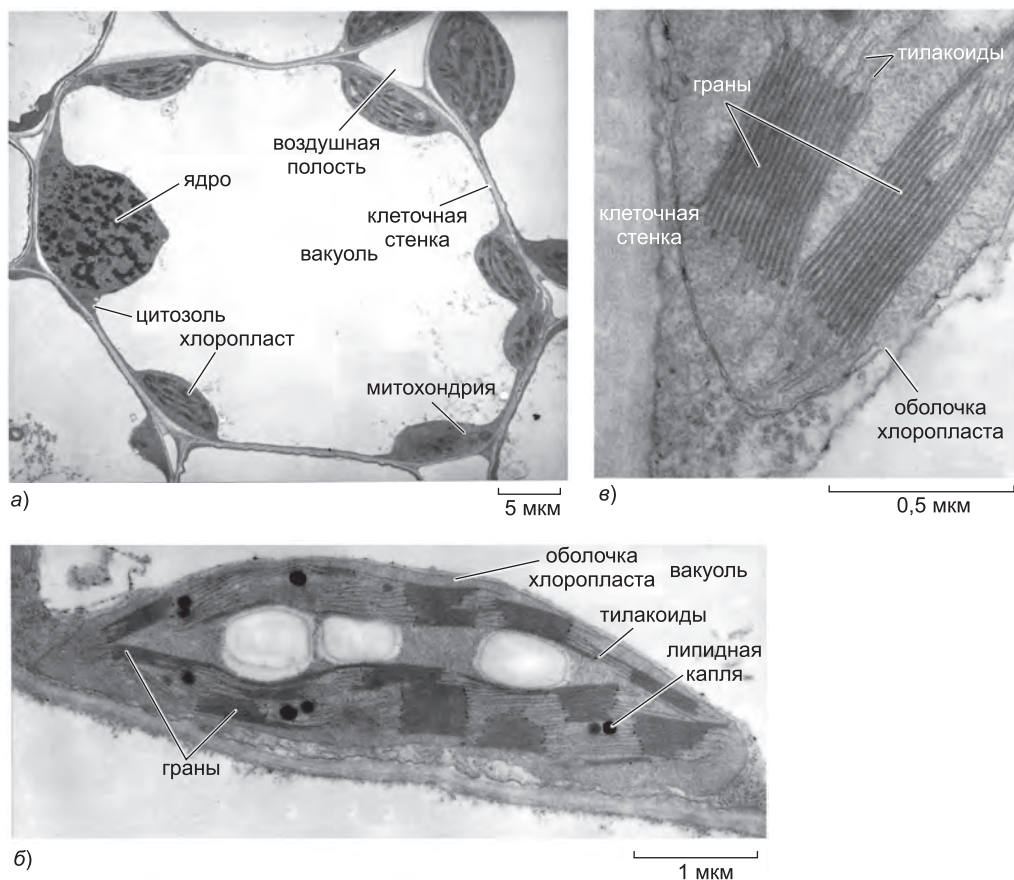


Рис. 14.35. Электронные микрофотографии хлоропластов. (а) В клетке листа пшеницы тонкий слой цитоплазмы, содержащий хлоропласты, ядро и митохондрии, окружает крупную вакуоль. (б) Тонкий срез отдельного хлоропласта, на котором видны оболочки, крахмальные зерна и липидные (жировые) капли, накопившиеся в стромах в результате проходящего там биосинтеза. (в) Две граны под большим увеличением. Грана — это стопка тилакоидов. (С любезного разрешения К. Plaskitt.)

между ними межмембранное пространство. Вместе эти мембраны образуют оболочку хлоропласта (рис. 14.35, б, в). Внутренняя мембрана окружает большое пространство, носящее название **стромы**. Строма похожа на митохондриальный матрикс и несет большое число метаболических ферментов. Как и митохондрии, хлоропласты имеют свой собственный геном и генетическую систему. Таким образом, строма также содержит специальный набор рибосом, РНК и хлоропластную ДНК.

Однако между внутренней организацией хлоропластов и митохондрий существует важное различие. Внутренняя мембрана хлоропластов не образует кристы и не несет электрон-транспортных цепей. Вместо этого, электрон-транспортные цепи, фотосинтетические светособирающие системы и АТФ-синтаза содержатся в **мембране тилакоидов**, третьей мембраны хлоропластов. Она образует набор уплотненных дисковидных мешочков, **тилакоидов** (рис. 14.36). Считается, что люмен каждого тилакоида сообщается с люменом остальных тилакоидов, из чего следует

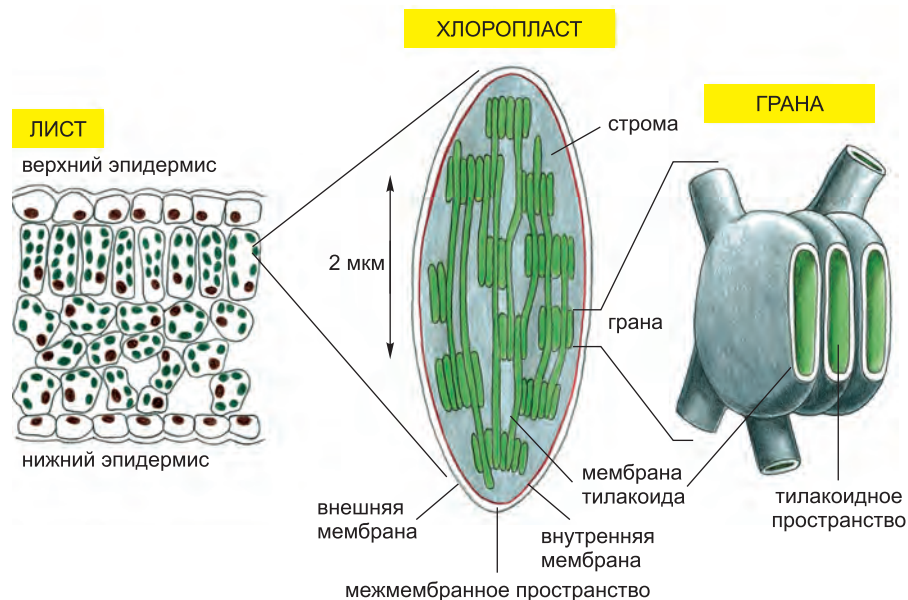


Рис. 14.36. Хлоропласт. Эта фотосинтетическая органелла содержит три различные мембраны (внешнюю мембрану, внутреннюю мембрану и тилакоидную мембрану), которые окружают три компартмента (межмембранное пространство, строму и тилакоидное пространство). Тилакоидная мембрана несет все производящие энергию системы хлоропластов, включая весь хлорофилл. На электронных микрофотографиях кажется, что эта мембрана разбита на отдельные единицы, окружающие индивидуальные уплощенные пузырьки (см. рис. 14.35), но, скорее всего, они все объединены в одну складчатую мембрану. Как показано, отдельные тилакоиды взаимосвязаны и слипаются с образованием гран.

определение третьего внутреннего компартмента — *тилакоидного пространства*, которое отделено от окружающей его стромы тилакоидной мембраной. Мембраны тилакоидов взаимодействуют друг с другом и образуют многочисленные локальные стопки, носящие название *гран*.

На **рис. 14.37** показаны основные сходства и различия между митохондриями и хлоропластами. Важным различием является то, что «гриб» АТФ-синтазы, где синтезируется АТФ, в хлоропласте выходит из тилакоидной мембраны в строму, тогда как во внутренней мембране митохондрий он выходит в матрикс.

14.3.3. Хлоропласты улавливают энергию света и используют ее для фиксации углерода

Мы можем объединить многочисленные протекающие в растениях во время фотосинтеза реакции в две широкие категории.

1. В реакциях **фотосинтетического электронного транспорта** (их также называют «световыми реакциями») энергия, полученная от Солнца, возбуждает электрон в зеленом органическом пигменте *хлорофилле*. В результате электрон становится способным двигаться по электрон-транспортной цепи тилакоидной мембраны точно так же, как электроны в дыхательной цепи митохондрий. Хлорофилл получает свои электроны от воды (H_2O) с образованием в качестве побочного продукта O_2 . Во время процесса переноса электрона через тилакоидную мембрану перекачивают-

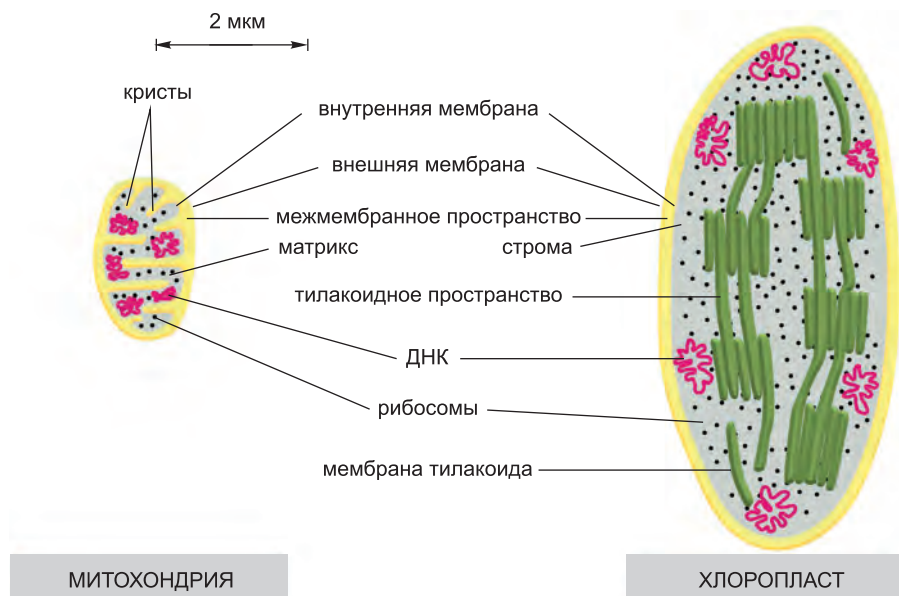


Рис. 14.37. Сравнение митохондрий и хлоропластов. Обычно хлоропласт значительно крупнее митохондрии и содержит, помимо внешней и внутренней мембран, тилакоидную мембрану, окружающую тилакоидное пространство. В отличие от внутренней мембраны хлоропластов, внутренняя мембрана митохондрий для увеличения площади поверхности образует складки — кристы.

ся H^+ , и образующийся при этом электрохимический протонный градиент служит движущей силой синтеза АТФ в строме. Конечным этапом этой последовательности реакций является перенос высокоэнергетических электронов и H^+ на $NADP^+$ с образованием NADPH. Все эти реакции протекают в хлоропласте.

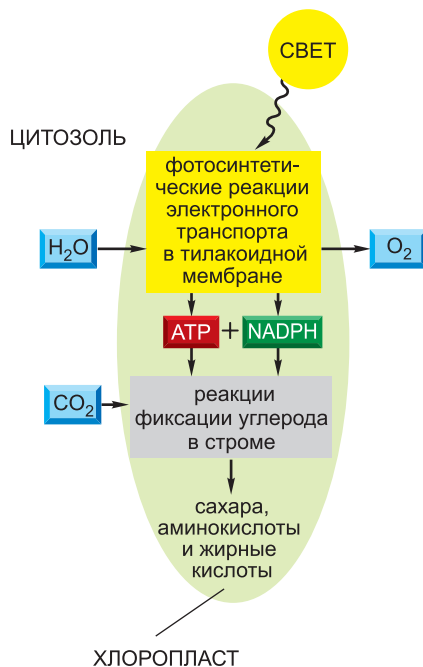
2. В **реакциях фиксации углерода** (которые также называют «темновыми реакциями») АТФ и NADPH, синтезированные в реакциях фотосинтетического электронного транспорта, служат источником энергии и восстановителем соответственно для преобразования CO_2 в углеводы. В листьях растений в реакциях фиксации углерода, начинающихся в строме и продолжающихся в цитозоле, синтезируются сахароза и многие другие органические молекулы. Сахароза экспортируется в другие ткани в качестве источника как органических молекул, так и энергии для роста.

Таким образом, образование АТФ, NADPH и O_2 (которое напрямую требует энергии света) и превращение CO_2 в углеводы (для которого энергия света требуется косвенно) — это разные процессы (**рис. 14.38**), хотя между ними существует сложная система обратных связей. Например, несколько хлоропластных ферментов, необходимых для фиксации углерода, инактивируются в темноте и реактивируются светозависимыми процессами электронного транспорта.

14.3.4. Фиксация углерода катализируется рибулозобисфосфаткарбоксилазой

Ранее в этой главе мы рассмотрели, как клетки синтезируют АТФ за счет большого количества свободной энергии, высвобождаемой при окислении углеводов

Рис. 14.38. Реакции фотосинтеза в хлоропласте. В реакциях фотосинтетического электронного транспорта происходит окисление воды и выделение кислорода. В реакциях фиксации углерода происходит ассимиляция (фиксация) углекислого газа для синтеза сахаров и других органических молекул.



до CO_2 и H_2O . Таким образом, очевидно, что обратная реакция, в которой CO_2 и H_2O объединяются с образованием углеводов, должна быть очень энергетически невыгодной и протекать только в сопряжении с энергетически выгодными реакциями.

На **рис. 14.39** показана центральная реакция **фиксации углерода**, в которой атом неорганического углерода превращается в органический углерод: атмосферный CO_2 объединяется с пятиуглеродным соединением рибулозо-1,5-бисфосфатом и водой с образованием двух молекул трехуглеродного соединения 3-фосфоглицерата. Эта реакция «захвата углерода», открытая в 1948 г., катализируется в строме хлоропластов крупным ферментом *рибулозобисфосфаткарбоксилазой*. Поскольку каждая молекула комплекса работает довольно медленно (пропуская всего около 3 молекул субстрата в секунду, в отличие от 1000 молекул, как другие ферменты), для реакции требуется необычно большое количество молекул фермента. Рибубозобисфосфаткарбоксилаза часто составляет более 50% всех белков хлоропласта и считается самым распространенным белком на Земле.

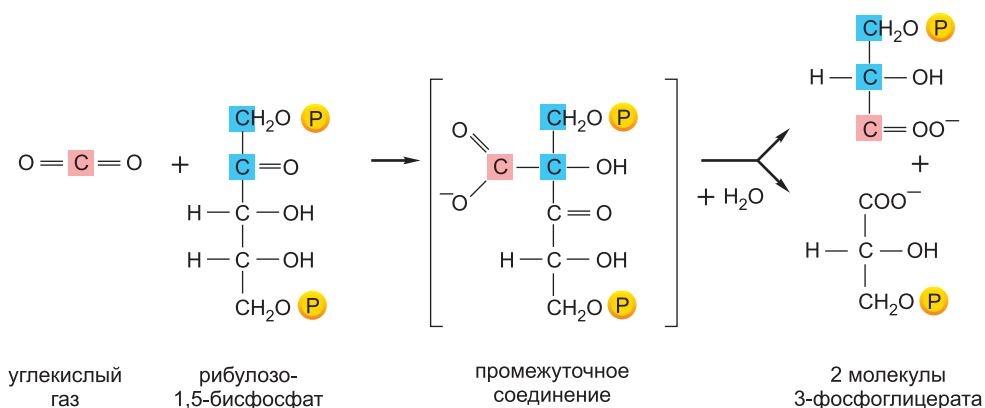


Рис. 14.39. Начальная реакция фиксации углерода. Эта реакция, в ходе которой углекислый газ превращается в органический углерод, катализируется в строме хлоропластов ферментом рибубозобисфосфаткарбоксилазой. Продуктом реакции является 3-фосфоглицерат, который также служит интермедиатом гликолиза. Два атома углерода, окрашенные голубым, используются для синтеза фосфогликолята, когда тот же фермент присоединяет кислород вместо CO_2 (см. текст).

14.3.5. Фиксация одной молекулы CO_2 требует трех молекул АТФ и двух молекул NADPH

Сама реакция фиксации углерода энергетически выгодна благодаря реакционной способности высокоэнергетического соединения *рибулозо-1,5-бисфосфата*, к которому присоединяется молекула CO_2 (см. рис. 14.39). Сложный метаболический путь синтеза рибулозо-1,5-бисфосфата требует затраты как АТФ, так и NADPH; он был открыт в одном из первых удачных биохимических экспериментов по использованию радиоизотопов в качестве меток. Этот **цикл фиксации углерода** (также известный как **цикл Кальвина**) показан на **рис. 14.40**. Он начинается, когда 3 молекулы CO_2 фиксируются рибулозобисфосфаткарбоксилазой с образованием шести молекул 3-фосфоглицерата (содержащих в общем $6 \times 3 = 18$ атомов углерода: 3 из CO_2 и 15 из рибулозо-1,5-бисфосфата). 18 углеродных атомов затем вступают в цикл реакций, в результате которого регенерируется 3 молекулы рибулозо-1,5-бисфосфата, вступившие в исходную реакцию фиксации углерода (они содержат $3 \times 5 = 15$ атомов углерода). Суммарным выходом цикла, таким образом, будет одна молекула *глицеральдегид-3-фосфата* (3 атома углерода).

На включение одной молекулы CO_2 в углевод в общей сложности затрачивается 3 молекулы АТФ и 2 молекулы NADPH. Суммарное уравнение выглядит следующим образом:



Таким образом, синтез органических молекул из CO_2 и H_2O требует как *энергии фосфатных связей* (в форме АТФ), так и *восстановительной способности* (в форме NADPH). Мы вернемся к этому важному вопросу позднее.

Глицеральдегид-3-фосфат, образующийся в хлоропластах в цикле фиксации углерода, представляет собой трехуглеродный сахар, который также служит центральным интермедиатом гликолиза. Большая его часть экспортируется в цитозоль, где он может быть превращен во фруктозо-6-фосфат и глюкозо-1-фосфат путем обращения некоторых реакций гликолиза (см. приложение 2.8, **стр. 120–121**). Затем глюкозо-1-фосфат преобразуется в нуклеотидсахар UDP-глюкозу, которая соединяется с фруктозо-6-фосфатом с образованием фосфата сахарозы, предшественника дисахарида сахарозы. **Сахароза** — это основная форма транспорта сахаров между клетками растения: так же как глюкоза транспортируется в крови животных, сахароза экспортируется из листьев по сосудистым пучкам в остальные части растения.

Большая часть глицеральдегид-3-фосфата, оставшегося в хлоропласте, превращается в стромах в крахмал. Как и гликоген в животных клетках, **крахмал** — это крупный полимер глюкозы, выполняющий функцию запасания углеводов (см. рис. 14.34, б). Синтез крахмала регулируется таким образом, что он образуется и запасается в виде крупных гранул в стромах хлоропластов во время избыточной фотосинтетической активности. Это происходит посредством реакций в стромах, направление которых обратно направлению гликолиза: они превращают глицеральдегид-3-фосфат в глюкозо-1-фосфат, который затем используется для синтеза нуклеотидсахара ADP-глюкозы, предшественника крахмала. Ночью растение расщепляет крахмал для поддержания метаболических нужд организма. Крахмал является важной составляющей рациона всех животных, питающихся растениями.

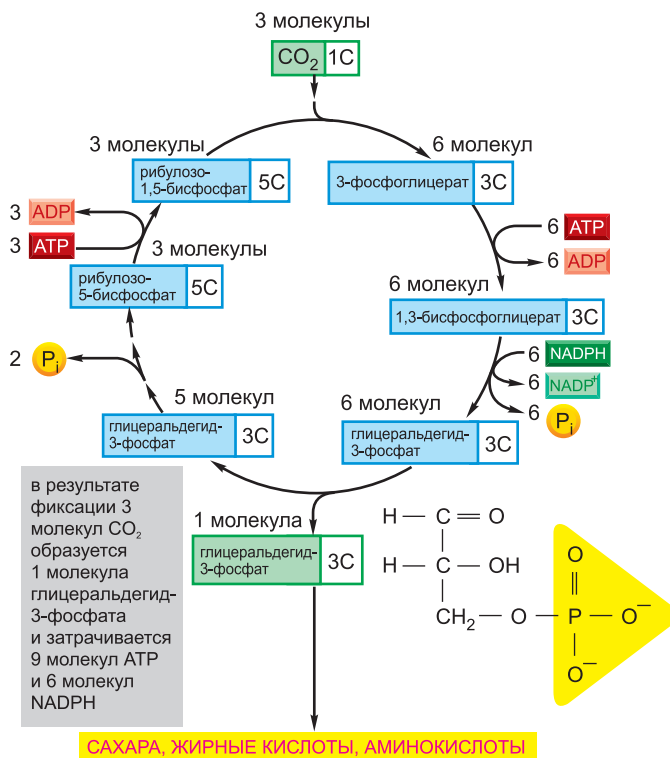


Рис. 14.40. Цикл фиксации углерода, в котором из CO_2 и H_2O образуются органические соединения. Количество углеродных атомов в каждом типе молекул указано рядом с его названием. Между глицеральдегид-3-фосфатом и рибулозо-5-фосфатом расположено множество интермедиатов, но здесь они для простоты опущены. Также не показан вход воды в цикл.

14.3.6. В некоторых растениях фиксация углерода компартментализована для усиления роста при низких концентрациях CO_2

Несмотря на то что рибулозобисфосфаткарбоксилаза обычно присоединяет CO_2 к рибулозо-1,5-бисфосфату, она также способна использовать O_2 вместо CO_2 , и если концентрация CO_2 мала, она будет это делать (см. рис. 14.39). Это первый шаг метаболического пути, носящего название **фотодыхания**, в результате которого происходит утилизация O_2 и выделение CO_2 без запасаемой полезной энергии. Во многих растениях около одной третьей фиксированного CO_2 теряется за счет его выделения в ходе фотодыхания.

Фотодыхание может быть необходимостью для растений, обитающих в жарких, сухих условиях, которые заставляют их закрывать свои устьица (газообменные поры в листьях) для предупреждения избыточной потери воды. Это, в свою очередь, вызывает сильное падение в листьях уровня CO_2 , что способствует фотодыханию. Однако у листьев многих растений, например кукурузы и сахарного тростника, растущих в жарких, засушливых областях, есть особая адаптация. В этих растениях цикл фиксации углерода протекает только в хлоропластах специализированных *клеток обкладки сосудистых пучков*, которые содержат все молекулы рибулозобисфосфаткарбоксилазы растения. Эти клетки защищены от воздуха и окружены

специализированным слоем *клеток мезофилла*, которые используют собранную их хлоропластами энергию для «закачки» CO_2 в клетки обкладки сосудистых пучков. В результате рибулозобисфосфаткарбоксилаза в достаточном количестве снабжается CO_2 , что значительно снижает фотодыхание.

Накачка CO_2 происходит в цикле реакций, начинающихся в цитозоле клеток мезофилла. Этап фиксации CO_2 катализируется ферментом, связывающим углекислый газ (в форме бикарбоната) и присоединяющим его к трехуглеродной молекуле (фосфоэнолпирувату) с образованием четырехуглеродной молекулы. Затем эта четырехуглеродная молекула диффундирует в клетки обкладки, где она расщепляется для высвобождения CO_2 и образования молекулы с тремя углеродными атомами. Цикл накачки завершается, когда трехуглеродная молекула возвращается в клетки мезофилла и преобразуется в свою исходную активную форму. Поскольку CO_2 сначала захватывается путем превращения его в соединение с четырьмя углеродами, накачивающие CO_2 растения называются *C_4 -растениями*. Все остальные растения называются *C_3 -растениями*, поскольку они фиксируют CO_2 в трехуглеродное соединение 3-фосфоглицерат (рис. 14.41).

Большинство направленных транспортных процессов требует затраты энергии, и накачка CO_2 в клетки обкладки C_4 -растений не исключение (происходит гидролиз АТФ; см. рис. 14.41, б). Однако в жарких, засушливых условиях для этого может понадобиться значительно меньше энергии, чем теряется при фотодыхании C_3 -растениями, поэтому C_4 -растения обладают потенциальным преимуществом. Более того, поскольку C_4 -растения способны фотосинтезировать при более низких концентрациях CO_2 в листьях, им реже требуется открывать устьица, и поэтому они могут фиксировать в общей сложности в два раза больше углерода на единицу потерянной воды, чем C_3 -растения. Такой тип фиксации углерода независимо эволюционировал в нескольких различных линиях растений. Несмотря на то что абсолютное большинство видов растений относятся к C_3 -группе, C_4 -растения, например кукуруза и сахарный тростник, значительно эффективнее преобразуют энергию света в биомассу, чем C_3 -растения, например злаковые. Поэтому они играют особую роль в мировой агрокультуре.

14.3.7. Фотосинтез основан на фотохимии молекул хлорофилла

Теперь, обсудив реакции фиксации углерода, вернемся к вопросу о том, как в хлоропласте в результате фотосинтетических реакций электронного транспорта образуются АТФ и NADPH, необходимые для синтеза углеводов из CO_2 и H_2O . Свет, поглощенный молекулами **хлорофилла**, предоставляет необходимую энергию (рис. 14.42). Процесс преобразования энергии начинается, когда квант света (фотон) возбуждает молекулу хлорофилла. Это приводит к тому, что электрон в хлорофилле переходит с одной молекулярной орбитали на другую орбиталь с большей энергией. Такая возбужденная молекула нестабильна и стремится как можно скорее вернуться в свое исходное, невозбужденное состояние. Это происходит одним из трех способов:

- 1) путем преобразования избыточной энергии в тепло (молекулярные движения) или некоторое сочетание тепла и света большей длины волны (флуоресценция); это происходит, когда изолированная молекула хлорофилла в растворе поглощает энергию света;

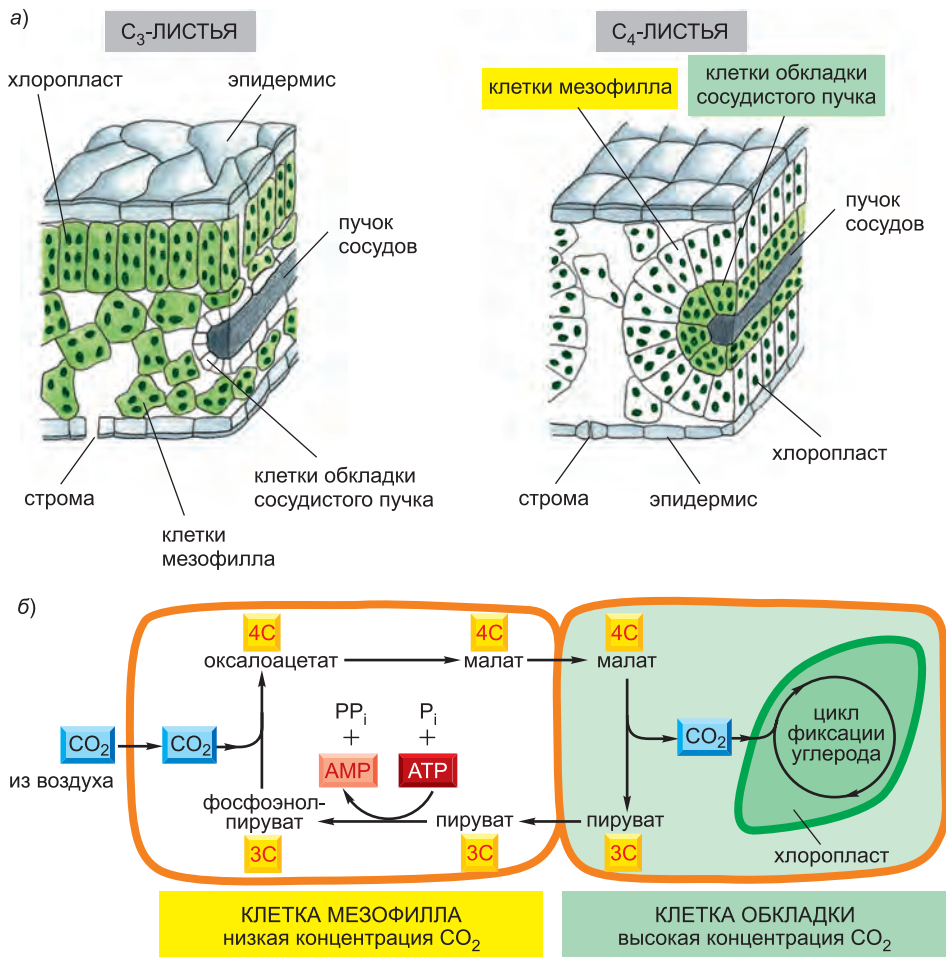


Рис. 14.41. Накачка CO₂ в C₄-растениях. (а) Сравнение анатомии листьев C₃- и C₄-растений. Клетки с зеленым цитозолем в толще листа содержат хлоропласты, в которых протекает нормальный цикл фиксации углерода. В C₄-растениях клетки мезофилла специализируются на накачке CO₂, а не на фиксации углерода. Таким образом, они создают высокое соотношение между CO₂ и O₂ в клетках обкладки сосудистых пучков, где протекает цикл фиксации. Сосудистые пучки транспортируют синтезированную в обкладке сахарозу из листьев в другие ткани. (б) Как углекислый газ концентрируется в клетках обкладки посредством использования энергии ATP в клетках мезофилла.

- 2) путем передачи энергии (но не электрона) на соседнюю молекулу хлорофилла в процессе, носящем название *резонансного переноса энергии*;
 - 3) путем переноса отрицательно заряженного высокоэнергетического электрона на другую близлежащую молекулу, *акцептор электрона*, после чего положительно заряженный хлорофилл возвращается в исходное состояние путем захвата низкоэнергетического электрона другой молекулы, *донора электрона*.
- В процессе фотосинтеза последние два механизма значительно преобладают благодаря двум разным белковым комплексам: резонансному переносу энергии способствует *антенный комплекс*, а переносу высокоэнергетического электро-

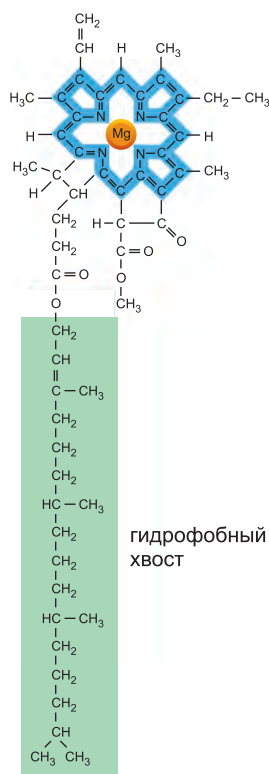


Рис. 14.42. Структура хлорофилла. Атом магния удерживается в порфириновом кольце, родственном связывающему железо в геме порфириновому кольцу (см. рис. 14.22). Электроны, делокализованные по связям, показаны голубым.

на — *фотохимический реакционный центр*. Эти два типа белковых комплексов, работая вместе, делают возможной почти всю жизнь на Земле. Теперь мы рассмотрим, как они работают.

14.3.8. Фотохимический реакционный центр и антенный комплекс образуют фотосистему

Большие мультибелковые комплексы, носящие название **фотосистем**, катализируют преобразование энергии света, захваченной возбужденными молекулами хлорофилла, в форму, полезную для клетки. Фотосистема состоит из двух взаимосвязанных компонентов. Первый компонент, антенный комплекс, образован белками, связанными с большим набором пигментных молекул, улавливающих энергию света. Эта энергия затем переходит на второй компонент, фотохимический реакционный центр, состоящий из комплекса белков и молекул хлорофилла, позволяющих преобразовать солнечную энергию в энергию химических связей.

Антенный комплекс играет важнейшую роль в улавливании энергии света. В хлоропластах он состоит из нескольких различных мембранных белковых комплексов (известных как светособирающие комплексы): вместе эти белки связывают несколько сотен (в расчете на один реакционный центр) определенным образом ориентированных в тилакоидной мембране молекул хлорофилла. Антенный комплекс также несет дополнительные пигменты *каротиноиды*, которые защищают хлорофилл от окисления и помогают собирать свет других длин волн. Когда свет возбуждает молекулу хлорофилла в антенном комплексе, энергия быстро передается от одной молекулы на другую по механизму резонансного переноса энергии до тех пор, пока она не достигнет специальной пары молекул хлорофилла в реакционном центре. Таким образом, антенный комплекс служит своего рода воронкой, собирающей энергию света и направляющей ее в место, где она может быть эффективно использована (**рис. 14.43**).

Фотохимический реакционный центр — это трансмембранный пигмент-белковый комплекс, от которого зависит весь процесс фотосинтеза. Считается, что он появился 3 миллиарда лет назад в примитивных фотосинтетических бактериях. Особая пара молекул хлорофилла в реакционном центре является надежной «ловушкой» для кванта света, поскольку попав в нее, возбужденный электрон мгновенно передается на цепь электронных акцепторов белкового комплекса (**рис. 14.44**). Быстро удаляя высокоэнергетический электрон с хлорофиллов, фотохимический электронный центр переносит его в среду, где он значительно более устойчив. Таким образом, электрон должным образом подготовлен к последующим реакциям. Для них необходимо больше времени и они приводят к образованию светозависимых высокоэнергетических электронов, уходящих в транспортные цепи.

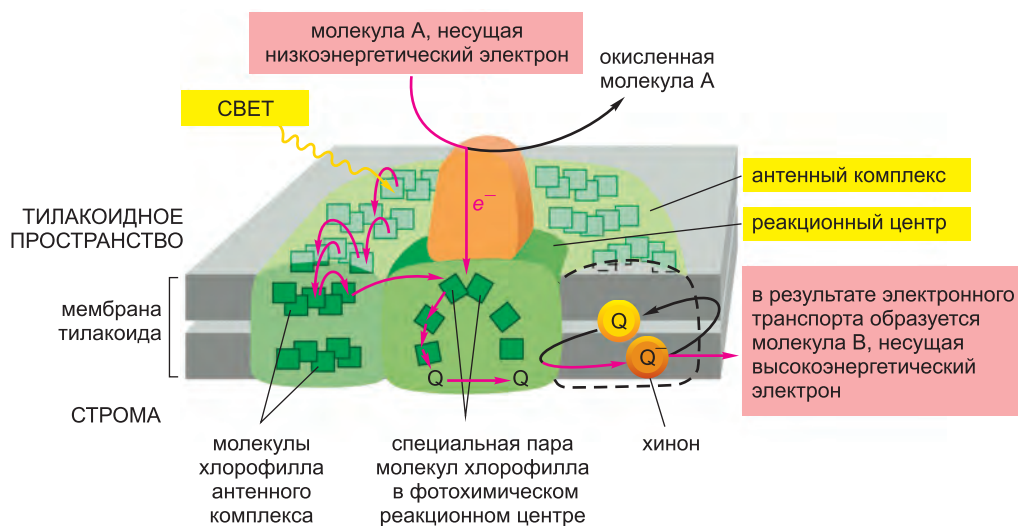


Рис. 14.43. Антенный комплекс и фотохимический реакционный центр в фотосистеме. Антенный комплекс собирает энергию света в форме возбужденных электронов. Энергия возбужденных электронов направляется через последовательные резонансные переносы энергии на специальную пару молекул хлорофилла в фотохимическом реакционном центре. Затем в реакционном центре образуется высокоэнергетический электрон, который может быть быстро передан в электрон-транспортную цепь в тилакоидной мембране посредством хинона.

14.3.9. В реакционном центре уловленная хлорофиллом энергия преобразует слабый донор электронов в сильный

Описанный выше перенос электрона, составляющий часть фотохимических реакций, активно изучается при помощи методов быстрой спектроскопии. На **рис. 14.45** показаны общие принципы того, как свет обеспечивает энергией перенос электрона со слабого электронного донора (молекулы с высоким сродством к электрону) на молекулу сильного электронного донора в восстановленной форме (молекулу с низким сродством к электрону). Специальная пара молекул хлорофилла в реакционном центре расположена так, чтобы передавать электроны на особым образом ориентированную соседнюю молекулу в том же белковом комплексе (акцептор электронов). Молекула хлорофилла, потерявшая электрон, становится положительно заряженной, но она быстро получает новый электрон от близлежащего электронного донора и возвращается в свое невозбужденное, незаряженное состояние (**рис. 14.45, а, оранжевый электрон**). Затем в более медленных реакциях происходит восстановление отданного донором электрона, и высокоэнергетический электрон, образовавшийся на хлорофилле, передается в электрон-транспортную цепь (**рис. 14.45, б**). Таким образом, энергия возбуждения хлорофилла, которая в норме уходила бы в флуоресценцию или тепло, здесь используется для образования единственного сильного донора электронов (молекулы, несущей высокоэнергетический электрон) там, где раньше ее не было.

Фотосистема пурпурных бактерий устроена несколько проще, чем эволюционно родственные ей фотосистемы хлоропластов. Она послужила хорошей моделью для изучения деталей реакций. Реакционный центр этой фотосистемы представляет

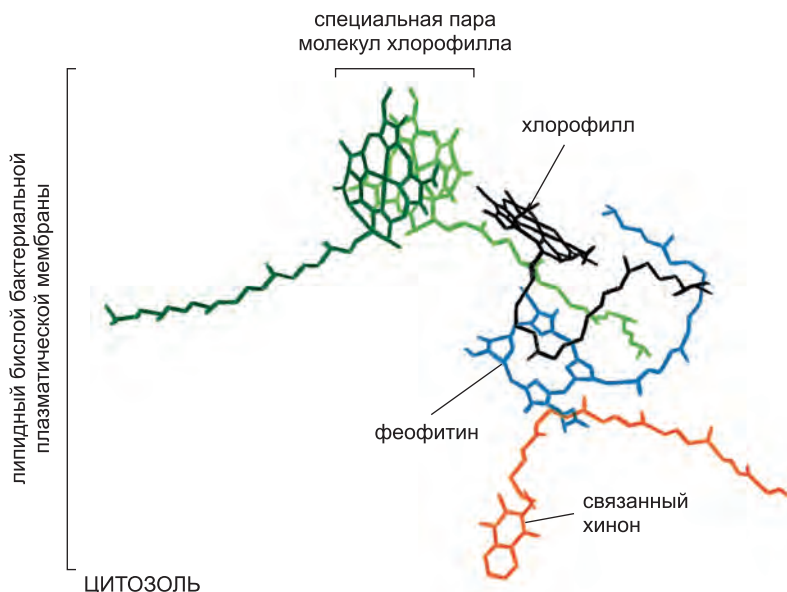


Рис. 14.44. Упаковка электронных переносчиков в фотохимическом реакционном центре пурпурной бактерии. Показанные пигментные молекулы удерживаются внутри трансмембранного белка и окружены липидным бислоем в бактериальной плазматической мембране. Электрон в специальной паре молекул хлорофилла возбуждается по резонансному механизму хлорофиллом антенного комплекса, и затем возбужденный электрон поэтапно переносится с пары хлорофиллов на хинон (см. также рис. 14.45). У растений электронные переносчики реакционных центров организованы сходным образом (см. рис. 14.47).

собой крупный пигмент-белковый комплекс, который можно солубилизировать детергентами и выделить в активной форме. Определение при помощи рентгеноструктурной кристаллографии его трехмерной структуры было триумфом структурного анализа (см. рис. 10.34). Эта структура и кинетические данные предоставили нам почти все имеющиеся на данный момент знания о первичных реакциях электронного транспорта при фотосинтезе. На **рис. 14.46**, для сравнения с рис. 14.45, *a*, показана реальная последовательность переноса электрона.

У пурпурных бактерий электрон, заполняющий возникшую в результате светозависимого разделения зарядов «дырку» на хлорофилле, приходит из циклического потока электронов, опосредуемого цитохромом (см. *оранжевое* выделение на рисунке 14.45); образующийся сильный электронный донор — это хинон. Одна из двух фотосистем в хлоропластах высших растений точно так же создает хинон, несущий высокоэнергетические электроны. Однако, как мы обсудим дальше, поскольку электроны на эту фотосистему поставляются из воды в результате фотосинтеза в растениях, в отличие от фотосинтеза в пурпурных бактериях, то выделяется большое количество кислорода.

14.3.10. В результате нециклического фотофосфорилирования образуются NADPH и ATP

В результате фотосинтеза в растениях и цианобактериях напрямую образуются ATP и NADPH в двухстадийном процессе, носящем название **нециклического**

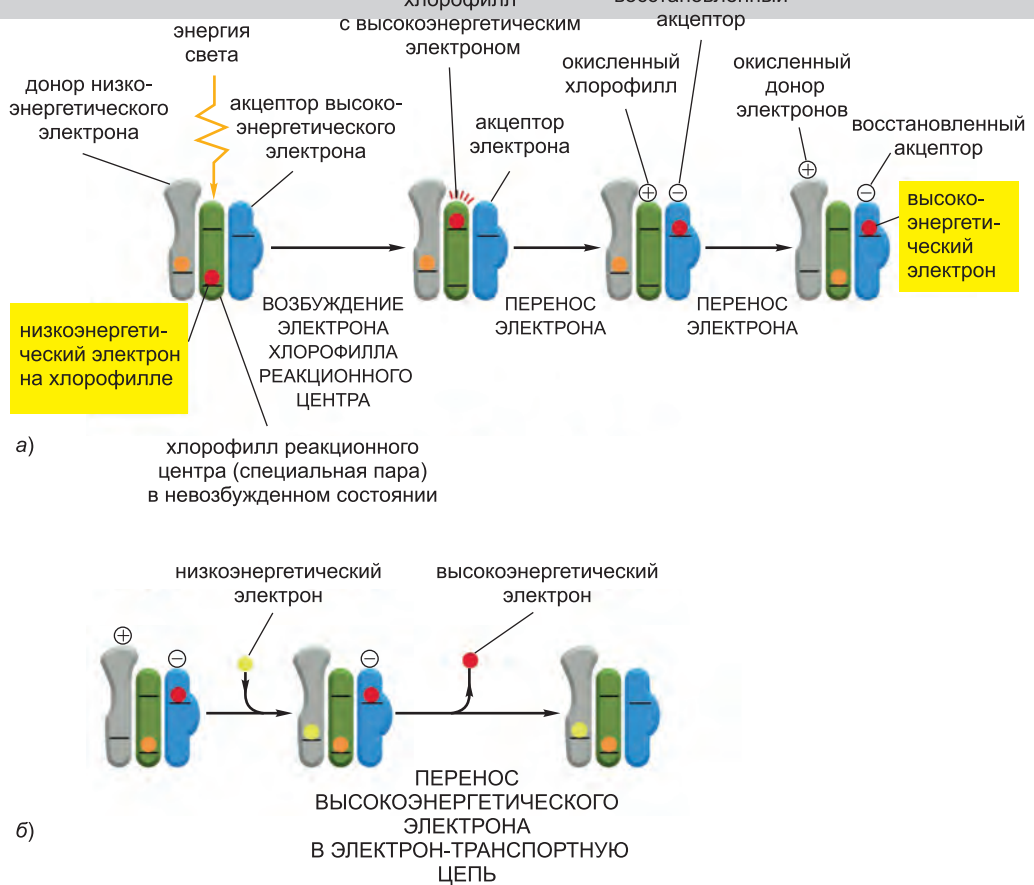


Рис. 14.45. Как молекула хлорофилла реакционного центра использует энергию света. (а) Начальные события в реакционном центре приводят к разделению зарядов. Молекула хлорофилла специальной пары в пигмент-белковом комплексе особым образом ориентирована для того, чтобы потенциальный низкоэнергетический электронный донор (оранжевый) и потенциальный высокоэнергетический электронный акцептор (зеленый) были легко доступны. Когда свет придает энергию электрону молекулы хлорофилла (красный электрон), возбужденный электрон мгновенно передается на акцептор и благодаря этому частично стабилизируется. Положительно заряженная молекула хлорофилла затем быстро притягивает низкоэнергетический электрон от электронного донора и возвращается в состояние покоя, что приводит к еще большему разделению зарядов и дальнейшей стабилизации высокоэнергетического электрона. Для протекания этих реакций необходимо меньше 10^{-6} с. (б) На заключительном этапе этого процесса, следующего за этапами на (а), фотосинтетический реакционный центр возвращается в свое исходное состояние покоя за счет захвата нового низкоэнергетического электрона и переноса высокоэнергетического электрона, образовавшегося на хлорофилле, в электрон-транспортную цепь мембраны. Как мы обсудим дальше, основным источником низкоэнергетических электронов для фотосистемы II в хлоропласте служит вода; в результате в тилакоидной мембране свет создает высокоэнергетические электроны из низкоэнергетических электронов воды.

фотофосфорилирования. Благодаря тому что две фотосистемы — I и II — работают последовательно для перевода электрона в достаточно высокоэнергетическое состояние, электрон может быть перенесен на NADPH. По мере того как высокоэнергетические электроны проходят по сопряженным фотосистемам для синтеза NADPH, часть их энергии перекачивается на синтез ATP.

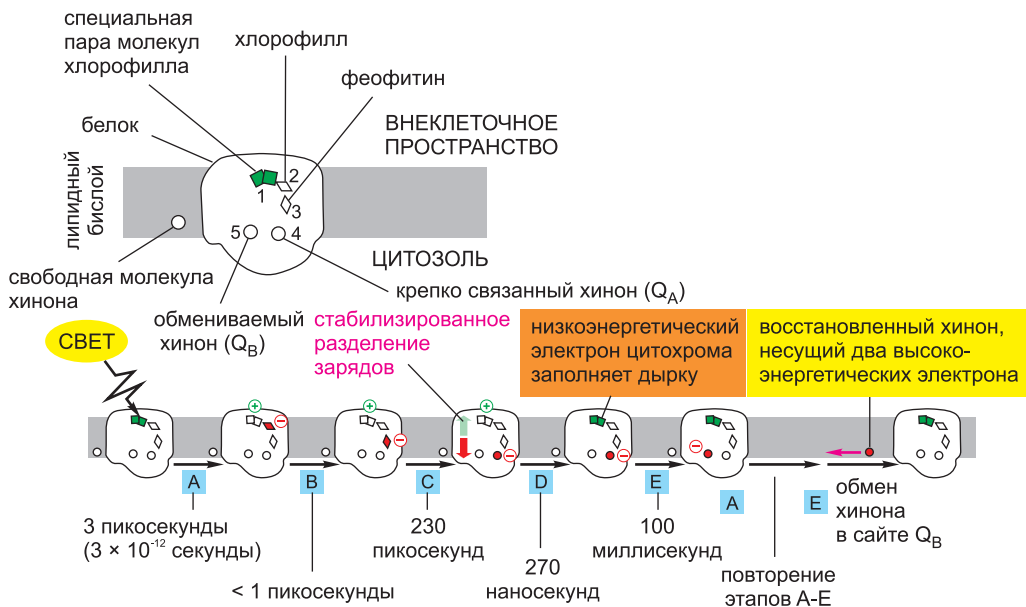


Рис. 14.46. Перенос электрона в фотохимическом реакционном центре пурпурных бактерий. Сходная последовательность реакций протекает в эволюционно родственной фотосистеме II растений. Слева сверху представлена схема ориентаций молекул, переносящих электрон. Они совпадают с переносчиками на рис. 14.45 с добавлением обменяемого хинона (Q_B) и подвижного хинона (Q), растворенного в липидном бислое. Электронные переносчики 1-5 в определенных положениях связаны с трансмембранным белком, состоящим из 596 аминокислотных остатков и двух субъединиц (см. рис. 10.34). После возбуждения фотоном света высокоэнергетический электрон уходит с молекулы пигмента, что очень быстро создает устойчивое *разделение зарядов*, как показано на A–C, где пигментная молекула, несущая высокоэнергетический электрон, окрашена *красным*. Затем протекают этапы D и E. После того как второй фотон повторил последовательность со вторым электроном, обменяемый хинон высвобождается в бислой, неся два высокоэнергетических электрона. Этот хинон быстро теряет заряд, присоединяя два протона (см. рис. 14.24).

Первая из двух фотосистем, по историческим причинам парадоксально называемая *фотосистемой II*, обладает уникальной способностью выделять электроны из воды. Кислороды двух молекул воды связываются с кластером из четырех атомов марганца на люминальной поверхности комплекса реакционного центра фотосистемы II (рис. 14.47). Этот кластер делает возможным последовательное удаление электронов из воды, что необходимо для заполнения электронных «дырок», созданных светом в молекулах хлорофилла реакционного центра. Как только из двух молекул воды удаляется четыре электрона (для чего необходимо четыре кванта света), выделяется O_2 . Таким образом, фотосистема II катализирует реакцию $2H_2O + 4 \text{ фотона} \rightarrow 4H^+ + 4e^- + O_2$. Как мы упоминали, когда обсуждали электрон-транспортную цепь митохондрий, поглощающую O_2 и выделяющую воду, такой механизм препятствует выделению частично окисленных молекул воды в форме опасных, обладающих высокой реакционной способностью кислородных радикалов. Фактически весь кислород земной атмосферы синтезирован таким образом.

Ядро реакционного центра фотосистемы II гомологично описанному выше бактериальному реакционному центру и оно также создает сильных доноров электро-

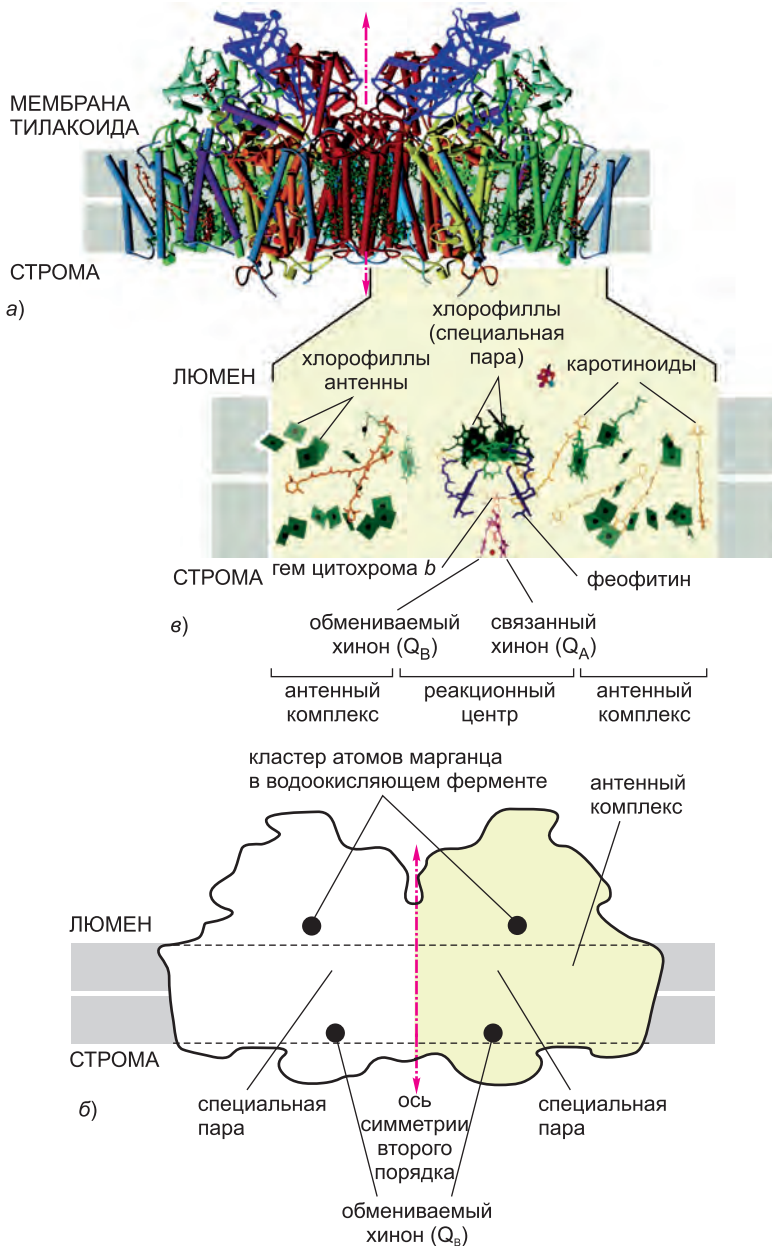


Рис. 14.47. Структура фотосистемы II растений и цианобактерий. Изображенная структура представляет собой димер, организованный вокруг оси симметрии второго порядка (красные пунктирные стрелки). Каждый мономер состоит из 16 интегральных мембранных белковых субъединиц, трех субъединиц с люминальной стороны, 36 связанных хлорофиллов, 7 каротиноидов, двух феофитинов, двух гемов, двух пластохинонов и одного марганцевого кластера в водоокисляющем комплексе. (а) Полная трехмерная структура димера. (б) Схема димера с основными составляющими. (в) Мономер, на котором показаны только небелковые молекулы структуры, т. е. связанные с белком пигменты и электронные переносчики; зеленые структуры — хлорофилл. (Адаптировано из K. N. Ferreira et al., *Science* 303: 1831–1838, 2004. С любезного разрешения издательства AAAS.)

нов в форме растворенных в липидном бислое мембраны восстановленных молекул хинонов. Хиноны передают электроны на H^+ -насос, носящий название *цитохром b_6-f комплекса*, который напоминает цитохром $b-c_1$ комплекс дыхательной цепи митохондрий. Цитохром b_6-f комплекс закачивает H^+ через тилакоидную мембрану в тилакоидное пространство (или в цитозоль через плазматическую мембрану у цианобактерий), и образующийся в результате электрохимический градиент служит движущей силой синтеза АТФ АТФ-синтазой (рис. 14.48).

Конечным акцептором электронов в этой электрон-транспортной цепи служит вторая фотосистема, *фотосистема I*, принимающая электрон в «дырку», образованную светом в молекуле хлорофилла ее реакционного центра. Все электроны, попадающие на фотосистему I, переходят в конце концов на очень высокий энергетический уровень, что позволяет им перейти на железо-серный кластер ферредоксина, а затем — на $NADP^+$ с образованием $NADPH$.

Описанная здесь схема фотосинтеза известна как *Z-схема*. За счет двух стадий возбуждения электрона, катализируемых каждой из фотосистем, электрон переносится с воды, которая обычно очень крепко держит свои электроны (редокс-потенциал = +820 мВ), на $NADPH$, который в норме слабо удерживает электроны (редокс-потенциал = -320 мВ) (рис. 14.49).

Одному кванту видимого света не хватает энергии для проталкивания электрона от низа фотосистемы II на верх фотосистемы I, что, по-видимому, является необходимой разностью энергии для того, чтобы эффективно перенести электрон от воды на $NADP^+$. Последовательное использование двух фотосистем делает возможным использование для этого двух квантов света. Более того, остается еще достаточно энергии для того, чтобы связывающая две фотосистемы электрон-транспортная цепь могла перекачивать H^+ через тилакоидную мембрану (или плазматическую мембрану у цианобактерий), и, следовательно, для синтеза АТФ АТФ-синтазой за счет энергии света.

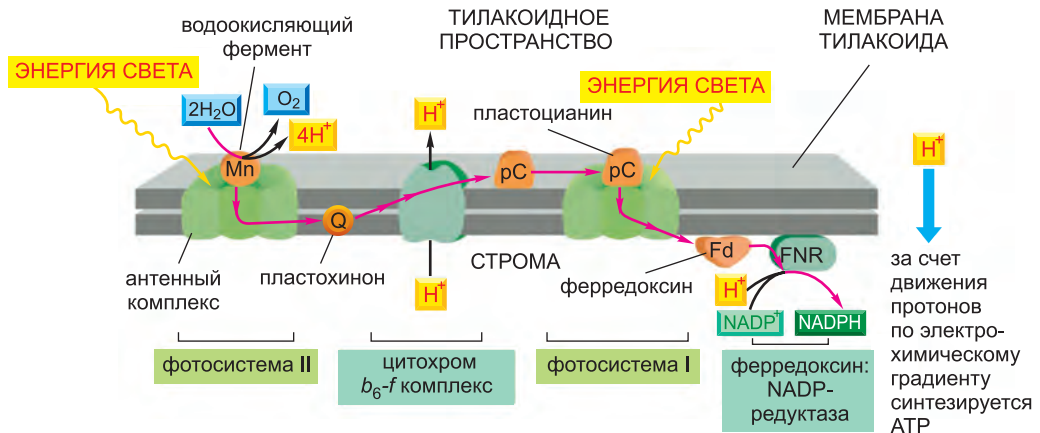


Рис. 14.48. Транспорт электронов при фотосинтезе в мембране тилакоида. Подвижными переносчиками электронов в цепи являются пластохинон (который очень похож на убихинон митохондрий), пластоцианин (маленький содержащий медь белок) и ферредоксин (маленький белок с железо-серным кластером). Цитохром b_6f комплекс похож на цитохром $b-c_1$ комплекс митохондрий и $b-c$ комплекс бактерий (см. рис. 14.73): все три комплекса принимают электроны от хинонов и перекачивают H^+ через мембрану. H^+ , высвобождаемые в результате окисления воды в люмен тилакоида, и H^+ , поглощенные при синтезе $NADPH$ в строме, также вносят вклад в формирование электрохимического градиента H^+ . Как показано, этот градиент служит движущей силой синтеза АТФ АТФ-синтазой, расположенной в той же мембране.

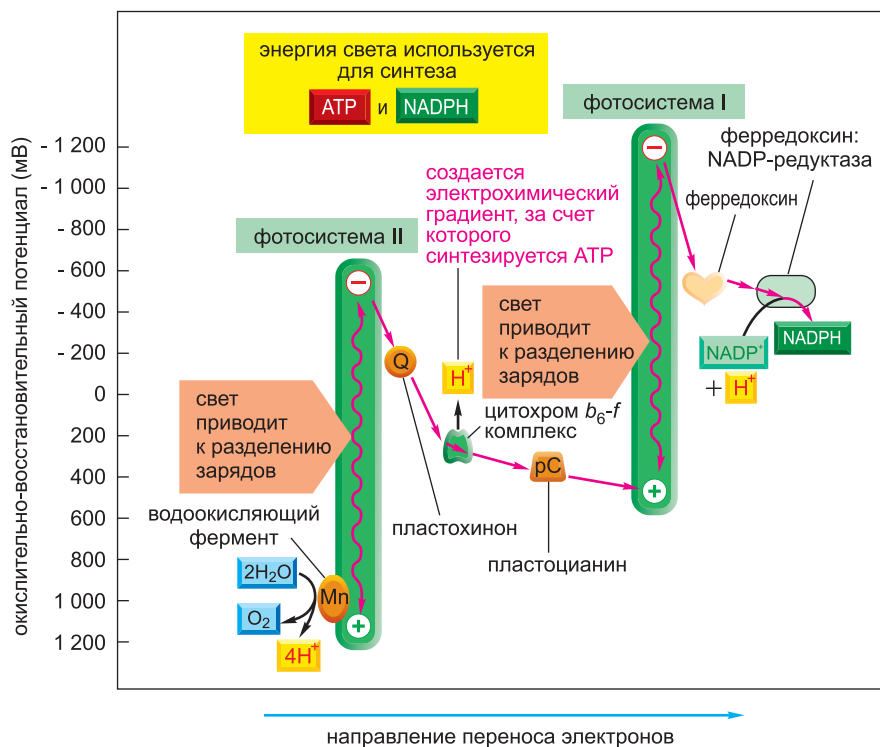


Рис. 14.49. Изменение редокс-потенциала во время фотосинтеза. Положение молекулы вдоль вертикальной оси отражает ее редокс-потенциал. Обратите внимание, что фотосистема II передает полученные из воды электроны на фотосистему I. Суммарный последовательный электронный поток через фотосистемы идет от воды к NADP⁺, и в результате него синтезируются NADPH и ATP.

ATP синтезируется АТФ-синтазой, которая использует электрохимический протонный градиент, создаваемый тремя сайтами H⁺-активности, указанными на рис. 14.48. Данная Z-схема синтеза ATP носит название нециклического фотофосфорилирования для того, чтобы отличать ее от циклической схемы, в которой участвует только фотосистема I (см. в тексте).

14.3.11. Хлоропласты способны синтезировать ATP посредством циклического фосфорилирования без синтеза NADPH

В рассмотренной чуть выше схеме нециклического фосфорилирования покидающие фотосистему II высокоэнергетические электроны используются для синтеза ATP и передаются на фотосистему I для обеспечения энергией образования NADPH. В результате, образуется чуть больше 1 молекулы ATP на пару электронов, перенесенных с H₂O на NADP⁺ для синтеза молекулы NADPH. Но для фиксации углерода необходимо 1,5 молекулы ATP на одну молекулу NADPH (см. рис. 14.40). Для синтеза дополнительного ATP хлоропласты способны переключать фотосистему I в циклический режим, заставляя ее синтезировать ATP вместо NADPH. В этом процессе, носящем название *циклического фосфорилирования*, высокоэнергетические электроны переносятся с фотосистемы I на цитохром b_6-f комплекс, а не на NADP⁺. С цитохром b_6-f комплекса электроны возвращаются на фотосистему I в низкоэнерге-

тическом состоянии. Единственным выходом этого процесса, помимо преобразования части энергии света в тепло, является перекачка H^+ через тилакоидную мембрану цитохром b_6-f комплексом, по мере того как по нему проходят электроны. Таким образом, увеличивается электрохимический протонный градиент, служащий движущей силой синтеза АТФ. (Это аналогично циклическому процессу, протекающему в пурпурных несерных бактериях на рис. 14.73 ниже.)

В заключение отметим, что в циклическом фосфорилировании участвует только фотосистема I, и образуется только АТФ без образования NADPH или O_2 . Чтобы определить, сколько энергии света будет преобразовано в восстановитель (NADPH), а сколько в высокоэнергетические фосфатные связи, клетка регулирует относительные активности циклического и нециклического электронных потоков.

14.3.12. Структуры фотосистем I и II родственны и похожи на структуру бактериальных фотосистем

Механизмы фундаментальных клеточных процессов, например репликации ДНК или дыхания, обычно оказываются одинаковыми у эукариотических клеток и бактерий, хотя количество участвующих белковых компонентов у эукариот значительно больше. Эукариоты эволюционировали из прокариот, и дополнительные белки, по-видимому, отобраны для дальнейшей эволюции потому, что они увеличивали эффективность, усиливали полезную для клетки регуляцию, или и то и другое.

Фотосистемы — это хороший пример эволюции такого типа. Атомные структуры обеих эукариотических фотосистем расшифрованы методами электронной и рентгеновской кристаллографии, и анализ показал близкое родство между фотосистемой I, фотосистемой II и фотохимическим реакционным центром пурпурных бактерий (рис. 14.50).

14.3.13. В митохондриях и хлоропластах действует одна и та же протондвижущая сила

Наличие тилакоидного пространства разделяет хлоропласт на три внутренних компартмента, в отличие от митохондрий, где их два. Однако суммарный эффект переноса H^+ в этих двух органеллах одинаков. Как показано на рис. 14.51, в хлоропластах H^+ закачиваются из стромы (pH 7,5) в тилакоидное пространство (pH ~4,5), что создает градиент, составляющий около 3 единиц pH. Это соответствует протондвижущей силе через тилакоидную мембрану в 180 мВ, которая обеспечивает энергией синтез АТФ АТФ-синтазой, встроенной в эту мембрану. Эта сила практически равна силе через внутреннюю митохондриальную мембрану, но большую ее часть составляет градиент pH, а не мембранный потенциал, как в случае митохондрий.

В митохондриях и хлоропластах каталитический сайт АТФ-синтазы находится при pH около 7,5 в крупном компартменте органеллы (матриксе или строме), содержащем множество растворимых ферментов. Именно здесь синтезируется весь АТФ органеллы (см. рис. 14.51).

14.3.14. Белки-переносчики внутренней мембраны хлоропластов контролируют обмен метаболитов с цитозолем

Если выделить хлоропласты, не повреждая их внутреннюю мембрану, можно наблюдать селективную проницаемость этой мембраны, отражающую присутствие в ней специфических транспортеров. Например, значительная часть образованного

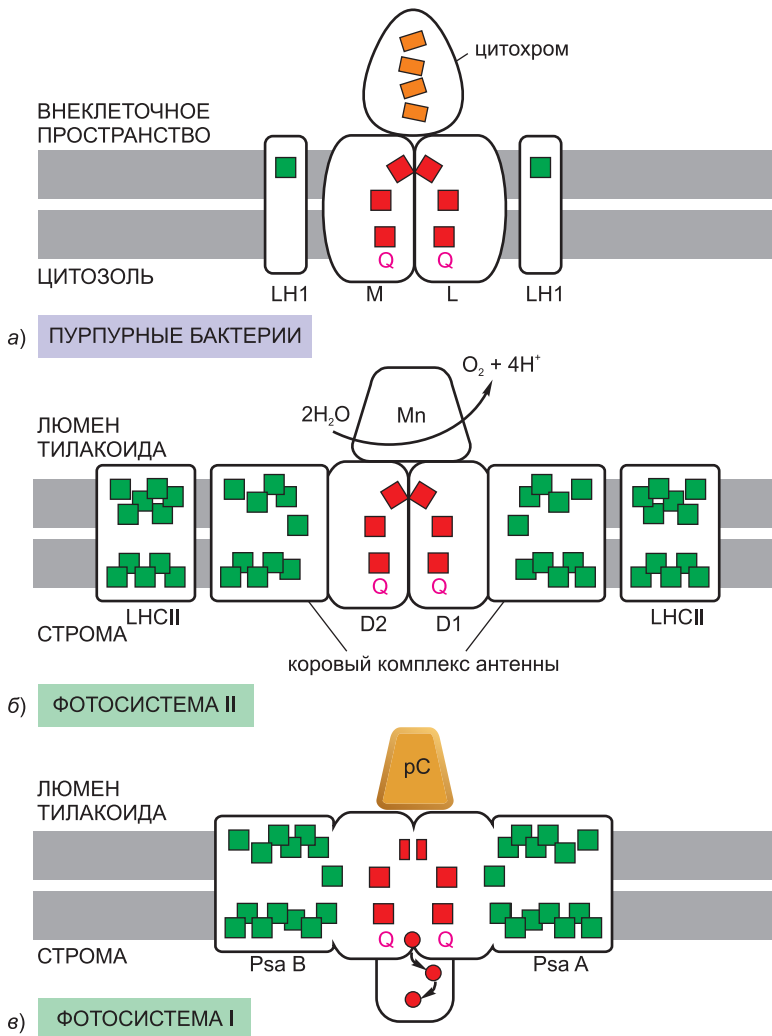


Рис. 14.50. Сравнение трех типов фотосинтетических реакционных центров. Пигменты, участвующие в поглощении энергии света, окрашены *зеленым*; пигменты, участвующие в центральных фотохимических реакциях — *красным*. (а) Фотохимический реакционный центр пурпурных бактерий, подробная структура которого показана на рис. 10.34, содержит две родственные белковые субъединицы, **L** и **M**, которые связывают пигменты, участвующие в основных этапах фотосинтеза (см. рис. 14.46). Низкоэнергетические электроны переносятся на возбужденный хлорофилл с цитохрома. **LH1** — это пигмент-белковый комплекс, участвующий в улавливании света. (б) Фотосистема II содержит белки **D₁** и **D₂**, которые гомологичны субъединицам **L** и **M** на (а). Низкоэнергетические электроны переносятся на возбужденный хлорофилл с воды в марганцевом кластере. **LHCII** — это светособирающий комплекс, который отдает энергию корковым белкам антенны (см. рис. 14.4). (в) Фотосистема I содержит белки **Psa A** и **Psa B**, каждый из которых эквивалентен слиянию белка **D₁** или **D₂** с антенным белком фотосистемы II. Низкоэнергетические электроны переносятся на возбужденный хлорофилл с обратимо связанного пластоцианина (**Pc**). Как показано, в фотосистеме I высокоэнергетические электроны передаются с неподвижного хинона (**Q**) на последовательность трех железо-серных кластеров (*красные кружки*). (Модифицировано из K. Rhee, E. Morris, J. Barber and W. Kühlbrandt, *Nature* 396: 283–286, 1998; W. Kühlbrandt, *Nature* 411: 896–899, 2001. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

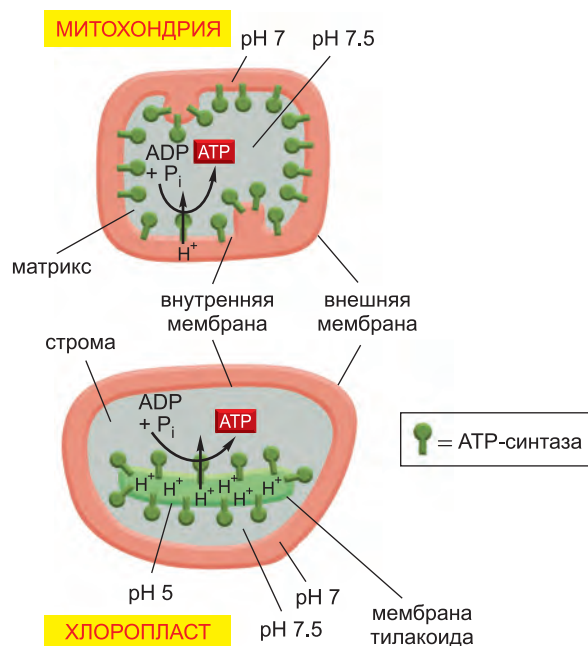


Рис. 14.51. Сравнение потоков H^+ и ориентации АТФ-синтазы в митохондриях и хлоропластах. Компартменты с одинаковыми величинами pH окрашены одним цветом. Протондвижущая сила через тилакоидную мембрану почти полностью состоит из градиента pH; высокая проницаемость этой мембраны для ионов Mg^{2+} и Cl^- позволяет току этих ионов снимать большую часть мембранного потенциала. По-видимому, митохондриям требуется большой мембранный потенциал, потому что без него pH матрикса для создания нужной протондвижущей силы должен быть равен 10, что слишком много для нормальной работы белков.

в строме хлоропласта в результате фиксации CO_2 глицеральдегид-3-фосфата экспортируется эффективным антипортом, обменивающим фосфаты трехуглеродных сахаров на неорганический фосфат.

Глицеральдегид-3-фосфат в норме является достаточным источником углеводов для цитозоля, и используется клеткой в качестве исходного вещества для различных биосинтезов, включая синтез сахарозы на экспорт. Но это не все, для чего служит эта молекула. Как только глицеральдегид-3-фосфат достигает цитозоля, он быстро превращается (в гликолизе) в 1,3-фосфоглицерат, а затем в 3-фосфоглицерат (см. **стр. 92**) с образованием одной молекулы АТФ и одной молекулы NADP. (В сходной двухстадийной реакции, протекающей в обратную сторону, в цикле фиксации углерода образуется глицеральдегид-3-фосфат; см. рис. 14.40.) В результате экспорт глицеральдегид-3-фосфата из хлоропласта создает не только основной источник фиксированного углерода для клетки, но также обеспечивает ее восстановительной способностью и АТФ, необходимыми для метаболизма вне хлоропласта.

14.3.15. В хлоропластах также протекает биосинтез

Помимо фотосинтеза, в хлоропластах также происходит биосинтез многих важных соединений. Ферменты в строме хлоропластов катализируют, например, образование всех жирных кислот клетки и некоторых аминокислот. Точно так же восстановительная способность активированных светом электронов является движущей силой восстановления в хлоропласте нитрита (NO_2^-) до аммиака (NH_3); аммиак затем служит источником азота для синтеза аминокислот и нуклеотидов. Таким образом, метаболическое значение хлоропластов для растений и водорослей распространяется далеко за пределы фотосинтеза.

Заключение

Хлоропласты и фотосинтетические бактерии получают высокоэнергетические электроны благодаря фотосинтезу, при котором происходит захват

электронов, возбужденных за счет поглощения света молекулами хлорофилла. Фотосистемы состоят из антенного комплекса, который собирает энергию, и фотохимического реакционного центра, где определенным образом ориентированный комплекс белков и пигментов позволяет электронным переносчикам улавливать энергию возбужденного электрона хлорофилла. Лучшее всего изучен фотохимический реакционный центр пурпурных фотосинтетических бактерий, содержащих только одну фотосистему. У растений и цианобактерий фотосистем две. Две различные фотосистемы обычно связаны последовательно и переносят электрон от воды на NADP^+ с образованием NADPH , в процессе чего образуется трансмембранный электрохимический протонный градиент. В этих взаимосвязанных фотосистемах молекулярный кислород O_2 образуется в качестве побочного продукта в результате отрыва четырех электронов от двух определенным образом расположенных молекул воды. Трехмерные атомные структуры фотосистем I и II обладают удивительной гомологией со структурой фотосистем пурпурных фотосинтетических бактерий, что указывает на значительный уровень консервативности этих белков, несмотря на миллиарды лет эволюции.

По сравнению с митохондриями, хлоропласты обладают дополнительной внутренней мембраной (тилакоидной мембраной) и третьим внутренним пространством (тилакоидным пространством, или люменом). Все электрон-транспортные процессы протекают в тилакоидной мембране: для синтеза ATP H^+ откачиваются из тилакоидного пространства, а в результате обратного тока H^+ через ATP -синтазу в строме хлоропластов образуется ATP . Этот ATP и образовавшийся в ходе фотосинтеза NADPH используются в многочисленных биосинтетических реакциях в строме хлоропластов, включая крайне важный цикл фиксации углерода, в результате которого из CO_2 образуются углеводы. Наравне с другими важными продуктами хлоропластов это углевод экспортируется в цитозоль клетки, где он в форме глицеральдегид-3-фосфата служит для всей остальной клетки источником органического углерода, ATP и восстановительной способности.

14.4. Генетические системы митохондрий и пластид

Точка зрения, что митохондрии и пластыды эволюционировали от бактерий, поглощенных предковыми клетками, может объяснить, почему эти органеллы несут свой собственный геном, а также биосинтетическую машинерию для синтеза РНК и белков. Митохондрии и пластыды никогда не образуются из ниоткуда, они появляются в результате роста и деления уже существующих митохондрий или пластид. В среднем каждая органелла должна удваивать свою массу в каждом поколении клеток, а затем распределяться по дочерним клеткам. Даже неделящиеся клетки должны компенсировать органеллы, деградировавшие в результате непрерывного процесса обновления, или образовывать дополнительные органеллы, если в них есть необходимость. Рост и пролиферация органелл — это сложный процесс, поскольку белки митохондрий и пластид кодируются в двух местах: ядерном геноме и геномах, содержащихся в самих органеллах (рис. 14.52). В главе 12 мы обсудили, как определенные белки и липиды импортируются из цитозоля в митохондрии и хлоропласты. Теперь мы опишем, как поддерживаются геномы этих органелл и какой вклад они вносят в биогенез.

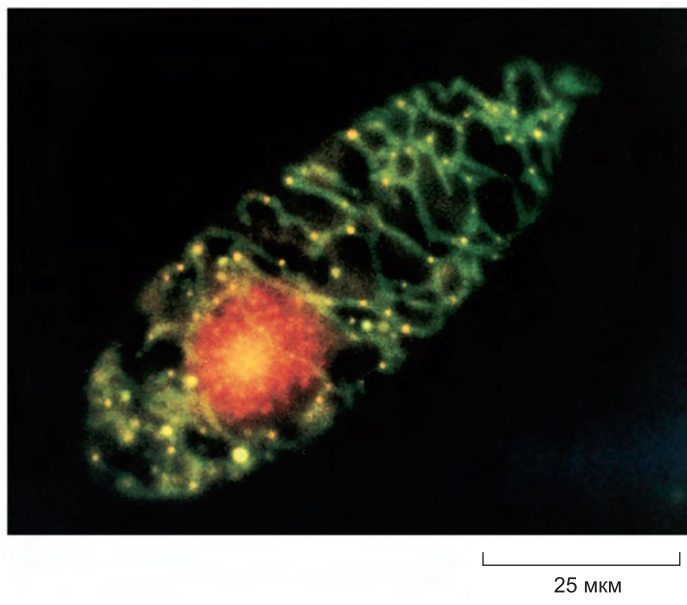


Рис. 14.52. Митохондриальная и ядерная ДНК, окрашенная флуоресцентным красителем. На этой микрофотографии показано распределение ядерного генома (красный) и множественных митохондриальных геномов (ярко-желтые пятна) в клетке *Euglena gracilis*. ДНК окрашена этидиум бромидом, флуоресцентным красителем, испускающим красный свет. Пространство матрикса митохондрий окрашено также зеленым флуоресцентным красителем, благодаря которому видно, что митохондрии образуют разветвленную сеть, распространяющуюся по всему цитозолю. Перекрывание зеленого матрикса и красной ДНК придает геному митохондрий желтый цвет. (Из Y. Hayashi and K. Ueda, *J. Cell Sci.* 93: 565–570, 1989. С любезного разрешения The Company of Biologists.)

14.4.1. Митохондрии и хлоропласты содержат полные генетические системы

Для биосинтеза митохондрий и пластид требуется вклад двух разных генетических систем. Специальные гены в ядерной ДНК кодируют большую часть белков митохондрий и хлоропластов. Органеллы импортируют эти белки из цитозоля после того, как они синтезированы на цитоплазматических рибосомах. ДНК органелл кодирует другие белки, которые синтезируются на рибосомах внутри органеллы при помощи синтезированных там же мРНК, определяющих аминокислотную последовательность (рис. 14.53). Поток белков между цитозолем и этими органеллами однонаправлен, поскольку в норме белки из митохондрий и хлоропластов в цитозоль не экспортируются. Исключением служат особые условия, когда клетка готовится в апоптозу. Как мы подробно рассмотрим в главе 19, митохондрии высвобождают через внешнюю митохондриальную мембрану белки межмембранного пространства (включая цитохром *c*), что является частью сложного сигнального пути, служащего для того, чтобы клетка претерпела запрограммированную клеточную смерть.

Процессы транскрипции ДНК, синтеза белка и репликации ДНК (рис. 14.54) в органеллах протекают там, где расположен геном: в матриксе митохондрий или в строме хлоропластов. Несмотря на то что белки, опосредующие эти генетические процессы, уникальны для этой органеллы, большинство из них кодируется ядерным

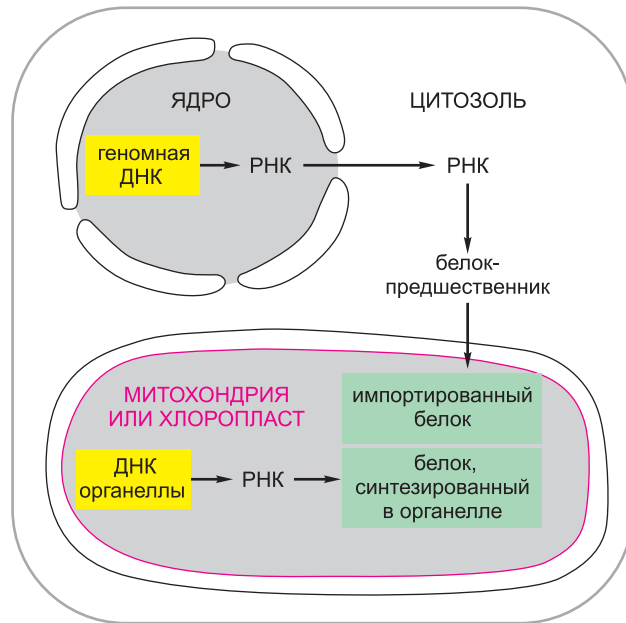


Рис. 14.53. Синтез митохондриальных и хлоропластных белков двумя различными генетическими системами. Большая часть белков этих органелл кодируется ядром и должна быть импортирована из цитозоля.

геномом. Это тем более удивительно, что аппарат белкового синтеза органелл больше похож на бактериальный, чем на эукариотический. Особенное сходство обнаружено в хлоропластах. Например, хлоропластные рибосомы очень похожи на рибосомы *E. coli* как по структуре, так и по чувствительности к различным антибиотикам (таким как хлорамфеникол, стрептомицин, эритромицин и тетрациклин). Более того, синтез белков в хлоропластах, как и в бактериях, начинается с *N*-формилметионина, а не с метионина, как в цитозоле эукариотических клеток. Хотя митохондриальные генетические системы меньше напоминают геном современных бактерий, чем генетические системы хлоропластов, их рибосомы также чувствительны к антибактериальным антибиотикам, а белковый синтез начинается с *N*-формилметионина.

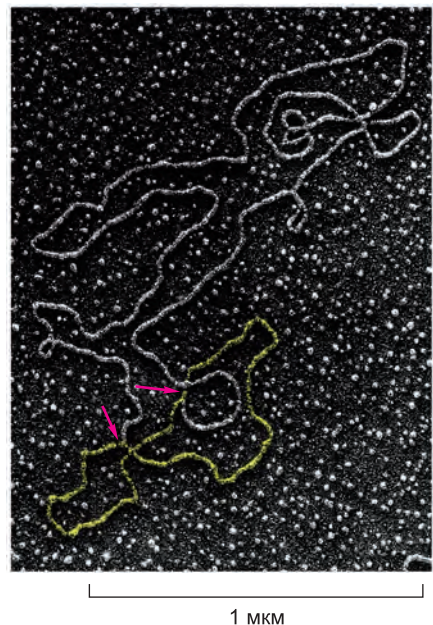


Рис. 14.54. Электронная микрофотография митохондриальной ДНК животной клетки в процессе репликации ДНК. Кольцевая ДНК генома реплицировалась только между двумя точками, отмеченными красными стрелками. Новосинтезированная ДНК окрашена желтым. (С любезного разрешения David A. Clayton.)

14.4.2. Рост и деление органелл определяют число митохондрий и пластид в клетке

В клетках млекопитающих митохондриальная ДНК составляет менее 1 % всей клеточной ДНК. Однако в других клетках, например, листьях высших растений или очень больших яйцеклетках амфибий, в митохондриях или хлоропластах может содержаться бо́льшая доля клеточной ДНК (таблица 14.2), и значительная часть синтеза РНК и белков протекает именно в этих органеллах.

Таблица 14.2. Относительное содержание митохондриальной и хлоропластной ДНК в некоторых клетках и тканях

Организм	Тип ткани или клеток	Количество молекул ДНК на органеллу	Количество органелл на клетку	Доля (в %) ДНК органеллы от общей клеточной ДНК
Митохондриальная ДНК				
Крыса	печень	5–10	1 000	1
Дрожжи*	вегетативные	2–50	1–50	15
Лягушка	яйцеклетка	5–10	107	99
Хлоропластная ДНК				
<i>Chlamydomonas</i>	вегетативные	80	1	7
Кукуруза	листья	0–300**	20–40	0–15**

*Значительная разница в числе и размере митохондрий в клетках дрожжей объясняется их делением и слиянием.

**В случае кукурузы количество хлоропластной ДНК значительно падает в зрелых листьях; после остановки клеточных делений хлоропластная ДНК деградирует, и белковый синтез протекает за счет устойчивых мРНК.

Митохондрии и пластиды достаточно велики для наблюдения в живых клетках в световой микроскоп. Например, митохондрии можно визуализировать путем экспрессии в клетках созданного методами генетической инженерии химерного белка, состоящего из митохондриального белка и зеленого флуоресцентного белка GFP, или клетки можно инкубировать вместе с флуоресцентным красителем, специфически транспортируемым в митохондрии за счет электрохимического градиента. Полученные этими методами изображения показывают, что митохондрии живых клеток — это динамические структуры: они, как упоминалось ранее, часто делятся, сливаются и изменяют свою форму (рис. 14.55). Деление и слияние этих органелл представляет собой топологически сложный процесс, поскольку органеллы окружены двойной мембраной, и митохондрии должны поддерживать во время протекания этих процессов единство своих компартментов (рис. 14.56).

Число и форма митохондрий значительно изменяется в различных типах клеток и может меняться в одном и том же типе в зависимости от физиологических условий от многочисленных сферических или цилиндрических органелл до одной разветвленной органеллы (ретикулума). Это контролируется относительными скоростями деления и слияния, которые регулируются соответствующими GTPазами, расположенными в мембране митохондрий. Более того, по необходимости может регулироваться общая масса органелл на клетку. Например, при регулярной стимуляции покоящихся скелетных мышц, заставляющей их сокращаться продолжительное время, происходит значительное увеличение в митохондрии (иногда в 5–10 раз).

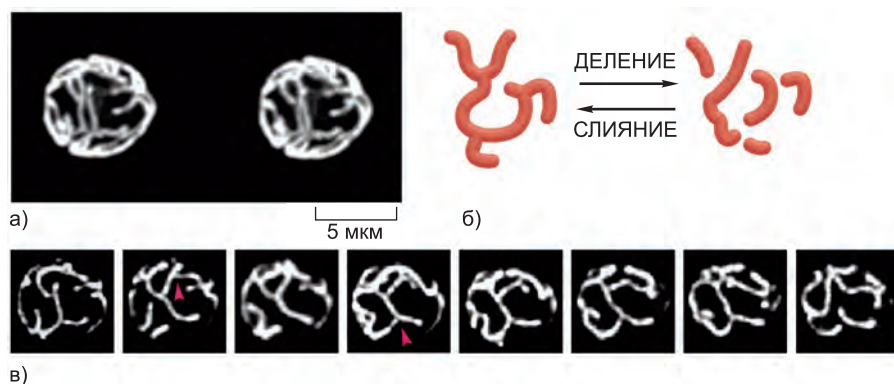


Рис. 14.55. Динамический митохондриальный ретикулум. (а) В клетках дрожжей митохондрии образуют непрерывный ретикулум, лежащий под плазматической мембраной (стереопара). (б) Отношение между слиянием и делением определяет форму и число митохондрий в различных клетках. (в) Замедленная съемка через флуоресцентный микроскоп показывает динамическое поведение митохондриальной сети в дрожжевых клетках. Помимо изменения формы, деление и слияние постоянно перестраивают сеть (красные стрелки). Эти снимки сделаны с трехминутными интервалами. (а и в, из J. Nunnari et al., *Mol. Biol. Cell* 8: 1233–1242, 1997. С любезного разрешения American Society for Cell Biology.)

В пространстве, окруженном внутренней мембраной митохондрий и пластид, может содержаться несколько копий генома. Уровень фрагментации органеллы определяет число геномов в одной органелле; обычно, отдельный компартмент несет множество геномов (см. таблицу 14.2). В большинстве клеток репликация ДНК органеллы не ограничивается S-фазой, когда реплицируется ядерная ДНК, но происходит на протяжении всего клеточного цикла — вне зависимости от фазы клеточного деления. По-видимому, молекулы ДНК органеллы отбираются для репликации случайным образом, т. е. в течение клеточного цикла одни молекулы будут удвоены несколько раз, а другие — ни разу. Несмотря на это, в неизменяющихся условиях процесс регулируется таким образом, что все молекулы ДНК органеллы будут удвоены за клеточный цикл. Это необходимо для того, чтобы каждый тип клеток поддерживал постоянное количество ДНК.

В особых обстоятельствах клетка способна очень точно контролировать деление органелл. Например, у некоторых водорослей, содержащих всего один или несколько хлоропластов на клетку, органеллы делятся незадолго до деления самой клетки в той же плоскости, в которой будет идти клеточное деление.

14.4.3. Геномы митохондрий и хлоропластов разнообразны

Многочисленные копии митохондриальной и хлоропластной ДНК, содержащиеся в матриксе или стромах этих органелл, обычно распределены по нескольким кластерам, носящим название *нуклеоидов*. Считается, что нуклеоиды прикреплены к внутренней мембране. Структура ДНК в нуклеоидах скорее всего сильнее напоминает структуру ДНК бактерий, чем эукариотический хроматин; например, как и у бактерий, в органеллах отсутствуют гистоны.

Разброс размеров ДНК органелл похож на разброс в вирусных ДНК. Молекулы митохондриальной ДНК изменяются в размерах от менее 6 000 п. н. в *Plasmodium falciparum* (малярийный паразит человека) до более 300 тысяч п. н. в некоторых

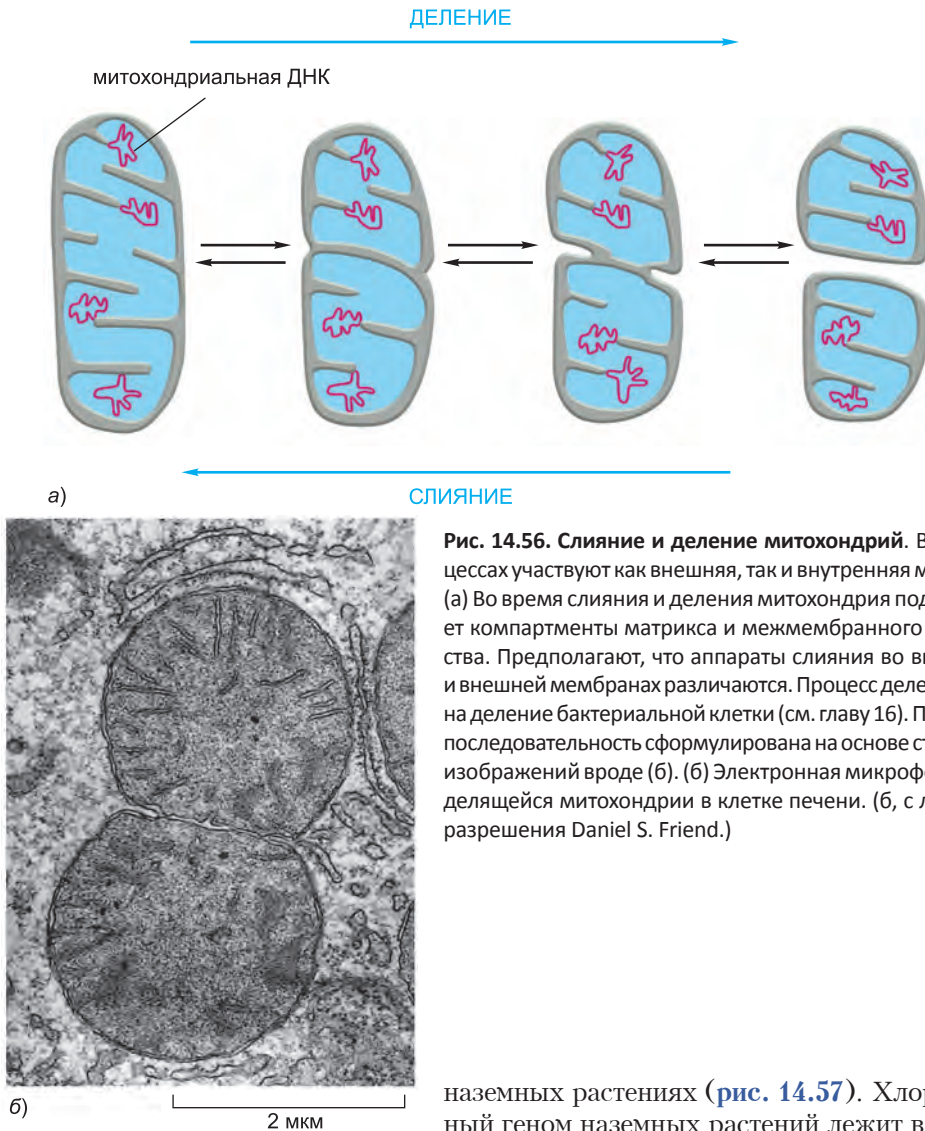


Рис. 14.56. Слияние и деление митохондрий. В этих процессах участвуют как внешняя, так и внутренняя мембраны. (а) Во время слияния и деления митохондрия поддерживает компартменты матрикса и межмембранного пространства. Предполагают, что аппараты слияния во внутренней и внешней мембранах различаются. Процесс деления похож на деление бактериальной клетки (см. главу 16). Показанная последовательность сформулирована на основе статических изображений вроде (б). (б) Электронная микрофотография делящейся митохондрии в клетке печени. (б, с любезного разрешения Daniel S. Friend.)

наземных растений (**рис. 14.57**). Хлоропластный геном наземных растений лежит в области размеров от 70 до 200 тысяч п. н. Долго считали, что хлоропластные хромосомы представляют собой кольцевые молекулы ДНК, содержащие одну копию генома, но оказалось, что в большинстве хлоропластов преобладают линейные молекулы, состоящие из последовательно соединенных множественных копий генома. Наилучшее объяснение такого разнообразия структур хлоропластных хромосом состоит в том, что процесс репликации ДНК связан с рекомбинацией ДНК, как это происходит при репликации некоторых вирусов, например герпеса. Сходные типы структур могут также присутствовать во многих митохондриальных геномах. Однако у млекопитающих геном митохондрий представляет собой простую кольцевую ДНК длиной около 16500 п. н. (менее 0,001% размера всего генома). При этом размер генома практически не отличается даже у таких разных животных, как *Drosophila* и морской еж.

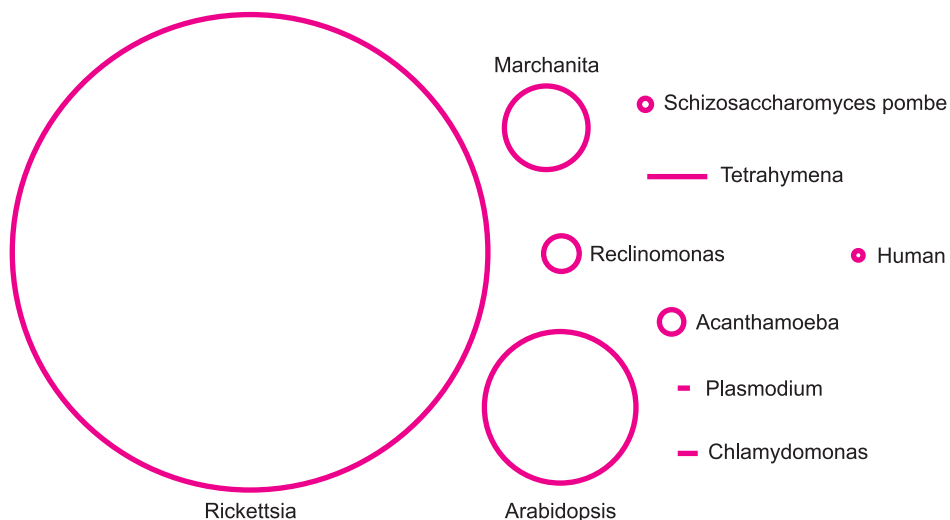


Рис. 14.57. Митохондриальные геномы различного размера. Определены полные нуклеотидные последовательности ДНК почти 500 митохондриальных геномов. В масштабе показаны длины нескольких из этих геномов. Геномы, которые считаются кольцевыми, представлены в виде окружностей, а линейные геномы – линиями. Самая большая окружность соответствует геному *Rickettsia prowazekii*, маленькой патогенной бактерии, чей геном очень похож на митохондриальный. Размер генома митохондрии слабо коррелирует с количеством кодируемых им белков: если человеческая митохондриальная ДНК кодирует 13 белков, то превышающая ее в 22 раза митохондриальная ДНК *Arabidopsis* кодирует всего 32 белка, т.е. всего в 2,5 раза больше. Дополнительная ДНК, обнаруженная в *Arabidopsis*, *Marchantia* и других растительных митохондриях, может быть всего лишь бессмысленной ДНК. Митохондриальная ДНК простейшего *Reclinomonas americana* несет 98 генов, больше, чем известная на данный момент митохондриальная ДНК любого другого организма. (Адаптировано из M. W. Gray et al., *Science* 283: 1476–1481, 1999. С любезного разрешения издательства AAAS.)

14.4.4. По-видимому, митохондрии и хлоропласты эволюционировали из эндосимбиотических бактерий

Прокариотический характер генетических систем митохондрий и хлоропластов, особенно яркий в случае последних, указывает на то, что эти органеллы эволюционировали из бактерий, которые эндоцитировали более 1 миллиарда лет назад. Согласно одной из версий этой *эндосимбиотической гипотезы*, эукариотические клетки изначально были анаэробными организмами без митохондрий или хлоропластов, но затем вступили в стабильные эндосимбиотические отношения с бактерией, систему окислительного фосфорилирования которой они приспособили к собственным нуждам (рис. 14.58). В соответствии с этой гипотезой событие эндоцитоза, приведшее к развитию митохондрий, произошло, когда концентрация кислорода в атмосфере стала значительной, т.е. более $1,5 \times 10^9$ лет назад, до разделения растений и животных (см. рис. 14.71). По-видимому, хлоропласты позже возникли сходным образом в результате эндоцитоза кислородвыделяющего фотосинтетического организма, напоминавшего цианобактерию.

Большая часть генов, кодирующих современные митохондриальные и хлоропластные белки, располагается в клеточном ядре. Таким образом, в процессе эволюции эукариот должен был происходить активный перенос генов из органелл

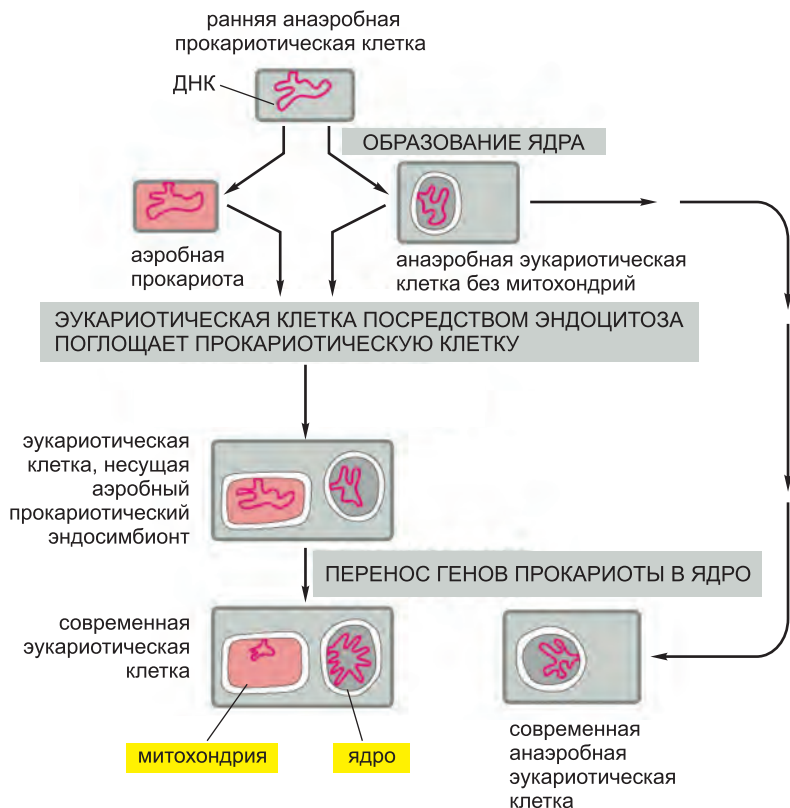


Рис. 14.58. Один из возможных эволюционных путей возникновения митохондрий. На Земле сейчас живут анаэробные одноклеточные эукариоты, у которых отсутствует митохондриальный геном, например простейшее *Giardia*. Однако у всех исследованных организмов такого рода обнаружен некий мембранный остаток органеллы, в котором протекают реакции, похожие на митохондриальные, например синтез железо-серных кластеров. До сих пор мы не нашли живого примера анаэробной клетки, которая могла бы быть той самой первой клеткой, поглотившей предка митохондрий. По этой и некоторым другим причинам, предлагают альтернативные пути, в которых бактерия и архея привели к появлению первой эукариотической клетки и первой митохондрии.

в ядро. Успешный перенос такого рода должен быть редким событием, поскольку ген ДНК органеллы, для того чтобы стать функциональным ядерным геном, должен претерпеть изменения: он должен адаптироваться к требованиям ядерной и цитоплазматической транскрипции и трансляции. Более того, он также должен приобрести сигнальную последовательность, позволяющую кодируемому белку попасть в органеллу после его синтеза в цитозоле. Несмотря на это, существуют доказательства того, что и сейчас в некоторых организмах происходит такого рода перенос генов в ядро.

Перенос генов объясняет, почему многие ядерные гены, кодирующие митохондриальные и хлоропластные белки, похожи на гены бактерий. Аминокислотная последовательность митохондриального белка *супероксиддисмутазы* курицы, например, гораздо больше похожа на последовательность соответствующего бактериального белка, чем на супероксиддисмутазу цитозоля той же эукариотической клетки.

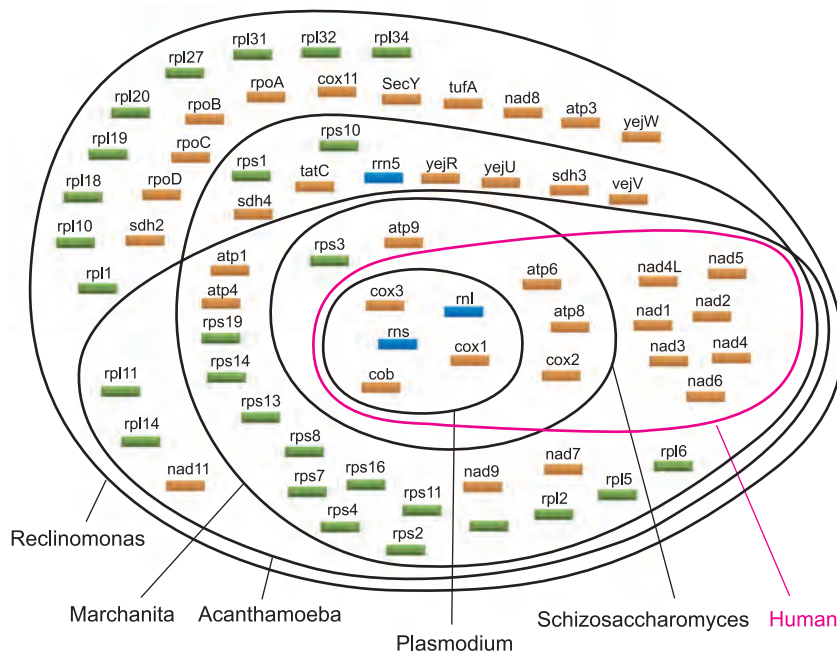


Рис. 14.59. Сравнение митохондриальных геномов. Менее сложные митохондриальные геномы кодируют набор белков и рибосомных РНК, который кодируется и более крупными геномами. Во всех известных митохондриальных геномах совпадают только четыре гена; они кодируют рибосомные РНК (*rns* и *rnl*), цитохром *b* (*cob*) и субъединицу цитохромоксидазы (*cox1*). (Адаптировано из M. W. Gray et al., *Science* 283: 1476–1481, 1999. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Перенос генов, по-видимому, был постепенным процессом. При сравнении митохондриальных геномов, содержащих разное количество генов, открывается тенденция к последовательной редукции кодируемых митохондриальных функций (**рис. 14.59**). Например, самые маленькие и, по-видимому, наиболее совершенные геномы митохондрий кодируют всего несколько белков внутренней мембраны, участвующих в реакциях электронного транспорта, рибосомные РНК и некоторые тРНК. Более сложные митохондриальные геномы обычно несут тот же набор генов и несколько других. Наиболее крупные геномы характеризуются присутствием в них множества дополнительных генов по сравнению с митохондриальными геномами животных и дрожжей. Многие из этих генов кодируют компоненты митохондриальной генетической системы, например субъединицы РНК-полимеразы и рибосомные белки; в организмах, которые снизили содержание ДНК в митохондриях, эти гены располагаются в ядре.

Какой тип бактерии стал прародителем митохондрий? Согласно сравнению последовательностей митохондрии произошли от определенного типа пурпурных фотосинтетических бактерий, которые ранее потеряли способность фотосинтезировать и у которых осталась только дыхательная цепь.

14.4.5. Митохондриям свойственны свободное использование кодонов и отличающийся генетический код

Относительно небольшой размер человеческого митохондриального генома сделал его особенно привлекательным объектом для ранних проектов по расшифровке

последовательности ДНК, и в 1981 г. опубликовали полную последовательность длиной 16569 нуклеотидов. Сравнение этой последовательности с известными последовательностями митохондриальной тРНК и доступными на тот момент неполными аминокислотными последовательностями белков, кодируемых митохондриальной ДНК, позволило отметить все человеческие митохондриальные гены на кольцевой молекуле ДНК (рис. 14.60).

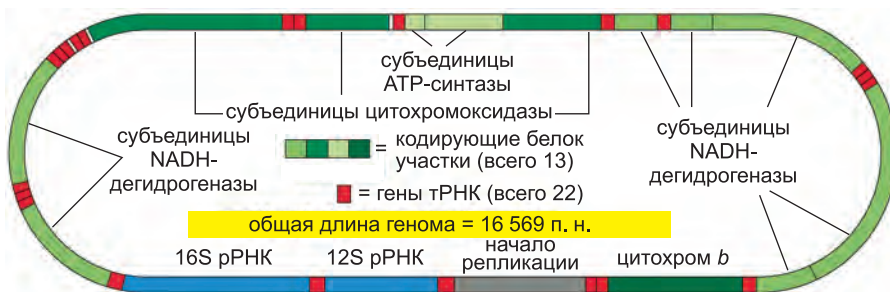


Рис. 14.60. Организация митохондриального генома человека. Геном содержит 2 гена рРНК, 22 гена тРНК и 13 последовательностей, кодирующих белки. Митохондриальные геномы многих других животных также были полностью расшифрованы. Большинство этих ДНК кодирует те же белки, что и человеческий митохондриальный геном, причем последовательность генов не изменяется от млекопитающих до рыб.

По сравнению с ядерным, хлоропластным и бактериальным геномами человеческий митохондриальный геном обладает несколькими удивительными свойствами:

1. **Плотная упаковка генов.** В отличие от других геномов, почти все нуклеотиды входят в состав кодирующей последовательности белка, рРНК или тРНК. Поскольку эти кодирующие последовательности продолжают друг друга, остается очень мало места для регуляторных последовательностей ДНК.

2. **Свободное использование кодонов.** Тогда как в цитозоле и хлоропластах аминокислоты задаются 30 и более тРНК, для синтеза митохондриальных белков требуется всего 22. Нормальные правила спаривания кодона и антикодона в митохондриях ослаблены, т.е. многие молекулы тРНК узнают любой из четырех нуклеотидов в третьем (неоднозначном) положении. Такое спаривание «2 из 3» позволяет одной тРНК взаимодействовать с любым из четырех кодонов. В результате для синтеза белка требуется меньше молекул тРНК.

3. **Отличающийся генетический код.** Наверное, наиболее удивительным результатом сравнения митохондриальной последовательности ДНК с аминокислотными последовательностями соответствующих белков был тот факт, что их генетические коды различаются: «значения» 4 из 64 кодонов отличаются от значений тех же кодонов в других геномах (таблица 14.3).

Близкое сходство между генетическим кодом всех организмов является доказательством того, что клетки произошли от одного общего предка. Как же тогда объяснить несколько отличий генетического кода многих митохондрий? Ответ нашли, когда обнаружили, что митохондриальный генетический код у разных организмов отличается. В митохондриях с самым большим количеством генов на рис. 14.59, т.е. у простейшего *Reclinomonas*, генетический код не отличается от стандартного кода клеточного ядра. Однако UGA, который в других местах служит стоп-кодоном, в митохондриях млекопитающих, грибов и беспозвоночных считается как триптофан.

Таблица 14.3. Некоторые различия между «универсальным» и митохондриальным генетическими кодами*

Кодон	«Универсальный» код	Митохондриальные коды			
		Млекопитающие	Беспозвоочные	Дрожжи	Растения
UGA	STOP	<i>Trp</i>	<i>Trp</i>	<i>Trp</i>	STOP
UAU	Ile	<i>Met</i>	<i>Met</i>	<i>Met</i>	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	<i>Thr</i>	Leu
AGA } AGG }	Arg	<i>STOP</i>	<i>Ser</i>	Arg	Arg

*Красным курсивом выделены кодоны, значение которых отличается от значения в «универсальном» коде.

Точно так же кодон AGG обычно кодирует аргинин, но в митохондриях млекопитающих он кодирует стоп-сигнал, а в митохондриях *Drosophila* — серин (см. таблицу 14.3). Эти отличия указывают на то, что в генетическом коде митохондрий может происходить случайное смещение. Предполагается, что благодаря необычно малому числу кодируемых митохондриальным геномом белков изменение значения редкого кодона не приводит к тяжелым последствиям, тогда как такое изменение в большом геноме повлияет на функционирование многих белков и, следовательно, разрушит клетку.

14.4.6. Митохондрии животных содержат самые простые генетические системы из известных

Сравнение последовательностей ДНК различных организмов показало, что у позвоночных животных (включая нас с вами) в ходе эволюции скорость замены нуклеотидов в митохондриальном геноме была в 10 раз больше, чем в ядерном геноме. Это различие скорее всего объясняется меньшей точностью репликации митохондриальной ДНК, малоэффективной репарацией ДНК или и тем и другим. В митохондрии животной клетки должно быть реплицировано и экспрессировано в форме РНК и белков всего около 16500 нуклеотидов. Поэтому уровень ошибок при репликации ДНК в расчете на нуклеотид, который затем был пропущен репарацией, транскрибирован РНК-полимеразой или транслирован в белок митохондриальными рибосомами, может быть довольно высоким без повреждения относительно небольшого числа генных продуктов. Это может объяснить, почему механизм этих процессов прост по сравнению с механизмом в других частях клетки. Наличие всего 22 тРНК и необычно маленький размер рРНК (меньше двух третей от размера рРНК *E. coli*), например, должны снижать точность синтеза белка в митохондриях, хотя это еще нужно проверить экспериментально.

Относительно высокая скорость эволюции митохондриальных генов животных делает сравнение последовательностей митохондриальных ДНК особенно удобным для оценки времени относительно недавних эволюционных событий, например этапов эволюции приматов.

14.4.7. Некоторые гены митохондрий и хлоропластов содержат интроны

Процессинг предшественников РНК играет важную роль в двух наиболее изученных митохондриальных системах — человека и дрожжей. В человеческих клетках обе цепочки митохондриальной ДНК транскрибируются с одинаковой

скоростью с единственного промоторного участка на каждой из цепей с образованием двух различных гигантских молекул РНК, каждая из которых содержит полную копию одной цепочки ДНК. Таким образом, транскрипция абсолютно симметрична. Затем происходит интенсивный процессинг транскриптов одной цепочки путем нуклеазного расщепления с образованием двух рРНК, большей части тРНК и около 10 поли-А-содержащих РНК. С другой стороны, из транскрипта второй цепочки в результате процессинга образуется только 8 тРНК и 1 небольшая поли-А-содержащая РНК; оставшиеся 90% этого транскрипта, по-видимому, не содержат полезной информации (поскольку они комплементарны кодирующей последовательности другой цепочки) и деградируют. Поли-А-содержащие РНК — это митохондриальные мРНК: несмотря на то что у них отсутствует кэп-группа на 5'-конце, они несут поли-А-хвост на 3'-конце, который добавляется посттрансляционно митохондриальной поли-А-полимеразой.

В отличие от митохондриальных генов человека, некоторые митохондриальные гены растений и грибов (включая дрожжи) содержат *интроны*, которые должны быть удалены сплайсингом РНК. Интроны также встречаются в некоторых хлоропластных генах растений. Многие интроны в генах органелл содержат семейство родственных нуклеотидных последовательностей, способных самостоятельно удаляться из транскриптов РНК путем РНК-опосредованного катализа (см. главу 6), хотя обычно в таких реакциях сплайсинга белки все же участвуют. Присутствие интронов в генах органелл неожиданно, поскольку они нечасто встречаются в генах бактерий, от чьих предков, как предполагается, произошли митохондрии и растительные хлоропласты.

В дрожжах один и тот же митохондриальный ген может содержать интрон в одном штамме, но не содержать в другом. Такие «факультативные интроны», по-видимому, способны покидать геном и возвращаться в него как мобильные генетические элементы. С другой стороны, интроны в митохондриях других дрожжей были обнаружены в соответствующих положениях в митохондриях *Aspergillus* и *Neurospora*, что указывает на то, что они были унаследованы от общего предка этих грибов. Возможно, эти интронные последовательности имеют древнее происхождение — вплоть до бактериального предка, и несмотря на то, что они были утрачены многими бактериями, в некоторых геномах органелл, в которых происходит регуляция и сплайсинг РНК для контроля экспрессии генов, они преимущественно сохранялись.

14.4.8. Хлоропластный геном высших растений содержит около 120 генов

К настоящему времени секвенировано более 20 хлоропластных геномов. Геномы даже состоящих в дальнем родстве растений (например, табака и печеночного мха) очень похожи, и даже геномы зеленых водорослей им близки (**рис. 14.61**). Гены хлоропластов участвуют в четырех основных типах процессов: транскрипции, трансляции, фотосинтезе и биосинтезе малых молекул: аминокислот, жирных кислот и пигментов. Гены растительных хлоропластов кодируют еще по крайней мере 40 белков, чьи функции до сих пор неизвестны. Как ни странно, все известные на данный момент кодируемые хлоропластами белки являются частью более крупных белковых комплексов, которые также содержат одну или несколько субъединиц, кодируемых ядром. Мы обсудим возможные причины этого парадокса позже.

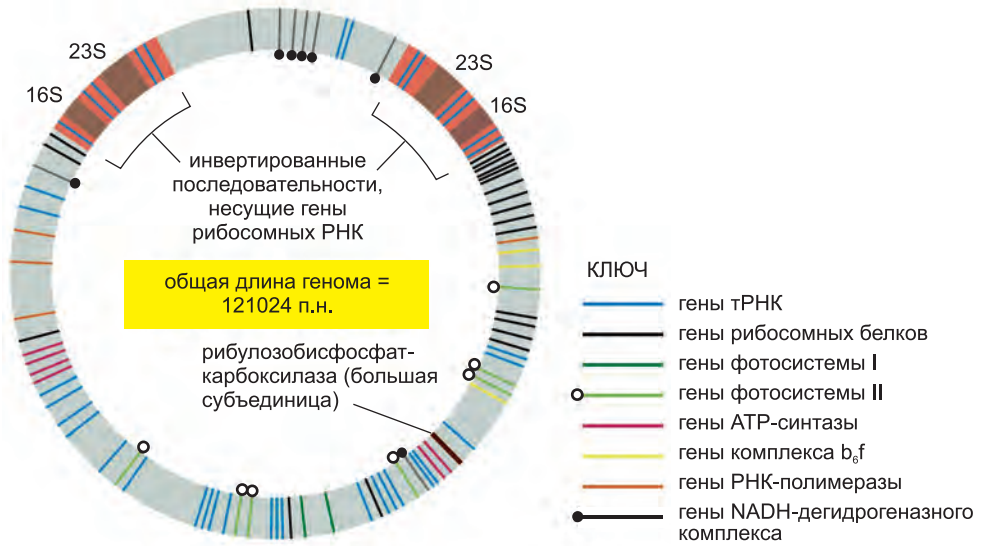


Рис. 14.61. Строение хлоропластного генома печеночного мха. Хлоропластный геном всех высших растений организован сходным образом, но его размер варьирует среди видов в зависимости от того, сколько ДНК, окружающей гены, кодирующие рибосомные РНК 16S и 23S, присутствует в двух копиях.

Геномы хлоропластов и митохондрий обладают удивительным сходством. Основные регуляторные последовательности, например промоторы и терминаторы транскрипции, в этих органеллах практически идентичны. Аминокислотные последовательности белков, кодируемых в хлоропластах, явно бактериального типа, и несколько кластеров генов с родственными функциями (например, генов, кодирующих рибосомные белки) одинаковым образом организованы в геномах хлоропластов, *E. coli* и цианобактерий.

Дальнейшее сравнение большого числа гомологичных нуклеотидных последовательностей должно помочь прояснить эволюционный путь от бактерий к хлоропластам, но уже сейчас можно сформулировать несколько заключений:

1. Хлоропласты высших растений произошли от фотосинтетических бактерий.
2. Многие гены исходной бактерии сейчас располагаются в ядерном геноме, куда они интегрировались и где стабильно поддерживаются. Например, в высших растениях две трети из 60 или около того хлоропластных рибосомных белков кодируются клеточным ядром; эти гены имеют бактериальное происхождение, и хлоропластные рибосомы сохранили свои исходные бактериальные характеристики.

14.4.9. Митохондриальные гены наследуются не по менделевскому механизму

Большое количество экспериментов по выяснению механизмов биогенеза митохондрий проводится на *Saccharomyces cerevisiae* (пекарских дрожжах). Такой выбор объекта объясняется несколькими причинами. Во-первых, при росте на глюкозе эти дрожжи способны жить исключительно за счет гликолиза и, следовательно, способны выживать с дефектными митохондриями, у которых повреждено окислительное фосфорилирование. Таким образом, можно выращивать клетки с мутациями

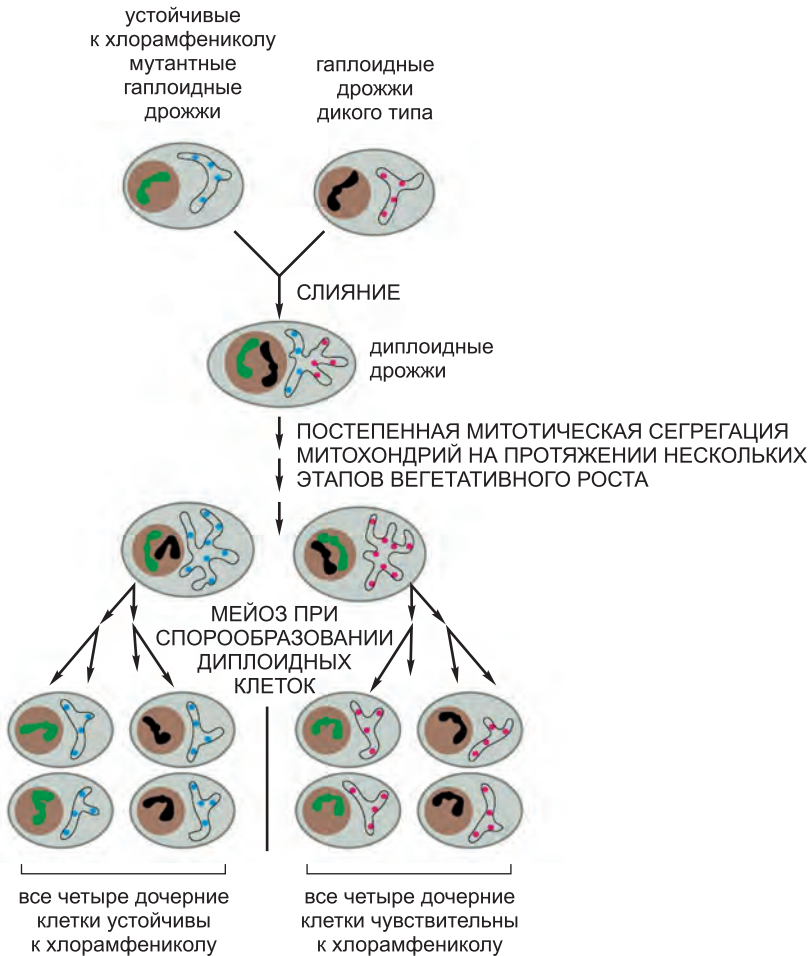


Рис. 14.62. Различия в принципах наследования митохондриальных и ядерных генов дрожжевых клеток. В случае ядерных генов (менделевское наследование) две из четырех образующихся в результате мейоза клеток наследуют ген от одной из исходных гаплоидных клеток (зеленые хромосомы), а две другие клетки наследуют ген второй (черные хромосомы). С другой стороны, в случае митохондриальных генов (неменделевское наследование) все четыре клетки, образовавшиеся в результате мейоза, могут унаследовать митохондриальные гены только от одной из двух родительских гаплоидных клеток. В данном примере митохондриальный ген — это ген, мутация в котором (митохондриальная ДНК отмечена голубыми точками) делает синтез белков в митохондриях устойчивым к хлорамфениколу — ингибитору белкового синтеза, который специфически воздействует на похожие на прокариотические рибосомы митохондрий и хлоропластов. Клетки, содержащие мутантный ген, можно обнаружить по их способности расти в присутствии хлорамфеникола на субстрате, например глицерине, который может использоваться для гликолиза. Когда гликолиз заблокирован, АТФ должен синтезироваться функционирующими митохондриями, и поэтому клетки, несущие нормальную (дикого типа) митохондриальную ДНК (красные точки), погибают.

в митохондриальной или ядерной ДНК, нарушающими функцию митохондрий; для многих эукариот такие мутации летальны. Во-вторых, дрожжи — это простые одноклеточные эукариоты, их просто выращивать и биохимически анализировать. Наконец, эти дрожжевые клетки обычно размножаются неполовым путем за счет

почкования, но они также способны размножаться половым путем. Во время полового размножения две гаплоидные клетки сливаются с образованием диплоидной зиготы, которая может либо митотически расти, либо делиться мейозом с образованием новых гаплоидных клеток.

Возможность контролировать тип размножения (половой или бесполой) в лабораторных условиях значительно ускоряет генетический анализ. Мутации митохондриальных генов не наследуются в соответствии с менделевскими законами, управляющими наследованием ядерных генов. Таким образом, задолго до того, как митохондриальный геном секвенировали, генетические исследования показали, какие гены, управляющие функционированием митохондрий, локализованы в ядре, а какие — в митохондриях. Пример неменделевского (цитоплазматического) наследования митохондриальных генов в гаплоидной дрожжевой клетке представлен на [рис. 14.62](#). На этом примере мы проследим наследование мутантного гена, который делает синтез митохондриальных белков устойчивым к хлорамфениколу.

Когда устойчивая к хлорамфениколу гаплоидная клетка сливается с хлорамфеникол-чувствительной гаплоидной клеткой дикого типа, образующаяся диплоидная зигота содержит смесь мутантных генов и генов дикого типа. Митохондриальные сети в зиготе сливаются, создавая один непрерывный ретикулум, содержащий геномы обеих родительских клеток. Когда зигота претерпевает митоз, копии митохондриальной ДНК мутантного и дикого типов распределяются по диплоидным дочерним клеткам. В случае ядерной ДНК каждая дочерняя клетка получает две копии каждой хромосомы, по одной от каждого родителя. С другой стороны, в случае митохондриальной ДНК дочерняя клетка может унаследовать больше копий мутантной ДНК, чем ДНК дикого типа, и наоборот. Последовательные митотические деления могут привести к накоплению ДНК определенного типа, что в конце концов приведет к появлению клеток, содержащих митохондриальную ДНК только одного генотипа. Этот стохастический процесс называется *митотической сегрегацией*.

Когда диплоидные клетки, распределившие таким образом свои митохондриальные геномы, претерпевают мейоз с образованием четырех гаплоидных дочерних клеток, каждый из четырех потомков получает одни и те же митохондриальные гены. Такой тип наследования называется *цитоплазматическим*, или неменделевским, *наследованием*, чтобы отличать его от менделевского наследования ядерных генов (см. [рис. 14.62](#)). Когда наблюдается неменделевское наследование, это указывает на то, что ген расположен вне ядерных хромосом.

Несмотря на то что кластеры митохондриальных молекул ДНК (нуклеоиды) относительно неподвижны в митохондриальном ретикулуме за счет их заякоривания во внутренней мембране, отдельные нуклеоиды периодически сближаются. Наиболее часто это происходит в местах слияния двух родительских митохондриальных сетей в процессе формирования зиготы. Когда в одном нуклеоиде присутствуют разные ДНК, может произойти генетическая рекомбинация. В результате могут появиться геномы, содержащие ДНК обеих родительских клеток. Эти геномы будут устойчиво наследоваться после митотической сегрегации.

14.4.10. Гены органелл во многих организмах наследуются по материнской линии

Цитоплазматическое наследование для некоторых организмов, включая людей, имеет более важные последствия, чем для дрожжей. В дрожжах две сливающиеся

гаплоидные клетки имеют одинаковые размеры, и их митохондриальные ДНК в равной степени вносят вклад в зиготу (см. рис. 14.62). Таким образом, у дрожжей митохондриальное наследование *бипарентально*: оба родителя вносят одинаковый вклад в митохондриальный генетический пул потомства (однако, как мы видели, после нескольких поколений вегетативного роста отдельные потомки содержат митохондрии только одного родителя). Однако у высших животных яйцеклетка всегда вносит в зиготу значительно большее количество цитоплазмы, чем сперматозоид. Таким образом, у животных митохондриальное наследование должно быть практически *унипарентальным* или, более точно, со стороны матери. Такое *наследование по материнской линии* показано на лабораторных животных. Скрещивание животных, несущих митохондриальную ДНК типа А, с животными, несущими митохондриальную ДНК типа Б, приводит к появлению потомства, несущего только материнский тип митохондриальной ДНК. Точно так же, проследивая распределение вариантов последовательностей митохондриальной ДНК в крупных семьях, ученые обнаружили, что митохондриальная ДНК наследуется по материнской линии.

Примерно в двух третях высших растений «отцовские» хлоропласты (содержащиеся в пыльце) не попадают в зиготу, поэтому хлоропластная, как и митохондриальная ДНК наследуются по материнской линии. В других растениях пыльцевые хлоропласты входят в зиготу, что делает наследование бипарентальным. В таких растениях дефектные хлоропласты приводят к *мозаицизму*: смешению нормальных и дефектных хлоропластов в зиготе во время роста и развития растения. Разные хлоропласты могут быть рассортированы митотической сегрегацией, что приведет к возникновению на листьях зеленых и белых участков. Зеленые участки несут нормальные хлоропласты, а белые — дефектные (рис. 14.63).

Оплодотворенная яйцеклетка человека несет около 2000 копий митохондриального генома, но все они, за исключением одной или двух, унаследованы от матери. Человек, у которого все эти копии несут вредную мутацию, скорее всего не выживет. Но некоторые матери несут смешанную популяцию мутантных и нормальных митохондриальных геномов. Их сыновья и дочери, унаследовавшие эту смесь, скорее всего будут здоровы, если только митотическая сегрегация случайным образом не приведет к преобладанию дефектных митохондрий в определенной ткани. Это наиболее опасно для мышечной и нервной тканей, поскольку им необходимо особенно много АТФ.



Мы можем распознать наследственную болезнь человека, вызванную мутацией митохондриальной ДНК, если она передается от больной матери как дочерям, так и сыновьям, но только дети дочери будут также больны. Как и следовало ожидать, в связи со случайной природой митотической сегрегации симптомы этих болезней в значительной степени варьируют у членов семьи, включая не только тяжесть и возраст развития, но и поражаемую ткань.

Рис. 14.63. Мозаичный лист. В белых участках расположены клетки, унаследовавшие дефектные хлоропласты. (С любезного разрешения John Innes Foundation.)

Рассмотрим, например, наследственную болезнь *миоклоническую эпилепсию с рваными мышечными волокнами* (*Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fiber Disease, MERRF*), которая может быть вызвана мутацией одного из митохондриальных генов транспортной РНК. Эта болезнь развивается, когда определенная ткань наследует пороговое количество дефектных митохондриальных ДНК. Выше этого порога пул дефектных тРНК снижает синтез митохондриальных белков, необходимых для электронного транспорта и синтеза АТФ. Результатом этого могут быть мышечная слабость или проблемы с сердцем (в результате действия в сердечной мышце), некоторые виды эпилепсии или слабоумие (в результате влияния на нервные клетки) или другие симптомы. Неудивительно, что такое же разнообразие фенотипов свойственно и другим митохондриальным фенотипам.

14.4.11. Карликовые мутанты дрожжей показывают значение клеточного ядра для биогенеза митохондрий

Генетические исследования дрожжей сыграли ключевую роль в анализе биогенеза митохондрий. Замечательный пример — изучение мутантов дрожжей, несущих крупные делеции в митохондриальной ДНК, т.е. весь митохондриальный белковый синтез у этих организмов разрушен. Неудивительно, что митохондрии этих мутантов не дышат. Поскольку они образуют необычно маленькие колонии при выращивании в среде, содержащей низкую концентрацию глюкозы, всех мутантов с такими дефектными митохондриями называют *цитоплазматическими карликовыми мутантами*.

Несмотря на то что карликовые мутанты не способны синтезировать белки и, следовательно, производящие АТФ митохондрии, митохондрии в них все же содержатся. Эти митохондрии обладают нормальной внешней мембраной, но их внутренняя мембрана характеризуется слабым развитием крист (**рис. 14.64**). Они содержат практически все митохондриальные белки, кодируемые ядерным геномом и импортируемые из цитозоля, включая ДНК- и РНК-полимеразы. Это указывает на огромное значение ядра для биогенеза митохондрий. Исследования карликовых мутантов также показали, что делящиеся путем фрагментации органеллы способны бесконечно воспроизводиться в цитоплазме пролиферирующих эукариотических клеток, даже в отсутствие собственного генома. Возможно, пероксисомы в норме реплицируются таким путем (см. рис. 12.33).

В случае хлоропластов самым близким эквивалентом митохондриальных карликовых мутантов являются мутанты одноклеточной водоросли *Euglena*. Мутантные водоросли, у которых не происходит хлоропластного белкового синтеза, продолжают нести хлоропласты и выживают на окисляемых субстратах. Однако, если развитие зрелых хлоропластов у высших растений заблокировано за счет выращивания их в темноте или дефектного или отсутствующего хлоропластного генома, они погибают.

14.4.12. Митохондрии и пластиды содержат тканеспецифичные белки, кодируемые клеточным ядром

В определенных типах клеток митохондрии выполняют специфические функции. Например, они принимают участие в *цикле мочевины*, который у млекопитающих служит центральным метаболическим путем избавления от содержащих азот продуктов разрушения клеток. Эти продукты выделяются с мочой в форме

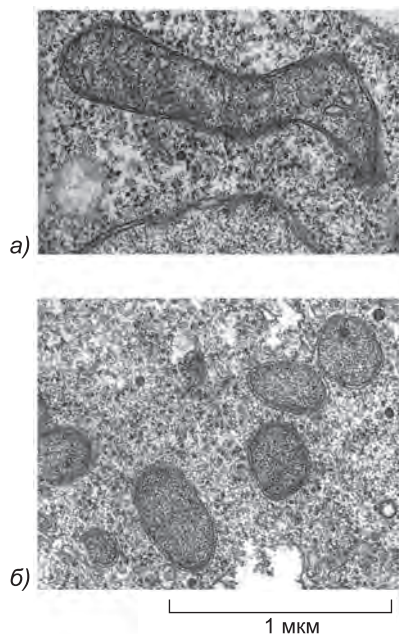


Рис. 14.64. Электронные микрофотографии дрожжевых клеток. (а) Структура нормальной митохондрии. (б) Митохондрия в карликовом мутанте. В карликовых мутантах отсутствуют все кодируемые митохондриями продукты генов, и органелла состоит исключительно из белков, кодируемых ядром. (С любезного разрешения Barbara Stevens.)

мочевины. Несколько этапов цикла катализируется кодируемыми в ядре ферментами митохондриального матрикса. Синтез мочевины происходит только в некоторых тканях, например в печени, и необходимые ферменты синтезируются и импортируются в митохондрии только в этих тканях.

У млекопитающих дыхательные ферментные комплексы внутренней мембраны митохондрий также содержат несколько тканеспецифичных кодируемых ядром субъединиц, которые, по-видимому, участвуют в регуляции электронного транспорта. Так, у некоторых людей с наследственным заболеванием мышц

в цитохромоксидазе содержится дефектная субъединица; поскольку эта субъединица специфична для скелетных мышц, другие клетки, включая клетки сердечной мышцы, функционируют нормально, и эти люди выживают. Как и следовало ожидать, тканеспецифичные различия также наблюдаются и среди кодируемых ядром белков хлоропластов.

14.4.13. Митохондрии импортируют большую часть своих белков; хлоропласты — синтезируют

Для биосинтеза новых митохондрий и хлоропластов, помимо нуклеиновых кислот и белков, требуются липиды. Хлоропласты обычно синтезируют необходимые липиды. Например, в листьях шпината весь клеточный синтез жирных кислот протекает в хлоропластах, хотя реакция десатурации происходит в другом месте. Основные гликолипиды хлоропластов также синтезируются локально.

С другой стороны, митохондрии импортируют большую часть своих липидов. Животные клетки синтезируют фосфолипиды фосфатидилхолин и фосфатидилсерин в эндоплазматическом ретикулуме, а затем транспортируют их во внешнюю мембрану митохондрий. Помимо декарбоксилирования импортированного фосфатидилсерина до фосфатидилэтаноламина, основная реакция биосинтеза липидов также катализируется самими митохондриями. Это реакция превращения импортированных липидов в кардиолипин (бифосфатидилглицерол). Кардиолипин — это «двойной» фосфолипид, содержащий четыре жирнокислотных хвоста (рис. 14.65). Он встречается, в основном, во внутренней мембране митохондрий, где составляет 20 % всех липидов.

Вопрос импорта цитоплазматических белков в митохондрии и хлоропласты рассматривается в главе 12.

Рис. 14.65. Структура кардиолипина. Кардиолипин — это необычный липид внутренней мембраны митохондрий.

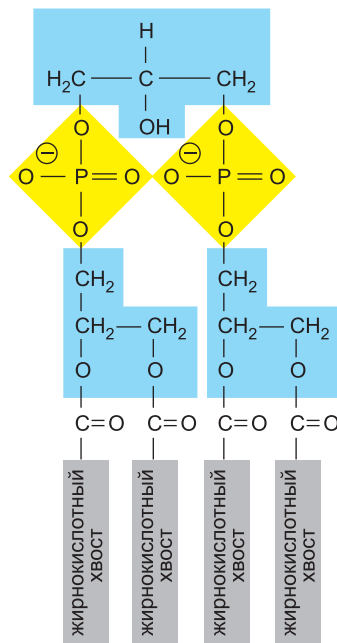
14.4.14. Митохондрии могут вносить вклад в старение клеток и организмов

Газообразный кислород O_2 , обладающий высоким сродством к электронам, становится особенно реакционно-способным, если он приобретает один электрон и частично восстанавливается до супероксида O_2^- . Это объясняет, почему в самом конце дыхательной цепи два атома кислорода супероксида O_2^- крепко удерживаются цитохромоксидазой до тех пор, пока не приобретут четыре электрона и не будут высвобождены в форме двух молекул воды (см. рис. 14.27). По мере того как мы все больше узнаем о биологических процессах электронного транспорта, оказывается, что эволюция отобрала множество эффективных механизмов, не дающих высокоэнергетическим электронам покинуть электрон-транспортную цепь. Но случайности происходят, и довольно часто: по оценкам, молекула O_2^- образуется в одном из 2000 переносов электрона с NADH на кислород.

У клеток есть аварийные системы, сводящие к минимуму ущерб, наносимый супероксидом и другими активными формами кислорода. Основной такой системой является фермент *супероксиддисмутаза* (SOD), катализирующий реакцию $O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$. Затем все еще ядовитая перекись водорода превращается в воду либо ферментом *каталазой* (которая катализирует реакцию $H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$), либо *глутатионпероксидазой* (которая катализирует реакцию $H_2O_2 + 2GSH \rightarrow 2H_2O + GSSH$, где GSH — это трипептид глутатион с сульфгидрильной группой цистеина).

Примерно 90% O_2^- в клетке образуется в митохондриях. Поэтому неудивительно, что митохондрии содержат собственные ферменты супероксиддисмутазу и глутатионпероксидазу, или что мыши, у которых мало митохондриальной супероксиддисмутазы (MnСОD), рано погибают, в отличие от мышей, лишенных цитоплазматической или внеклеточной формы фермента. Даже у нормальных животных митохондриальная ДНК содержит в десять раз больше окисленных дефектных нуклеотидов, чем ядерная ДНК. Эти наблюдения, а также тот факт, что у пожилых людей митохондрии работают хуже, привели к формулировке гипотезы «порочного круга», которая направлена на объяснение старения организма. Согласно этой точке зрения, окислительное повреждение вызывает накопление мутаций в митохондриальной ДНК соматических тканей, что, в свою очередь, приводит к увеличению ошибок окисления в этих тканях. Этот вредный круговорот существует до тех пор, пока митохондрии пожилых мышей или людей не синтезируют столько продуктов окисления, что весь организм увядает, что приводит к изнуряющему преклонному возрасту.

Соответствует ли эта идея действительности? Очевидно, что старение — это очень сложный процесс. Более того, продолжительность жизни низших многокле-



точных организмов, например червей и мух, можно значительно увеличить при помощи нескольких генетических модификаций. Полученные данные указывают на то, что эти организмы были запрограммированы постареть и умереть в определенный момент, а не «износиться» из-за накопления мутаций. В качестве прямой проверки гипотезы порочного круга выведены мыши, содержащие в два раза меньше MnSOD, чем нормальные. Оказалось, что эти мутантные мыши живут столько же, сколько и мыши дикого типа, и у них не наблюдается преждевременного старения. Несмотря на это, у них накапливается необычно большое количество митохондриальных окислительных повреждений, раньше снижается функция митохондрий и чаще образуются опухоли.

Несмотря на то что в случае человека этот вопрос еще не решен, сомнительно, что мы сможем продлить свою жизнь, просто глотая таблетки с антиоксидантами.

14.4.15. Почему у митохондрий и хлоропластов есть свои собственные генетические системы?

Зачем митохондриям и хлоропластам собственная отдельная генетическая система, когда другим органеллам в той же цитоплазме, например лизосомам и пероксисомам, этого не требуется? Это нетривиальный вопрос, поскольку поддерживать отдельную генетическую систему довольно затратно: специально для этого ядерный геном кодирует более 90 белков, включая многие рибосомные белки, аминоацил-тРНК-синтазы, ДНК- и РНК-полимеразы и белки модификации и процессинга РНК (рис. 14.66). Аминокислотные последовательности большинства этих белков митохондрий и хлоропластов отличаются от последовательностей их ядерных и цитоплазматических аналогов, и, по-видимому, у этих органелл очень мало общих белков с остальной клеткой. Это означает, что ядро должно предоставлять по крайней мере 90 генов только для поддержания генетической системы каждой из этих органелл.

Непонятно, почему клетки используют такую затратную систему. Мы не можем придумать убедительных причин, почему белки, синтезируемые в митохондриях и хлоропластах, не могут синтезироваться в цитозоле.

Отдельные белковые субъединицы в различных митохондриальных ферментных комплексах очень консервативны с точки зрения эволюции, но это не относится к сайту их синтеза (см. рис. 14.59). Несмотря на это, два кодирующих белки гена *Cox1* и *Cob* присутствуют во всех митохондриальных геномах. Эти гены кодируют крупные гидрофобные белки с множеством трансмембранных сегментов. Возможно, они должны котрансляционно встраиваться во внутреннюю мембрану рибосомами митохондрий.

С другой стороны, генетические системы органелл вполне могут быть эволюционным тупиком. В терминах эндосимбиотической гипотезы это означает, что процесс переноса генов эндосимбионтов в ядро остановился до своего завершения. Дальнейший перенос в случае митохондрий стал невозможен из-за изменений митохондриального генетического кода, т. е. при переносе оставшихся митохондриальных генов в ядро они переставали функционировать.

Заключение

Митохондрии позволили большинству эукариотических клеток производить окислительное фосфорилирование, тогда как хлоропласты позволяют

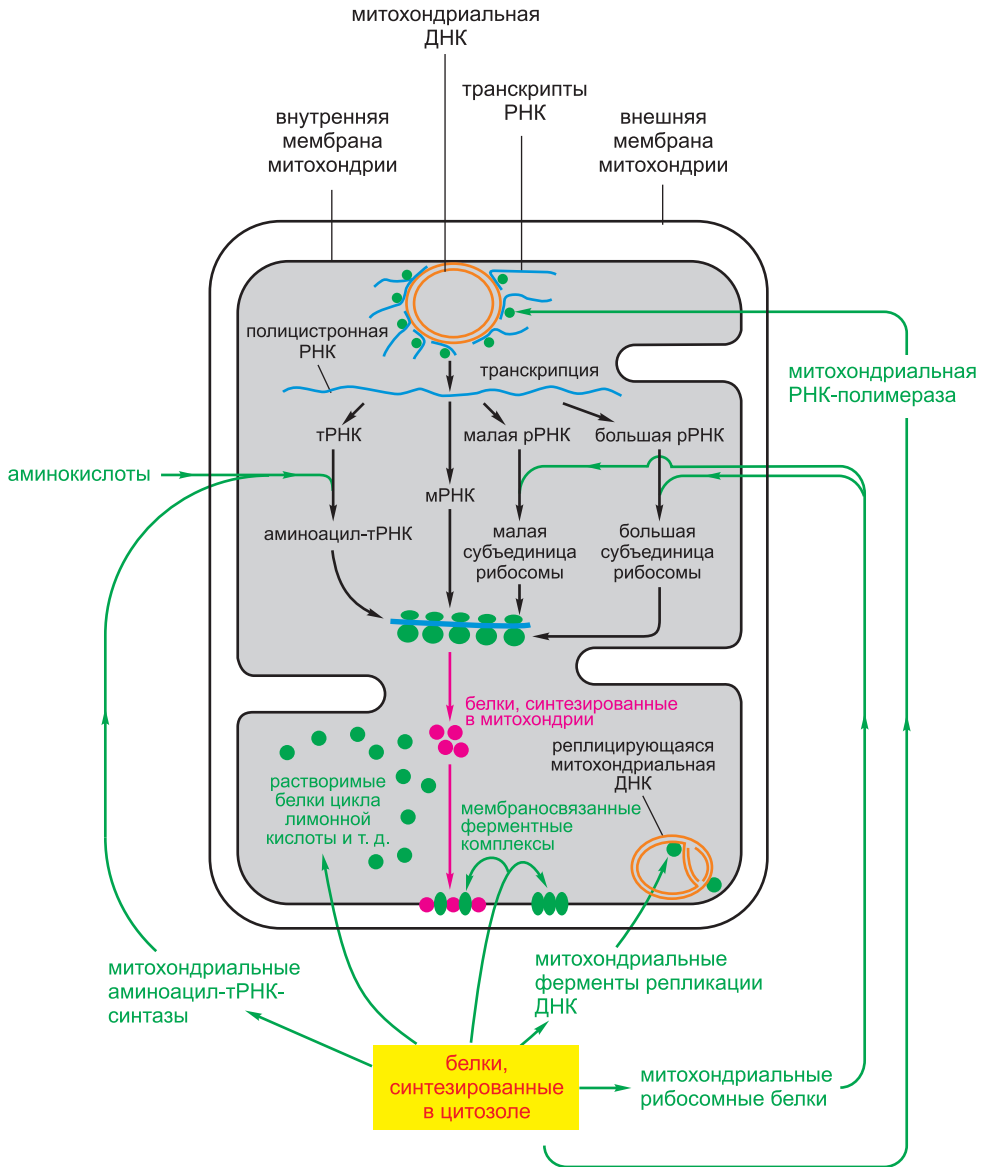


Рис. 14.66. Происхождение митохондриальных РНК и белков. Белки, кодируемые в ядре и импортируемые из цитозоля, играют важную роль в поддержании генетической системы митохондрий. Более того, они также составляют большую часть других белков органеллы. На схеме не указано существование дополнительных кодируемых ядром белков, которые регулируют экспрессию отдельных митохондриальных белков на посттранскрипционном уровне. Сама митохондрия вносит в свою генетическую систему только мРНК, рРНК и тРНК, но у некоторых организмов даже тРНК импортируются.

определенным эукариотам (растениям и некоторым водорослям) фотосинтезировать. Предположительно, за счет своего прокариотического происхождения эти органеллы растут в результате скоординированного процесса, требующего участия двух разных генетических систем: одной — в самой органелле

и одной — в клеточном ядре. Большинство белков этих органелл кодируется ядерной ДНК, синтезируется в цитозоле и затем импортируется в органеллу. Некоторые белки и РНК органелл кодируются их собственной ДНК и синтезируются в самой органелле. Человеческий митохондриальный геном состоит из примерно 16500 нуклеотидов и кодирует 2 рибосомные РНК, 22 транспортных РНК и 13 различных полипептидных цепей. Хлоропластные геномы примерно в 10 раз больше и несут около 120 генов. Но даже в мутантах, лишенных функционального генома митохондрий или хлоропластов, формируются частично функциональные органеллы, что указывает на огромный вклад ядра в биогенез этих органелл.

Рибосомы хлоропластов очень похожи на бактериальные рибосомы, тогда как митохондриальные обладают как сходствами, так и отличиями от бактериальных, что усложняет поиск их прародителя. Однако сходство белков указывает на то, что обе органеллы появились, когда примитивная эукариотическая клетка вступила в эндосимбиотические отношения с бактерией. Предполагается, что митохондрии произошли от пурпурной бактерии, а (позже) цианобактерия стала предшественником хлоропластов. Несмотря на то что многие гены этих древних бактерий все еще функционируют для синтеза белков органелл, большинство из них интегрировалось в ядерный геном, где они кодируют сходные с бактериальными ферменты, которые синтезируются на цитоплазматических рибосомах и затем импортируются в органеллу.

Повреждения, со временем накапливающиеся в геномах митохондрий, вносят уникальный вклад в старение клеток и организмов. Однако для проверки этой гипотезы «порочного круга» необходимо провести еще немало исследований.

14.5. Эволюция электрон-транспортных цепей

Значительная доля структур, функций и эволюции клеток и организмов может быть отнесена за счет их потребности в энергии. Мы видели, что фундаментальные механизмы получения энергии из таких разных источников, как свет и окисление глюкозы, по сути своей одинаковы. По всей видимости, эффективный способ синтеза АТФ появился рано в ходе эволюции и с тех пор почти не изменялся. Как впервые появились ключевые компоненты этой системы: АТФ-синтаза, потенциал-зависимые H^+ -насосы и фотосистемы? Гипотезы о событиях, произошедших на эволюционной временной шкале, сложно проверить. Но у нас есть множество подсказок как в различных сохранившихся примитивных электрон-транспортных цепях некоторых современных бактерий, так и в геологических данных об условиях на Земле миллиарды лет назад.

14.5.1. Предполагается, что самые ранние клетки для синтеза АТФ использовали брожение

В главе 1 мы упоминали, что первые живые клетки на Земле появились более 3×10^9 лет назад, когда возраст Земли не превышал 10^9 лет. Предположительно, на планете не было кислорода, но было много геохимически синтезированных органических молекул, и некоторые из наиболее ранних метаболических путей синтеза АТФ могли напоминать современное брожение.

В процессе брожения АТФ синтезируется в результате фосфорилирования, использующего энергию, высвобождаемую при частичном окислении обогащенной

водородом молекулы, например глюкозы (см. рис. 2.71). Электроны, потерянные окисленной органической молекулой, переносятся (посредством NADH или NADPH) на другую органическую молекулу (или на другую часть той же молекулы), которая в результате становится более восстановленной. В конце процесса брожения одна или несколько образованных органических молекул выделяются в среду в качестве побочных продуктов метаболизма; другие, например пируват, остаются в клетке для биосинтеза.

Выделяемые конечные продукты в разных организмах различны, но обычно это органические кислоты (соединения углерода с COOH-группой). Одними из наиболее важных продуктов такого рода являются молочная кислота (которая также накапливается при анаэробном гликолизе в мышцах) и муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная и янтарная кислоты.

14.5.2. Электрон-транспортные цепи позволили анаэробным бактериям использовать несбраживаемые молекулы в качестве основного источника энергии

Ранние процессы брожения должны были давать не только АТФ, но и восстановители (NADH или NADPH), необходимые для биосинтеза. Таким образом, многие основные метаболические пути могли эволюционировать, когда брожение было единственным способом получения энергии. Однако со временем метаболическая активность этих прокариотических организмов должна была изменить их локальное окружение, заставляя эти организмы развивать новые биохимические пути. Например, накопление побочных продуктов брожения могло привести к следующей последовательности изменений:

Стадия 1. Продолжительная экскреция органических кислот снизила pH среды, что способствовало эволюции белков, выполняющих функции трансмембранных H^+ -насосов и способных откачивать H^+ из клетки для защиты ее от опасных последствий внутриклеточного закисления. Один из этих насосов мог использовать энергию гидролиза АТФ и мог послужить предшественником современной АТФ-синтазы.

Стадия 2. В то же самое время, когда несбраживаемые органические кислоты накапливались в среде и способствовали эволюции АТФ-зависимого H^+ -насоса, запасы геохимически синтезированных сбраживаемых питательных веществ, которые предоставляли энергию для работы насосов и других клеточных процессов, истощались. Это давало преимущество бактериям, способным выделять H^+ без гидролиза АТФ и сохраняющим АТФ для других клеточных процессов. Давление отбора такого рода могло привести к появлению первых мембраносвязанных белков, способных использовать электронный транспорт между молекулами с разными редокс-потенциалами в качестве источника энергии для транспорта H^+ через плазматическую мембрану. Некоторые из этих белков могли найти своих электронных доноров и акцепторов среди накапливающихся несбраживаемых органических кислот. Современные бактерии содержат множество такого рода электрон-транспортных белков; некоторые бактерии, растущие на муравьиной кислоте, например, откачивают H^+ при помощи небольшого количества окислительно-

восстановительной энергии, полученной за счет транспорта электронов с муравьиной кислоты на фумарат (рис. 14.67). У других есть сходные электрон-транспортные компоненты, служащие исключительно для окисления и восстановления неорганических субстратов (смотри, например, рис. 14.69).

Стадия 3. В конце концов некоторые бактерии развили откачивающие H^+ электрон-транспортные системы, которые были достаточно эффективны для того, чтобы получать больше окислительно-восстановительной энергии, чем требуется для поддержания внутреннего pH. Теперь преимущество получили бактерии, несущие оба типа H^+ -насосов. В этих клетках большой электрохимический протонный градиент позволил протонам просачиваться обратно в клетку через АТФ-зависимые H^+ -насосы, таким образом меняя направление их работы и заставляя их работать как АТФ-синтазы и синтезировать АТФ. Поскольку таким бактериям требовалось значительно меньше сбраживаемых питательных веществ, которых в среде стало уже совсем мало, они процветали за счет своих соседей.

На рис. 14.68 показаны эти три гипотетические стадии эволюции механизмов окислительного фосфорилирования.

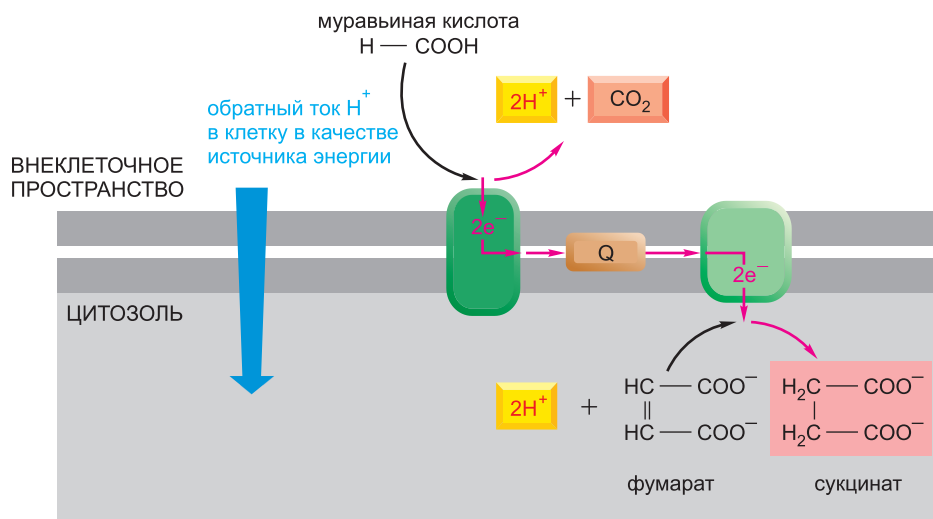


Рис. 14.67. Окисление муравьиной кислоты в некоторых современных бактериях. В некоторых анаэробных бактериях, в том числе *E. coli*, окисление опосредовано преобразующей энергию электрон-транспортной цепью плазматической мембраны. Как показано, исходными веществами служат муравьиная кислота и фумарат, а продуктами – сукцинат (янтарная кислота) и CO_2 . Обратите внимание, что H^+ внутри клетки потребляется, а снаружи образуется, что соответствует откачке H^+ во внешнюю среду. Таким образом, данная мембраносвязанная электрон-транспортная система способна создавать электрохимический протонный градиент через плазматическую мембрану. Редокс-потенциал пары муравьиная кислота- CO_2 равен -420 мВ, а пары фумарат-сукцинат +30 мВ. (Сравни с рис. 14.29.)

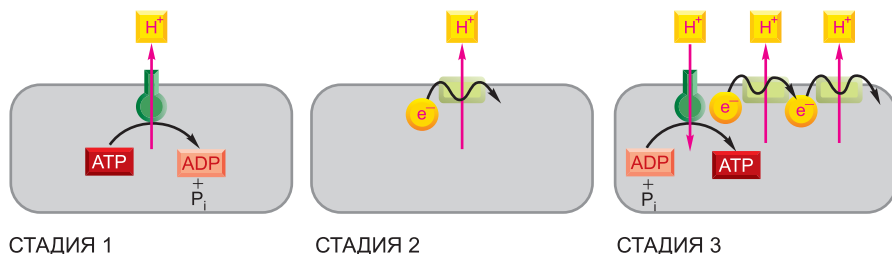


Рис. 14.68. Эволюция механизмов окислительного фосфорилирования. Показана одна из возможных последовательностей; стадии описаны в тексте.

14.5.3. Создав неистощимый источник восстановительной способности, фотосинтетические бактерии преодолели важную эволюционную преграду

Описанные выше эволюционные шаги решают проблему поддержания как нейтрального внутриклеточного pH, так и источника энергии, но они не способны решить другую, в равной степени серьезную, проблему. Истощение органических питательных веществ в среде означало, что организмам было необходимо найти альтернативный источник углерода для синтеза сахаров, служивших предшественниками для многих других клеточных молекул. Несмотря на то что атмосферный CO_2 служил потенциально богатым источником углерода, для его перевода в органическую молекулу, например углеводород, требуется восстановление фиксированного CO_2 сильным электронным донором вроде NADH или NADPH, способным дать высокоэнергетические электроны, необходимые для образования каждой (CH_2O) -единицы из CO_2 (см. рис. 14.40). На ранних стадиях клеточной эволюции сильных восстановительных агентов (электронные доноры) было в избытке, поскольку они образовывались в результате брожения. Но по мере того как становилось меньше сбраживаемых питательных веществ, а мембраносвязанная АТФ-синтаза начала синтезировать большую часть АТФ, источник NADH и других восстановительных агентов должен был исчезнуть. Таким образом, клеткам стало необходимо развить новый способ синтеза сильных восстановителей.

Предположительно, основными все еще доступными на тот момент восстановительными агентами были органические кислоты, образовывавшиеся в результате анаэробного метаболизма углеводов, неорганических молекул, например геохимически синтезированного сероводорода (H_2S), и воды. Но восстановительная способность этих молекул была слишком мала для фиксации CO_2 . Ранний источник сильных электронных доноров мог быть создан путем использования электрохимического протонного градиента через плазматическую мембрану для обеспечения энергией обратного транспорта электронов. Для этого потребовалась бы эволюция мембраносвязанных ферментных комплексов вроде NADH-дегидрогеназы. Механизмы такого рода до сих пор сохранились в анаэробном метаболизме некоторых современных бактерий (рис. 14.69).

Однако крупным эволюционным прорывом в энергетическом метаболизме было, очевидно, развитие фотохимических реакционных центров, которые могли использовать энергию солнечного света для синтеза таких молекул, как NADH. Считается, что это произошло довольно рано в процессе клеточной эволюции —

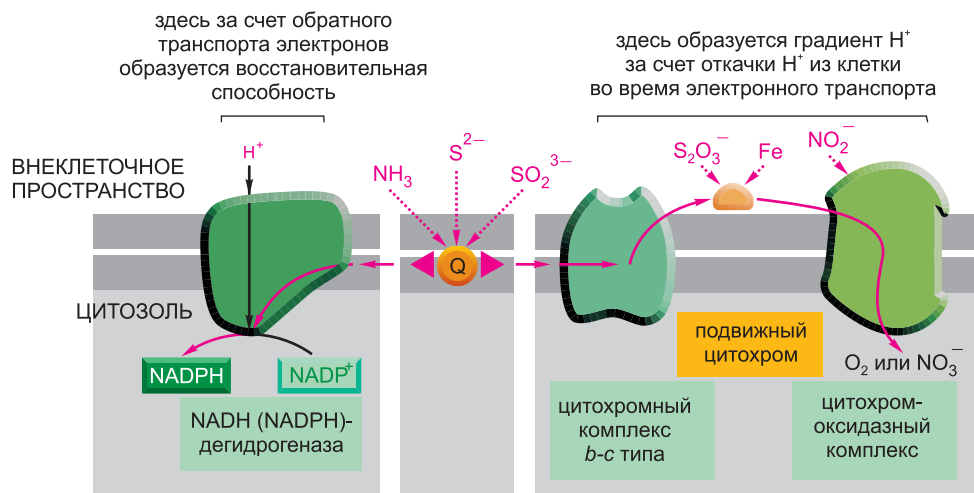


Рис. 14.69. Некоторые электрон-транспортные цепи современных бактерий. Некоторые виды способны анаэробно расти за счет замещения кислорода нитратом в качестве конечного акцептора электронов. Большинство использует цикл фиксации углерода и синтезирует собственные органические молекулы исключительно из углекислого газа. Показанные пути создают необходимые АТФ и восстановительную способность за счет окисления неорганических молекул, например железа, аммиака, нитрита и соединений серы.

более 3×10^9 лет назад в предках зеленых серных бактерий. Современные зеленые серные бактерии используют энергию света для переноса атомов водорода (в форме электрона и протона) с H_2S на NADPH, создавая таким образом сильный восстановитель для фиксации углерода (рис. 14.70). Поскольку удаленные с H_2S электроны имеют более отрицательный редокс-потенциал, чем электроны H_2O (-230 мВ для H_2S по сравнению с $+820$ мВ для H_2O), одного поглощенного единственной фотосистемой таких бактерий кванта света достаточно для достижения высокого редокс-потенциала для синтеза NADPH в относительно простой фотосинтетической электрон-транспортной цепи.

Обратите внимание, что прямой и обратный потоки электронов протекают через хинон (Q). Как и в дыхательной цепи, прямой поток электронов приводит к откачке H^+ из клетки, и образующийся градиент H^+ используется для синтеза АТФ АТФ-синтазой (не показано). NADPH, требующийся для фиксации углерода, синтезируется посредством энергозатратного обратного транспорта электронов; как показано, здесь также используется энергия градиента H^+ .

14.5.4. Фотосинтетическая электрон-транспортная цепь цианобактерий синтезировала атмосферный кислород и позволила возникнуть новым формам жизни

Следующий этап, который, предположительно, связан с развитием цианобактерий примерно 3×10^9 лет назад, состоял в эволюции организмов, способных использовать воду в качестве источника электронов для CO_2 . Это повлекло за собой эволюцию водоокисляющего фермента и потребовало добавления второй фотосистемы, работающей последовательно с первой, для преодоления огромного разрыва между окислительно-

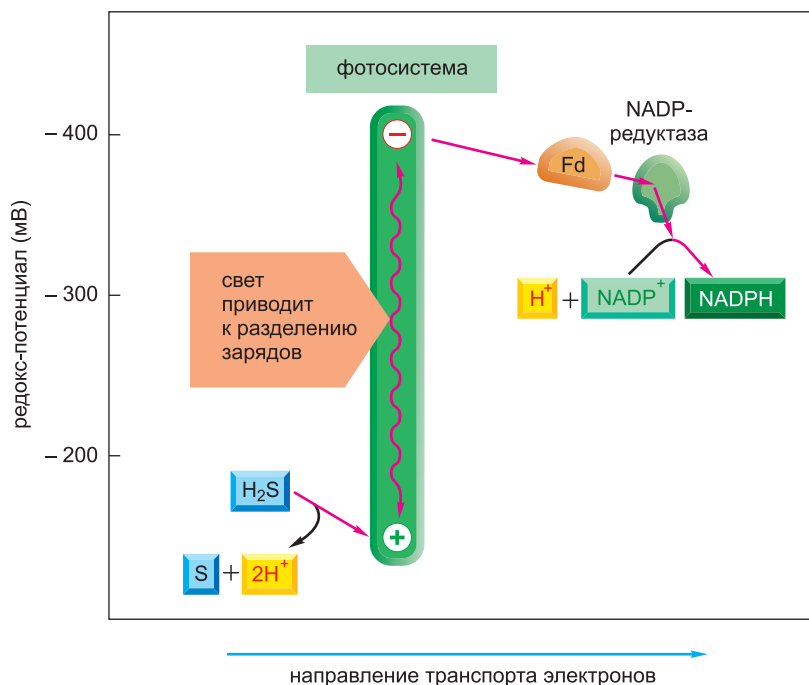


Рис. 14.70. Общий поток электронов в относительно примитивной разновидности фотосинтеза современных зеленых серных бактерий. Фотосистема зеленых серных бактерий похожа на фотосистему I растений и цианобактерий. Оба типа фотосистем содержат последовательность железо-серных кластеров, служащих акцепторами электронов, и высокоэнергетические электроны в конце концов донируются на ферредоксин (Fd). Бактерия такого типа, *Chlorobium tepidum*, способна выживать при высоких температурах и низкой интенсивности света в горячих источниках.

восстановительными потенциалами H_2O и NADPH. Наблюдающаяся сегодня структурная гомология между фотосистемами указывает на то, что при этом происходила кооперация между фотосистемой зеленых бактерий (фотосистемой I) и фотосистемой пурпурных бактерий (фотосистема II). Биологические последствия этого эволюционного шага были огромными. Впервые появились организмы, которые очень мало химически зависели от окружающей среды. Эти клетки могли распространяться и эволюционировать путями, недоступными ранним фотосинтетическим бактериям, которым требовались H_2S или органические кислоты в качестве источника электронов. В результате накопилось много биологически синтезированных восстановленных органических веществ. Более того, в атмосфере впервые появился кислород.

Кислород очень ядовит, поскольку связанные с ним окислительные реакции могут случайным образом изменять биологические молекулы. Многие современные анаэробные бактерии, например, на воздухе быстро погибают. Таким образом, организмы на примитивной Земле должны были развить механизмы защиты против растущего уровня O_2 в окружающей среде. Поздно эволюционировавшие организмы, например мы с вами, обладают множеством механизмов обезвреживания кислорода, защищающих наши клетки. Но все равно накопление окислительных повреждений макромолекул считается одной из основных причин человеческого старения, как отмечено выше.

Увеличение концентрации атмосферного O_2 происходило сначала очень медленно и позволило защитным механизмам развиваться постепенно. Например, ранние моря содержали много железа в двухвалентном состоянии (Fe^{2+}), и почти весь образовавшийся ранними фотосинтетическими бактериями O_2 мог уходить на превращение Fe^{2+} в Fe^{3+} . В результате произошло накопление огромного количества оксидов трехвалентного железа, и слоистые железные образования в осадочных породах, возникшие около $2,7 \times 10^9$ лет назад, позволяют оценить время распространения цианобактерий. Около 2×10^9 лет назад запас двухвалентного железа истощился, и образование железных осадочных пород прекратилось. Геологические данные указывают на то, что после этого уровень O_2 в атмосфере стал быстро нарастать и достиг современного уровня между $0,5$ и $1,5 \times 10^9$ лет назад (рис. 14.71).

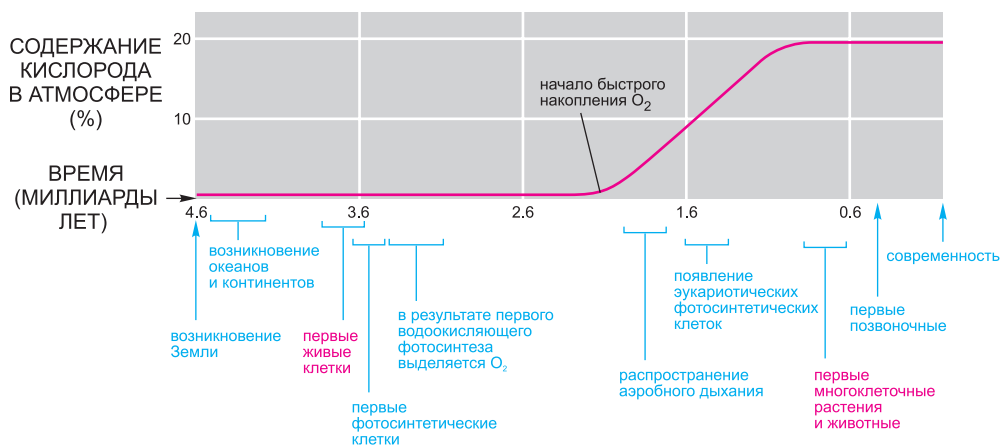


Рис. 14.71. Основные события, предположительно произошедшие во время эволюции живых организмов на Земле. С возникновением мембраносвязанных процессов фотосинтеза организмы смогли синтезировать свои собственные органические молекулы из CO_2 . Как объясняется в тексте, временная задержка в примерно 10^9 лет между появлением бактерий, способных расщеплять воду и выделять O_2 во время фотосинтеза, и накоплением высокого уровня O_2 в атмосфере объясняется взаимодействием кислорода с присутствовавшим в избытке в ранних океанах двухвалентным железом Fe^{2+} . Только когда железо иссякло, накопление кислорода стало возможным. В ответ на увеличение концентрации кислорода в атмосфере появились нефотосинтетические кислородопотребляющие организмы, и уровень кислорода в воздухе стал постоянным.

Доступность O_2 сделала возможным развитие бактерий, полагающихся на аэробный метаболизм для синтеза АТФ. Как показано ранее, эти организмы могли получать большое количество высвобождаемой энергии путем расщепления углеводов и других восстановленных органических молекул до CO_2 и H_2O . Компоненты уже существующих электрон-транспортных комплексов были модифицированы для получения цитохромоксидазы. В результате полученные от органических или неорганических субстратов электроны могли быть транспортированы на O_2 — конечный акцептор электронов. Многие современные фотосинтетические пурпурные бактерии могут переключаться между фотосинтезом и дыханием в зависимости от доступности света и O_2 . Для этого им необходима лишь незначительная перестройка электрон-транспортной цепи.

По мере того как на Земле в результате фотосинтеза накапливались органические вещества, некоторые фотосинтетические бактерии (включая предшественников *E. coli*) потеряли способность выживать исключительно за счет энергии света и стали полагаться только на дыхание. Как описано ранее (см. рис. 14.58), предположительно митохондрии впервые появились около $1,5 \times 10^9$ лет назад, возможно, когда примитивные эукариотические клетки эндоцитировали такую зависящую от дыхания бактерию. Считается, что растения эволюционировали позже, когда потомки этих ранних аэробных эукариотических клеток эндоцитировали фотосинтетическую бактерию, ставшую прародителем хлоропластов.

На **рисунке 14.72** мы соотносим эти эволюционные пути с различными типами описанных в данной главе бактерий. Эволюция всегда консервативна, она берет части старых механизмов и на их основе создает новые. Таким образом, части электрон-транспортной цепи, появившиеся в анаэробных бактериях 3×10^9 – 4×10^9 лет назад,

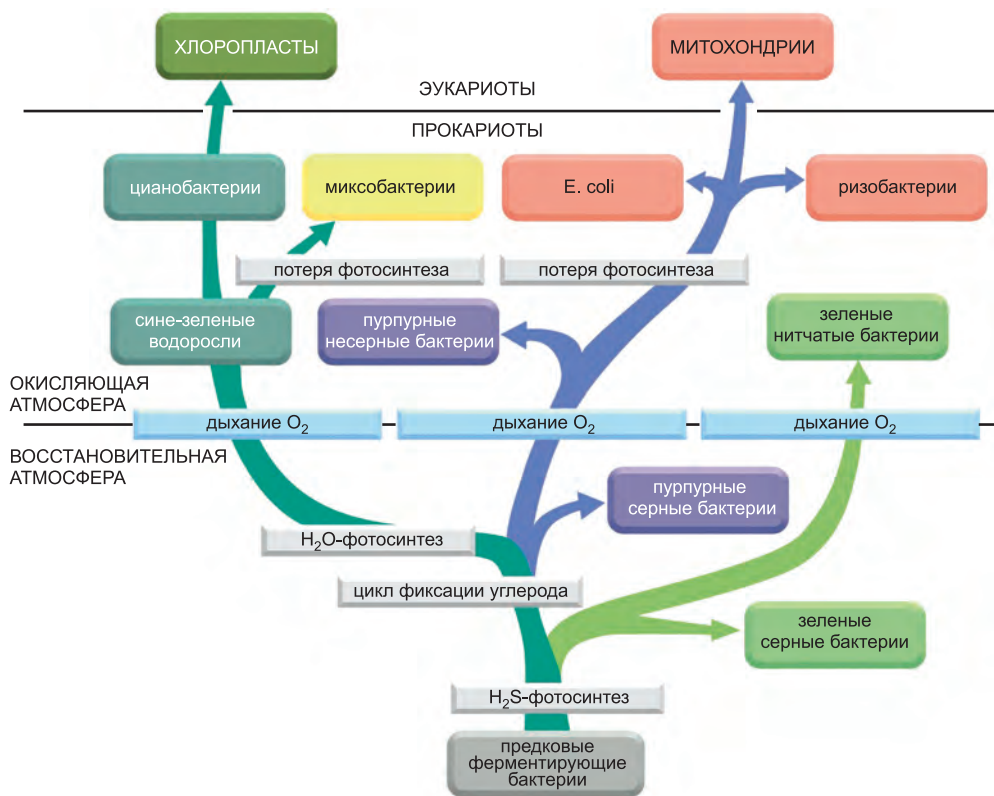


Рис. 14.72. Филогенетическое дерево предполагаемой эволюции митохондрий и хлоропластов и их бактериальных предшественников. Считают, что кислородное дыхание начало развиваться примерно 2×10^9 лет назад. Как показано, оно, по-видимому, независимо появилось в зеленой, пурпурной и сине-зеленой (цианобактерии) линиях фотосинтетических бактерий. Предположительно, аэробная пурпурная бактерия, потерявшая способность к фотосинтезу, стала предком митохондрий, тогда как цианобактерия — предком хлоропластов. Анализ нуклеотидных последовательностей показывает, что митохондрии появились из пурпурной бактерии, напоминавшей ризобактерии, агробактерии и риккетсии — три близкородственных вида, которые способны жить в симбиозе с современными эукариотическими клетками. У архей отсутствуют фотосистемы описанного в этой главе типа, поэтому они сюда не включены.

скорее всего, в измененной форме сохранились в митохондриях и хлоропластах современных высших эукариот. Хорошим примером служит гомология структуры и функции ферментного комплекса, транспортирующего H^+ в центральном сегменте митохондриальной дыхательной цепи (цитохром b_1 -с комплекс), и его аналогов в электрон-транспортных цепях бактерий и хлоропластов (рис. 14.73).

Заключение

Считается, что ранние клетки представляли собой бактериоподобные организмы в среде, обогащенной восстановленными органическими молекулами, образовывавшимися в результате геохимических процессов на протяжении сотен миллионов лет. Они получали большую часть своего АТФ путем превращения

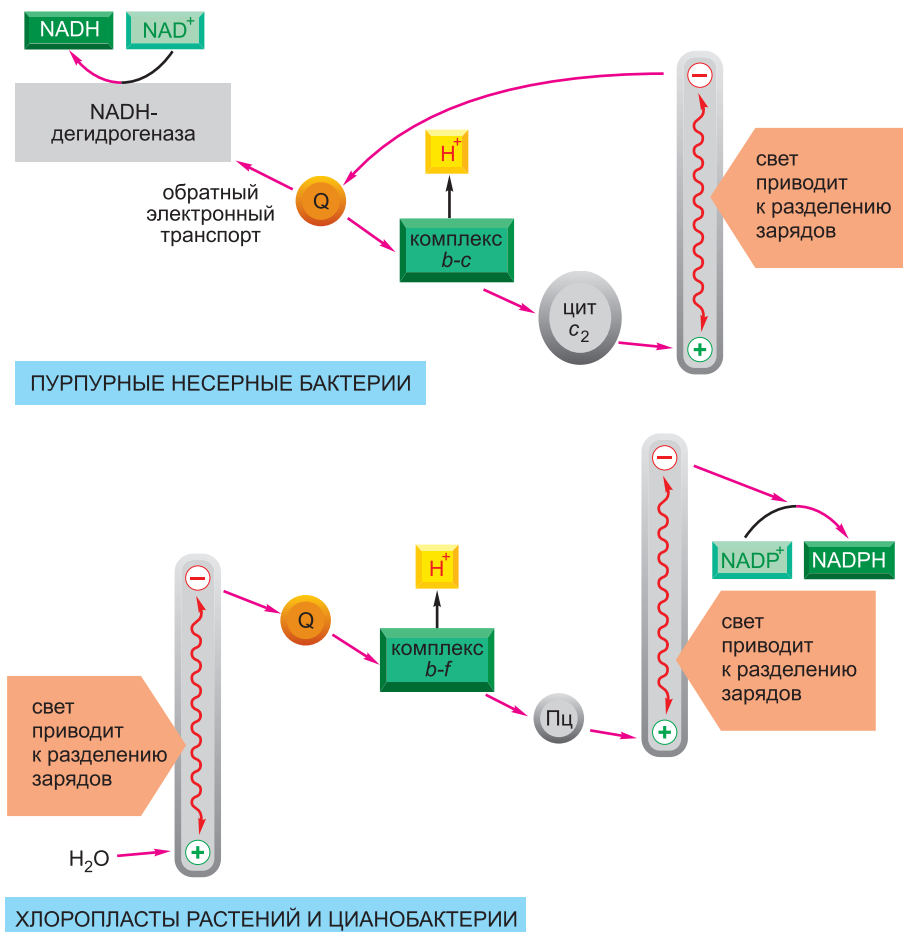


Рис. 14.73. Сравнение трех описанных в данной главе электрон-транспортных цепей. Бактерии, хлоропласты и митохондрии содержат мембраносвязанный ферментный комплекс, похожий на цитохром $b-c_1$ комплекс митохондрий. Все эти комплексы принимают электроны от хинонного переносчика (Q) и транспортируют H^+ через соответствующие мембраны. Более того, *in vitro* в искусственных системах различные комплексы способны замещать друг друга, а структуры их компонентов показывают, что они эволюционно связаны.

этих восстановленных органических молекул в разнообразные органические кислоты, которые затем выделяли в качестве побочных продуктов. Такое брожение закисляло среду, что могло привести к эволюции первых мембраносвязанных H^+ -насосов, которые были способны поддерживать нейтральный pH внутренней среды клетки за счет откачивания H^+ . Характеристики современных бактерий указывают на то, что зависимый от электронного транспорта H^+ -насос и АТР-зависимый H^+ -насос впервые появились в анаэробных условиях. Изменение направления работы АТР-зависимого насоса позволило ему работать в качестве АТР-синтазы. По мере того как развивались все более эффективные электрон-транспортные цепи, энергия, высвобождаемая в окислительно-восстановительных реакциях между неорганическими молекулами и/или накопленными несбраживаемыми соединениями, создала большой электрохимический протонный градиент, который можно было использовать АТР-зависимым насосом для синтеза АТР.

Поскольку образование органических молекул в результате геохимических процессов идет очень медленно, развитие бактерий, использовавших уже существующие органические вещества в качестве источника углерода и восстановительной способности, не могло продолжаться вечно. Истощение сбраживаемых органических питательных веществ, по-видимому, привело к эволюции бактерий, способных использовать CO_2 для синтеза углеводов. Благодаря объединению уже существующих частей электрон-транспортных цепей, в фотосинтетических бактериях единственная фотосистема стала использовать энергию света для синтеза NADPH, необходимого для фиксации углерода. Последующее появление более сложных электрон-транспортных цепей цианобактерий дало возможность использовать H_2O в качестве электронного донора для образования NADPH, а не значительно менее распространенные электронные доноры, необходимые другим бактериям. Это позволило жизни широко распространиться по Земле, и началось повторное накопление восстановленных органических молекул.

Примерно 2×10^9 лет назад в атмосфере начал накапливаться выделяемый цианобактериями при фотосинтезе O_2 . Как только стало много органических молекул и O_2 , электрон-транспортные цепи приспособились к транспорту электронов от NADH на O_2 , и во многих бактериях развился эффективный аэробный метаболизм. Точно такие же аэробные механизмы действуют в настоящее время в митохондриях эукариот. Сейчас появляется все больше доказательств, что митохондрии и хлоропласты произошли от аэробных бактерий.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

14.1. Три дыхательных ферментных комплекса во внутренней мембране митохондрий существуют в структурно упорядоченных кластерах, что способствует правильному переносу электронов между комплексами.

14.2. Слабые липофильные кислоты, замыкая нормальный ток протонов через внутреннюю мембрану, убирают протондвижущую силу, останавливают синтез АТР и блокируют электронный транспорт.

14.3. Мутации, наследуемые по менделевским законам, затрагивают ядерные гены; мутации, наследование которых нарушает менделевские законы, скорее всего, располагаются в геноме органелл.

Решите следующие задачи

14.4. В 60-х гг. XIX века Луи Пастер заметил, что если к анаэробной культуре дрожжей, растущей на глюкозе, добавить O_2 , скорость поглощения глюкозы падает. Объясните этот результат, известный как эффект Пастера.

14.5. В активно дышащих митохондриях печени рН матрикса примерно на половину единицы рН выше, чем рН цитозоля. Пусть рН цитозоля 7, а матрикс представляет собой сферу диаметром 1 мкм [$V = (4/3)\pi r^3$]. Рассчитайте общее число протонов в матриксе дышащей митохондрии печени. Если исходный рН матрикса был равен 7 (и равен рН цитозоля), сколько протонов должно было быть выкачано, чтобы рН матрикса стал равен 7,5 (разница в 0,5 единиц рН)?

14.6. Сердечная мышца получает большую часть АТФ, требующегося для поддержания непрерывных сокращений, посредством окислительного фосфорилирования. При окислении глюкозы до CO_2 сердечная мышца поглощает O_2 со скоростью 10 мкмоль/мин на г ткани. Это покрывает затраты АТФ на сокращение и поддерживает постоянную концентрацию АТФ в ткани, равную 5 мкмоль/г. Сколько секунд понадобится сердцу для поглощения количества АТФ, равного стационарному уровню? (При полном окислении одной молекулы глюкозы до CO_2 синтезируется 30 АТФ, 26 из которых образуется в результате окислительного фосфорилирования с использованием 12 пар электронов, переносимых NADH и $FADH_2$.)

14.7. Если выделенные митохондрии инкубировать с источником электронов, например сукцинатом, но без кислорода, электроны будут входить в дыхательную цепь, почти полностью восстанавливая все электронные переносчики. Если затем ввести кислород, переносчики окисляются с разной скоростью (рис. Q14.1). Как этот эксперимент позволяет определить последовательность электронных переносчиков в дыхательной цепи? В каком порядке они расположены?

14.8. Разобщик динитрофенол когда-то прописывали в качестве лекарства для потери веса. Как разобщик окислительного фосфорилирования способствует похуданию? Почему его больше не прописывают?

14.9. Сколько энергии в видимом свете? Сколько энергии солнечный свет доставляет на Землю? Насколько эффективно растения преобразуют световую энергию в энергию химических связей? Ответы на эти вопросы очень важны для изучения фотосинтеза.

Каждый квант или фотон несет энергию $h\nu$, где h — постоянная Планка ($1,58 \times 10^{-37}$ ккал с/фотон), а ν — частота в s^{-1} . Частота света равна c/λ , где c — скорость света ($3,0 \times 10^{17}$ нм/с), а λ — длина волны в нм. Таким образом, энергия (E) фотона равна

$$E = h\nu = hc/\lambda.$$

А. Рассчитайте энергию моля фотонов (6×10^{23} фотонов/моль) при 400 нм (фиолетовый свет), 680 нм (красный) и 800 нм (ближний инфракрасный).

Б. Яркий солнечный свет падает на Землю со скоростью, примерно равной 0,3 ккал/с на квадратный метр. Для простоты расчетов примем, что солнечный свет состоит из монохроматического света длиной волны 680 нм. Сколько секунд понадобится для того, чтобы на квадратный метр попал моль фотонов?

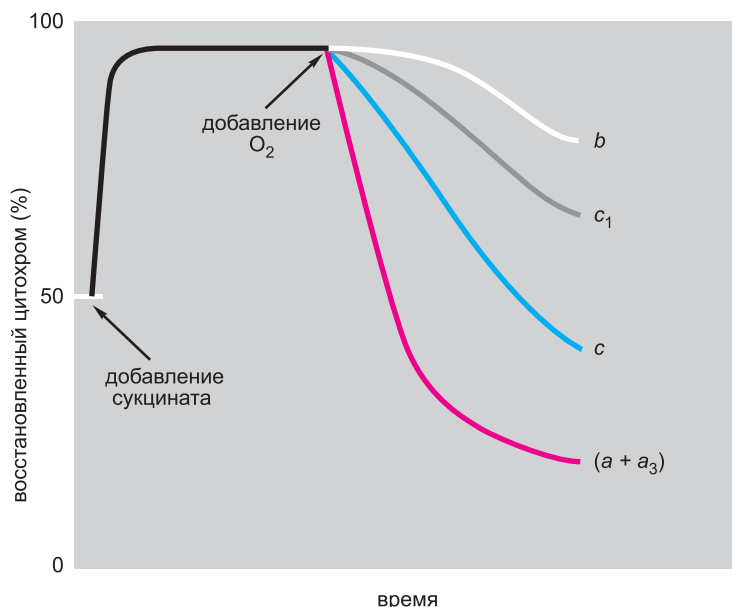


Рис. Q14.1. Быстрый спектрофотометрический анализ скорости окисления электронных переносчиков дыхательной цепи (задача 14.7). Цитохромы a и a_3 различить невозможно, поэтому они указаны как цитохром $(a + a_3)$.

В. Если для фиксации одной молекулы CO_2 в форме углевода в оптимальных условиях требуется восемь фотонов (в настоящее время принятым значением является 8–10 фотонов), рассчитайте, сколько времени понадобится томату с площадью листьев 1 квадратный метр синтезировать моль глюкозы из CO_2 . Пусть фотоны падают на листья со скоростью, рассчитанной в прошлом пункте, и пусть все фотоны поглощаются и используются для фиксации CO_2 .

Г. Если для фиксации моля CO_2 с образованием углеводорода требуется 112 ккал/моль, какова эффективность преобразования световой энергии в химическую энергию после поглощения фотона? Снова примите, что для фиксации одной молекулы CO_2 требуется 8 фотонов красного света (680 нм).

14.10. Вспомнив знаменитый эксперимент Джозефа Пристли, в котором росток мяты спас жизнь мыши в запечатанной камере, вы решаете провести аналогичный опыт, чтобы посмотреть, что будет с C_3 - и C_4 -растениями в изолированной среде. Вы помещаете растение кукурузы (C_4) и герань (C_3) в запечатанную пластиковую камеру с нормальным воздухом (300 частей на миллион CO_2), и ставите камеру на подоконник в своей лаборатории. Что случится с растениями? Будут ли они конкурировать или сотрудничать? Если они будут конкурировать, кто победит и почему?

14.11. Рассмотрите мозаичный лист на рис. Q14.2. На нем много желтых пятен, окруженных зеленым, но нет зеленых пятен, окруженных желтым. Предложите свое объяснение этого явления.

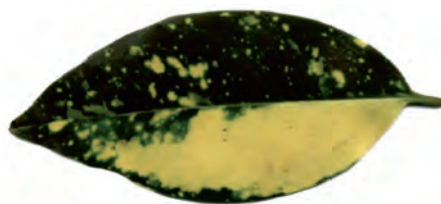


Рисунок Q14.2. Мозаичный лист *Aucuba japonica* с зелеными и желтыми пятнами (задача 14.11).

Литература

Общая

Cramer W. A. & Knaff D. B. (1990) *Energy Transduction in Biological Membranes: A Textbook of Bioenergetics*. New York: Springer-Verlag.

Mathews C. K., van Holde K. E. & Ahern K.-G. (2000) *Biochemistry*, 3rd ed. San Francisco: Benjamin Cummings.

Nicholls D. G. & Ferguson S. J. (2002) *Bioenergetics*, 3rd ed. London: Academic Press.

Митохондрия

Abrahams J. P., Leslie A. G., Lutter R. & Walker J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370: 621–628.

Berg H. C. (2003) The rotary motor of bacterial flagella. *Annu. Rev. Biochem.* 72: 19–54.

Boyer P. D. (1997) The ATP synthase — a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* 66: 717–749.

Ernster L. & Schatz G. (1981) Mitochondria: a historical review. *J. Cell Biol.* 91: 227s–255s.

Frey T. G., Renken C. W. & Perkins G. A. (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim. Biophys. Acta.* 1555: 196–203.

Pebay-Peyroula E. & Brandolin G. (2004) Nucleotide exchange in mitochondria: insight at a molecular level. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 420–425.

Meier T., Polzer P., Diederichs K. et al. (2005) Structure of the rotor ring of F-type Na⁺-ATPase from *Halobacterium salinarum*. *Science* 308: 659–662.

Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191: 144–148.

Nicholls D. G. (2006) The physiological regulation of uncoupling proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757: 459–466.

Racker E. & Stoeckenius W. (1974) Reconstitution of purple membrane vesicles catalyzing light-driven proton uptake and adenosine triphosphate formation. *J. Biol. Chem.* 249: 662–663.

Saraste M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488–1493.

Scheffler I. E. (1999) *Mitochondria*. New York/Chichester: Wiley-Liss.

Stock D., Gibbons C., Arechaga I. et al. (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 10: 672–679.

Weber J. (2007) ATP synthase — the structure of the stator stalk. *Trends Biochem. Sci.* 32: 53–56.

Электрон-транспортные цепи и их протонные насосы

Beinert H., Holm R. H. & Munck E. (1997) Iron-sulfur clusters: nature's modular, multipurpose structures. *Science* 277: 653–659.

Berry E. A., Guergova-Kuras M., Huang L. S. & Crofts A. R. (2000) Structure and function of cytochrome bc complexes. *Annu. Rev. Biochem.* 69: 1005–1075.

Brand M. D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 897–904.

Brandt U. (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* 75: 69–92.

Chance B. & Williams G.R. (1955) A method for the localization of sites for oxidative phosphorylation. *Nature* 176: 250–254.

Gottschalk G. (1997) Bacterial Metabolism, 2nd ed. New York: Springer.

Gray H.B. & Winkler J.R. (1996) Electron transfer in proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 65: 537–556.

Keilin D. (1966) The History of Cell Respiration and Cytochromes. Cambridge: Cambridge University Press.

Sazanov L.A. (2007) Respiratory complex I: mechanistic and structural insights provided by the crystal structure of the hydrophilic domain. *Biochemistry* 46: 2275–2288.

Subramaniam S. & Henderson R. (2000) Molecular mechanism of vectorial proton translocation by bacteriorhodopsin. *Nature* 406: 653–657.

Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E. et al. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8Å. *Science* 272: 1136–1144.

Wikstrom M. & Verkhovsky M.I. (2006) Towards the mechanism of proton pumping by the haem-copper oxidases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1757: 1047–1051.

Хлоропласты и фотосинтез

Blankenship R. E. (2002) Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Oxford, UK: Blackwell Scientific.

Bassham J. A. (1962) The path of carbon in photosynthesis. *Sci. Am.* 206: 88–100.

Deisenhofer J. & Michel H. (1989) Nobel lecture. The photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodospseudomonas viridis*. *EMBO J.* 78: 2149–2170.

Edwards G. E., Furbank R. T., Hatch M. D. & Osmond C.B. (2001) What does it take to be c(4)? – lessons from the evolution of c(4) photosynthesis. *Plant Physiol.* 125: 46–49.

Ferreira K. N., Iverson T. M., Maghlaoui K. et al. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center. *Science* 303: 1831–1838.

Iwata S. & Barber J. (2004) Structure of photosystem II and molecular architecture of the oxygen-evolving centre. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14: 447–453.

Jordan P., Fromme P., Witt H. T. et al. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5Å resolution. *Nature* 411: 909–917.

Merchant S. & Sawaya M. R. (2005) The light reactions: A guide to recent acquisitions for the picture gallery. *The Plant Cell* 17: 648–663.

Nelson N. & Ben-Shem A. (2004) The complex architecture of oxygenic photosynthesis. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5: 971–982.

Генетические системы митохондрий и пластид

Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G. et al. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290: 457–465.

Balaban R. S., Nemoto S. & Finkel T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120: 483–495.

Bendich A. J. (2004) Circular chloroplast genomes: The grand illusion. *The Plant Cell* 16: 1661–1666.

Birky C. W., Jr. (1995) Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11331–11338.

Bullerwell C.E. & Gray M.W. (2004) Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 528–534.

Cavalier-Smith T. (2002) Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr. Biol.* 12: R62–R64.

Chen X.J. & Butow R.A. (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature Rev. Genet.* 6: 815–825.

Clayton D.A. (2000) Vertebrate mitochondrial DNA—a circle of surprises. *Exp. Cell Res.* 255: 4–9.

Daly D.O. & Whelan J. (2005) Why genes persist in organelle genomes. *Genome Biol.* 6: 110.

de Duve C. (2007) The origin of eukaryotes: A reappraisal. *Nature Rev. Genet.* 8: 395–403.

Dyall S.D., Brown M.T. & Johnson P.J. (2004) Ancient invasions: From endosymbionts to organelles. *Science* 304: 253–257.

Hoppins S., Lackner L. & Nunnari J. (2007) The Machines that Divide and Fuse Mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76: 751–80.

Wallace D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283: 1482–1488.

Эволюция электрон-транспортных цепей

Blankenship R.E. & Bauer C.E. (eds.) (1995) Anoxygenic Photosynthetic Bacteria. Dordrecht: Kluwer.

de Las Rivas J., Balsera M. & Barber J. (2004) Evolution of oxygenic photosynthesis: genome-wide analysis of the OEC extrinsic proteins. *Trends Plant Sci.* 9: 18–25.

Orgel L.E. (1998) The origin of life—a review of facts and speculations. *Trends Biochem. Sci.* 23: 491–495.

Schafer G., Purschke W. & Schmidt C.L. (1996) On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiol. Rev.* 18: 173–188.

Skulachev V.P. (1994) Bioenergetics: the evolution of molecular mechanisms and the development of bioenergetic concepts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 65: 271–284.

Механизмы межклеточной сигнализации

Чтобы создать сложное общество, люди должны общаться друг с другом. Точно так же клетки должны обмениваться информацией для поддержания многоклеточного организма. Общение между людьми — это не только передача звука из рта в ухо, а межклеточная коммуникация — это не просто передача химических сигналов через пространство, разделяющее две клетки. Чтобы регулировать то, какие сигналы посылаются в каждый конкретный момент и как клетки, на которые они направлены, интерпретируют эти сигналы и используют их для изменения своего поведения, существуют сложные межклеточные механизмы. Согласно палеонтологическим исследованиям, сложные многоклеточные организмы возникли на Земле только когда одноклеточные организмы, напоминающие современных прокариот, существовали уже около 2,5 миллионов лет. Такая длительная задержка может отражать сложность эволюции систем взаимодействия клеток животных, растений и грибов — аппарата, позволяющего клеткам иметь один и тот же геном, координировать свое поведение, специализироваться и подчинять свои индивидуальные шансы на выживание интересам многоклеточного организма как целого. Этим высокоразвитым механизмам межклеточной коммуникации и сигнализации посвящена данная глава.

Взаимодействие между клетками в основном опосредовано **внеклеточными сигнальными молекулами**. Некоторые из них действуют на больших расстояниях, передавая сигналы удаленным клеткам; другие взаимодействуют только с ближайшими соседями. Большинство клеток многоклеточных организмов как принимают, так и посылают сигналы. Получение (рецепция) сигнала зависит от *рецепторных белков*, обычно (но не всегда) расположенных на поверхности клетки и связывающих сигнальную молекулу. Связывание активирует рецептор, который, в свою очередь, активирует один или несколько *внутриклеточных сигнальных путей*. Последовательности молекул — в основном, *внутриклеточных сигнальных белков* — обрабатывают сигнал внутри клетки и распределяют его по соответствующим внутриклеточным мишеням. Мишени обычно представляют собой *белки-эффекторы*, которые изменяются при активации сигнального пути и соответствующим образом изменяют функционирование клетки. В зависимости от сигнала и природы клетки, на которую он направлен, эффекторы, помимо прочего, могут быть белками-регуляторами генов, ионными каналами, компонентами метаболического пути или частями цитоскелета (**рис. 15.1**).

Мы начнем эту главу с обсуждения общих принципов клеточной коммуникации. Затем мы рассмотрим основные семейства поверхностных рецепторных белков и основные активируемые ими внутриклеточные сигнальные пути. Эта глава

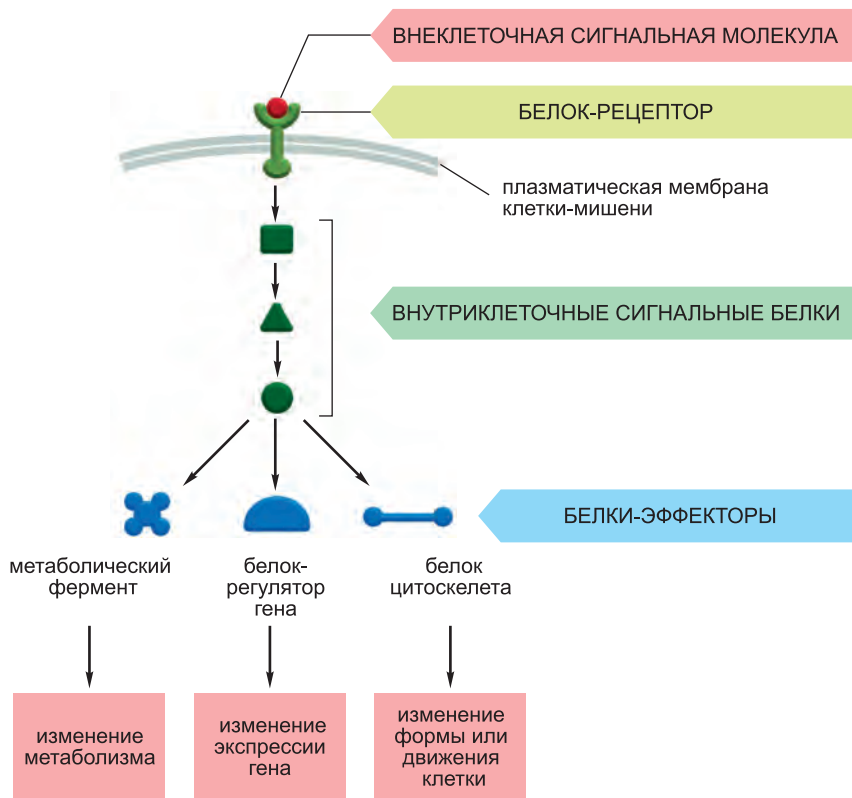


Рис. 15.1. Простой внутриклеточный сигнальный путь, активируемый внеклеточной сигнальной молекулой. Сигнальная молекула обычно связывается с белком-рецептором, встроенным в плазматическую мембрану клетки-мишени, и активирует один или несколько путей, опосредованных набором сигнальных белков. Затем внутриклеточные сигнальные белки изменяют функционирование белков-эффекторов и, следовательно, функционирование всей клетки.

в основном посвящена животным клеткам, но в конце мы рассмотрим свойства межклеточной коммуникации растений.

15.1. Общие принципы клеточной коммуникации

Задолго до того, как на Земле возникли многоклеточные организмы, одноклеточные организмы развили механизмы ответа на физические и химические изменения окружающей среды. Среди них, без сомнения, были механизмы ответа на присутствие других клеток. На это указывают современные исследования таких одноклеточных организмов, как бактерии и дрожжи. Несмотря на то что эти клетки живут, как правило, независимо, они способны взаимодействовать и влиять на функционирование друг друга. Например, многие бактерии отвечают на секретируемые их соседями сигналы и увеличение концентрации при увеличении плотности популяции. Этот процесс, носящий название «ощущения кворума» (или *кворум-сенсинга*, англ. *quorum sensing*), позволяет бактериям координировать свое поведение, включая подвижность, синтез антибиотиков, образование спор и половую конъюгацию.

Клетки дрожжей также «общаются» друг с другом во время подготовки к размножению. Хорошо изученным примером служат почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*: когда гаплоидная особь готова к размножению, она выделяет пептидный *фактор спаривания*, который сигнализирует клеткам противоположного типа спаривания об остановке пролиферации и подготовке к размножению (рис. 15.2). Последующее слияние двух гаплоидных клеток противоположных типов спаривания приводит к формированию диплоидной клетки, которая затем способна претерпеть мейоз и образовать споры, то есть в результате образуются гаплоидные клетки с новыми наборами генов (см. рис. 21.36). Перетасовка генов посредством полового размножения способствует выживанию вида в непредсказуемо изменяющейся среде (см. главу 21).

Изучение дрожжей, не способных к спариванию, позволило идентифицировать множество белков, необходимых для процесса сигнализации. Эти белки образуют сигнальную сеть, включающую в себя рецепторы на поверхности клетки, GTP-связывающие белки и протеинкиназы. Каждая из этих категорий имеет близких родственников среди рецепторов и внутриклеточных сигнальных белков животных клеток. Однако благодаря дупликации и дивергенции генов сигнальные системы животных значительно сложнее, чем системы дрожжей; в человеческом геноме, например, содержится более 1500 генов, кодирующих белки-рецепторы, а число различных рецепторов еще больше за счет альтернативного сплайсинга РНК и посттрансляционных модификаций.

Используемые животными многочисленные сигнальные белки, рецепторы и внутриклеточные сигнальные белки можно объединить в небольшое число высококонсервативных белковых семейств. Мухи, черви и животные, по сути, несут одинаковый аппарат клеточной коммуникации, и многие ключевые компоненты и сигнальные пути впервые обнаружены благодаря анализу мутаций *Drosophila* и *C. elegans*.

15.1.1. Внеклеточные сигнальные молекулы специфически связываются с рецепторами

Клетки многоклеточных животных взаимодействуют посредством сотен сигнальных молекул разного типа, включая белки, короткие пептиды, аминокислоты,

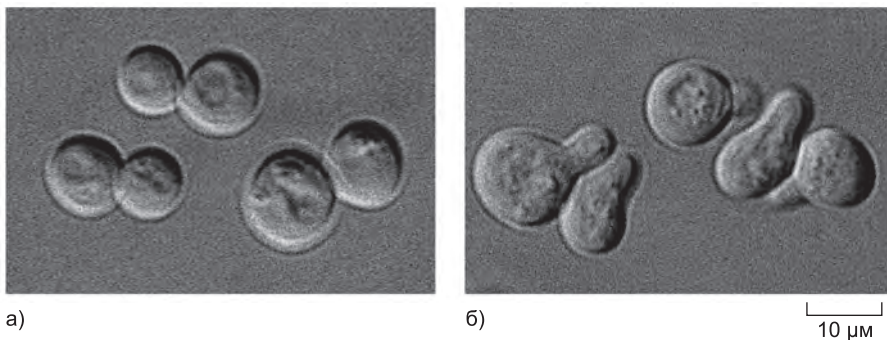


Рис. 15.2. Ответ почкующихся дрожжей на фактор спаривания. (а) В норме клетки имеют сферическую форму. (б) В ответ на фактор спаривания, секретируемый соседними клетками, дрожжи, готовясь к слиянию, образуют выпячивание, направленное в сторону источника фактора. (С любезного разрешения Michael Snyder.)

нуклеотиды, стероиды, ретиноиды, производные жирных кислот и даже растворенные в крови газы, например оксид азота и угарный газ. Большинство сигнальных молекул высвобождается путем экзоцитоза из сигнализирующей клетки во внеклеточное пространство, как обсуждалось в главе 13. Однако бывает, что молекулы диффундируют через плазматическую мембрану сигнализирующей клетки или располагаются на поверхности клетки и передают сигнал другим клеткам только при прямом контакте. В последнем случае для сигнализации могут использоваться трансмембранные белки. Иногда внеклеточные домены таких белков протеолитически отщепляются от поверхности сигнализирующей клетки и приобретают способность действовать на расстоянии.

Вне зависимости от природы сигнала *клетка-мишень* регистрирует его посредством **рецептора**, который специфически связывает сигнальную молекулу и запускает ответ. Внеклеточные сигнальные молекулы часто действуют в очень малых концентрациях (обычно $\leq 10^{-8}$ М), и узнающие их рецепторы обладают к ним высоким сродством (константа сродства $K_c \geq 10^8$ литр/моль; см. рис. 3.43).

В большинстве случаев рецепторы — это трансмембранные белки на поверхности клетки-мишени. Когда эти белки связывают внеклеточную сигнальную молекулу (*лиганд*), они активируются и посылают различные внутриклеточные сигналы, изменяющие функционирование клетки. Иногда рецепторы располагаются внутри клетки-мишени, и для связывания с ними сигнальные молекулы должны войти в клетку: для этого сигнальная молекула должна быть достаточно маленькой и гидрофобной, т.е. она могла диффундировать через плазматическую мембрану клетки-мишени (**рис. 15.3**).

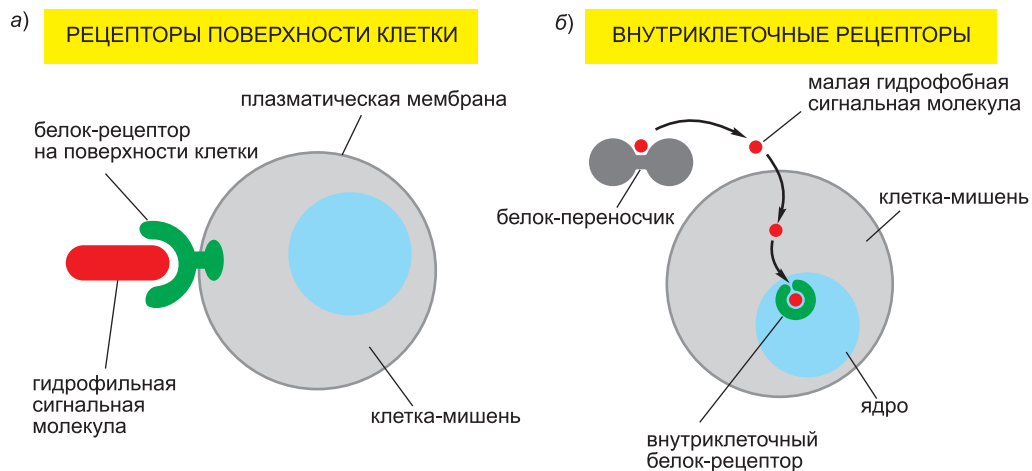


Рис. 15.3. Связывание внеклеточной сигнальной молекулы поверхностными и внутриклеточными рецепторами. (а) Большинство сигнальных молекул гидрофильны и поэтому не способны самостоятельно пересечь плазматическую мембрану клетки-мишени; вместо этого, они связываются с поверхностными рецепторами, которые, в свою очередь, передают сигнал внутрь клетки-мишени (см. рис. 15.1). (б) Некоторые малые сигнальные молекулы, наоборот, диффундируют через плазматическую мембрану и связываются с рецепторами внутри клетки-мишени — либо в цитозоле, либо в ядре (как показано здесь). Большинство таких малых сигнальных молекул гидрофобно и почти не растворимо в воде; поэтому они транспортируются в крови и других внеклеточных жидкостях в связанной форме с белками-переносчиками, от которых они диссоциируют перед входом в клетку-мишень.

15.1.2. Внеклеточные сигнальные молекулы могут действовать на коротких и дальних расстояниях

Многие сигнальные молекулы остаются связанными с поверхностью сигнализирующей клетки и влияют только на клетки, которые напрямую контактируют с ними (рис. 15.4, а). Такая **контакт-зависимая сигнализация** особенно важна во время развития организма и при иммунном ответе. Контакт-зависимая сигнализация во время развития может иногда действовать на относительно больших расстояниях: в этом случае клетки для соприкосновения друг с другом образуют длинные отростки.

Однако в большинстве случаев клетки секретируют сигнальные молекулы во внеклеточную жидкость. Эти молекулы могут быть транспортированы на большое расстояние для взаимодействия с отдаленными клетками-мишенями или использоваться в качестве **локальных медиаторов**, влияя только на клетки в ближайшем окружении сигнализирующей клетки. Последний процесс носит название **паракринной сигнализации** (рис. 15.4, б). Обычно при паракринной сигнализации клетка-мишень и сигнализирующая клетка принадлежат к разным типам, но клетки могут посылать сигналы, на которые реагируют сами — этот процесс называют *аутокринной сигнализацией*. Раковые клетки, например, часто используют эту стратегию для усиления своего выживания и пролиферации.

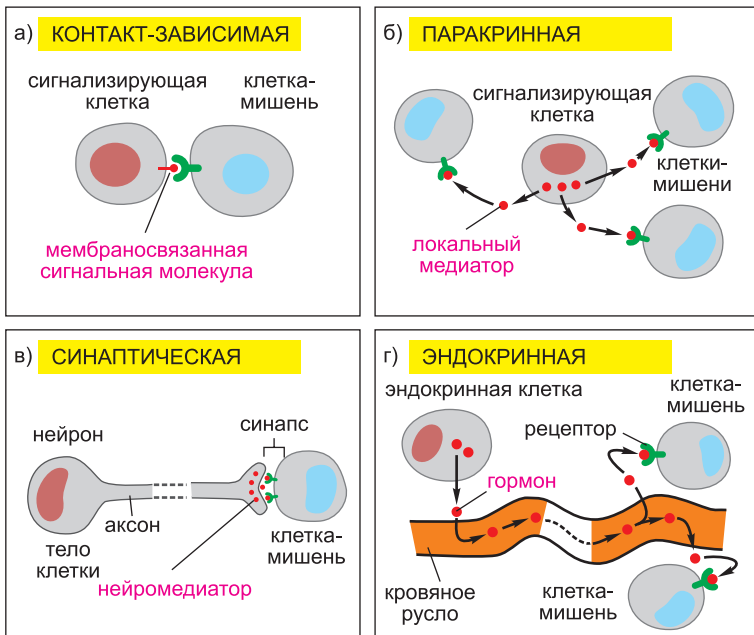


Рис. 15.4. Четыре способа межклеточной сигнализации. (а) При контакт-зависимой сигнализации клетки должны напрямую контактировать с мембранами. (б) При паракринной сигнализации высвобождаемые во внеклеточное пространство сигналы действуют локально на соседние клетки. (в) Нейроны осуществляют синаптическую сигнализацию, передавая электрические сигналы вдоль своих аксонов и высвобождая нейромедиаторы в синапсах, которые обычно расположены вдали от тела нейрона. (г) Эндокринная сигнализация зависит от эндокринных клеток, которые секретируют гормоны в кровь для распространения по всему телу. В паракринной, синаптической и эндокринной сигнализациях часто используются одни и те же типы молекул; основные различия этих механизмов заключаются в скорости и селективности доставки сигналов к мишеням.

Чтобы паракринные сигналы действовали только локально, секретированные молекулы не должны далеко диффундировать, поэтому обычно они быстро захватываются соседними клетками-мишенями, разрушаются внеклеточными ферментами или иммобилизуются внеклеточным матриксом. *Гепарансульфатпротеогликаны* (см. главу 19), располагающиеся либо во внеклеточном матриксе, либо на поверхности клетки, часто принимают участие в ограничении радиуса действия секретированных сигнальных белков. Эти молекулы несут длинные полисахаридные боковые цепи, связывающие и таким образом иммобилизующие сигнальные белки. Они также могут регулировать стабильность этих белков, их транспорт через внеклеточное пространство или взаимодействие с поверхностными рецепторами. Секретируемые белковые *антагонисты* также влияют на расстояние действия паракринных сигнальных белков. Антагонисты связываются либо с самой сигнальной молекулой, либо с ее поверхностным рецептором, блокируя таким образом ее активность. Антагонисты играют важную роль в ограничении расстояния дальнего действия секретируемых сигнальных молекул, влияющих в развитии на принимаемые эмбриональными клетками решения (см. главу 22).

Для координации функционирования клеток в различных частях тела крупным, сложным многоклеточным организмам необходимы дальнедействующие механизмы сигнализации. Таким образом, они развили клетки, специализирующиеся на внутриклеточной сигнализации на больших расстояниях. Наиболее сложным типом таких клеток являются нервные клетки, или нейроны, которые обычно несут длинные ветвящиеся отростки (аксоны), позволяющие им контактировать с удаленными клетками-мишенями. Аксоны оканчиваются специализированными сайтами передачи сигнала — *химическими синапсами*. При активации внешним или посланным другими нервными клетками стимулом нейрон быстро посылает вдоль своего аксона электрические импульсы (потенциалы действия). Когда импульс достигает синапса на конце аксона, он вызывает секрецию химического сигнала, действующего в качестве **нейромедиатора**. Плотная организованная структура синапса делает возможной специфическую доставку нейромедиатора на рецепторы постсинаптической клетки-мишени (рис. 15.4, в). **Синаптическая сигнализация** подробно рассмотрена в главе 11.

Другую стратегию сигнализации на большие расстояния используют эндокринные клетки. Они секретируют сигнальные молекулы, носящие название **гормонов**, в кровь, которая транспортирует эти молекулы по всему телу, позволяя им воздействовать на клетки-мишени в любом органе (рис. 15.4, г).

На **рис. 15.5** представлено сравнение механизмов, позволяющих эндокринным и нервным клеткам координировать функционирование животных клеток на больших расстояниях. Поскольку эндокринная сигнализация основана на диффузии и токе крови, она происходит относительно медленно. Синаптическая сигнализация, с другой стороны, действует значительно быстрее и точнее. Нервные клетки способны передавать информацию на большие расстояния посредством электрических импульсов, скорость которых может достигать 100 метров в секунду; после высвобождения из нервного окончания нейромедиатору для взаимодействия с клеткой-мишенью нужно диффундировать на расстояние, не превышающее 100 нм, для чего требуется меньше миллисекунды. Еще одно различие между эндокринной и синаптической сигнализацией заключается в том, что гормоны в крови и внеклеточной жидкости очень разбавлены и поэтому способны действовать в очень низких концентрациях (обычно $< 10^{-8}$ М), тогда как нейромедиаторы менее разбавлены, и их локальная концентрация может быть довольно высокой. Концентрация *ацетилхолина* в си-

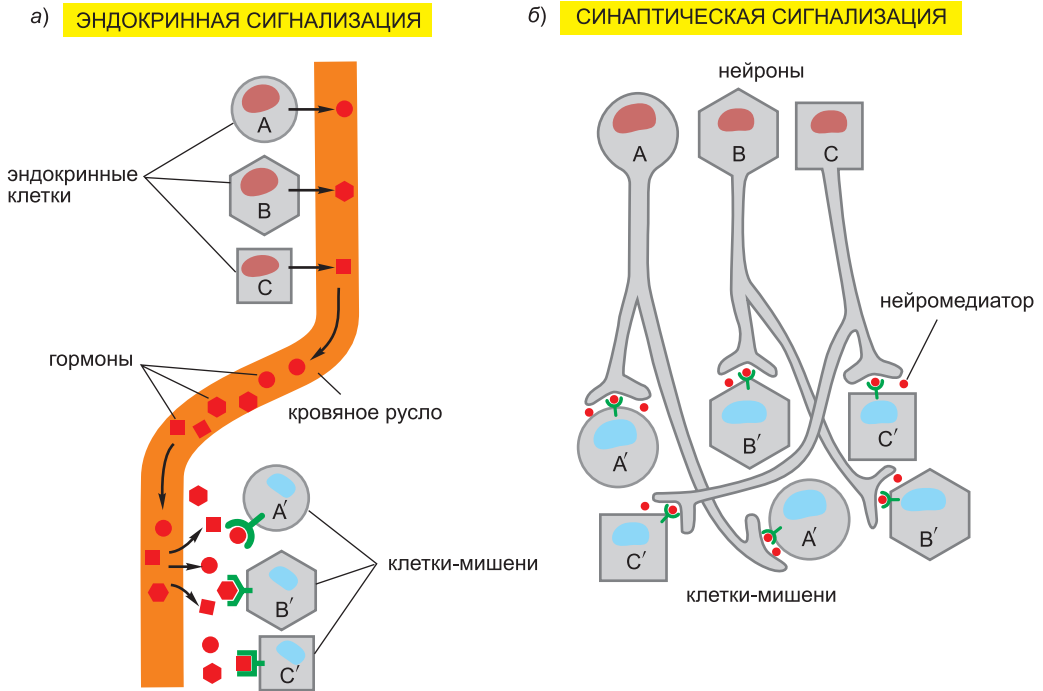


Рис. 15.5. Различия между эндокринной и нервной стратегиями далекодействующей сигнализации. В сложных животных эндокринные и нервные клетки совместно координируют функционирование клеток в различных частях тела. Если различные эндокринные клетки должны использовать различные гормоны для специфического взаимодействия с клетками-мишенями, то разные нервные клетки могут использовать один и тот же нейромедиатор, сохраняя специфичность сигнализации. (а) Эндокринные клетки секретируют в кровяное русло гормоны, которые действуют только на клетки, несущие соответствующие рецепторы. Рецепторы специфически связывают гормон, таким образом удаляя его из внеклеточной жидкости. (б) С другой стороны, при синаптической сигнализации специфичность — это результат синаптического контакта между нервной клеткой и определенной клеткой-мишенью. Обычно только клетка-мишень в синапсе с нервной клеткой подвергается действию нейромедиатора, высвобождаемого из нервного окончания (хотя некоторые нейромедиаторы действуют и в паракринном режиме и служат локальными медиаторами, влияющими на несколько клеток в данной области).

наптической щели активного нервно-мышечного соединения, например, составляет 5×10^{-4} М. Соответственно, сродство рецепторов нейромедиаторов к лиганду относительно мало. Это означает, что нейромедиатор для остановки сигнала может быстро диссоциировать от своего рецептора. Более того, после высвобождения из нервного окончания нейромедиатор быстро удаляется из синаптической щели либо посредством разрушения специфическими гидролитическими ферментами, либо за счет обратного захвата мембранными транспортными белками в нервное окончание или соседние глиальные клетки. Таким образом, синаптическая сигнализация точнее, чем эндокринная, как во времени, так и в пространстве.

Скорость ответа на внеклеточный сигнал зависит не только от механизма доставки сигнала, но и от природы ответа клетки-мишени. Когда для ответа требуются только изменения уже присутствующих в клетке белков, он может происходить очень быстро: аллостерическая перестройка нейромедиатор-зависимого ионного

канала (см. главу 11), например, способна изменить электрический потенциал плазматической мембраны за миллисекунды, а ответы, зависящие исключительно от фосфорилирования белков, протекают за секунды. Однако, когда для ответа требуется изменение экспрессии генов и синтез новых белков, он обычно занимает минуты и часы, вне зависимости от того, как сигнал доставлен (рис. 15.6).

15.1.3. Щелевые контакты позволяют соседним клеткам обмениваться сигнальной информацией

Щелевые контакты — это узкие, заполненные водой каналы, напрямую соединяющие цитоплазму соседних эпителиальных клеток, а также клеток некоторых других типов (см. рис. 19.34). Каналы позволяют клеткам обмениваться неорганическими ионами и другими малыми водорастворимыми молекулами, но не макромолекулами, например, белками или нуклеиновыми кислотами. Таким образом, клетки, контактирующие посредством щелевых контактов, способны напрямую взаимодействовать друг с другом без необходимости преодоления барьера, создаваемого плазматической мембраной (рис. 15.7). Щелевые контакты — это самый интимный вид межклеточной коммуникации, за исключением цитоплазматических мостиков (см. рис. 21.31) или слияния клеток.

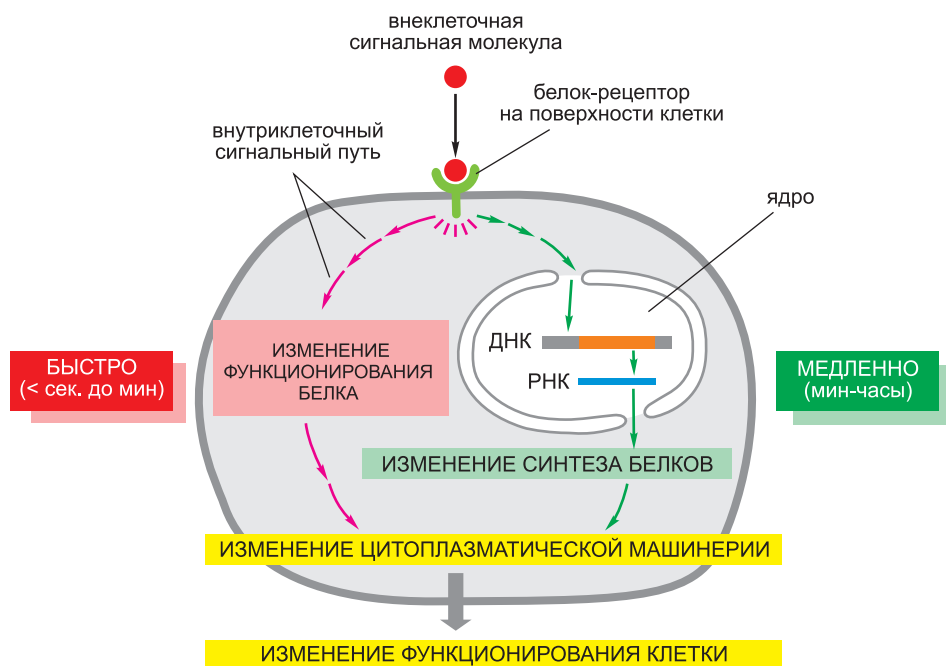


Рис. 15.6. Внеклеточные сигналы могут изменять функционирование клеток как быстро, так и медленно. Определенные типы сигнальных ответов, например усиление роста и деления клеток, включают в себя изменение экспрессии генов и синтез новых белков; они протекают медленно, обычно начинаясь только через час. Другие сигналы, например изменение движения клеток, секреции или метаболизма, не затрагивают транскрипцию генов и поэтому протекают значительно быстрее, запускаясь через секунды или минуты. При таких ответах, например, происходит быстрое фосфорилирование белков-эффекторов цитоплазмы. Синаптические ответы, опосредуемые изменением мембранного потенциала, занимают миллисекунды (не показано).

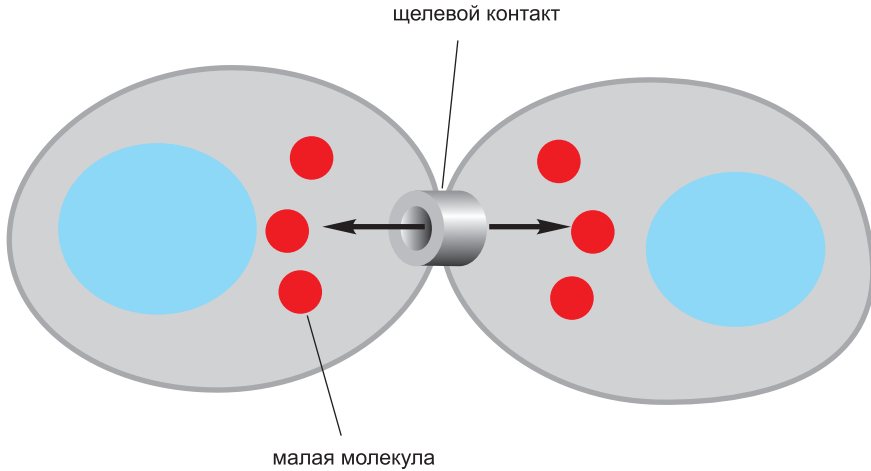


Рис. 15.7. Сигнализация посредством щелевых контактов. Клетки, соединенные щелевыми контактами, обмениваются малыми молекулами, включая внутриклеточные сигнальные молекулы, например циклический АМР и Ca^{2+} , и, следовательно, способны скоординированно отвечать на внеклеточные сигналы.

В отличие от других способов клеточной сигнализации, щелевые контакты обычно позволяют сигналам симметрично передаваться в обе стороны. Их действие направлено на уравнивание условий в контактирующих клетках. Они также играют важную роль в распространении действия внеклеточных сигналов, передающихся посредством небольших внутриклеточных медиаторов, к примеру Ca^{2+} или циклического АМР (см. ниже), которые быстро передаются через каналы щелевых контактов. В печени, например, снижение концентрации глюкозы в крови высвобождает *норадреналин* из симпатических нервных окончаний. Норадреналин вызывает расщепление гликогена гепатоцитами печени и высвобождение глюкозы в кровь. Такой ответ основывается на увеличении внутриклеточной концентрации циклического АМР. Однако не все гепатоциты иннервируются симпатическими нервами. Благодаря соединяющим гепатоциты щелевым контактам иннервируемые клетки передают сигнал неиннервируемым, пропуская через контакты циклический АМР. Как и следовало ожидать, у мышей с мутацией основного гена щелевых контактов в печени нарушена мобилизация гликогена при падении уровня глюкозы в крови. Щелевые контакты рассмотрены в главе 19.

15.1.4. Каждая клетка запрограммирована отвечать на определенные сочетания внеклеточных сигнальных молекул

Типичная клетка многоклеточного организма может одновременно подвергаться действию сотен различных сигнальных молекул в своем окружении. Эти молекулы могут быть растворимыми или связанными с внеклеточным матриксом или поверхностью соседней клетки; они могут быть активирующими или ингибирующими; они могут действовать на клетки в бесчисленных сочетаниях; и они могут влиять практически на любой аспект функционирования клеток. Клетки должны отвечать на эту неразбериху сигналов селективно, в зависимости от своих свойств. Это достигается благодаря прогрессирующей специализации клеток в процессе развития. Клетка может отвечать на одно сочетание сигналов путем дифференциации, на другое —

путем роста и деления, на третье — выполняя определенную специализированную функцию, например сокращение или секрецию. Один из главных вопросов клеточной биологии состоит в том, как клетка собирает и обрабатывает всю эту информацию для выполнения ключевых функций, будь то деление, движение, дифференциация и так далее. Для большинства клеток животных тканей даже продолжение жизни зависит от правильной интерпретации специфического сочетания сигналов, необходимых для выживания. В отсутствие этих сигналов (в чашке Петри, например) клетка активирует программу самоубийства и погибает, обычно путем *апоптоза* — разновидности *запрограммированной клеточной смерти* (рис. 15.8; см. главу 18). Поскольку различным типам клеток необходимы различные сочетания сигналов выживания, окружение каждого типа клеток в теле строго ограничено. Например, многим эпителиальным клеткам для выживания нужны сигналы базальной пластинки, на которой они расположены (см. главу 19); они претерпевают апоптоз, если теряют контакт с этим слоем матрикса.

В принципе, сотни сигнальных молекул, синтезируемых животными, могут быть использованы в неограниченном числе сигнальных сочетаний для высоко-специфичного контроля различных функций клетки. Достаточно относительно небольшого числа типов сигнальных молекул и рецепторов. Сложность заключается в том, как клетки реагируют на сочетания получаемых ими сигналов.

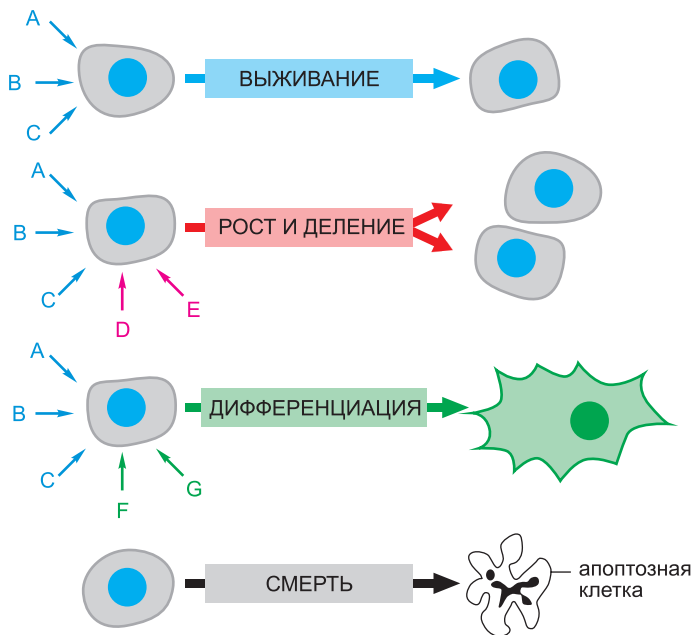


Рис. 15.8. Зависимость животной клетки от многочисленных внеклеточных сигнальных молекул. Каждый тип клеток несет набор рецепторов, позволяющих ему отвечать на соответствующий посылаемый другими клетками набор сигнальных молекул. Сочетания сигнальных молекул регулируют функционирование клетки. Как здесь показано, иногда отдельным клеткам требуется несколько сигналов для выживания (*голубые стрелки*) и дополнительные сигналы для роста и деления (*красная стрелка*) или дифференциации (*зеленые стрелки*). В отсутствие соответствующих сигналов выживания клетки претерпевают апоптоз (запрограммированную клеточную смерть). В реальности все еще сложнее. На рисунке не показано, что некоторые сигнальные молекулы ингибируют эти и другие функции клеток или даже запускают апоптоз.

15.1.5. Обычно различные типы клеток по-разному отвечают на одну и ту же внеклеточную сигнальную молекулу

Ответ клетки на внеклеточный сигнал зависит не только от рецепторов, которые она несет, но и от внутриклеточного аппарата, при помощи которого она обрабатывает и интерпретирует получаемые сигналы. Таким образом, единственная сигнальная молекула обычно по-разному действует на разные типы клеток-мишеней. Нейромедиатор ацетилхолин (рис. 15.9, а), например, снижает частоту и силу сокращений клеток сердечной мышцы (рис. 15.9, б) и стимулирует сокращение клеток скелетных мышц (рис. 15.9, в). В данном случае рецепторные белки ацетилхолина в скелетных мышцах отличаются от рецепторов сердечной мышцы. Но обычно различия в рецепторах не объясняют различия в ответах. Одна и та же сигнальная молекула, связываясь с одинаковыми рецепторами, обычно оказывает разное действие в различных типах клеток-мишеней, как в случае связывания ацетилхолина в сердечной мышце и клетках слюнных желез (сравни рис. 15.9, б и 15.9, г). Иногда это отражает различия в активируемых внутриклеточных сигнальных белках, иногда — различия в белках-эффекторах или активируемых генах. Таким образом, внеклеточный сигнал сам по себе несет мало информации о своем содержании, он просто-напросто вызывает ответ клетки, предопределенный ее состоянием, которое зависит от истории развития клетки и специфики экспрессируемых ею генов.

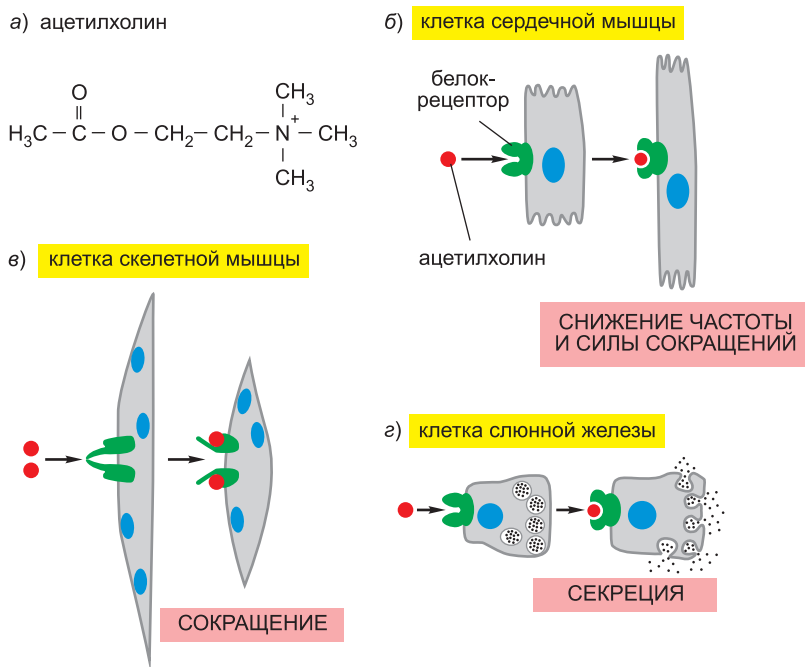


Рис. 15.9. Различные ответы на нейромедиатор ацетилхолин. (а) Химическая структура ацетилхолина. (б–г) Различные типы клеток по-разному реагируют на ацетилхолин. В некоторых случаях (б и в) отличаются рецепторы к ацетилхолину. В других ацетилхолин связывается с одним и тем же рецептором, но результирующие внутриклеточные сигналы в клетках, специализирующихся в выполнении разных функций, по-разному интерпретируются.

Вопрос о том, как клетка интегрирует, обрабатывает различные входящие сигналы и реагирует на них, аналогичен вопросу о том, как мозг собирает и обрабатывает получаемую информацию для регуляции поведения организма. В обоих случаях, для того чтобы понять, как работает данный процесс, нам требуется больше чем список компонентов и связей в системе. На первом этапе нам необходимо рассмотреть некоторые базовые принципы, касающиеся того, как клетка отвечает на простой сигнал данного типа.

15.1.6. Судьба некоторых развивающихся клеток зависит от их положения в градиенте морфогена

Один и то же сигнал, действующий на клетки одного типа, может вызывать качественно разный ответ в зависимости от его концентрации. Как мы обсудим в главе 22, такая зависимость ответа клетки от концентрации сигнальной молекулы играет ключевую роль в эмбриональном развитии животных, когда клетки начинают отличаться друг от друга.

Внеклеточная сигнальная молекула, действующая таким образом в процессе развития, называется **морфогеном**. В простейшем случае она диффундирует из фиксированного клеточного источника (*сигнального центра*), создавая концентрационный градиент сигнала. Расположение клеток в градиенте определяет их судьбу: у клеток, расположенных ближе всего к сигнальному центру и оказывающихся под действием наибольшей концентрации сигнала, активируется наибольшее число рецепторов, в результате чего они идут по одному пути развития. Другие же клетки, расположенные чуть дальше от источника сигнала, пойдут по другому пути, и так далее (**рис. 15.10**). Как мы обсудим позже (и в главе 22), различные уровни активации рецепторов приводят к различиям в их концентрации или активности одного или нескольких регуляторных белков генов в ядре клетки, что, в свою очередь, приводит к различным профилям экспрессии генов. Более того, локальные сигнальные взаимодействия между клетками в градиенте часто способствуют закреплению и стабилизации различных путей развития.

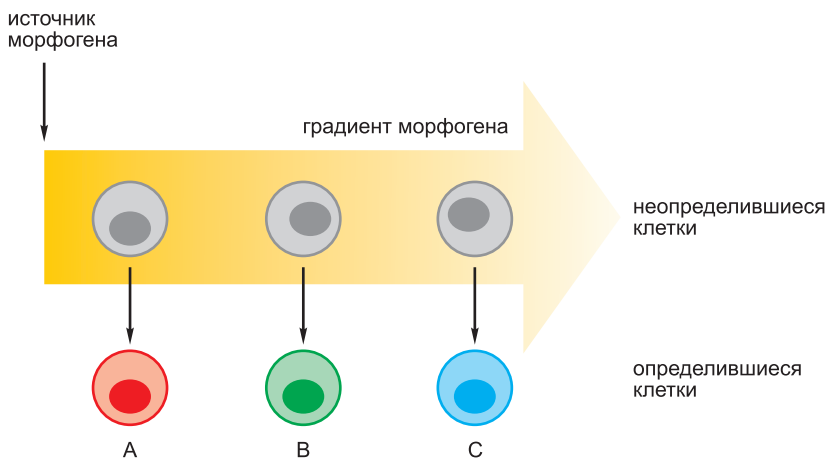


Рис. 15.10. Клетки идут по различным путям развития в зависимости от их положения в градиенте морфогена. Различные концентрации морфогена приводят к экспрессии разных групп генов, что определяет расхождение путей развития клеток (на рисунке обозначены разными буквами и цветами).

15.1.7. Клетка может быстро изменить концентрацию внутриклеточной молекулы, только если время жизни молекулы мало

Естественно рассуждать о сигнальных системах в терминах изменений, происходящих при доставке внеклеточного сигнала. Но не менее важно рассматривать, что происходит, когда сигнал исчезает. В процессе развития действие короткоживущих внеклеточных сигналов часто может приводить к длительным эффектам: оно может запустить изменения в развитии клетки, бесконечно сохраняющиеся в клеточных механизмах памяти, как мы обсудим ниже (и в главах 7 и 22). Однако в зрелых тканях в большинстве случаев ответ заканчивается с исчезновением сигнала. Зачастую влияние сигнала является временным, потому что он оказывает действие на концентрации короткоживущих (нестабильных) внутриклеточных молекул, претерпевающих непрерывное обновление. Таким образом, как только внеклеточный сигнал исчезает, замена старых молекул новыми стирает все следы воздействия сигнала. Следовательно, скорость ответа клетки на удаление сигнала зависит от скорости разрушения или обновления внутриклеточных молекул, на которые влияет сигнал.

Значительно менее очевиден тот факт, что скорость обновления также определяет, насколько быстро клетка отвечает на сигнал. Рассмотрим, например, две внутриклеточные сигнальные молекулы X и Y, концентрация каждой из которых в норме поддерживается на уровне 1000 молекул на клетку. Клетка синтезирует и разрушает молекулу Y со скоростью 100 молекул в секунду, среднее время жизни каждой молекулы составляет 10 секунд. Скорость оборота молекулы X в 10 раз медленнее, чем скорость оборота Y: она синтезируется и разрушается со скоростью 10 молекул в секунду, и среднее время жизни для нее составляет 100 секунд. Если сигнал вызывает десятикратное увеличение скоростей синтеза X и Y без изменения времен жизни этих молекул, после 1 секунды концентрация Y возрастет почти на 900 молекул на клетку ($10 \times 100 = 1000$), тогда как концентрация X вырастет всего на 90 молекул на клетку. В самом деле, после быстрого увеличения или уменьшения скорости синтеза молекулы время, необходимое для того, чтобы концентрация молекул достигла половины своего нового равновесного значения, зависит от времени полужизни молекулы, т.е. равно времени, необходимому для падения концентрации наполовину при остановке синтеза (рис. 15.11).

Сходные принципы применимы для белков и малых молекул вне зависимости от того, расположены ли они в клетке или во внеклеточном пространстве. Многие внутриклеточные белки имеют короткое время полужизни, иногда составляющее менее 10 минут. В большинстве случаев это ключевые регуляторные белки, чьи концентрации в клетке могут быстро изменяться за счет изменения скорости их синтеза.

Позднее мы рассмотрим, как во многих случаях ответ клеток на внеклеточные сигналы зависит от активации или инактивации внутриклеточных сигнальных белков, а не от их синтеза или деградации. Фосфорилирование или связывание GTP, например, часто активируют сигнальные белки. Однако даже в таких случаях, для того чтобы сигнализация могла протекать быстро, активация должна непрерывно и быстро сниматься (в данных примерах путем дефосфорилирования или гидролиза GTP до GDP соответственно). Процессы инактивации играют ключевую роль в том, какими будут амплитуда, скорость и продолжительность сигнала.

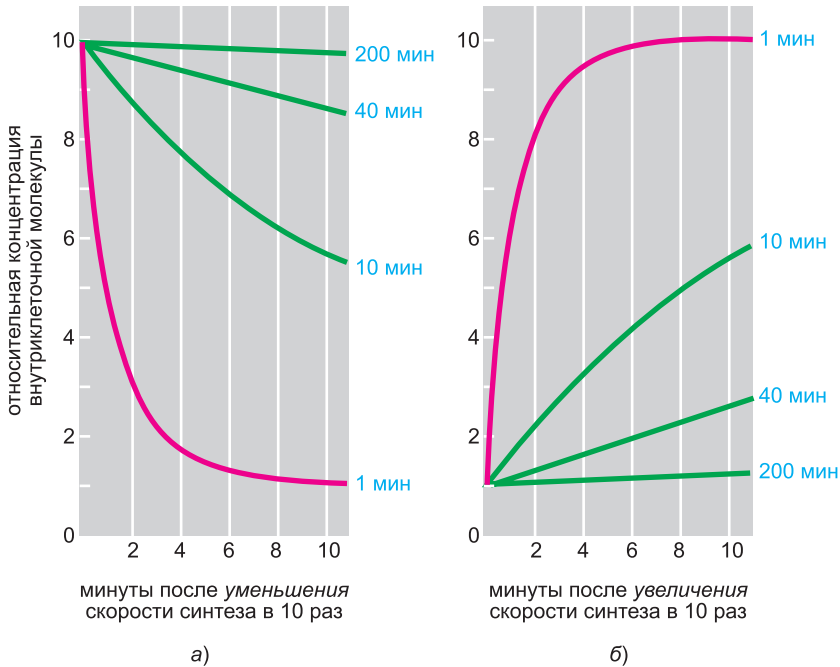


Рис. 15.11. Влияние быстрого обновления. На графиках изображены предсказанные относительные скорости изменения внутриклеточных концентраций молекул с разными временами оборота при быстром десятикратном (а) уменьшении или (б) увеличении скорости их синтеза. В обоих случаях концентрация молекул, которые в норме разрушаются быстро (*красные линии*), так же быстро и изменяется, тогда как концентрация медленно разрушающихся молекул (*зеленые линии*) изменяется пропорционально медленнее. Числа справа (*голубые*) — это предположительные времена полужизни молекул.

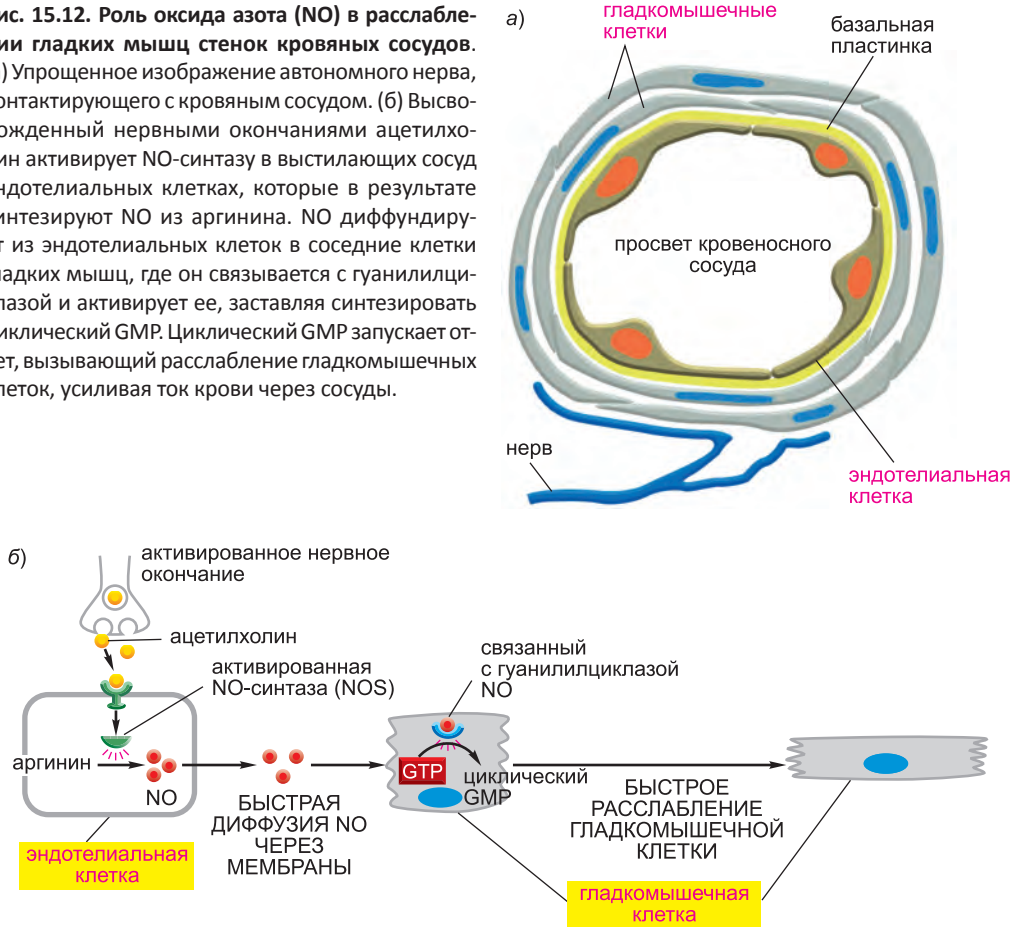
15.1.8. Сигнал оксида азота основан на прямой регуляции активности специфических белков клетки-мишени

Большая часть данной главы посвящена сигнальным путям, активируемым поверхностными рецепторами клетки. Однако прежде чем мы начнем обсуждать эти рецепторы и пути, кратко рассмотрим некоторые важные сигнальные молекулы, активирующие *внутриклеточные рецепторы*. К этим молекулам относятся оксид азота и стероидные гормоны, которые мы обсудим по очереди. Несмотря на то что большинство внеклеточных сигнальных молекул гидрофильно и связывается с рецепторами на поверхности клетки-мишени, некоторые из них достаточно гидрофобны или малы (или и то, и другое) для того, чтобы легко преодолевать плазматическую мембрану клетки-мишени. Попад внутрь, они напрямую регулируют активность специфических внутриклеточных белков. Важным примером такого рода молекул является газ **оксид азота NO**, который служит сигнальной молекулой как в растительных, так и в животных клетках. Даже некоторые бактерии способны чувствовать очень низкие концентрации NO и избегать его.

У млекопитающих одна из многочисленных функций NO — расслабление гладких мышц, например, в стенках кровяных сосудов (**рис. 15.12, а**). Автономные нервы в стенках сосудов высвобождают ацетилхолин; ацетилхолин воздействует

Рис. 15.12. Роль оксида азота (NO) в расслаблении гладких мышц стенок кровяных сосудов.

(а) Упрощенное изображение автономного нерва, контактирующего с кровяным сосудом. (б) Высвобожденный нервными окончаниями ацетилхолин активирует NO-синтазу в выстилающих сосуд эндотелиальных клетках, которые в результате синтезируют NO из аргинина. NO диффундирует из эндотелиальных клеток в соседние клетки гладких мышц, где он связывается с гуанилилциклазой и активирует ее, заставляя синтезировать циклический GMP. Циклический GMP запускает ответ, вызывающий расслабление гладкомышечных клеток, усиливая ток крови через сосуды.



на близлежащие эндотелиальные клетки, изнутри выстилающие сосуд; и эндотелиальные клетки отвечают высвобождением NO, который расслабляет гладкие мышцы в стенках сосудов, позволяя сосудам расширяться. Такое влияние NO на кровяные сосуды объясняет механизм действия нитроглицерина, который около 100 лет используют для лечения стенокардии (боли, вызываемой нарушением тока крови в сердечную мышцу). Нитроглицерин превращается в NO, который расслабляет кровеносные сосуды. Это понижает нагрузку на сердце и в результате снижает потребность сердечной мышцы в кислороде.

Многие типы нервных клеток используют NO напрямую для сигнализации своим соседям. NO, высвобождаемый автономными нервами в половом члене, например, вызывает локальное расширение сосудов, приводящее к эрекции. NO также синтезируется активированными макрофагами и нейтрофилами, способствуя обезвреживанию чужеродных микроорганизмов. В растениях NO участвует в защитных ответах на повреждение и инфекции.

NO синтезируется путем дезаминирования аминокислоты аргинина, катализируемого ферментами **NO-синтазами** (NO synthase, **NOS**) (рис. 15.12, б). NOS в эндотелиальных клетках называется *eNOS* (endothelial **NOS**), а в нервных и мы-

печных — *nNOS* (neuronal NOS). Нервные и мышечные клетки конститутивно синтезируют *nNOS*, которая активируется для синтеза NO входом Ca^{2+} при стимуляции клетки. Макрофаги, с другой стороны, синтезируют еще один вид NOS, носящий название индуцируемой NOS (inducible NOS, *iNOS*). Она синтезируется только в активированных макрофагах, обычно в ответ на инфекцию.

Поскольку растворенный NO легко диффундирует через мембраны, он быстро выходит из клетки, где синтезирован, и входит в соседние (см. рис. 15.12, б). Он действует только локально, поскольку его время полужизни во внеклеточном пространстве до того, как кислород и вода превратят его в нитраты и нитриты, мало и составляет около 5–10 секунд.

В некоторых клетках-мишенях, включая гладкие мышечные клетки, NO обратимо связывается с железом в активном сайте фермента *гуанилилциклазы*, которая в ответ синтезирует малую внутриклеточную сигнальную молекулу *циклический GMP*, который мы обсудим позже. Таким образом, гуанилилциклаза одновременно является внутриклеточным рецептором NO и внутриклеточным сигнальным белком (см. рис. 15.12, б). NO способен увеличить концентрацию циклического GMP в цитозоле за несколько секунд, поскольку нормальная скорость обновления этой молекулы очень велика: быстрая деградация GMP *фосфодиэстеразой* непрерывно уравнивает синтез гуанилилциклазой циклического GMP из GTP. Препарат Виагра и его более новые аналоги ингибируют фосфодиэстеразу циклического GMP в половом члене. Таким образом, после запуска синтеза NO локальными нервными окончаниями высокий уровень циклического GMP в клетках гладких мышц полового члена сохраняется дольше. А циклический GMP, в свою очередь, поддерживает расслабление кровяных сосудов и, следовательно, эрекцию.

NO также может действовать на клетки независимо от циклического GMP. Например, NO способен изменять активность внутриклеточного белка, ковалентно нитрозилируя тиоловые (-SH) группы определенных цистеинов.

Моноксид углерода (CO, угарный газ) — это еще один газ, используемый в качестве внеклеточной сигнальной молекулы. Как и NO, он способен действовать через гуанилилциклазу. Но, как мы обсудим дальше, это не единственные сигнальные молекулы, способные напрямую проходить через плазматическую мембрану клетки-мишени.

15.1.9. Ядерные рецепторы — это лиганд-зависимые белки-регуляторы генов

Различные малые гидрофобные сигнальные молекулы напрямую диффундируют через плазматическую мембрану клеток-мишеней и связываются с внутриклеточными рецепторами, которые представляют собой белки-регуляторы генов. В число таких сигнальных молекул входят стероидные гормоны, гормоны щитовидной железы (тиреоидные гормоны), ретиноиды и витамин D. Несмотря на то что они отличаются друг от друга по химической структуре (рис. 15.13) и функциям, в основе их действия лежит один и тот же механизм. Они связываются с соответствующими внутриклеточными рецепторными белками и изменяют их способность регулировать транскрипцию определенных генов. Таким образом, эти белки одновременно служат внутриклеточными рецепторами и внутриклеточными эффекторами.

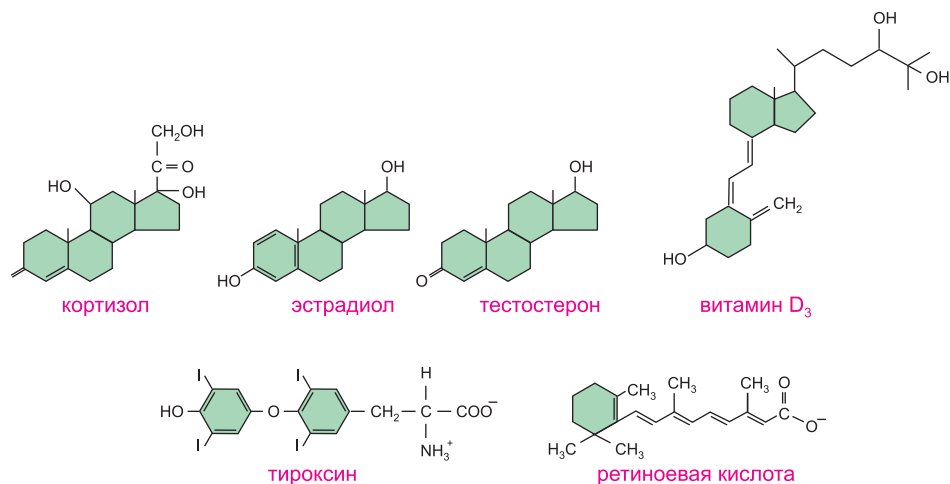


Рис. 15.13. Некоторые негазообразные сигнальные молекулы, связывающиеся с внутриклеточными рецепторами. Обратите внимание, что все они гидрофобны и небольшого размера. Показана активная, гидроксилированная форма витамина D₃. Эстрадиол и тестостерон — это стероидные половые гормоны.

Все эти рецепторы структурно родственны друг другу, являясь членами очень большого **суперсемейства ядерных рецепторов**. Многие из них обнаружены только за счет секвенирования ДНК, и их лиганды до сих пор неизвестны; такие белки называют *ядерными рецепторами-сиротами*. В настоящее время более половины из 48 ядерных рецепторов, кодируемых человеческим геномом, остаются сиротами, так же как 17 из 18 в *Drosophila* и все 278 в нематодe *C. elegans* (см. рис. 4.85). Некоторые ядерные рецепторы млекопитающих регулируются внутриклеточными метаболитами, а не секретируемыми сигнальными молекулами; например, *активируемые пролифератором пероксисом рецепторы* (Peroxisome Proliferation-Activated Receptrs, *PPARs*) связывают внутриклеточные липидные метаболиты и регулируют транскрипцию генов, участвующих в метаболизме липидов и дифференциации жировых клеток (см. главу 23). По-видимому, ядерные рецепторы гормонов эволюционировали из таких рецепторов внутриклеточных метаболитов, что объясняет их локализацию в клетке.

Стероидные гормоны — кортизол, стероидные половые гормоны, витамин D (у позвоночных) и гормон линьки *экдизон* (у насекомых) — синтезируются из холестерина. *Кортизол* образуется в коре надпочечников и влияет на метаболизм многих типов клеток. *Стероидные половые гормоны* синтезируются в яичниках и семенниках и отвечают за вторичные половые признаки, отличающие мужчин от женщин. *Витамин D* синтезируется в коже под действием солнечного света; после перевода в активную форму в печени или почках он регулирует метаболизм Ca²⁺, стимулируя всасывание Ca²⁺ в кишечнике и снижая его экскрецию в почках. *Гормоны щитовидной железы* (*тиреоидные гормоны*), синтезируемые из аминокислоты тирозина, увеличивают скорость метаболизма многих клеток. *Ретиноиды*, например ретиновая кислота, образуются из витамина A и выполняют функцию локальных медиаторов в эмбриональном развитии позвоночных. Все эти молекулы относительно нерастворимы в воде, поэтому для транспорта

в крови и других внеклеточных жидкостях они связываются со специфическими белками-переносчиками, от которых они диссоциируют перед входом в клетку-мишень (см. рис. 15.13, б).

Ядерные рецепторы связываются со специфическими последовательностями ДНК, прилегающими к генам, которые регулирует лиганд. Некоторые рецепторы, например рецепторы кортизола, локализованы в основном в цитозоле и входят в ядро только после связывания лиганда; другие, например рецепторы тиреоидных гормонов и ретиноидов, связаны в ядре с ДНК даже в отсутствие лиганда. В любом случае неактивные рецепторы обычно связаны с ингибиторными белковыми комплексами. Связывание лиганда изменяет конформацию рецепторного белка, что приводит к диссоциации ингибиторного комплекса и связыванию с рецептором коактиваторных белков, стимулирующих транскрипцию генов (рис. 15.14). Однако бывает, что связывание лиганда, наоборот, ингибирует транскрипцию: некоторые рецепторы гормонов щитовидной железы, например, в отсутствие своего гормона играют роль активаторов транскрипции, а при связывании лиганда становятся репрессорами.

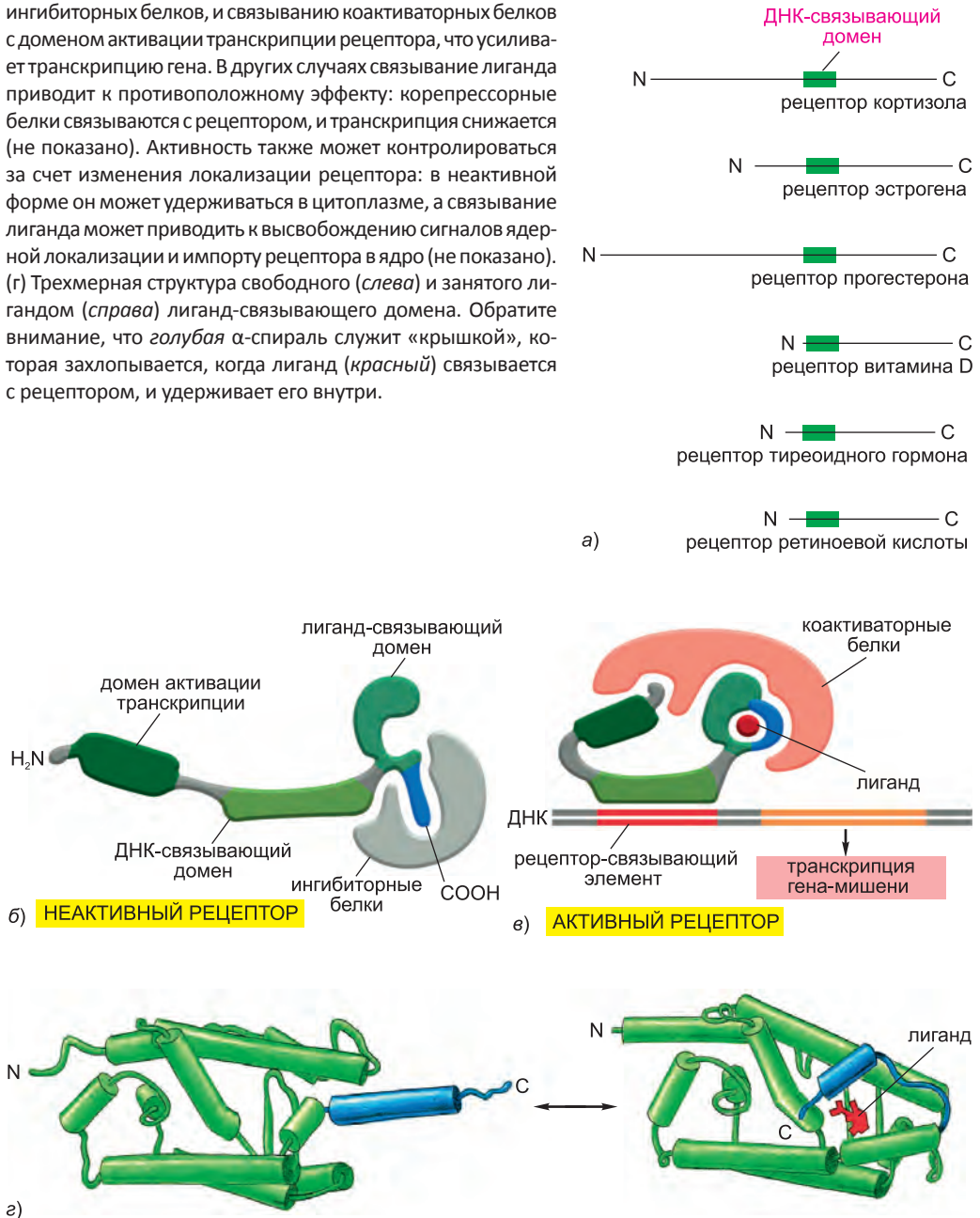
Транскрипционный ответ обычно протекает в несколько этапов. Например, в случаях, когда связывание лиганда активирует транскрипцию, прямая стимуляция небольшого числа специфических генов происходит в течение примерно 30 минут, что является *первичным ответом*; белковые продукты этих генов, в свою очередь, активируют другие гены для запуска замедленного *вторичного ответа*; и так далее. Более того, некоторые белки, синтезированные в результате первичного ответа, могут ингибировать транскрипцию своих собственных генов, ограничивая таким образом ответ, — это пример отрицательной обратной связи, которую мы обсудим позднее. В результате простой гормональный сигнал может вызвать очень сложные изменения профиля экспрессии генов (рис. 15.15).

Ответы на стероидные и тиреоидные гормоны, витамин D и ретиноиды определяется как природой клетки-мишени, так и природой самой сигнальной молекулы. Многие типы клеток несут одинаковые внутриклеточные рецепторы, но наборы генов, регулируемых этими рецепторами, различаются. Это объясняется тем, что обычно для регуляции транскрипции эукариотического гена с ним должно связаться несколько типов белков-регуляторов. Таким образом, внутриклеточный рецептор может регулировать ген только вместе с другими белками-регуляторами, многие из которых специфичны для данного типа клеток.

В заключение отметим, что все эти гидрофобные сигнальные молекулы вызывают у животных характерные наборы ответов по двум причинам. Во-первых, только определенные типы клеток несут рецепторы. Во-вторых, каждый из этих типов клеток содержит различное сочетание регуляторных белков, которые совместно с активированным рецептором влияют на транскрипцию определенного набора генов. Этот принцип применим ко всем сигнальным ответам, зависящим от белков-регуляторов генов, включая другие многочисленные примеры, которые мы обсудим в данной главе. Молекулярные механизмы того, как ядерные рецепторы и другие белки-регуляторы генов контролируют транскрипцию, обсуждаются в главе 7.

Ядерные рецепторные белки иногда располагаются на поверхности клетки, и механизм их действия полностью отличается от описанного выше. Далее в данной главе мы будем рассматривать различные пути преобразования поверхностными рецепторами внеклеточного сигнала во внутриклеточный. Этот процесс носит название *передачи сигнала (сигнальной трансдукции)*.

Рис. 15.14. Суперсемейство ядерных рецепторов. Все ядерные рецепторы связывают ДНК в составе гомодимеров или гетеродимеров, но для простоты здесь они показаны в форме мономеров. (а) Структуры рецепторов родственны. Здесь короткий ДНК-связывающий домен, общий для всех рецепторов, показан *светло-зеленым*. (б) Неактивный рецепторный белок связан с ингибиторными белками. Эксперименты по замене доменов показали, что многие лиганд-связывающие, активирующие транскрипцию и ДНК-связывающие домены этих рецепторов могут функционировать как взаимозаменяемые модули. (в) Активация рецептора. Обычно связывание лиганда с рецептором приводит к замыканию лиганд-связывающего домена вокруг лиганда, диссоциации ингибиторных белков, и связыванию коактиваторных белков с доменом активации транскрипции рецептора, что усиливает транскрипцию гена. В других случаях связывание лиганда приводит к противоположному эффекту: корепрессорные белки связываются с рецептором, и транскрипция снижается (не показано). Активность также может контролироваться за счет изменения локализации рецептора: в неактивной форме он может удерживаться в цитоплазме, а связывание лиганда может приводить к высвобождению сигналов ядерной локализации и импорту рецептора в ядро (не показано). (г) Трехмерная структура свободного (*слева*) и занятого лигандом (*справа*) лиганд-связывающего домена. Обратите внимание, что *голубая* α -спираль служит «крышкой», которая захлопывается, когда лиганд (*красный*) связывается с рецептором, и удерживает его внутри.



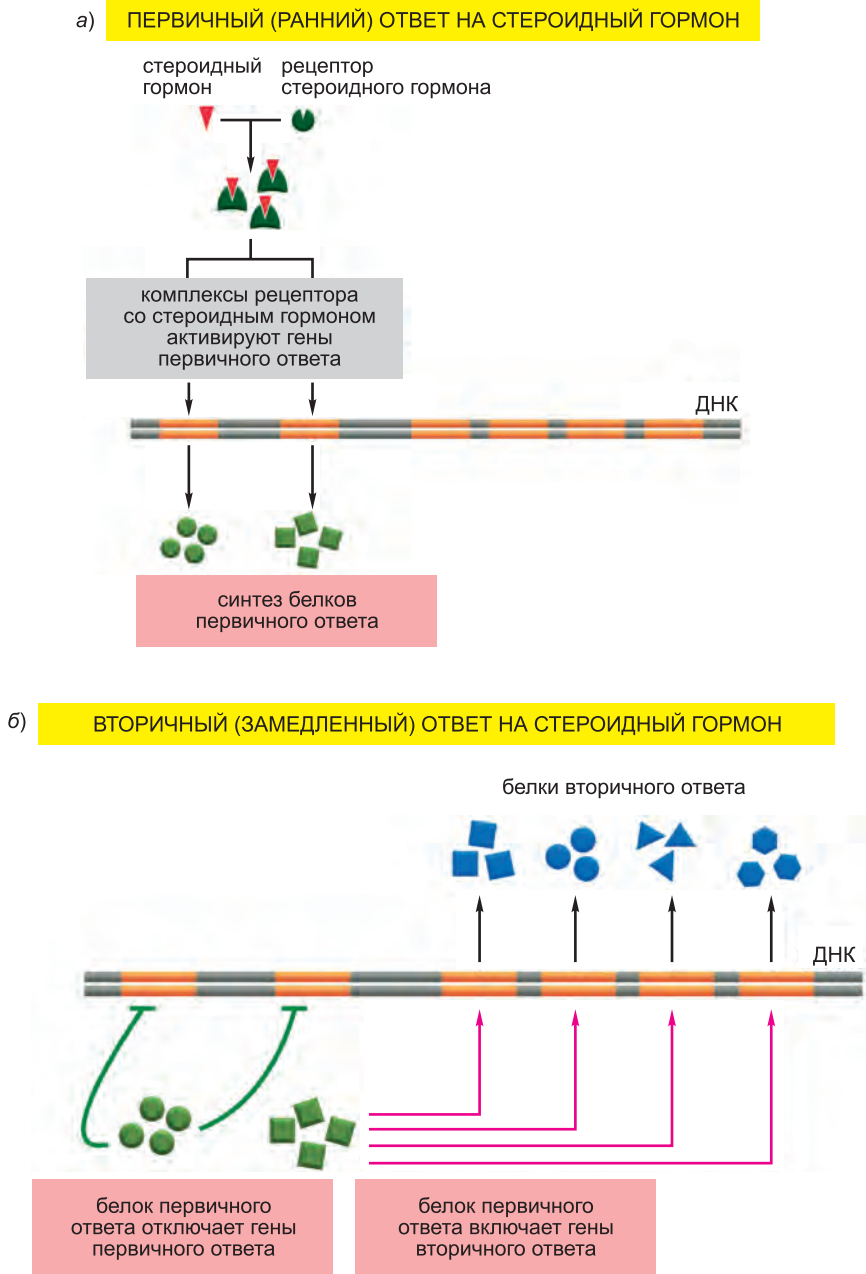


Рис. 15.15. Пример первичного и вторичного ответов, вызванных активацией ядерного рецептора гормонов. (а) Ранний первичный ответ и (б) замедленный вторичный ответ. Часть генов первичного ответа активирует гены вторичного ответа, тогда как другая часть отключает гены первичного ответа. Реальное число генов больше, чем показано. Соединения, ингибирующие белковый синтез, подавляют транскрипцию генов вторичного ответа, но не первичного, что позволяет легко различить эти два класса транскрипционных ответов. На рисунке показаны ответы на стероидный гормон, но общие принципы применимы ко многим другим лигандам, активирующим ядерные белки-рецепторы.

15.1.10. Три самых крупных класса поверхностных рецепторов — рецепторы, сопряженные с ионными каналами, с G-белками и с ферментами

В отличие от описанных выше небольших гидрофобных молекул, связывающихся с внутриклеточными рецепторами, большинство внеклеточных сигнальных молекул связывается с рецепторными белками на поверхности клетки-мишени и не проникает в цитозоль или ядро. Эти поверхностные мембранные рецепторы служат *передатчиками сигнала*, преобразуя внеклеточное связывание лиганда во внутриклеточные сигналы, изменяющие функционирование клетки-мишени.

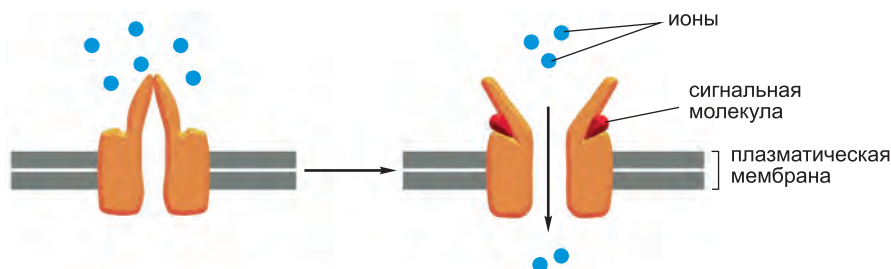
Большая часть поверхностных рецепторов входит в состав одного из трех классов, отличающихся друг от друга механизмом передачи сигнала. **Рецепторы, сопряженные с ионными каналами**, известные также как *медиатор-зависимые ионные каналы* или *ионотропные рецепторы*, участвуют в быстрой синаптической сигнализации между нервными клетками и другими электрически возбудимыми клетками-мишенями, например нервными или мышечными (рис. 15.16, а). Данный тип сигнализации опосредуется небольшим числом нейромедиаторов, которые временно открывают или закрывают ионный канал, образованный белком, с которым они связываются. Таким образом, изменяется ионная проницаемость плазматической мембраны и, следовательно, возбудимость постсинаптической клетки-мишени. Большинство сопряженных с ионными каналами рецепторов принадлежит к большому семейству гомологичных многопроходных трансмембранных белков. Поскольку они подробно рассмотрены в главе 11, здесь мы на них останавливаться не будем.

Рецепторы, сопряженные с G-белками, действуют за счет косвенной регуляции активности другого связанного с плазматической мембраной белка-мишени, который обычно представляет собой фермент или ионный канал. *Тримерный GTP-связывающий белок (G-белок)* опосредует взаимодействие между активированным рецептором и его белком-мишенью (рис. 15.16, б). Активация белка-мишени может привести к изменению концентрации одного или нескольких малых внутриклеточных медиаторов (если белок-мишень представляет собой фермент) или ионной проводимости плазматической мембраны (если белок-мишень — это ионный канал). Малые внутриклеточные медиаторы, в свою очередь, изменяют функционирование других сигнальных белков клетки. Все рецепторы, сопряженные с G-белками, принадлежат семейству гомологичных многопроходных трансмембранных белков.

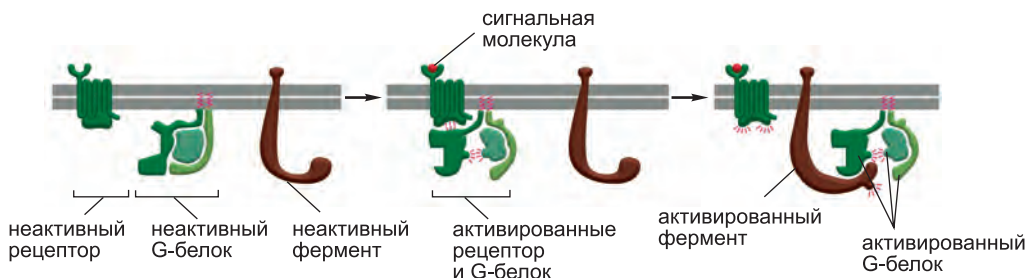
Рецепторы, сопряженные с ферментами, либо напрямую функционируют как ферменты, либо напрямую связываются с активируемыми ими ферментами (рис. 15.16, в). Обычно это однопроходные трансмембранные белки, у которых лиганд-связывающий домен расположен снаружи клетки, а фермент-связывающий сайт — внутри. Сопряженные с ферментами рецепторы, по сравнению с предыдущими двумя классами, довольно неоднородны по своей структуре. Однако большинство из них либо представляет собой протеинкиназы, либо связывает протеинкиназы, при активации фосфорилирующие специфические сайты белков клетки-мишени.

Существует еще несколько типов поверхностных рецепторов, которые сложно распределить по этим трем классам, но которые играют важную роль в регуляции специализации различных типов клеток во время развития, обновления и зажив-

а) РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С ИОННЫМИ КАНАЛАМИ



б) РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С G-БЕЛКАМИ



в) РЕЦЕПТОРЫ, СОПРЯЖЕННЫЕ С ФЕРМЕНТАМИ

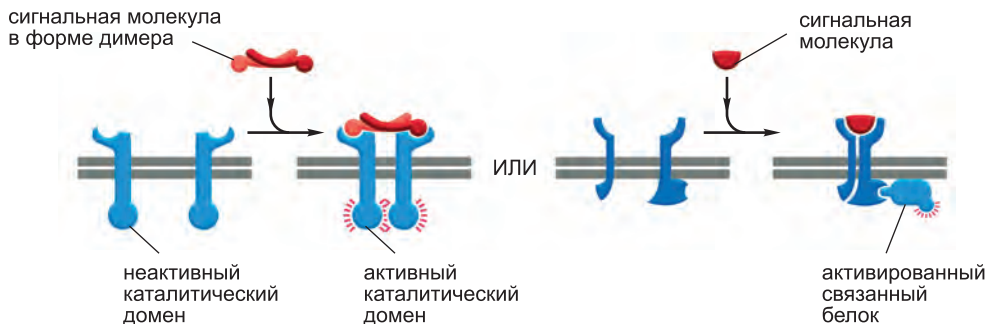


Рис. 15.16. Три класса поверхностных рецепторов. (а) Сопряженные с ионными каналами рецепторы (также называемые медиатор-зависимыми ионными каналами), (б) сопряженные с G-белками рецепторы и (в) сопряженные с ферментами рецепторы. Несмотря на то что многие сопряженные с ферментами рецепторы сами по себе обладают ферментативной активностью, как показано слева на (в), многие из них полагаются на связывание ферментов, как показано на (в) справа.

ления тканей. Мы обсудим их в другом разделе, после того как объясним работу рецепторов, сопряженных с G-белками и ферментами. Однако сначала мы рассмотрим некоторые общие принципы сигнализации посредством поверхностных рецепторов, что поможет понять более подробное обсуждение основных классов рецепторов, которое последует позднее.

15.1.11. Большинство активированных поверхностных рецепторов передают сигнал посредством малых молекул и сети внутриклеточных сигнальных белков

Набор малых и крупных *внутриклеточных сигнальных молекул* передает полученные на поверхности сигналы посредством рецепторов, сопряженных с G-белками или ферментами, внутрь клетки. Последовательность внутриклеточных сигнальных событий в конце концов изменяет белки-эффекторы, отвечающие за модификацию функционирования клетки (см. рис. 15.1).

Малые внутриклеточные сигнальные молекулы называются **малыми внутриклеточными медиаторами**, или **вторичными посредниками**, или **мессенджерами** («первичные посредники» — это внеклеточные сигналы). Они образуются в больших количествах в ответ на активацию рецепторов и часто диффундируют от своего источника, распространяя сигнал в другие части клетки. Некоторые, например, *циклический АМР* и Ca^{2+} , растворимы в воде и диффундируют в цитозоле. Другие же, например *диацилглицерин*, жирорастворимы и диффундируют в плоскости плазматической мембраны. В любом случае они передают сигнал посредством связывания с определенными сигнальными белками или белками-эффекторами и изменения их конформации и активности.

Крупные внутриклеточные сигнальные молекулы — это **внутриклеточные сигнальные белки**, которые способствуют передаче сигнала в клетку за счет синтеза малых внутриклеточных медиаторов или активации следующего сигнального или эффекторного белка пути. Эти белки образуют функциональную сеть, в которой каждый белок способствует обработке сигнала одним из следующих способов по мере распространения сигнала по клетке (**рис. 15.17**):

1. Просто *передать* сигнал следующему сигнальному компоненту цепи.
2. Служить *каркасом* для объединения двух и более сигнальных белков, ускоряя и упрощая их взаимодействие.
3. *Преобразовать* сигнал в другую форму, пригодную для передачи дальше или вызывающую клеточный ответ.
4. *Усилить* полученный сигнал либо за счет синтеза большого количества вторичного посредника, либо посредством активации множества копий следующего по цепи белка. Таким образом, небольшое число внеклеточных сигнальных молекул может вызвать крупные изменения внутри клетки. Цепь передачи сигнала, в которой присутствует несколько этапов усиления, обычно называют **сигнальным каскадом**.
5. Получать сигнал от двух и более сигнальных путей и *совмещать* их, только после этого передавать сигнал дальше. Белок, которому для активации необходимы сигналы от нескольких сигнальных путей, часто называют детектором совпадений.
6. *Распространять* сигнал от одного сигнального пути в другой, создавая разветвления в сигнальном потоке и увеличивая таким образом сложность ответа.
7. *Заякоривать* один или несколько сигнальных белков пути в определенной структуре клетки, где они необходимы.
8. Белок может *модулировать* активность других сигнальных белков и таким образом регулировать силу сигнала в пути.

Теперь мы подробнее рассмотрим некоторые из этих стратегий, используемых внутриклеточными белками для обработки сигнала по мере его прохождения по сиг-

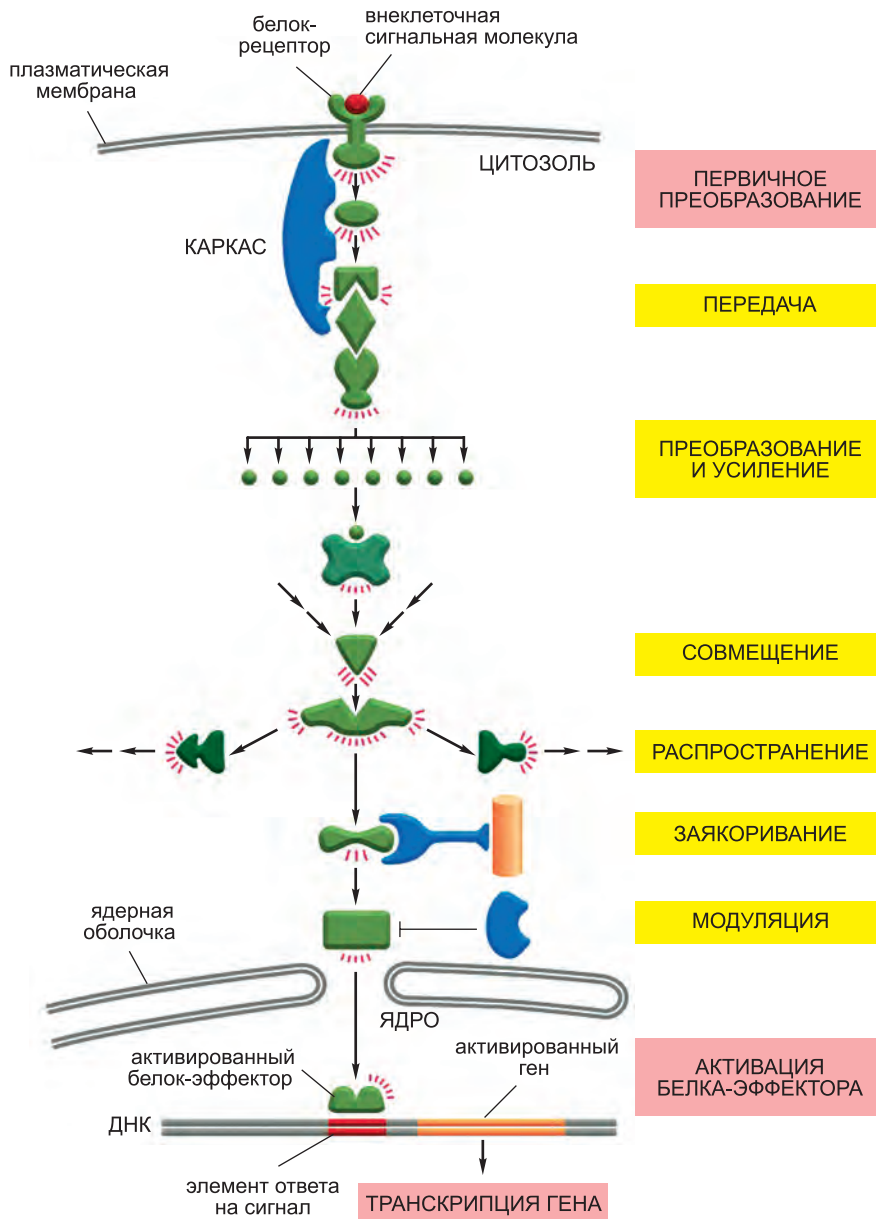


Рис. 15.17. Гипотетический внутриклеточный сигнальный путь от поверхности клетки к ядру. В данном примере последовательность сигнальных белков и малых внутриклеточных медиаторов передает внеклеточный сигнал в ядро, вызывая изменение экспрессии генов. Сигнал изменяется (преобразуется), усиливается, распределяется и модулируется. Поскольку другие внутриклеточные и внеклеточные сигналы могут влиять на многие этапы пути, конечное действие одного внеклеточного сигнала зависит от множества факторов, влияющих на клетку (см. рис. 15.8). В конце концов, сигнальный путь активирует (или инактивирует) эффекторные белки, изменяющие функционирование клетки. В данном примере эффектором служит белок-регулятор гена, активирующий транскрипцию. Несмотря на то что на рисунке одна функция выполняется одним сигнальным белком, в реальности белки обычно многофункциональны; например, каркасные белки часто также заякоривают несколько сигнальных белков в определенной внутриклеточной структуре.

нальному пути. Мы еще не раз встретимся с этими стратегиями в данной главе при обсуждении конкретных классов рецепторов и активируемых ими сигнальных путей.

Большинство сигнальных путей к ядру проще, чем представленный здесь, который не основан ни на одном известном пути.

15.1.12. Многие внутриклеточные сигнальные белки выполняют роль молекулярных переключателей, активируемых фосфорилированием или связыванием GTP

Многие внутриклеточные сигнальные белки играют роль *молекулярных переключателей*. Получив сигнал, они переходят из неактивной конформации в активную до тех пор, пока другой процесс снова не «выключит» их, возвратив в неактивную конформацию. Как мы упоминали ранее, инактивация не менее важна, чем активация. Чтобы сигнальный путь восстановился после передачи сигнала и был способен обработать следующий, все активированные молекулы пути должны вернуться в свое исходное, неактивное состояние.

Два важных класса молекулярных переключателей, участвующих во внутриклеточных сигнальных путях, зависят от приобретения или потери фосфатных групп при активации или инактивации, хотя способы присоединения или отщепления фосфата для этих двух классов различаются. Большой класс состоит из белков, активируемых или инактивируемых путем **фосфорилирования** (см. главу 3). Переключение этих белков осуществляют **протеинкиназа**, которая ковалентно присоединяет одну или несколько фосфатных групп к сигнальному белку, и **протеинфосфатаза**, которая удаляет фосфатные группы (**рис. 15.18, а**). Активность любого белка, регулируемая фосфорилированием, зависит от равновесия между активностями фосфорилирующих его киназ и дефосфорилирующих фосфатаз. Около 30% белков человека несут ковалентно связанный фосфат, и человеческий геном кодирует примерно 520 протеинкиназ и 150 протеинфосфатаз. Считают, что в клетке млекопитающих одновременно работают сотни различных типов протеинкиназ.

Многие сигнальные белки, регулируемые фосфорилированием, сами по себе являются протеинкиназами. Часто они образуют **каскады фосфорилирования**. В таком каскаде одна протеинкиназа, активированная фосфорилированием, фосфорилирует следующую киназу в последовательности и так далее. В результате происходит передача сигнала, а иногда и его усиление и распространение в другие пути. В качестве внутриклеточных сигнальных белков выступают два основных типа протеинкиназ. Большинство — это **серин-треониновые киназы**, фосфорилирующие белки по серинам и (значительно реже) треонинам. Второй тип — это **тирозинкиназы**, фосфорилирующие белки по тирозинам. Некоторые киназы способны действовать по обоим механизмам.

Второй важный класс молекулярных переключателей, механизм действия которых основан на присоединении и отщеплении фосфатных групп, образован **GTP-связывающими белками** (см. главу 3). Эти белки переключаются из активного состояния со связанным GTP в неактивное со связанным GDP. В активном состоянии они обладают GTPазной активностью и инактивируют себя, гидролизуя связанный GTP до GDP (**рис. 15.18, б**). Существует два основных типа GTP-связывающих белков. Крупные *тримерные GTP-связывающие белки* (также называемые *G-белками*) передают сигнал от активирующих их сопряженных с G-белками рецепторов (см. **рис. 15.16, б**). Небольшие **мономерные GTPазы** (также называемые *мономерными*

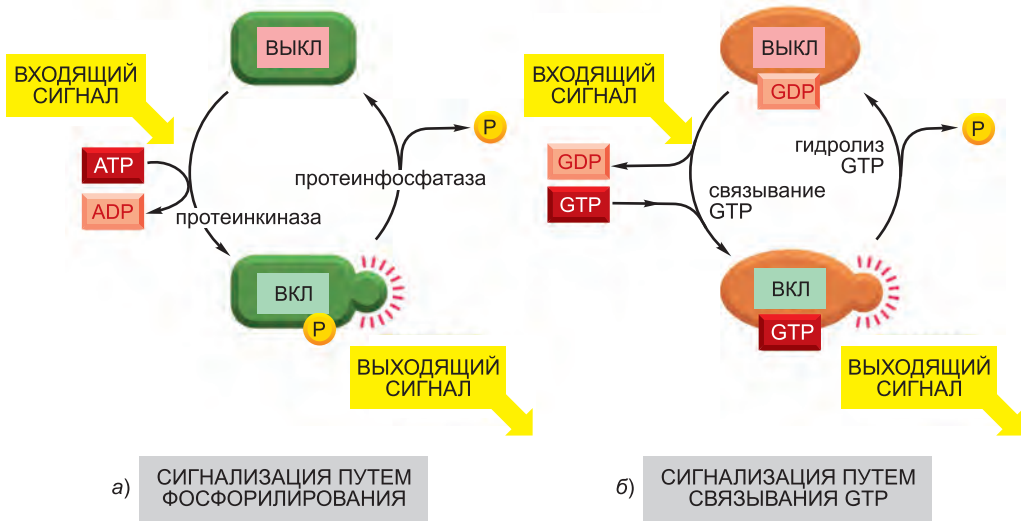


Рис. 15.18. Два типа внутриклеточных сигнальных белков, выполняющих функцию молекулярных переключателей. Несмотря на то что один тип активируется фосфорилированием, а другой — связыванием GTP, в обоих случаях присоединение фосфатной группы переключает активационное состояние белка, а удаление фосфата возвращает его в исходное состояние. (а) Протеинкиназа ковалентно присоединяет фосфат АТФ к сигнальному белку, а протеинфосфатаза его отщепляет. Некоторые сигнальные белки активируются дефосфорилированием, а не фосфорилированием (не показано). (б) GTP-связывающий белок обменивает GDP на GTP, что приводит к активации; затем белок инактивирует себя посредством гидролиза связанного GTP до GDP.

GTP-связывающими белками) передают сигналы от многих классов поверхностных рецепторов.

Специфические регуляторные белки контролируют оба типа GTP-связывающих белков. **ГТРаза-активирующие белки** (GTPase-Activating Protein, **GAP**) переводят белки в «выключенное» состояние, усиливая скорость гидролиза связанного GTP; выполняющие эту функцию GAP также называют *регуляторами сигнализации G-белков* (Regulators of G-protein Signaling, **RGS**). С другой стороны, рецепторы, сопряженные с G-белками, активируют тримерные G-белки, и **факторы обмена гуаниновых нуклеотидов** (Guanine Exchange Factor, **GEF**) активируют мономерные ГТРаза, вызывая высвобождение GDP в обмен на связывание GTP. На **рис. 15.19** показана регуляция мономерных ГТРаз.

Тримерные G-белки и мономерные ГТРаза также участвуют во многих других процессах в эукариотических клетках, включая регуляцию везикулярного транспорта и клеточное деление.

Как обсуждалось ранее, сложное поведение клетки, например выживание или рост и пролиферация, определяется не отдельной сигнальной молекулой, действующей в одиночку, а определенными сочетаниями внеклеточных сигналов (см. рис. 15.8). Таким образом, чтобы правильно организовать ответ, клетка должна объединять информацию, приходящую от многочисленных рецепторов; многим клеткам млекопитающих, например, для роста и пролиферации нужны как растворимые сигналы, так и сигналы внеклеточного матрикса (см. главу 19). Объединение отчасти зависит от внутриклеточных *детекторов совпадений*, которые аналогичны

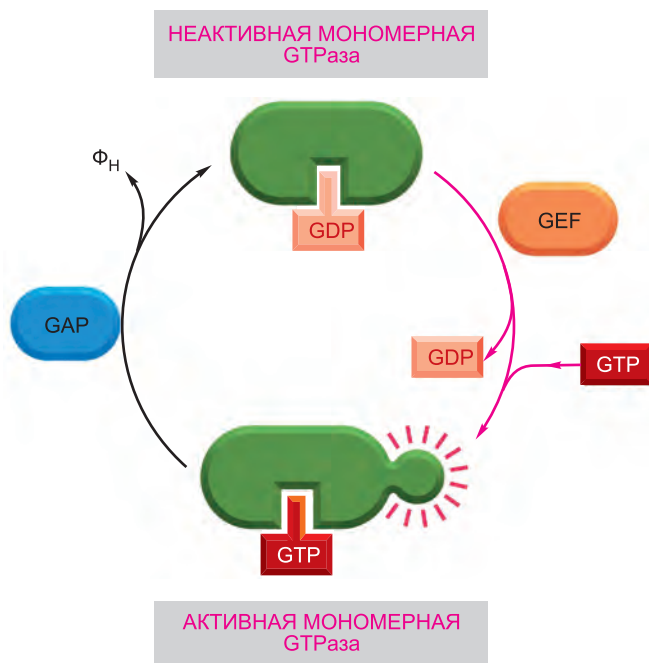


Рис. 15.19. Регуляция мономерной GTPазы. GTPаза-активирующие белки (GAP) инактивируют белок, вызывая гидролиз связанного GTP до GDP, который остается связанным с неактивной GTPазой. Факторы обмена гуаниновых оснований (GEF) активируют неактивный белок, вызывая высвобождение GDP; поскольку концентрация GTP в цитозоле в 10 раз больше концентрации GDP, белок быстро связывает GTP и активируется.

логическому элементу *И* в микропроцессоре компьютера, т.е. они активируются, только если получают многочисленные сходящиеся сигналы (см. рис. 15.17). На **рис. 15.20** показан простой гипотетический пример такого белка.

Однако не все молекулярные переключатели в сигнальных путях зависят от фосфорилирования или связывания GTP. Позже мы увидим, что некоторые сигнальные белки переключаются за счет связывания других сигнальных белков или малых внутриклеточных медиаторов, например циклического АМР или Ca^{2+} , или посредством ковалентных модификаций, отличных от фосфорилирования и дефосфорилирования, например убиквитинирования. Более того, не все внутриклеточные сигнальные белки функционируют как переключатели при фосфорилировании или других обратимых модификациях. Как мы обсудим позднее, во многих случаях ковалентно присоединенная группа просто помечает белок, для того чтобы впоследствии он мог взаимодействовать с другими узнающими модификацию сигнальными белками.

15.1.13. Внутриклеточные сигнальные комплексы увеличивают скорость, эффективность и специфичность ответа

Даже единственный тип внеклеточного сигнала, действующий через один тип поверхностных рецепторов, часто активирует несколько параллельных сигнальных путей и, таким образом, влияет на различные аспекты клеточного поведения, например форму, движение, метаболизм и экспрессию генов. Система «сигнал-ответ»

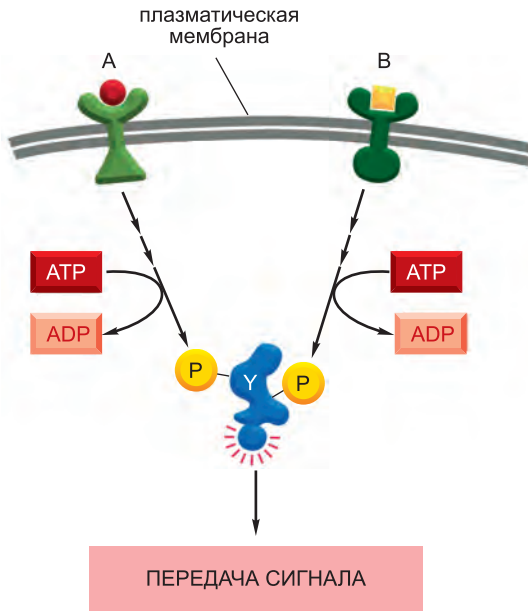


Рис. 15.20. Объединение сигналов. Внеклеточные сигналы A и B активируют разные внутриклеточные сигнальные пути, каждый из которых приводит к фосфорилированию белка Y, но по разным сайтам. Белок Y активируется, только если оба сайта фосфорилированы, поэтому он становится активным, только когда сигналы A и B действуют одновременно. Такие белки часто называют детекторами совпадений.

очень сложна, в нее часто входит несколько взаимодействующих цепей передачи сигнальных белков. Как же тогда клетка способна специфически отвечать на такие разные сочетания внеклеточных сигналов? Получение ответа на этот вопрос усложняется тем, что многие сигнальные молекулы очень похожи и связываются со сходными типами рецепторов. Один и тот же тип внутриклеточных сигнальных

белков может сопрягать один подтип рецепторов с одним набором эффекторов, одновременно сопрягая второй подтип рецепторов с другими эффекторами. В таком случае почему ответ специфичен и почему не возникает перекрестных помех? Одна стратегия — использование **каркасных белков** (см. рис. 15.17), которые, часто еще до того, как сигнал достигает клетки, связывают группы взаимодействующих сигнальных белков в *сигнальные комплексы* (рис. 15.21, а). Поскольку каркас удерживает сигнальные белки близко друг к другу, компоненты могут взаимодействовать с высокой локальной концентрацией, что увеличивает скорость, эффективность и селективность активации в ответ на соответствующий внеклеточный сигнал без нежелательного пересечения с другими сигнальными путями.

В других случаях сигнальные комплексы образуются лишь временно в ответ на внеклеточный сигнал и быстро разбираются после исчезновения стимула. Такие временные комплексы часто собираются вокруг рецептора после его активации внеклеточной сигнальной молекулой. Также часто цитоплазматическая часть активированного рецептора в процессе активации фосфорилируется, и фосфорилированные аминокислоты служат сайтами связывания для других сигнальных белков (рис. 15.21, б). Еще одна стратегия состоит в том, что активация рецептора приводит к образованию в прилегающей плазматической мембране модифицированных молекул фосфолипидов (носящих название фосфоинозитидов), которые затем рекрутируют специфические внутриклеточные сигнальные белки в данную область мембраны для активации (рис. 15.21, в). Роль фосфоинозитидов в мембранном транспорте обсуждается в главе 13.

15.1.14. Модульные домены опосредуют взаимодействия между внутриклеточными сигнальными белками

Сближения внутриклеточных сигнальных белков на короткое расстояние иногда достаточно для их активации. Таким образом, *индуцированное сближение*, то есть

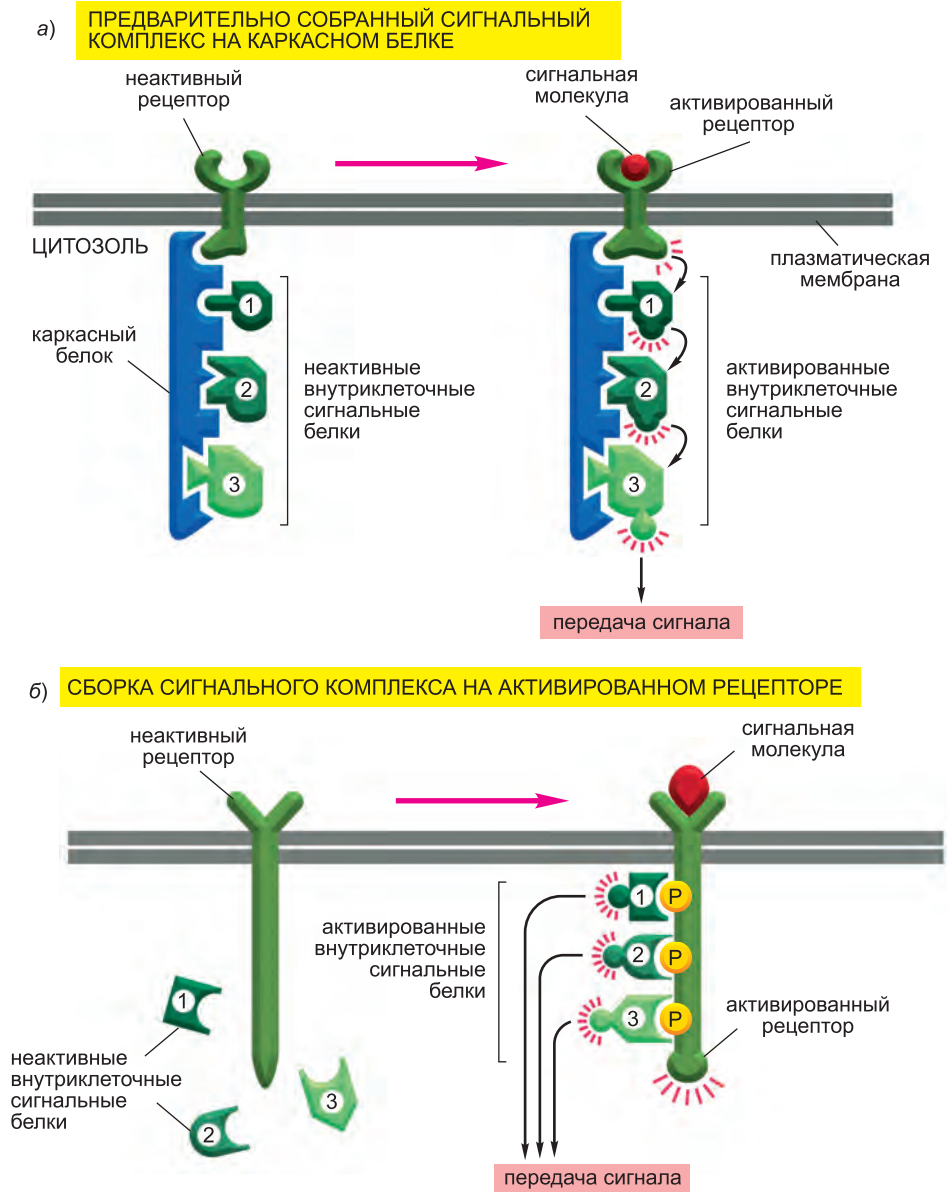


Рис. 15.21. Три типа внутриклеточных сигнальных комплексов. (а) Рецептор и некоторые последовательно активируемые им внутриклеточные сигнальные белки предварительно собираются в сигнальный комплекс на неактивном рецепторе посредством крупного каркасного белка. В других случаях предварительно собранный комплекс связывается с рецептором только после его активации (не показано). (б) Сигнальный комплекс собирается на рецепторе только после связывания внеклеточной сигнальной молекулы и активации; здесь активированный рецептор фосфорилирует сам себя по нескольким сайтам, которые затем служат сайтами докинга для внутриклеточных сигнальных белков. (в) Активация рецептора приводит к увеличению фосфорилирования в прилегающей плазматической мембране определенных фосфолипидов (фосфоинозитидов), которые затем служат сайтами докинга для взаимодействующих друг с другом специфических сигнальных белков.

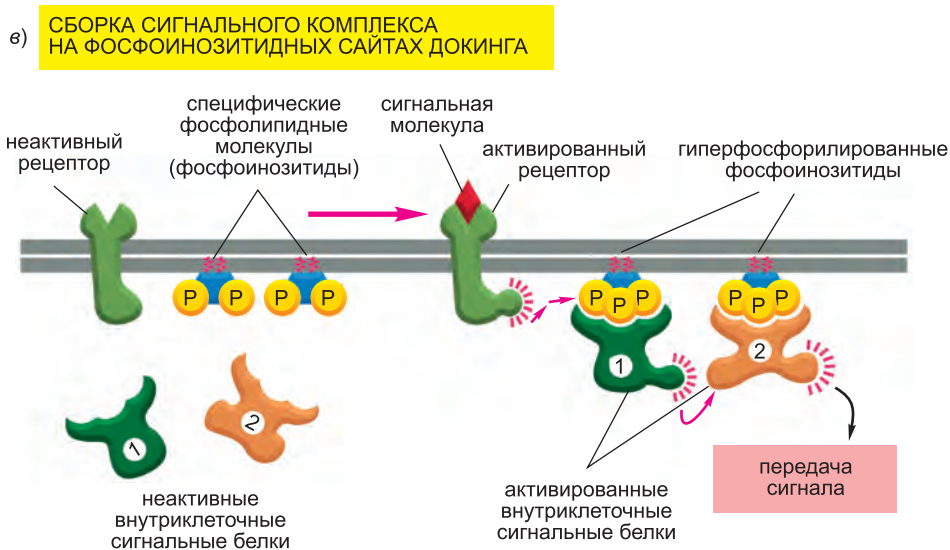


Рис. 15.21. Окончание.

инициация сигналом сборки сигнального комплекса, часто используется для передачи сигнала от одного белка другому. Сборка такого комплекса зависит от различных небольших высококонсервативных **доменов взаимодействия**, присутствующих во многих внутриклеточных сигнальных белках. Каждый из этих компактных белковых модулей связывает определенный структурный мотив другой белковой (или липидной) молекулы. Распознаваемый мотив во взаимодействующем белке может представлять собой короткую пептидную последовательность, ковалентную модификацию (например, фосфорилированные или убиквитинированные аминокислоты) или другой белковый домен. По-видимому, использование модульных доменов взаимодействия ускорило эволюцию новых сигнальных путей: поскольку они могут быть встроены практически в любой участок белка без нарушения его сворачивания или функции, новые домены в составе уже существующего сигнального белка могли связать белок с другими сигнальными путями.

Существует множество типов доменов взаимодействия сигнальных белков. Например, *домены Scr-гомологии 2* (Src Homology 2, SH2) и *домены связывания фосфотирозина* (Phosphotyrosine-Binding, PTB) связывают фосфорилированные тирозины в определенной пептидной последовательности активированных рецепторов или внутриклеточных сигнальных белков. *Домены Scr-гомологии 3* (Src Homology 3, SH3) связывают короткие, обогащенные пролином аминокислотные последовательности. Некоторые *домены гомологии к плекстрину* (Pleckstrin Homology, PH) связывают заряженные головные группы фосфоинозитидов, синтезируемых в плазматической мембране в ответ на внеклеточный сигнал; эти домены позволяют белку пристыковываться к мембране и взаимодействовать с другими рекрутированными туда сигнальными белками (см. рис. 15.21, в). Некоторые сигнальные белки состоят исключительно из двух или нескольких доменов взаимодействия и выполняют роль **адаптеров**, позволяющих двум другим белкам сигнального пути взаимодействовать друг с другом.

Домены взаимодействия позволяют сигнальным белкам связываться друг с другом в многочисленных специфичных комбинациях. Как кирпичики «Лего», белки могут образовывать линейные или ветвящиеся цепи или трехмерные сети, определяющие последовательность передачи сигнала в сигнальном пути. В качестве примера на **рис. 15.22** показано, как действуют некоторые домены взаимодействия в случае рецептора гормона *инсулина*.

Некоторые поверхностные рецепторы и внутриклеточные сигнальные белки способны образовывать временные кластеры в определенных микродоменах липидного бислоя плазматической мембраны, обогащенных холестерином и гликолипидами (см. рис. 10.13). Такие *липидные рафты* могут способствовать эффективной сигнализации, создавая сайты сборки и взаимодействия сигнальных молекул. Однако их значение для сигнализации остается недоказанным.

Еще одним способом сближения рецепторов и внутриклеточных сигнальных белков является их концентрация в определенном участке клетки. Важным при-

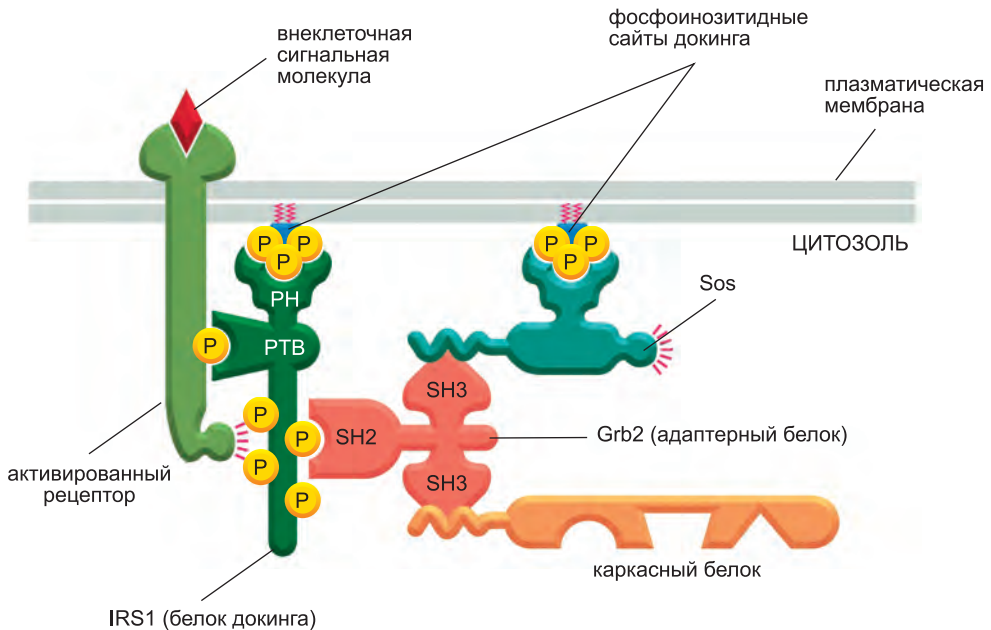


Рис. 15.22. Специфический сигнальный комплекс, образованный при помощи модульных доменов взаимодействия. Данный пример основан на сопряженном с ферментом рецепторе инсулина (связанный с тирозинкиназой рецептор, см. ниже). Сначала активированный рецептор автофосфорилируется по тирозинам, и затем один из фосфотирозинов рекрутирует белок докинга, носящий название субстрата рецептора инсулина-1 (IRS1), посредством домена PTV на IRS1. Домен PH на IRS1 также связывает специфические фосфоинозитиды на внутренней поверхности плазматической мембраны. Затем активированный рецептор фосфорилирует IRS1 по тирозинам, и один из этих фосфотирозинов рекрутирует адаптерный белок (Grb2) посредством домена SH2 на Grb2. Grb2 использует один из двух своих доменов SH3 для связывания с обогащенным пролином участком мономерного GTPаза-активирующего белка Sos (относящегося к классу Ras-GEF, см. ниже), который также связывает фосфоинозитиды плазматической мембраны посредством своего домена PH. Второй домен SH3 белка Grb2 связывается с обогащенной пролином последовательностью каркасного белка, который, в свою очередь, связывает несколько других сигнальных белков. Наконец, другие фосфотирозины IRS1 рекрутируют дополнительные сигнальные белки, несущие SH2-домен (не показано).

мером является **первичная ресничка**, которая выступает как антенна с поверхности большинства клеток позвоночных (см. главу 16). Она обычно короткая и неподвижная, и в ее основе лежат микротрубочки. В ней концентрируются некоторые поверхностные рецепторы и сигнальные белки. Позднее мы рассмотрим специализированные реснички, в которых концентрируются рецепторы света и запаха.

15.1.15. Клетки используют различные механизмы для быстрого ответа на постепенно возрастающую концентрацию внеклеточной сигнальной молекулы

Некоторые ответы клеток на внеклеточные сигналы плавно зависят от концентрации сигнальной молекулы. Но часто зависимость между сигналом и ответом бывает дискретной или «все или ничего», с резким переключением между одним действием и другим, когда концентрация сигнальной молекулы превышает определенное значение (**рис. 15.23**). Такое явление часто бывает результатом положительной обратной связи в системе ответа, это мы обсудим ниже. Два типа ответов встречаются одинаково часто, и различить их не всегда возможно. При измерении влияния сигнала на популяцию клеток зависимость ответа от сигнала может показаться плавной. При этом не исключено, что отдельные клетки отвечают по принципу «все или ничего», и концентрация сигнальной молекулы, при которой происходит переключение, изменяется от клетки к клетке; на **рис. 15.24** показан пример такого измерения.

Более того, плавная зависимость ответа от силы сигнала иногда может быть довольно крутой, создавая обманчивое впечатление о переключательном механизме. Клетки используют разнообразные механизмы для достижения такого эффекта.

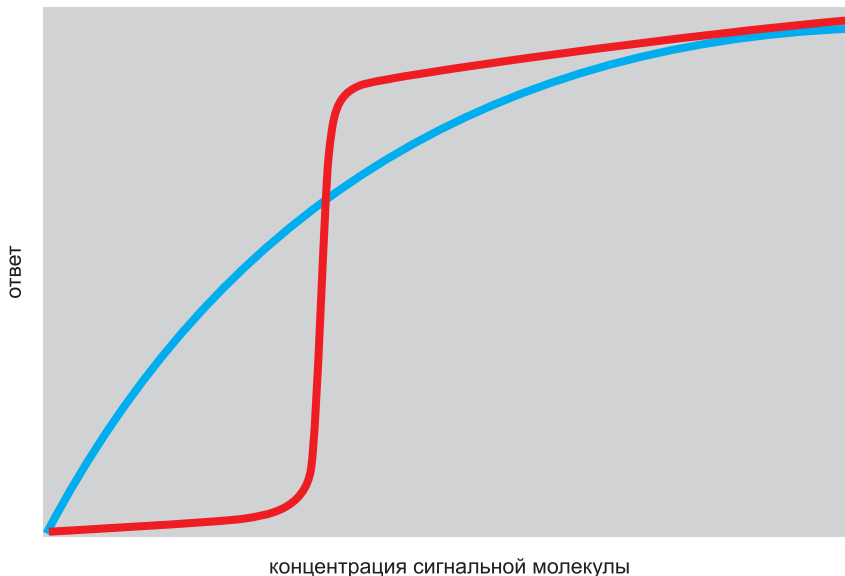


Рис. 15.23. Плавная зависимость ответа от сигнала и зависимость «все или ничего». Некоторые клеточные ответы постепенно возрастают по мере увеличения концентрации внеклеточной сигнальной молекулы (*голубая линия*). В других случаях клетка резко переходит из одного состояния в другое, когда сила сигнала превышает некоторое критическое значение (*красная линия*).

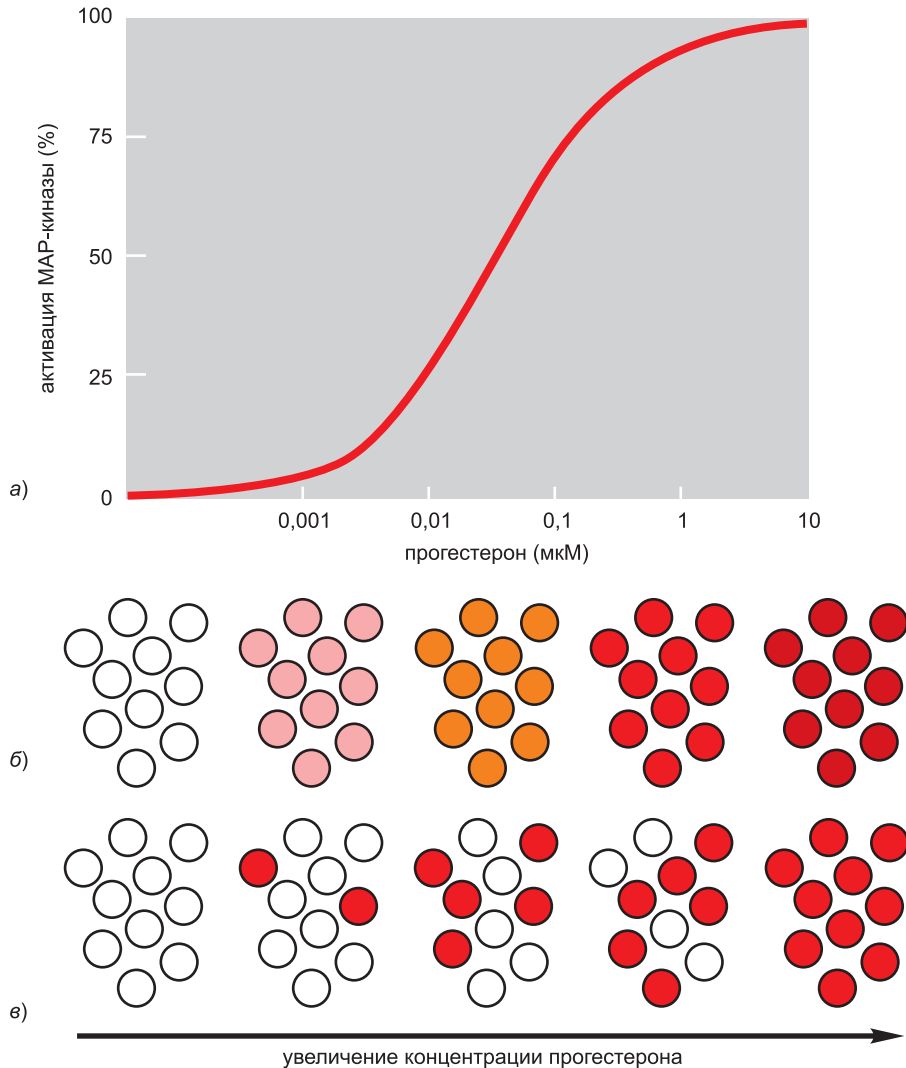


Рис. 15.24. Необходимость исследования отдельных клеток для обнаружения ответов «все или ничего» при увеличении концентрации внеклеточных сигнальных молекул. В данном эксперименте незрелые яйцеклетки лягушки (ооциты) стимулировали постепенным увеличением концентрации гормона прогестерона. Ответ оценивали, анализируя активацию *MAP-киназы* (см. ниже), которая при ответе фосфорилируется. Биохимически определяли количество фосфорилированной (активированной) *MAP-киназы* в экстрактах ооцитов. На (а) проанализированы экстракты популяций стимулированных ооцитов, и зависимость активации *MAP-киназы* от концентрации прогестерона кажется плавной. Существует два объяснения этого результата: (б) концентрация активной *MAP-киназы* могла постепенно увеличиваться с увеличением концентрации прогестерона; (в) или отдельные клетки могли отвечать по принципу «все или ничего», при этом постепенное увеличение общей активации *MAP-киназы* отражает увеличение количества клеток, отвечающих на прогестерон. Когда проанализировали экстракты отдельных ооцитов, показали, что в клетках содержалась либо очень большая, либо очень маленькая, но не промежуточная концентрация активированной киназы, т. е. на уровне отдельных клеток ответ протекал по принципу «все или ничего», как показано на (в). (Адаптировано из J. E. Ferrell and E. M. Machleder, *Science* 280: 895–898, 1998. С любезного разрешения издательства AAAS.)

В одном из механизмов для запуска ответа со следующим по цепи белком-мишенью должно связаться более одной внутриклеточной сигнальной молекулы. Как мы обсудим позже, для активации *циклической АМР-зависимой протеинкиназы* (Cyclic-AMP-dependent Protein Kinase, PKA), например, с ней должно одновременно связаться четыре молекулы малого внутриклеточного медиатора циклического АМР. Сходное усиление ответа наблюдается, когда для активации внутриклеточного сигнального белка требуется фосфорилирование по нескольким сайтам. Зависимость таких *кооперативных* ответов становится все круче по мере увеличения числа кооперирующих молекул или фосфатных групп. Если это число достаточно велико, ответы превращаются во «все или ничего» (рис. 15.25).

Зависимость ответов также становится круче, если внутриклеточная сигнальная молекула активирует один фермент и одновременно ингибирует другой, катализирующий противоположную реакцию. Хорошо изученным примером такого распространенного типа регуляции является расщепление гликогена в клетках скелетных мышц, вызываемое гормоном *адреналином* (эпинефрином). Связывание адреналина с сопряженным с G-белком поверхностным рецептором увеличивает внутриклеточную концентрацию циклического АМР, который одновременно активирует фермент, запускающий расщепление гликогена, и ингибирует фермент, способствующий его синтезу.

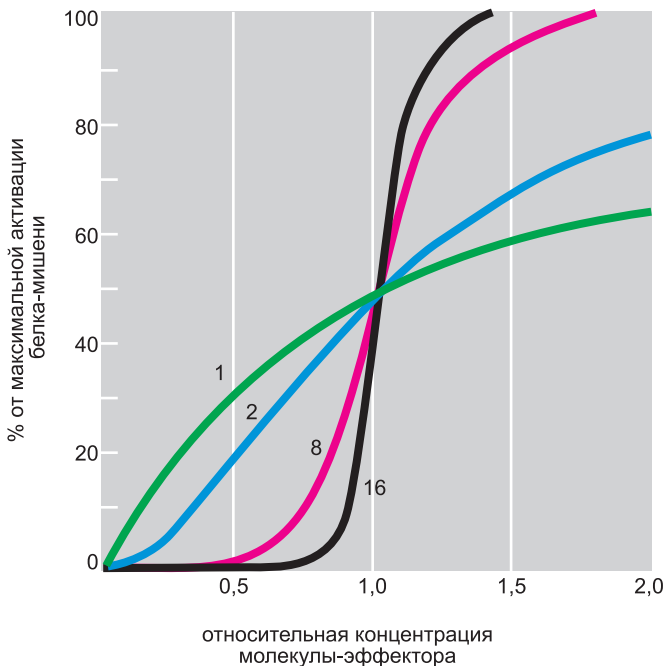


Рис. 15.25. Кривые зависимости активации аллостерического белка от концентрации молекулы-эффектора. Показано, что крутизна активационного ответа увеличивается с увеличением числа аллостерических молекул-эффекторов, которые должны одновременно связываться с белком-мишенью для его активации. Ожидаемые кривые изображены при определенных условиях, если для активации требуется 1, 2, 8 и 16 молекул-эффекторов.

Благодаря всем этим механизмам наклон зависимости ответа от сигнала может быть очень крутым, но все равно зависимость остается непрерывной в соответствии с концентрацией внеклеточной сигнальной молекулы. Для ответа по принципу «все или ничего» требуется другой механизм — *положительная обратная связь*, которую мы сейчас обсудим.

15.1.16. Во внутриклеточных сигнальных сетях часто используются обратные связи

Как и во внутриклеточных метаболических путях (см. главу 2), в большинстве внутриклеточных сигнальных путей используются обратные связи, в которых выход процесса регулирует сам процесс. При *положительной обратной связи* выход стимулирует собственное образование; при *отрицательной обратной связи* выход ингибирует свое образование (рис. 15.26). Петли обратной связи очень важны в биологии, и они регулируют многие химические и физические процессы в клетке. Они действуют в очень широких масштабах времени: от миллисекунд (в случае потенциала действия, например, см. рис. 11.29) до многих часов (в случае циркадных ритмов, например, см. рис. 7.73). Обратные связи, регулирующие клеточную сигнализацию, могут действовать исключительно в пределах клетки-мишени или включать в себя секрецию внеклеточных сигналов. Здесь мы будем рассматривать петли обратной связи, действующие в пределах клетки; даже простейшая петля может приводить к сложным и интересным эффектам.

Петля положительной обратной связи в сигнальном пути может изменять поведение отвечающей клетки. Если сила положительной обратной связи невелика, она просто увеличит ответ на сигнал. Но если связь достаточно сильна, она может

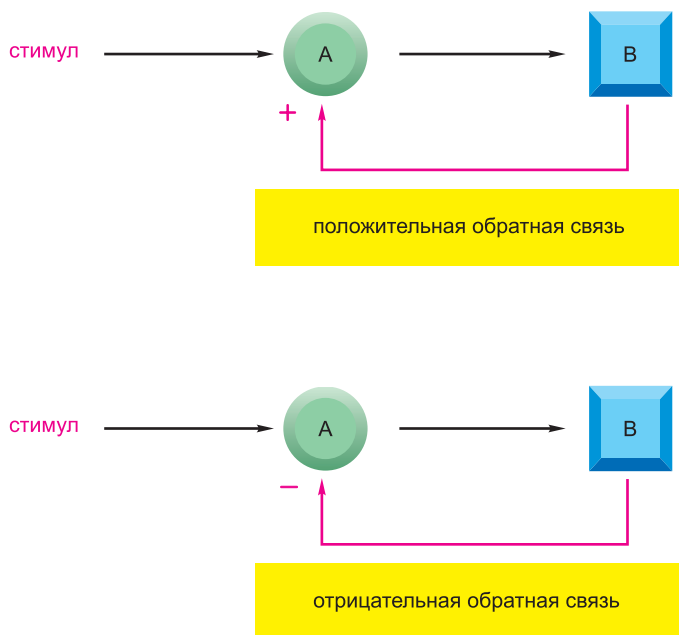
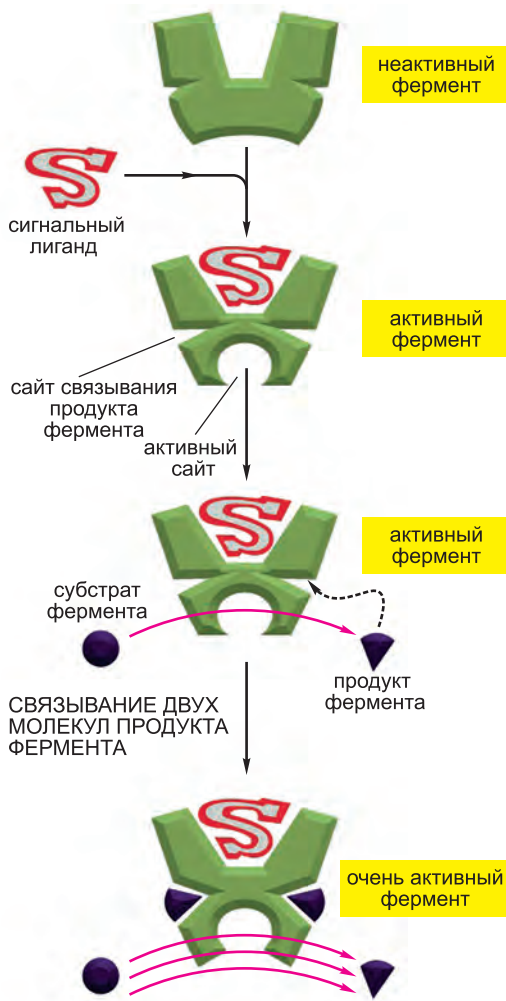


Рис. 15.26. Положительные и отрицательные обратные связи. В этих простых примерах стимул активирует белок А, который, в свою очередь, активирует белок В. Затем белок В действует в обратную сторону, увеличивая или уменьшая активность А.

привести к качественно иному результату — безудержному увеличению количества продукта при достижении сигналом порогового уровня. Это приведет к новой стационарной скорости синтеза, значительно отличающейся от значения при более слабом сигнале (рис. 15.27).

У такого ответа «все или ничего» есть еще одно неотделимое свойство: как только система перешла на более высокий уровень активации, это состояние самоподдерживается и может сохраняться, даже когда величина сигнала снова падает ниже критического значения. В таком случае систему называют *бистабильной*: она может существовать либо во «включенном», либо в «выключенном» состоянии, и непродолжительный стимул может перевести ее из одного состояния в другое (рис. 15.28, а и б). Клетки используют петли положительной обратной связи такого типа для принятия устойчивых решений по принципу «все или ничего». Особенно этот механизм важен в процессе развития, когда по-разному локализованные клетки должны выбирать между альтернативными путями развития в ответ на плавный градиент сигнала (морфогена), как обсуждалось ранее. Благодаря положительной обратной связи временный внеклеточный сигнал может вызвать продолжительные



изменения в клетках и их потомках, сохраняющиеся на протяжении всей жизни организма. Сигналы, запускающие дифференциацию мышечных клеток, например, включают транскрипцию набора генов, кодирующих специфичные для мышц регуляторные белки, которые стимулируют транскрипцию своих собственных генов, а также генов, кодирующих другие белки мышц; в этом случае решение о превращении в мышечную клетку становится необратимым (см. рис. 7.75). Этот тип клеточной памяти, зависящий от положительной обратной связи, является одним из базовых способов продолжи-

Рис. 15.27. Положительная обратная связь, приводящая к переключательному поведению. В данном примере внутриклеточная сигнальная молекула (лиганд) активирует следующий в сигнальном пути фермент. Две молекулы продукта ферментативной реакции связываются со своим ферментом и способствуют его дальнейшей активации. В результате в отсутствие лиганда скорость синтеза очень мала. Скорость очень медленно возрастает с увеличением концентрации лиганда до тех пор, пока при некотором пороговом уровне лиганда не синтезируется достаточно продукта для того, чтобы активировать фермент по самоускоряющемуся механизму. Концентрация продукта в результате увеличивается еще быстрее.

тельного изменения функционирования клетки без изменения последовательности ДНК; и это измененное состояние может передаваться дочерним клеткам. Такие механизмы наследования называются *эпигенетическими*, в отличие от генетических механизмов, связанных с мутациями ДНК (более подробно см. главу 7 и рис. 7.86).

В отличие от положительной обратной связи, **отрицательная обратная связь** противодействует влиянию стимула и, таким образом, сокращает и ограничивает уровень ответа, делая систему менее восприимчивой к возмущениям. Однако, как и в случае положительной обратной связи, при более сильной связи может быть достигнут качественно иной эффект. При достаточно большой временной задержке отрицательная связь может привести к раскачиванию ответов. Колебания могут сохраняться все время, пока действует стимул (рис. 15.28, *в*), или даже возникать самопроизвольно без внешнего воздействия (см. рис. 22.82). Позднее в этой главе мы встретим несколько примеров такого колебательного поведения внутриклеточных ответов на внеклеточные сигналы; все они зависят от отрицательных обратных связей.

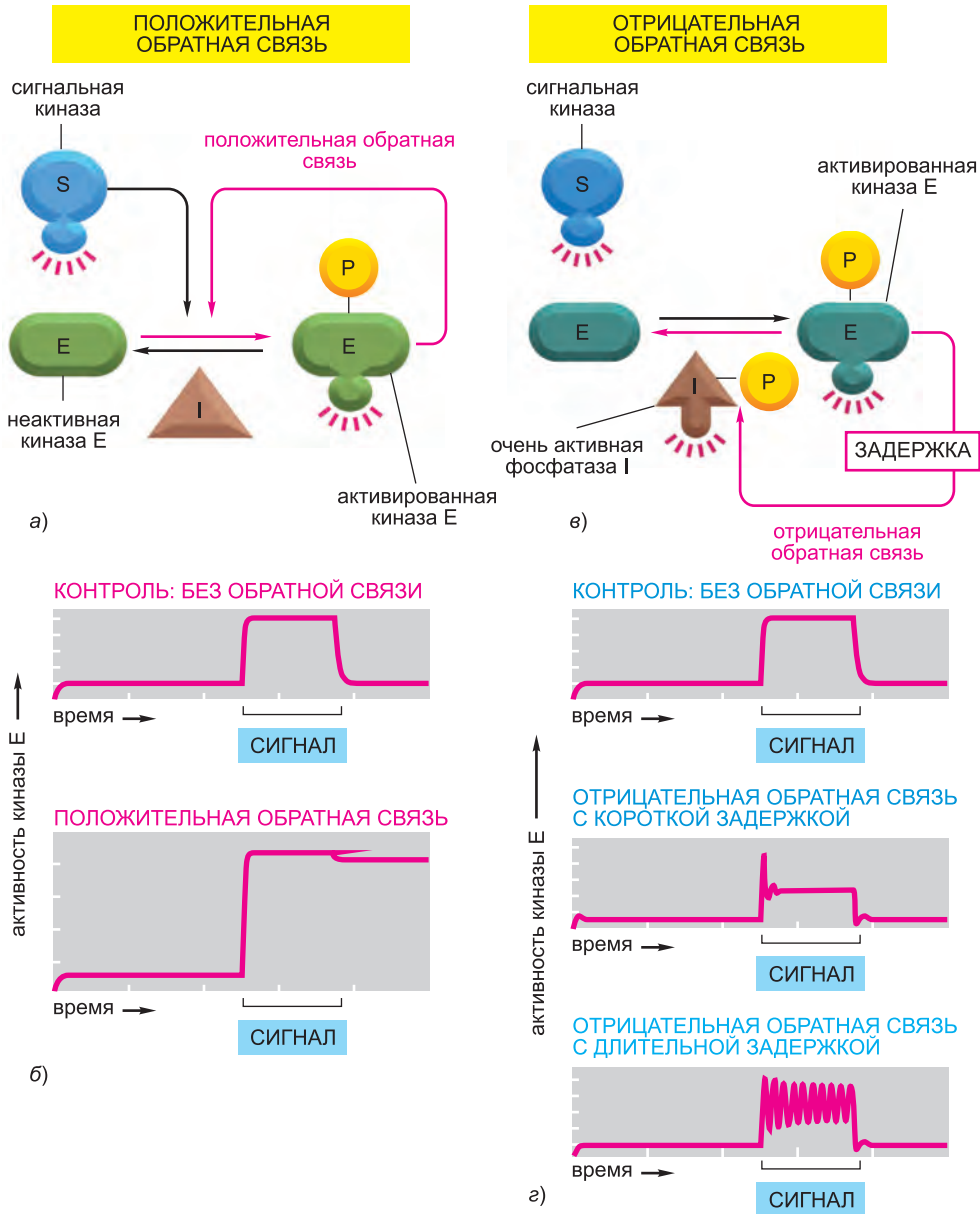
Если отрицательная обратная связь действует с небольшой задержкой, система функционирует как детектор изменений. Она генерирует сильный ответ на стимул, но он быстро снижается, даже если действие стимула сохраняется; однако, если стимул увеличить, система вновь будет отвечать, но ответ снова быстро снизится. Это явление, которое носит название *адаптации*, мы сейчас рассмотрим.

Небольшие изменения обратной связи могут значительно поменять ответ системы даже в случае такого простого примера. На рисунке показана лишь малая часть возможных ответов.

15.1.17. Клетки могут регулировать свою чувствительность к сигналу

При ответе на многие типы стимулов клетки и организмы способны зарегистрировать одинаковое изменение сигнала в очень широком диапазоне силы стимула. Для этого в клетках-мишенях существует обратимый процесс **адаптации**, или **десенситилизации**, при котором длительное действие стимула одинаковой силы приводит к снижению ответа клетки. При химической сигнализации адаптация позволяет клеткам отвечать на *изменения* в концентрации внеклеточной сигнальной молекулы (а не на абсолютное значение) в широком диапазоне концентраций. В основе этого процесса лежит отрицательная обратная связь с короткой временной задержкой: сильный ответ модифицирует аппарат сигнализации таким образом, что он обнуляет себя и становится менее чувствительным к исходному уровню сигнала (см. рис. 15.28, *д*, средний график). Однако благодаря задержке внезапное увеличение сигнала может вновь стимулировать клетку на короткий промежуток времени, пока отрицательная обратная связь снова не начнет действовать.

Адаптация к сигнальной молекуле может происходить по-разному. Она может служить результатом инактивации рецепторов. Связывание сигнальной молекулы с поверхностными рецепторами, например, может привести к эндоцитозу и временному депонированию рецепторов в эндосомах. В некоторых случаях такой сигнал-зависимый эндоцитоз рецепторов приводит к разрушению рецепторов в лизосомах — этот процесс называется *даун-регуляцией рецепторов* (однако в других случаях активированные рецепторы продолжают передавать сигнал даже после эндоцитоза, это мы обсудим позднее). Рецепторы также могут десенситилизоваться и на поверхности клетки, например, путем их фосфорилирования или метилирования через некоторое время после активации. Адаптация может протекать и на последующих



этапах сигнализации за счет изменения внутриклеточных сигнальных белков, участвующих в передаче внутриклеточного сигнала, или за счет синтеза ингибиторного белка, блокирующего процесс передачи. На **рис. 15.29** представлено сравнение различных механизмов десенсибилизации.

Обсудив некоторые общие принципы клеточной сигнализации, мы теперь обратимся к рецепторам, сопряженным с G-белками, которые в настоящее время считают самым крупным классом поверхностных рецепторов. Они опосредуют ответы на самые разнообразные внеклеточные сигналы.

Рис. 15.28 (слева). Некоторые эффекты простой обратной связи. На графиках представлены рассчитанные эффекты простых петель положительной и отрицательной обратных связей. Во всех случаях входящий сигнал — это активированная протеинкиназа (S), фосфорилирующая и, таким образом, активирующая другую протеинкиназу (E); протеинфосфатаза (I) дефосфорилирует и инактивирует активированную киназу E. На графиках *красные линии* соответствуют активности киназы E; *голубым* показано время действия входящего сигнала (активированной киназы S). (а) Схема петли положительной обратной связи, в которой активированная киназа S стимулирует собственное фосфорилирование и активацию; фосфатаза I при своей базовой активности с маленькой постоянной скоростью дефосфорилирует киназу E. (б) На верхнем графике показано, что без обратной связи активность киназы E пропорциональна (с короткой задержкой) уровню стимуляции киназой S. На нижнем графике видно, что при наличии положительной обратной связи система бистабильна (т. е. может существовать в одном из двух устойчивых состояний): кратковременная стимуляция киназой S переключает систему из одного состояния в другое, которое затем сохраняется после удаления стимула. (в) Схема отрицательной обратной связи, при которой активированная киназа S фосфорилирует и активирует фосфатазу I, увеличивая скорость, с которой фосфатаза дефосфорилирует и инактивирует фосфорилированную киназу E. (г) На верхнем графике снова показана активность киназы E без обратной связи. На следующих графиках изображено влияние отрицательной обратной связи с временной задержкой на активность киназы E. При короткой задержке система при резком изменении сигнала демонстрирует сильный непродолжительный ответ, но затем обратная связь снова уменьшает силу ответа. При длительной задержке обратная связь создает незатухающие в присутствии сигнала колебания.

Заключение

Все клетки многоклеточных организмов в процессе развития были запрограммированы отвечать на определенный набор внеклеточных сигнальных молекул, синтезируемых другими клетками. Сигнальные молекулы действуют в различных сочетаниях, регулируя функционирование клетки. Большинство сигнальных молекул действует в качестве локальных медиаторов, которые секретируются и быстро захватываются, разрушаются или иммобилизуются, в результате чего их влияние распространяется только на ближайшие клетки. Другие сигнальные молекулы остаются связанными с сигнализирующей клеткой и опосредуют контакт-зависимую сигнализацию. Также существует два типа дальнедействующей сигнализации. При эндокринной сигнализации гормоны, секретируемые эндокринными клетками, переносятся в крови к клеткам-мишеням. При синаптической сигнализации нейромедиаторы, секретируемые аксонами нервных клеток, локально действуют на постсинаптические клетки в месте контакта аксонов.

Для клеточной сигнализации необходимы не только внеклеточные сигнальные молекулы, но и комплементарный им набор рецепторных белков, экспрессируемых клеткой-мишенью, специфически связывающей данные сигнальные молекулы. Некоторые небольшие гидрофобные сигнальные молекулы, включая стероидные и тиреоидные гормоны, диффундируют через плазматическую мембрану клетки-мишени и активируют внутриклеточные рецепторы, которые напрямую регулируют транскрипцию определенных генов. Растворимые газы оксид азота и монооксид углерода служат локальными медиаторами, диффундируя через плазматическую мембрану клетки-мишени и активируя внутриклеточные белки, например гуанилилциклазу, которая синтезирует циклический GMP. Но большинство внеклеточных сигнальных молекул гидрофильно и не способно пройти через плазматическую мембрану. Они активируют расположенные на поверхности клетки рецепторы, которые служат передатчиками сигнала

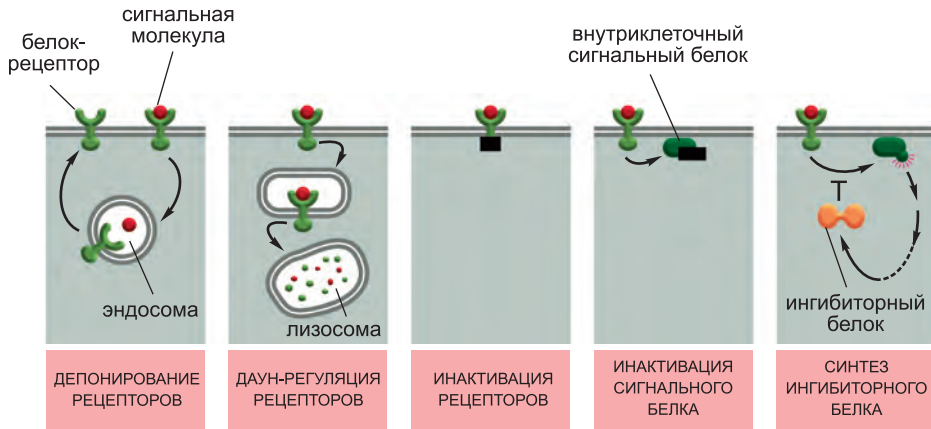


Рис. 15.29. Некоторые пути десенсибилизации (адаптации) клеток-мишеней по отношению к внеклеточной сигнальной молекуле. Механизмы, действующие на уровне рецепторов, включают в себя фосфорилирование или убиквитинирование рецепторных белков. Однако при бактериальном хемотаксисе, который мы обсудим позднее, адаптация основана на метилировании рецепторов.

и преобразуют внеклеточный сигнал во внутриклеточный, изменяющий функционирование клетки-мишени.

Три самых крупных семейства поверхностных рецепторов передают внеклеточные сигналы при помощи различных механизмов. Рецепторы, сопряженные с ионными каналами, представляют собой медиатор-зависимые ионные каналы, которые быстро открываются или закрываются в ответ на связывание нейромедиатора. Рецепторы, сопряженные с G-белками, посредством тримерных GTP-связывающих белков (G-белков) активируют или инактивируют связанные с плазматической мембраной ферменты или ионные каналы. Рецепторы, сопряженные с ферментами, сами являются ферментами или связаны с ними; обычно это протеинкиназы, фосфорилирующие рецепторы и определенные сигнальные белки клетки-мишени.

После активации рецепторы, сопряженные с G-белками или ферментами, передают сигнал внутрь клетки за счет активации внутриклеточных сигнальных белков. Некоторые из этих сигнальных белков преобразуют, усиливают или распространяют сигнал по мере передачи, тогда как другие объединяют сигналы из различных сигнальных путей. Некоторые выполняют функцию переключателей, временно активируемых фосфорилированием или связыванием GTP. Крупные сигнальные комплексы образуются посредством модульных доменов взаимодействия сигнальных белков, позволяющих белкам формировать функциональные сигнальные сети.

Клетки-мишени используют различные внутриклеточные механизмы, включая петли обратных связей, для регуляции своего ответа на внеклеточные сигналы. Положительные обратные связи помогают клеткам отвечать на постепенно возрастающую концентрацию сигнальной молекулы по принципу «все или ничего» или преобразовывать кратковременный сигнал в долговременный или даже постоянный ответ. Отрицательная обратная связь с временной задержкой позволяет клеткам адаптироваться к сигнальной молекуле. В результате

клетки способны отвечать на небольшие изменения концентрации сигнальной молекулы в широком концентрационном диапазоне.

15.2. Сигнализация посредством поверхностных сопряженных с G-белками рецепторов GPCR и малых внутриклеточных медиаторов

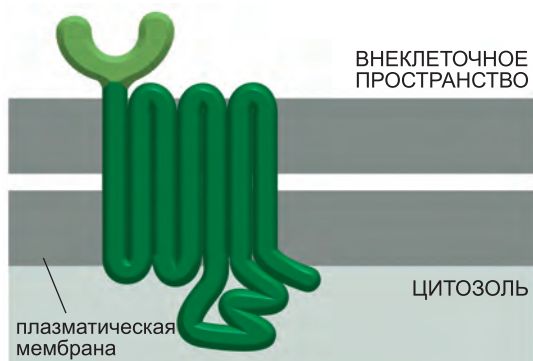
У всех эукариот есть **рецепторы, опосредованные G-белками (G-Protein Coupled Receptors, GPCR)**. Они составляют самое крупное семейство поверхностных рецепторов и опосредуют большинство сигналов внешнего мира и других клеток, включая действие гормонов, нейромедиаторов и локальных медиаторов. Наши чувства света, запаха и вкуса (возможно, за исключением ощущения кисло-го) зависят от них. У человека более 700 GPCR, а у мышей только 1000 связана с восприятием запаха. Сигнальные молекулы, действующие на GPCR, различаются как по структуре, так и по функциям: среди них можно встретить как белки и небольшие пептиды, так и производные аминокислот и жирных кислот, а также фотоны света и все молекулы, вкус и запах которых мы способны воспринимать. Одна и та же сигнальная молекула способна активировать различных представителей семейства GPCR; например, адреналин активирует по крайней мере 9 различных GPCR, ацетилхолин — 5, а нейромедиатор серотонин — не менее 14. Различные рецепторы одного и того же сигнала обычно экспрессируются в разных типах клеток и вызывают разные ответы.

Все GPCR обладают сходной структурой, несмотря на химическое и функциональное разнообразие активирующих их молекул. Они состоят из единственной полипептидной цепи, семь раз пересекающей липидный бислой (**рис. 15.30**). Помимо характерной ориентации в плазматической мембране, все они используют G-белки для передачи сигнала внутрь клетки.

В семейство GPCR входит *родопсин* — светочувствительный белок глаза позвоночных, а также многочисленные носовые запаховые рецепторы. Другие представители семейства обнаружены в одноклеточных организмах: например, в дрожжах это рецепторы, узнающие секретируемые факторы спаривания. Вероятно, GPCR, опосредующие межклеточную сигнализацию в многоклеточных организмах, эволюционировали из сенсорных рецепторов одноклеточных эукариотических предков.

Удивительно, но действие половины известных лекарств опосредовано GPCR или активируемые ими сигнальными путями. Из сотен генов человеческого гено-

Рис. 15.30. Рецептор, сопряженный с G-белком (GPCR). GPCR, связывающие белковые лиганды, несут крупный внеклеточный домен, образованный показанной *светло-зеленой* частью полипептидной цепи. Этот домен вместе с несколькими трансмембранными сегментами связывает белковый лиганд. Рецепторы малых лигандов, например адреналина, несут небольшие внеклеточные домены, и лиганд обычно связывается в плоскости мембраны с сайтом, образованным аминокислотами нескольких трансмембранных сегментов.



ма, кодирующих GPCR, около 150 кодируют рецепторы-сироты, лиганды которых неизвестны. Многие из них являются вероятными мишенями для новых лекарств, которые будут разработаны в будущем.

15.2.1. Тримерные G-белки передают сигнал от GPCR

Когда внеклеточная сигнальная молекула связывается с GPCR, рецептор претерпевает конформационные перестройки, позволяющие ему активировать **тримерный ГТР-связывающий белок (G-белок)**. G-белок прикреплен к цитоплазматической стороне плазматической мембраны, где он функционально сопрягает рецептор с ферментом или ионным каналом мембраны. В некоторых случаях G-белок физически связан с рецептором до его активации, тогда как в других он связывается только с активированным рецептором. Существуют различные типы G-белков, каждый из которых специфичен к определенному набору GPCR и белков-мишеней плазматической мембраны. Однако все они имеют сходную структуру и механизм действия.

G-белки состоят из трех субъединиц — α , β и γ . В отсутствие стимула α -субъединица несет связанный GDP и G-белок неактивен (**рис. 15.31**). Когда GPCR активируется, он выполняет функцию фактора обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) и заставляет α -субъединицу высвободить GDP и связать GTP. Такой обмен приводит к значительным конформационным перестройкам G-белка и его активации. Исходно считалось, что активация всегда приводит к диссоциации тримера на два активных компонента — α -субъединицу и $\beta\gamma$ -комплекс. Однако

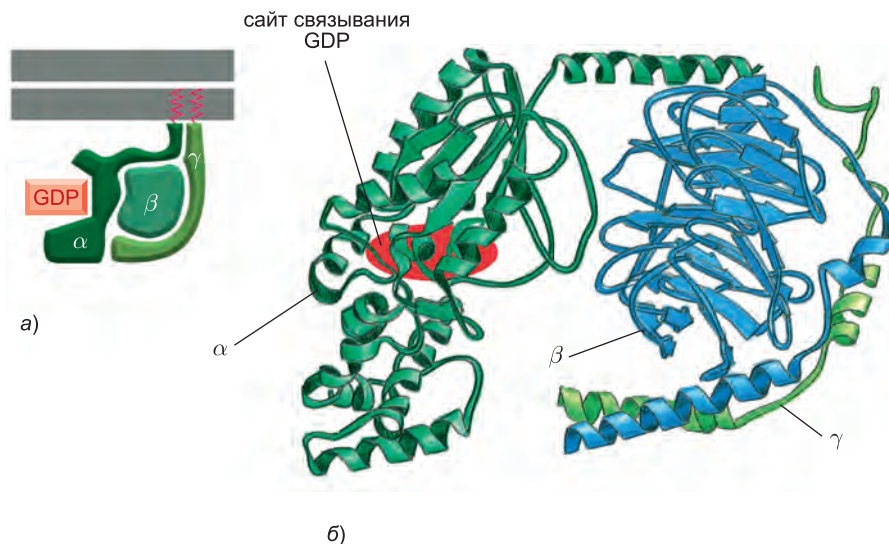


Рис. 15.31. Структура неактивного G-белка. (а) Обратите внимание, что α - и γ -субъединицы ковалентно связаны с липидными молекулами (красные), удерживающими их вблизи плазматической мембраны, и α -субъединица несет связанный GDP. (б) Трехмерная структура неактивного G-белка, основанная на транскрипции — G-белке, участвующем в зрительной передаче (обсуждается ниже). α -субъединица содержит ГТРазный домен и связывается с β -субъединицей, запирающей ГТРазный домен в неактивной конформации со связанным GDP. γ -субъединица связывается с противоположной стороны β -субъединицы, и вместе β и γ образуют функциональную единицу. (б, по D.G. Lombricht et al., *Nature* 379: 311–319, 1996. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

показано, что по крайней мере в некоторых случаях конформационная перестройка приводит к обнажению поверхности между α -субъединицей и $\beta\gamma$ -комплексом, то есть части G-белка становятся способны взаимодействовать со своими мишенями без диссоциации субъединиц (**рис. 15.32**). Мишенями служат либо ферменты, либо ионный каналы плазматической мембраны, передающие сигнал внутрь клетки.

α -субъединица представляет собой GTPазу, и после гидролиза GTP до GDP она инактивируется. Как долго G-белок остается активным, зависит от того, насколько быстро α -субъединица гидролизует связанный GTP. Обычно это происходит быстро, поскольку GTPазная активность усиливается связыванием α -субъединицы со вторым белком — белком-мишенью или специфическим **регулятором сигнальных путей G-белков** (Regulator of G protein Signaling, **RGS**). RGS служат специфичными к α -субъединице GTPаза-активирующими белками (GAP) (см. рис. 15.19), и у всех эукариот они способствуют остановке опосредованных G-белками ответов. Человеческий геном кодирует около 25 белков RGS, каждый из которых взаимодействует с определенным набором G-белков.

GPCR активируют различные внутриклеточные сигнальные пути, включая пути, которые также активируются фермент-сопряженными рецепторами. Однако в данном разделе мы сконцентрируемся на активируемых GPCR путях, использующих малые внутриклеточные медиаторы.

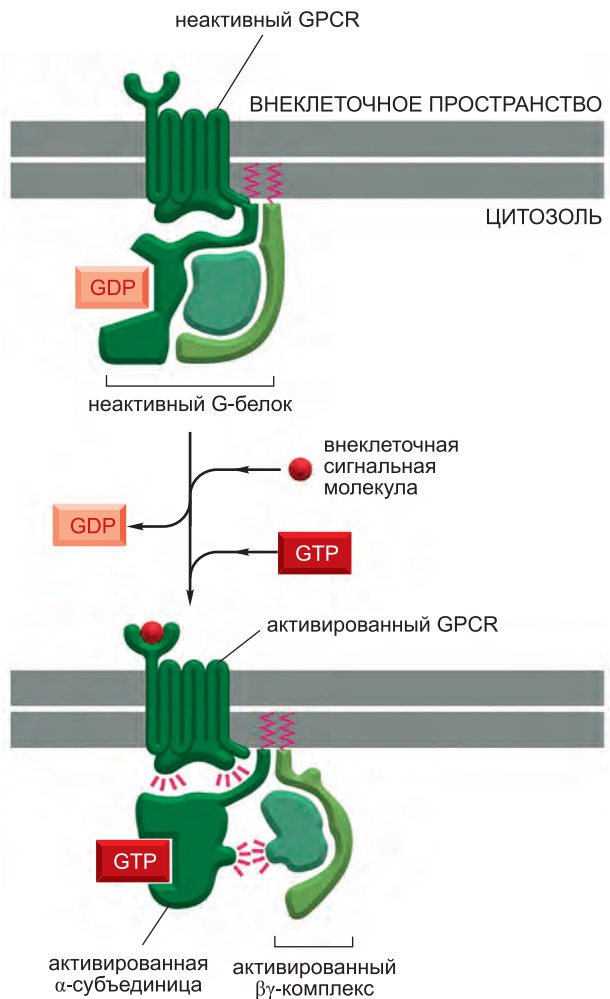


Рис. 15.32. Активация G-белка активированным GPCR. Связывание внеклеточного сигнала изменяет конформацию рецептора, которая, в свою очередь, изменяет конформацию G-белка. Перестройка α -субъединицы G-белка позволяет произойти обмену GDP на GTP, что активирует α -субъединицу и $\beta\gamma$ -комплекс, которые способны регулировать активность белков-мишеней в плазматической мембране. Рецептор остается активным до тех пор, пока с ним связана внешняя сигнальная молекула, следовательно, он может катализировать активацию нескольких молекул G-белка, которые диссоциируют от рецептора после активации (не показано). В некоторых случаях α -субъединица и $\beta\gamma$ -комплекс диссоциируют друг от друга после активации G-белка.

15.2.2. Некоторые G-белки регулируют образование циклического AMP

Циклический AMP (сAMP) служит малым внутриклеточным медиатором во всех исследованных клетках прокариот и животных. Нормальная концентрация сAMP в цитозоле составляет 10^{-7} М, но внеклеточный сигнал способен за секунды увеличить ее более чем в двадцать раз (**рис. 15.33**). Как объяснялось ранее (см. рис. 15.11), для такого быстрого ответа необходимо уравнивание быстрого синтеза молекулы и ее быстрого разрушения или удаления. Циклический AMP синтезируется из АТР связанным с плазматической мембраной ферментом **аденилилциклазой**, и он непрерывно быстро разрушается **сAMP-фосфодиэстеразами**, гидролизующими циклический AMP до аденозин-5'-монофосфата (5'-AMP) (**рис. 15.34**).

Действие многих внеклеточных сигнальных молекул направлено на увеличение концентрации циклического AMP за счет усиления активности аденилилциклазы при постоянной фоновой фосфодиэстеразной активности. Аденилилциклаза — это крупный многопроходный трансмембранный белок, чей каталитический сайт располагается на цитоплазматической стороне плазматической мембраны. У млекопитающих встречается по крайней мере восемь изоформ фермента, большая часть которых регулируется одновременно G-белками и Ca^{2+} . GPCR, увеличивающие концентрацию циклического AMP, сопряжены со **стимулирующим G-белком** (G_s), активирующим аденилилциклазу. Другой G-белок, носящий название **ингибирующего G-белка** (G_i), ингибирует аденилилциклазу, но его действие основано на прямой регуляции ионных каналов (см. ниже).

Белки G_s и G_i служат мишенями нескольких важных для медицины бактериальных токсинов. *Холерный токсин*, синтезируемый вызывающей холеру бактерией,

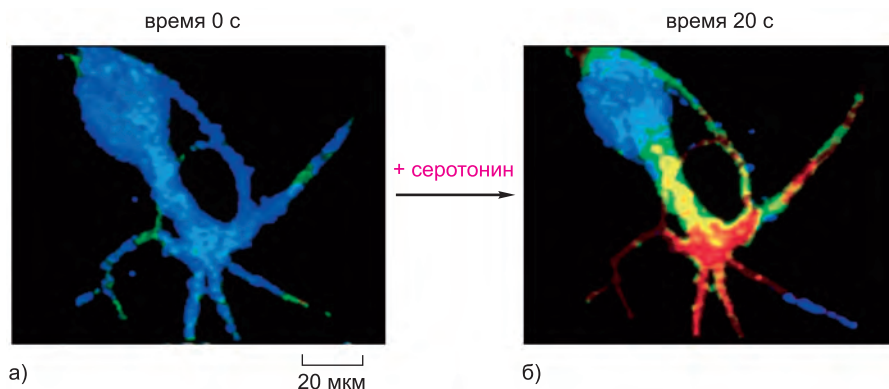
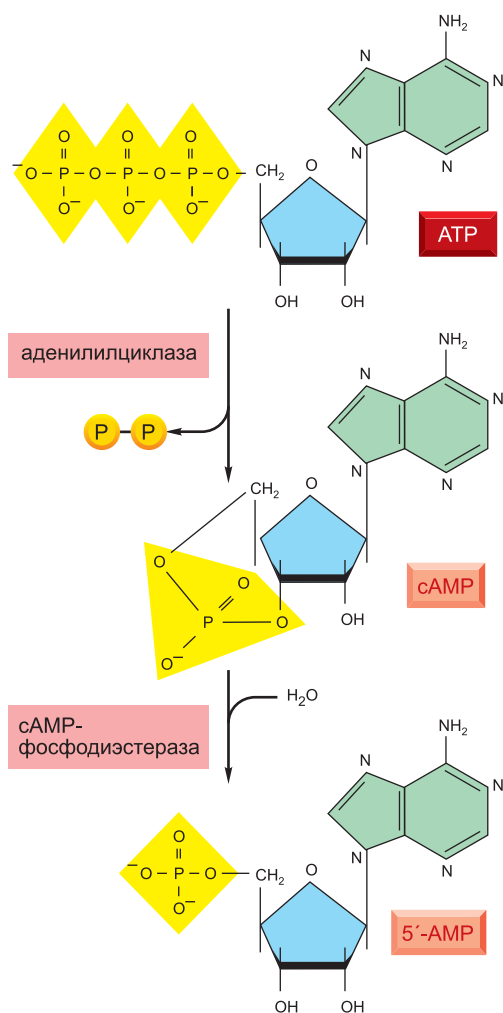


Рис. 15.33. Увеличение концентрации циклического AMP в ответ на внеклеточный сигнал. Данные нервные клетки в культуре отвечают на нейромедиатор серотонин, который действует посредством GPCR и вызывает быстрое увеличение внутриклеточной концентрации циклического AMP. Для наблюдения за уровнем циклического AMP в клетку поместили флуоресцентный белок, меняющий цвет при связывании с циклическим AMP. *Голубой* соответствует низкому уровню циклического AMP, *желтый* — промежуточному, а *красный* — высокому. (а) В покоящейся клетке уровень циклического AMP составляет около 5×10^{-8} М. (б) Через 20 секунд после добавления к культуре серотонина внутриклеточная концентрация циклического AMP возрастает в соответствующих частях клетки до 10^{-6} М, то есть более чем в 20 раз. (Из Brian J. Bacskai et al., *Science* 260: 222–226, 1993. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Рис. 15.34. Синтез и разрушение циклического AMP. В реакции образования цикла, катализируемой ферментом аденилициклазой, циклический AMP (сAMP) синтезируется из АТР посредством удаления двух фосфатных групп (P - P); пиррофосфатаза обеспечивает эту реакцию энергией за счет гидролиза пиррофосфата до фосфата (не показано). Циклический AMP в клетке нестабилен, поскольку он гидролизуется специфическими фосфодиэстеразами с образованием 5'-AMP.



представляет собой фермент, катализирующий перенос ADP-рибозы с внутриклеточного NAD^+ на α -субъединицу G_s . Такое ADP-рибозилирование изменяет α -субъединицу, в результате чего она перестает быть способной гидролизовать связанный GTP и остается в активном состоянии, бесконечно стимулирующем аденилициклазу. Длительное увеличение концентрации циклического AMP в эпителиальных клетках кишечника приводит к активному всасыванию Cl^- и воды, что вызывает характерную для холеры тяжелую диарею. *Коклюшный токсин*, синтезируемый вызывающей коклюш бактерией, катализирует ADP-рибозилирование α -субъединицы G_i , что препятствует взаимодействию белка с его рецепторами; в результате G-белок удерживает GDP и оказывается неспособным регулировать свои белки-мишени. Эти два токсина широко используют в экспериментах для определения того, каким белком, G_s или G_i , опосредуется GPCR-зависимый ответ клетки.

Некоторые ответы, опосредуемые G_s -стимулированным увеличением концентрации циклического AMP, перечислены в [таблице 15.1](#). Различные типы клеток по-разному отвечают на увеличение концентрации циклического AMP, но конкретный тип клеток обычно одинаково отвечает на такое увеличение вне зависимости от того, какой внеклеточный сигнал его вызвал. Например, в жировых клетках по крайней мере четыре гормона активируют аденилициклазу, и все они вызывают расщепление триглицерида (запасной формы жиров) до жирных кислот (см. таблицу 15.1).

Люди, у которых существует генетический недостаток определенных α -субъединиц белка G_s , слабее реагируют на действие некоторых гормонов. В результате у таких людей наблюдаются нарушения метаболизма, патологическое развитие костей и умственная отсталость.

Таблица 15.1. Некоторые клеточные ответы на гормоны, опосредуемые циклическим АМР

Ткань-мишень	Гормон	Основной ответ
Щитовидная железа	тиреотропный гормон (ТТГ)	синтез и секреция тироксина
Кора надпочечников	адренокортикотропный гормон (АКТГ)	секреция кортизола
Яичники	лютеинизирующий гормон	секреция прогестерона
Мышцы	адреналин	расщепление гликогена
Кости	паратиреоидный гормон	резорбция костей
Сердце	адреналин	увеличение частоты и силы сердечных сокращений
Печень	глюкагон	расщепление гликогена
Почки	вазопрессин	обратное всасывание воды
Жировая ткань	адреналин, АКТГ, глюкагон, ТТГ	расщепление триглицеридов

15.2.3. Действие циклического АМР в основном опосредуется циклической АМР-зависимой протеинкиназой (РКА)

В большинстве животных клеток действие циклического АМР опосредовано активацией **циклической АМР-зависимой протеинкиназы** (Cyclic AMP-dependent Protein Kinase, **РКА**). Эта киназа фосфорилирует определенные серины или треонины на белках-мишенях, включая внутриклеточные сигнальные белки и белки-эффекторы, таким образом регулируя их активность. Белки-мишени отличаются у клеток разных типов, что объясняет, почему действие циклического АМР в разных тканях настолько различно (см. таблицу 15.1).

В неактивном состоянии РКА состоит из комплекса двух каталитических субъединиц и двух регуляторных субъединиц. Связывание циклического АМР с регуляторными субъединицами изменяет их конформацию, и они диссоциируют из комплекса. Высвобожденные каталитические субъединицы активируются и фосфорилируют специфические белки-мишени (**рис. 15.35**). Регуляторные субъединицы РКА (также называемые А-киназой) играют важную роль в локализации киназы внутри клетки: специальные **якорные белки А-киназы** (**A-Kinase Anchoring Proteins, АКАР**) связывают регуляторные субъединицы и участок цитоскелета или мембраны органеллы, привязывая, таким образом, ферментный комплекс к определенному субклеточному компартменту. Некоторые АКАР также связывают и другие сигнальные белки, образуя комплекс, работающий как единый модуль. АКАР, распределенный вокруг ядра клеток сердечной мышцы, например, связывает РКА и фосфодиэстеразу, гидролизующую циклический АМР. В отсутствие стимула фосфодиэстераза поддерживает низкую локальную концентрацию циклического АМР, и связанная РКА неактивна; при стимулировании клетки концентрация циклического АМР быстро увеличивается, перегружая фосфодиэстеразу и активируя РКА. Одним из белков-мишеней, фосфорилируемых РКА в этих клетках, является фосфодиэстераза, которая снова быстро снижает концентрацию циклического АМР. Такая организация белков превращает то, что было бы слабым и продолжительным ответом РКА, в сильный, короткий и локальный всплеск активности РКА.

Если некоторые ответы, опосредованные циклическим АМР, протекают в течение секунд и не зависят от изменения в транскрипции генов (см. **рис. 15.33**), то

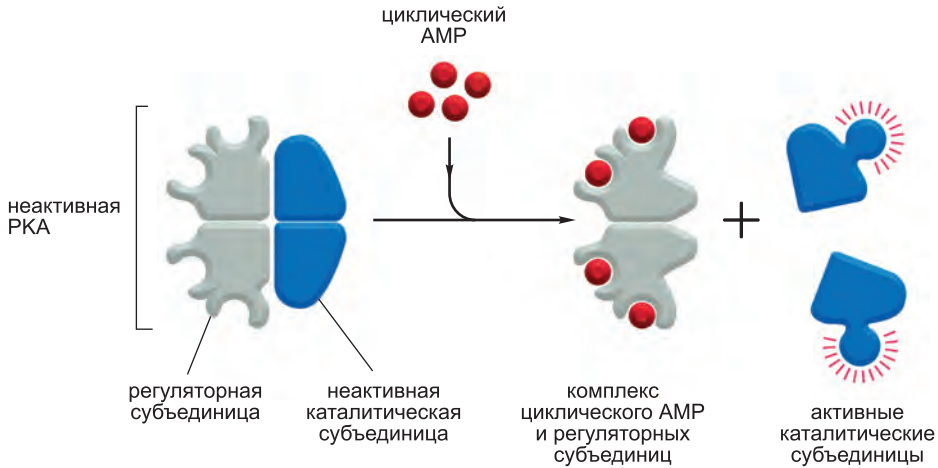


Рис. 15.35. Активация сАМР-зависимой протеинкиназы (РКА). Связывание циклического АМР с регуляторными субъединицами тетрамера РКА приводит к конформационным перестройкам, и эти субъединицы диссоциируют от каталитических субъединиц. Таким образом, каталитические субъединицы приобретают киназную активность. Для высвобождения каталитических субъединиц необходимо связывание с регуляторными субъединицами тетрамера двух или более молекул циклического АМР. Это условие значительно обостряет ответ киназы на изменение концентрации циклического АМР, как обсуждалось ранее (см. рис. 15.25). В клетках млекопитающих содержится по крайней мере два типа РКА: тип I локализован в основном в цитозоле, а тип II связан через регуляторные субъединицы со специальными якорными белками плазматической мембраны, ядерной оболочки, внешней мембраны митохондрий и микротрубочками. Каталитические субъединицы обоих типов после высвобождения и активации способны мигрировать в ядро (где они могут фосфорилировать белки-регуляторы генов), тогда как регуляторные субъединицы остаются в цитоплазме. Трехмерная структура протеинкиназного домена каталитической субъединицы РКА представлена на рис. 3.65.

другие требуют изменения транскрипции определенных генов, и для их полного протекания необходимы часы. Например, в клетках, секретирующих пептидный гормон *соматостатин*, циклический АМР активирует ген, кодирующий этот гормон. Регуляторный участок гена соматостатина содержит короткую последовательность ДНК, носящую название *циклический АМР-чувствительный элемент* (*Cyclic AMP Response Element, CRE*). CRE встречается и во многих других генах, активируемых циклическим АМР. Специфический белок-регулятор гена, носящий название **CRE-связывающего (CRE-Binding, CREB) белка**, узнает эту последовательность. Когда РКА активируется сАМР, она фосфорилирует CREB по одному серину; фосфорилированный CREB затем рекрутирует коактиватор транскрипции *CREB-связывающий белок* (*CRE-Binding Protein, CBP*), который стимулирует транскрипцию генов-мишеней (рис. 15.36). Таким образом, CREB может преобразовать короткий сигнал циклического АМР в долговременные изменения в клетке. Этот процесс, по-видимому, является важной частью некоторых форм обучения и памяти.

РКА опосредует не все механизмы действия циклического АМР в клетках. Как мы обсудим позже, в обонятельных нейронах циклический АМР также напрямую активирует специальные ионные каналы в плазматической мембране. Более того, в некоторых других клетках он напрямую активирует фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), который, в свою очередь, активирует мономерную GTPазу

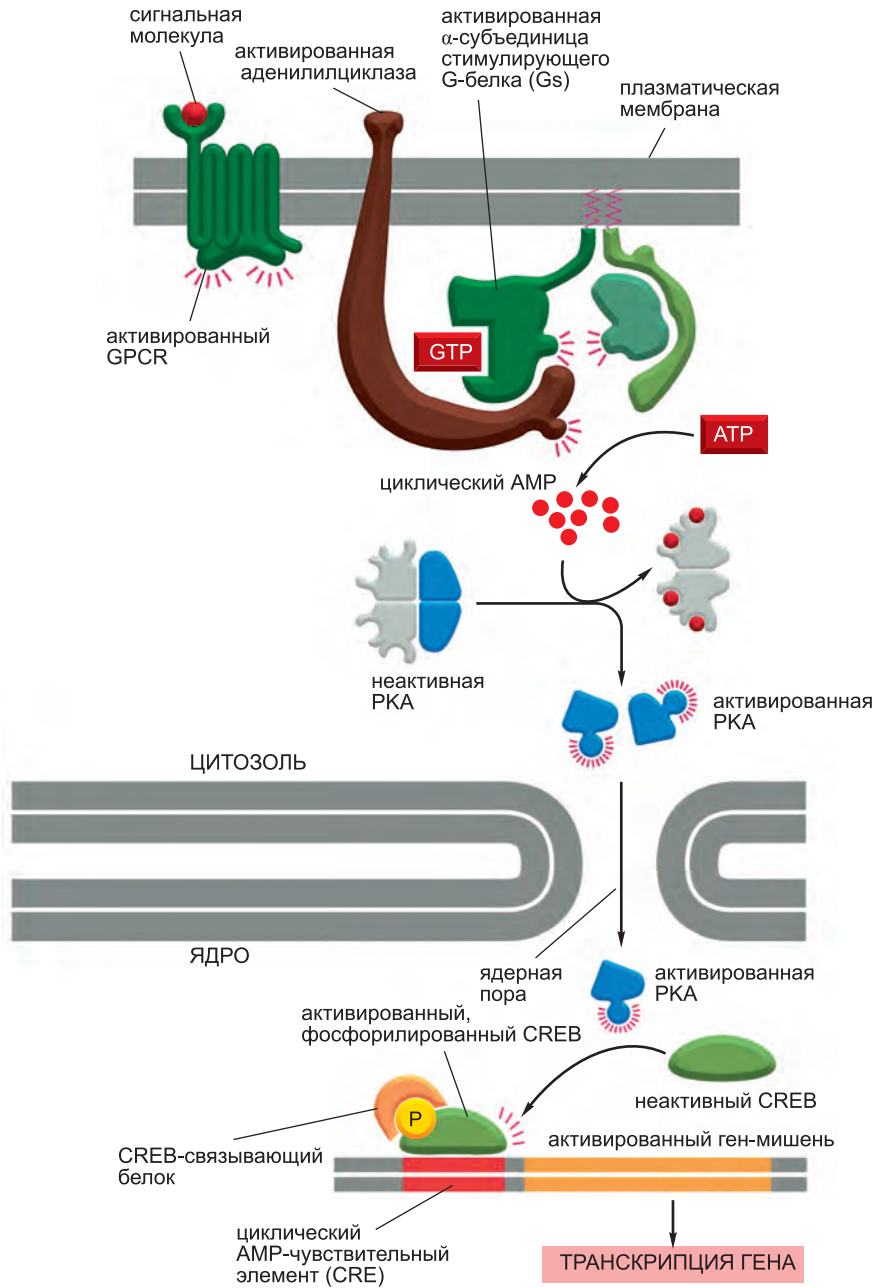


Рис. 15.36. Как увеличение внутриклеточной концентрации циклического AMP может изменять транскрипцию генов. Связывание внеклеточной сигнальной молекулы с GPCR посредством G_s активирует аденилициклазу и, следовательно, увеличивает концентрацию циклического AMP в цитозоле. Увеличение концентрации циклического AMP активирует PKA, после чего высвобожденные каталитические субъединицы PKA могут войти в ядро, где они фосфорилируют белок-регулятор генов CREB. Фосфорилированный CREB рекрутирует коактиватор CBP, который стимулирует транскрипцию генов. По крайней мере в некоторых случаях неактивный белок CREB до фосфорилирования связан с cAMP-чувствительным элементом (CRE) ДНК (не показано).

Rap1, что часто приводит к повышенной адгезии клеток за счет активации расположенных на поверхности клетки *интегринов* (см. главу 19).

Мы рассмотрели, как тримерные G-белки связывают активированные GPCR с аденилициклазой. Теперь же мы обсудим, как они сопрягают активированные GPCR с другим очень важным ферментом — *фосфолипазой C*. Активация этого фермента увеличивает концентрацию нескольких малых внутриклеточных медиаторов, включая Ca^{2+} , которые помогают передавать сигнал дальше. Ca^{2+} более распространен в качестве малого внутриклеточного медиатора, чем циклический AMP.

Данный сигнальный путь контролирует многие процессы в клетке, начиная от синтеза гормонов эндокринными клетками и заканчивая синтезом белков, необходимых для запуска процессов долговременной памяти в мозге. Позже мы увидим, что CREB может быть активирован некоторыми другими сигнальными путями, независимыми от cAMP.

15.2.4. Некоторые G-белки за счет активации фосфолипазы C активируют инозитолфосфолипидный сигнальный путь

Действие большого числа GPCR опосредуется G-белками, активирующими связанный с плазматической мембраной фермент **фосфолипазу C- β** (Phospholipase C- β , PLC β). В **таблице 15.2** перечислены некоторые примеры ответов, активируемых таким образом. Фосфолипаза воздействует на фосфорилированный инозитолфосфолипид (фосфоинозитид), носящий название **фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат** [**PI(4,5)P₂**, или **PIP₂**]. PIP₂ присутствует в небольшом количестве во внутренней половине липидного бислоя плазматической мембраны (**рис. 15.37**). Рецепторы, активирующие **инозитолфосфолипидный сигнальный путь**, обычно действуют посредством G-белка **G_q**, активирующего фосфолипазу C- β почти так же, как G_s активирует аденилициклазу. Активированная фосфолипаза затем расщепляет PIP₂ с образованием двух продуктов: **инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP₃)** и **диацилглицерина** (**рис. 15.38**). На этом этапе сигнальный путь расщепляется на две ветви.

Инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP₃) — это водорастворимая молекула, играющая роль малого внутриклеточного медиатора. Она покидает плазматическую мембрану и быстро диффундирует по цитозолю. Она достигает эндоплазматического ретикулула (ЭР) и связывается с расположенными в его мембране **IP₃-управляемыми Ca²⁺-каналами** (также называемыми **IP₃-рецепторами**), открывая их. Депонированный в ЭР Ca²⁺ высвобождается через открытые каналы, что приводит к быстрому увеличению концентрации Ca²⁺ в цитозоле (**рис. 15.39**). После истощения депо Ca²⁺ в ЭР, они заново заполняются за счет активации **депо-управляемых Ca²⁺-каналов** в плазматической мембране и белка-сенсора Ca²⁺ в мембране ЭР в областях, где две мембраны расположены близко друг к другу.

Таблица 15.2. Некоторые ответы клеток, при которых GPCR активирует PLC β

Ткань-мишень	Сигнальная молекула	Основной ответ
Печень	вазопрессин	расщепление гликогена
Поджелудочная железа	ацетилхолин	секреция амилазы
Гладкие мышцы	ацетилхолин	сокращение мышц
Тромбоциты	тромбин	агрегация тромбоцитов

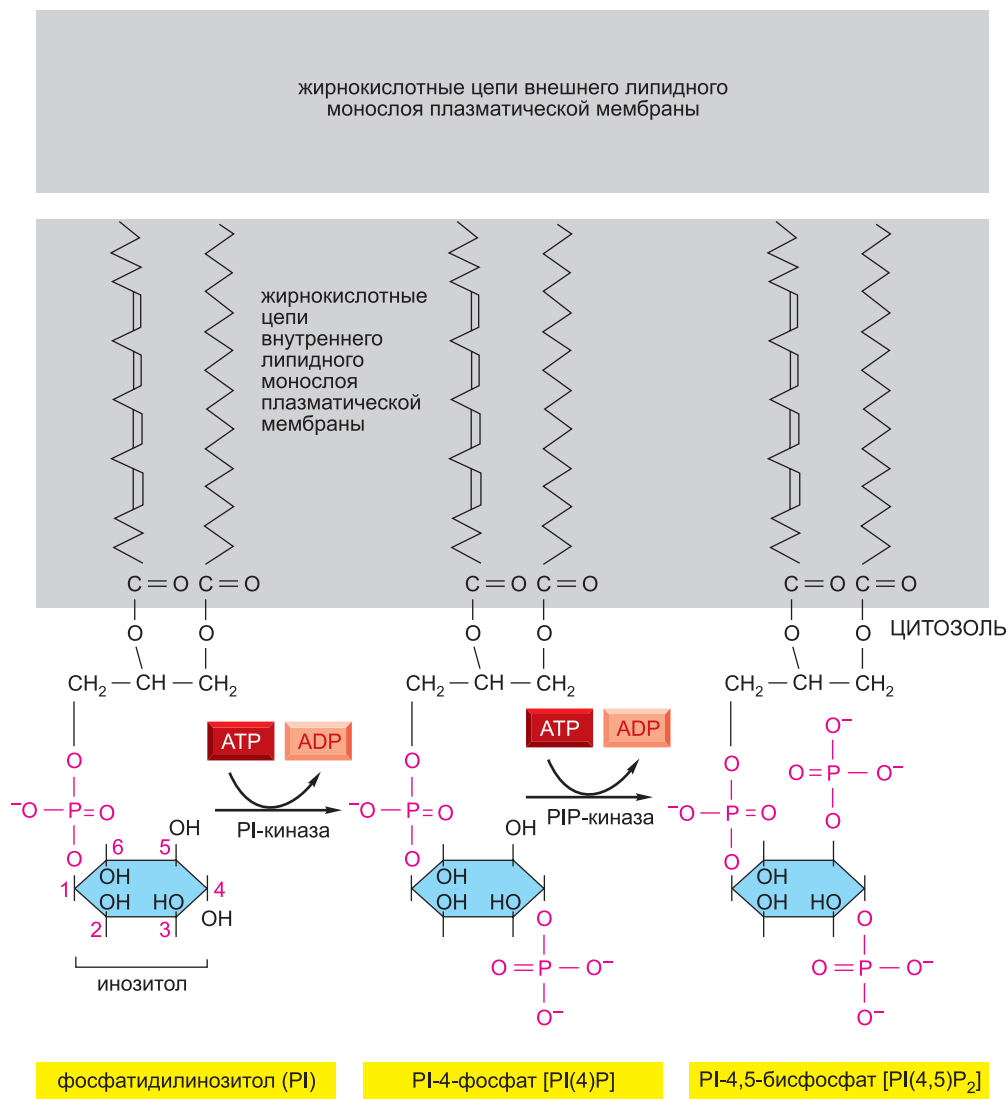


Рис. 15.37. Синтез PI(4,5)P₂. Фосфоинозитиды PI(4)P и PI(4,5)P₂ образуются в результате фосфорилирования фосфатидилинозитола и PI(4)P соответственно. Несмотря на то что при ответе клетки все три инозитолфосфолипиды могут быть разрушены, преобладает и играет самую важную роль расщепление PI(4,5)P₂, поскольку в результате него образуется два внутриклеточных медиатора (см. рис. 15.38 и 15.39). Однако PI(4,5)P₂ в клетке меньше всего: его концентрация составляет всего 10 % от общей концентрации инозитолфосфолипидов и около 1 % — от липидов плазматической мембраны. Традиционная нумерация атомов углерода инозитольного кольца показана *красным* на молекуле PI.

Позже мы обсудим, как увеличение концентрации цитоплазматического Ca²⁺ приводит к распространению сигнала, опосредованного активностью Ca²⁺-чувствительных внутриклеточных белков. Существует несколько механизмов, направленных на завершение исходного кальциевого ответа: (1) IP₃ быстро дефосфорилируется специфическими липидфосфатазами с образованием IP₂; (2)

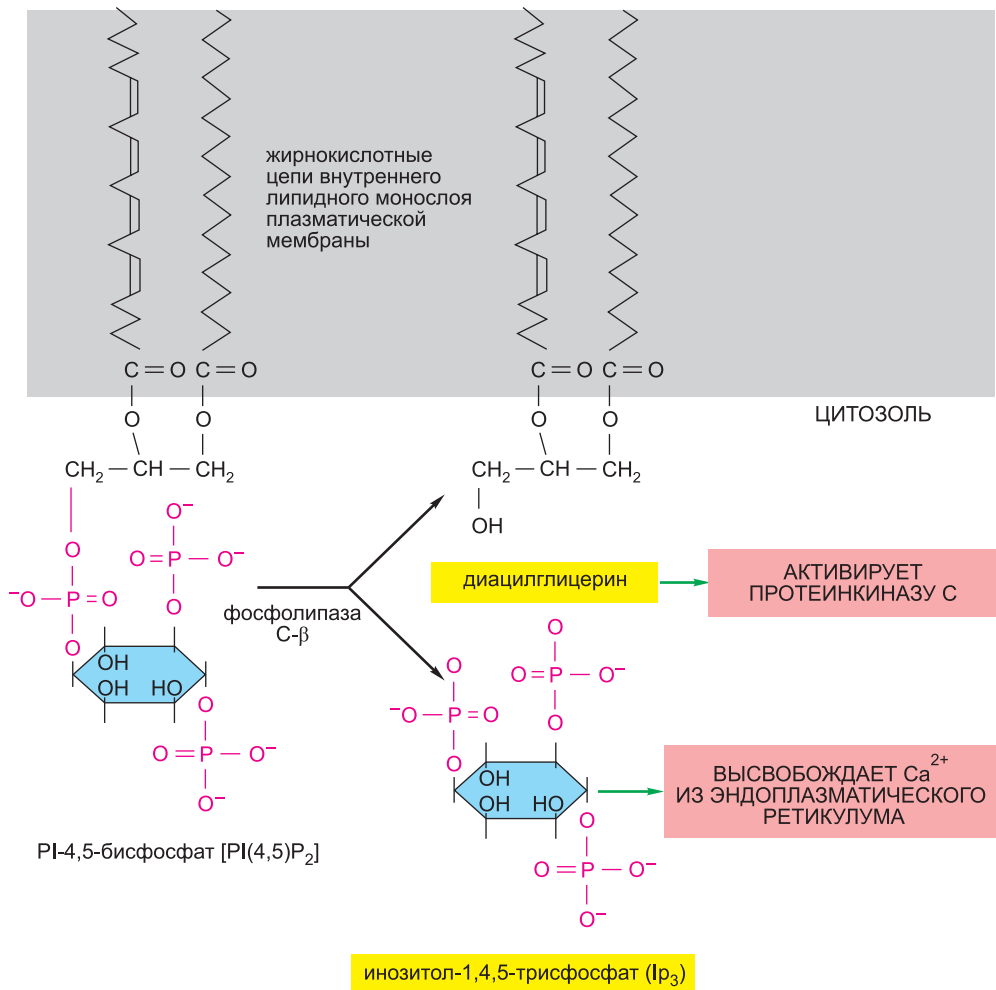


Рис. 15.38. Гидролиз PI(4,5)P₂ фосфолипазой C- β . В результате гидролиза PIP₂ образуется два малых внутриклеточных медиатора: инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP₃), который диффундирует по цитозолю и высвобождает Ca²⁺ из ЭР, и диацилглицерин, который остается в мембране и способствует активации протеинкиназы C (PKC, см. рис. 15.39). Существует несколько классов фосфолипаз C; в том числе β -класс, активируемый GPCR; позже мы увидим, что γ -класс активируется сопряженными с ферментами рецепторами, носящими название тирозинкиназных рецепторов (RTK).

IP₃ фосфорилируется специфическими липидкиназами с образованием IP₄ (который также может служить малым внутриклеточным медиатором); (3) входящий в цитозоль Ca²⁺ быстро откачивается, в основном во внеклеточное пространство (см. рис. 15.41).

Одновременно с увеличением концентрации Ca²⁺ в цитозоле за счет действия образованного в результате гидролиза PIP₂ IP₃, второй продукт расщепления PIP₂, **диацилглицерин**, тоже начинает действовать на клетку. Диацилглицерин также представляет собой малый внутриклеточный медиатор, но он остается в плазматической мембране, где потенциально способен выполнять несколько сигнальных ролей. Он

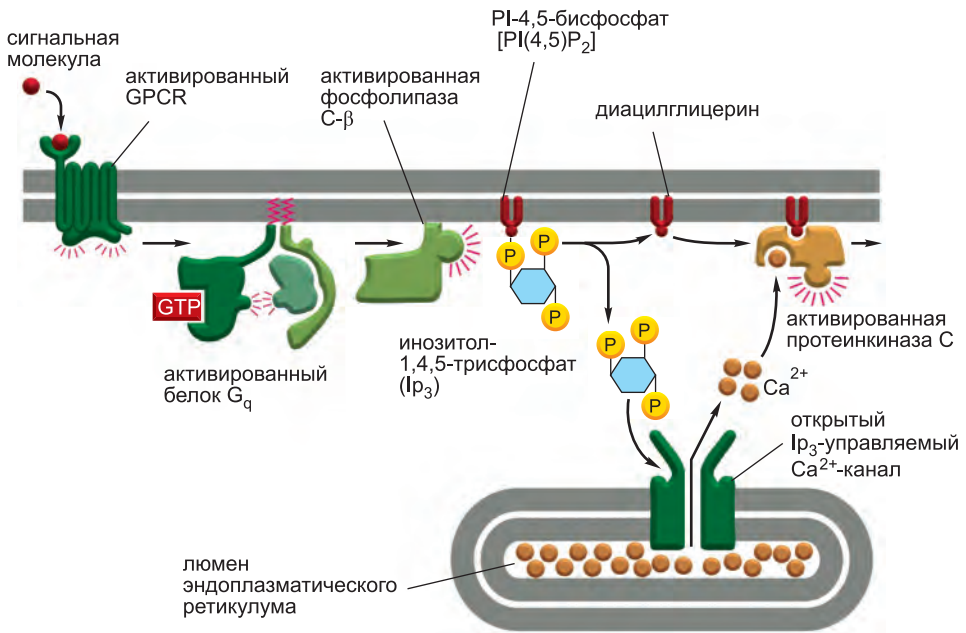


Рис. 15.39. Как GPCR увеличивают концентрацию Ca²⁺ в цитозоле и активируют PKC. Активированный GPCR посредством G-белка стимулирует связанную с плазматической мембраной фосфолипазу PLCβ. В зависимости от изоформы PLCβ может быть активирована α-субъединицей G_q, как показано, βγ-комплексом другого G-белка или тем и другим. При гидролизе PI(4,5)P₂ активированной PLCβ образуется две малые внутриклеточные мессенджерные молекулы. Инозитол-1,4,5-трисфосфат (IP₃) диффундирует по цитозолу и высвобождает Ca²⁺ из ЭР за счет связывания и открывания IP₃-управляемых Ca²⁺-каналов (IP₃-рецепторов) в мембране ЭР. Большой электрохимический градиент Ca²⁺ через эту мембрану приводит к выходу Ca²⁺ в цитозоль через открытые каналы. Диацилглицерин остается в плазматической мембране и вместе с фосфатидилсерином (не показан) и Ca²⁺ способствует активации протеинкиназы C (PKC), которая рекрутируется из цитозоля к цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. Из 10 или более различных изоформ PKC человека по крайней мере 4 активируются диацилглицерином.

может быть расщеплен с высвобождением арахидоновой кислоты, которая сама по себе может служить сигнальной молекулой или может быть использована для синтеза других малых липидных сигнальных молекул — *эйкозаноидов*. Большинство типов клеток позвоночных синтезирует эйкозаноиды. К эйкозаноидам относятся *простагландины*, выполняющие множество биологических функций. Например, они участвуют в болевом и воспалительном ответах, и действие большинства противовоспалительных лекарств (например, аспирин, ибупрофен и кортизон) основывается, по крайней мере частично, на ингибировании их синтеза.

Второй функцией диацилглицерина является активация важной серинтреониновой протеинкиназы, которая, поскольку она зависима от Ca²⁺, носит название **протеинкиназы C** (Protein Kinase C, **PKC**). Начальное вызванное IP₃ повышение концентрации Ca²⁺ в цитозоле влияет на PKC таким образом, что она переносится из цитозоля на цитоплазматическую поверхность плазматической мембраны. Там она активируется сочетанием Ca²⁺, диацилглицерина и отрицательно заряженного мембранного фосфолипида фосфатидилсерина (см. рис. 15.39). Ак-

тивированная РКС фосфорилирует белки-мишени, характерные для данного типа клеток. Принципы сходны с рассмотренными выше для РКА, но большинство белков-мишеней отличается.

Существует несколько классов РКС, только некоторые из которых (носящие название *традиционных РКС*) активируются кальцием и диацилглицерином; другие классы носят название *нестандартных РКС*. Различные РКС фосфорилируют разные субстраты, что, как правило, объясняется тем, что якорные или каркасные белки удерживают их вблизи различных клеточных компартментов.

15.2.5. Ca^{2+} функционирует как универсальный внутриклеточный медиатор

Многие внеклеточные сигналы, не только действующие посредством G-белков, запускают увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} . В яйцеклетках, например, внезапное увеличение концентрации цитоплазматического Ca^{2+} при оплодотворении сперматозоидом запускает волну Ca^{2+} , инициирующую эмбриональное развитие (рис. 15.40). В мышечных клетках Ca^{2+} запускает сокращение, а во многих секреторных клетках, включая нервные, — секрецию. Такое действие Ca^{2+} объясняется тем, что в норме его концентрация в цитозоле очень мала ($\sim 10^{-7}$ М), тогда как во внеклеточной жидкости и люмене ЭР [и саркоплазматическом ретикулуме (СР) мышц] велика (около 10^{-3} М). Таким образом, существует большой градиент, стремящийся перенести Ca^{2+} в цитозоль как через плазматическую мембрану, так и через мембраны ЭР и СР. Когда сигнал временно открывает Ca^{2+} -каналы этих мембран, Ca^{2+} устремляется в цитозоль, увеличивая локальную концентрацию иона в 10–20 раз и активируя Ca^{2+} -чувствительные белки клетки.

Ca^{2+} снаружи клетки входит в цитозоль через различные Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, которые открываются в ответ на связывание лиганда, растяжение или деполяризацию мембраны. Ca^{2+} ЭР входит в цитозоль через IP_3 -рецепторы (см. рис. 15.39) или **рианодиновые рецепторы** (название связано с тем, что они

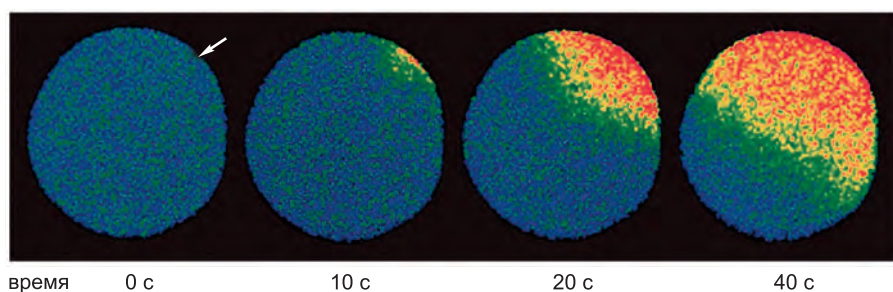


Рис. 15.40. Оплодотворение яйцеклетки сперматозоидом приводит к повышению концентрации цитоплазматического Ca^{2+} . В яйцеклетку морской звезды до оплодотворения ввели Ca^{2+} -чувствительный флуоресцентный краситель. Волна цитоплазматического Ca^{2+} (красная), высвобождаемого из ЭР, распространяется по яйцеклетке от места входа сперматозоида (стрелка). Эта волна Ca^{2+} изменяет поверхность яйцеклетки, препятствуя входу другого сперматозоида, а также инициирует эмбриональное развитие (см. главу 21). Считают, что начальное увеличение концентрации Ca^{2+} вызывается сперматозоид-специфической PLC (PLC ζ), которая вносится в цитоплазму яйцеклетки сперматозоидом при слиянии; PLC ζ расщепляет $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ с образованием IP_3 , который высвобождает Ca^{2+} из ЭР яйцеклетки. (С любезного разрешения A. Stricker.)

чувствительны к растительному алкалоиду рианодину). Рианодиновые рецепторы в норме активируются связыванием Ca^{2+} и, таким образом, усиливают сигнал. Ca^{2+} также активирует IP_3 -рецепторы, но только в присутствии IP_3 ; очень высокие концентрации Ca^{2+} эти рецепторы инактивируют. В главе 16 мы обсудим, как высвобождение Ca^{2+} из саркоплазматического ретикулума вызывает сокращение.

Существует несколько механизмов, поддерживающих низкую концентрацию Ca^{2+} в цитозоле покоящихся клеток (рис. 15.41). Плазматическая мембрана всех эукариотических клеток несет Ca^{2+} -насос, использующий энергию гидролиза АТФ для откачки Ca^{2+} из цитозоля. Такие клетки, как мышечные и нервные, интенсивно использующие кальциевую сигнализацию, несут в своей плазматической мембране дополнительный транспортный белок Ca^{2+} (Na^+ -зависимый Ca^{2+} -обменник), сопрягающий выходящий ток Ca^{2+} с входящим током Na^+ . Ca^{2+} -насос в мембране ЭР также играет важную роль в поддержании низкой концентрации цитоплазматического Ca^{2+} : он позволяет ЭР захватывать из цитозоля большое количество Ca^{2+} против крутого концентрационного градиента, даже когда уровень иона в цитозоле низок. Более того, расположенный во внутренней митохондриальной мембране высокопроизводительный Ca^{2+} -насос также играет важную роль в ограничении и завершении Ca^{2+} ответа; он использует электрохимический градиент, созданный на мембране в результате электрон-транспортных этапов окислительного фосфорилирования, для захвата Ca^{2+} из цитозоля. Увеличение концентрации Ca^{2+} в митохондриях может активировать некоторые ферменты цикла лимонной кислоты, усиливая таким образом синтез АТФ и связывая активацию клеток с производством энергии; однако избыточное увеличение концентрации Ca^{2+} в митохондриях ведет к клеточной смерти.

15.2.6. Частота колебаний Ca^{2+} влияет на ответ клетки

Исследователи часто используют Ca^{2+} -чувствительные флуоресцентные индикаторы, например *экворин* и *фуру-2* (см. главу 9), для наблюдения за цитоплазматическим Ca^{2+} после активации в клетках инозитолфосфолипидного пути. При такого рода наблюдениях сигнал Ca^{2+} сначала слабый и локализован в одной или нескольких областях клетки. Таким образом, всплески Ca^{2+} отражают локальное открывание в ЭР отдельных Ca^{2+} -каналов или их небольших групп. Поскольку различные Ca^{2+} -связывающие белки служат буфером Ca^{2+} и ограничивают диффузию Ca^{2+} , сигнал часто остается локализованным в месте входа Ca^{2+} в цитозоль. Однако, если внеклеточный сигнал достаточно силен и продолжителен, этот локальный сигнал Ca^{2+} может распространяться по цитозолю как самоподдерживающаяся волна Ca^{2+} (см. рис. 15.40), во многом напоминающая потенциал действия в аксоне. За такими всплесками концентрации Ca^{2+} часто следуют следующие всплески, длящиеся обычно несколько секунд (рис. 15.42). Колебания Ca^{2+} могут продолжаться столько времени, сколько рецепторы на поверхности клетки остаются активированными. Считают, что, по крайней мере частично, волны и колебания зависят от сочетания положительных и отрицательных обратных связей между кальцием и IP_3 -рецепторами и рианодиновыми рецепторами: высвобождаемый Ca^{2+} сначала стимулирует дальнейшее выделение Ca^{2+} обоими рецепторами в процессе, носящем название *Ca^{2+} -индуцированного высвобождения кальция*; но затем, как только его концентрация становится высокой, Ca^{2+} ингибирует высвобождение, и такая отрицательная обратная связь с задержкой приводит к колебаниям (см. рис. 15.28, г).

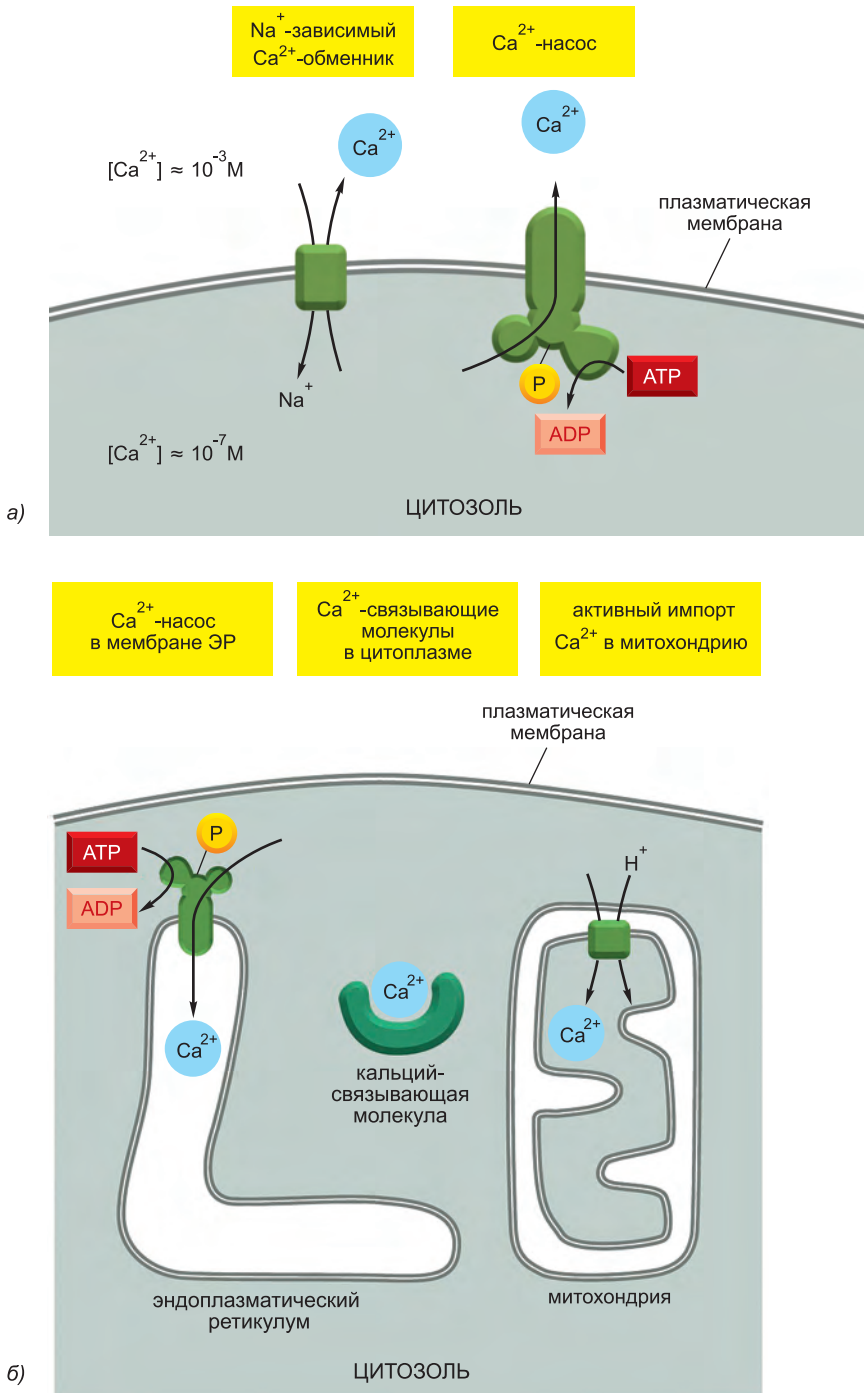


Рис. 15.41. Основные пути поддержания низкой концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле эукариотических клеток. (а) Ca^{2+} активно откачивается из цитозоля во внеклеточное пространство. (б) Ca^{2+} откачивается из цитозоля в ЭР и митохондрии, и различные молекулы цитозоля крепко связывают Ca^{2+} .

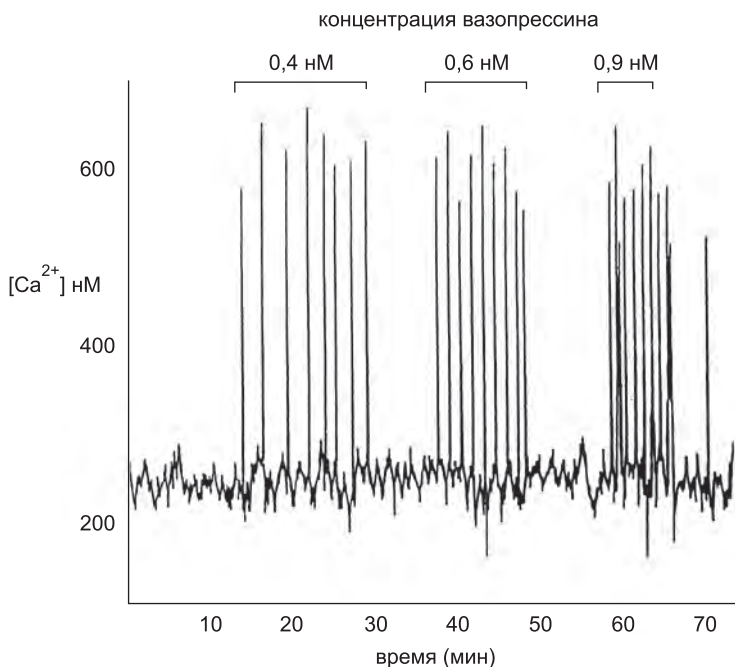


Рис. 15.42. Вызванные вазопрессином колебания Ca^{2+} в клетке печени. В клетку ввели Ca^{2+} -чувствительный белок экворин и подействовали на нее разными концентрациями пептидной сигнальной молекулы вазопрессина, активирующего GPCR и, следовательно, PLC β (см. таблицу 15.2). Обратите внимание, что частота пиков Ca^{2+} возрастает с увеличением концентрации вазопрессина, но амплитуда не меняется. Продолжительность каждого всплеска составляет около 7 секунд. (Адаптировано из N. M. Woods, K. S. R. Cuthbertson and P. H. Cobbold, *Nature* 319: 600–602, 1986. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

За колебаниями кальция на специфических Ca^{2+} -чувствительных белках можно наблюдать в реальном времени при помощи методов визуализации целых клеток, экспрессирующих флуоресцентные репортерные белки. Например, можно показать, что при ответах на некоторые сигналы при каждом пике кальция РКС рекрутируется к плазматической мембране, где она временно фосфорилирует репортерный белок.

Частота колебаний Ca^{2+} отражает силу внеклеточного стимула (см. рис. 15.42) и может быть преобразована в частотозависимый клеточный ответ. В некоторых случаях частотозависимый ответ сам по себе является колебательным: в секретирующих гормоны клетках гипофиза, например, стимуляция внеклеточным сигналом приводит к регулярным всплескам Ca^{2+} , каждый из которых соответствует секреции гормона. В других случаях частотозависимый ответ не является колебательным: в некоторых типах клеток, например, одна частота пиков Ca^{2+} активирует транскрипцию одного набора генов, а большая частота — другого. Как клетки чувствуют частоту колебаний Ca^{2+} и подстраивают под нее свой ответ? Предположительно, механизм зависит от Ca^{2+} -чувствительных белков, изменяющих свою активность в зависимости от частоты пиков Ca^{2+} . По-видимому, таким удивительным свойством обладает протеинкиназа, служащая молекулярным устройством памяти.

15.2.7. Ca^{2+} /кальмодулин-зависимые протеинкиназы (CaM-киназы) опосредуют многие ответы животных клеток на сигналы Ca^{2+}

Разнообразные Ca^{2+} -зависимые белки способствуют передаче цитоплазматического сигнала Ca^{2+} . Самым важным из них является **кальмодулин**, содержащийся во всех эукариотических клетках и составляющий до 1% всей массы белка. Кальмодулин служит многофункциональным внутриклеточным рецептором Ca^{2+} , управляющим многими регулируемым кальцием процессами. Он представляет собой высококонсервативную полипептидную цепь, четыре активных сайта которой с высоким сродством связывают Ca^{2+} (рис. 15.43, а). При активации, вызванной связыванием Ca^{2+} , кальмодулин претерпевает конформационные изменения. Поскольку для принятия активной конформации белок должен связать два или более ионов кальция, он реагирует на увеличение концентрации Ca^{2+} по переключательному механизму (см. рис. 15.25): десятикратное увеличение концентрации Ca^{2+} обычно приводит к пятидесятикратному увеличению активности кальмодулина.

Аллостерическая активация кальмодулина кальцием аналогична аллостерической активации РКА циклическим АМР, за исключением того, что Ca^{2+} /кальмоду-

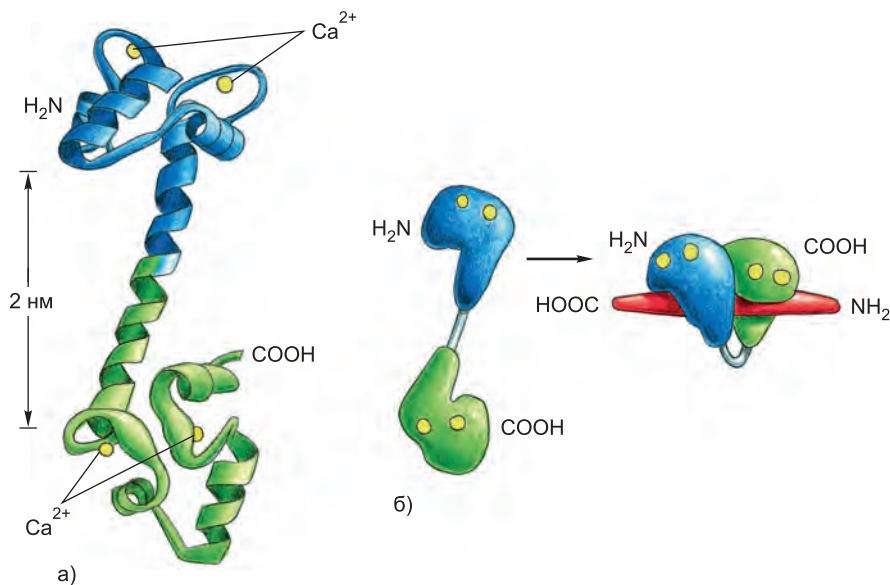


Рис. 15.43. Структура Ca^{2+} /кальмодулина, основанная на исследованиях методами рентгеновской дифракции и ЯМР. (а) Молекула имеет гантелевидную форму с двумя глобулярными концами, связывающимися с белками-мишенями. Глобулярные участки соединены длинной α -спиралью, позволяющей белку принимать различные конформации в зависимости от того, с каким белком-мишенью он взаимодействует. Глобулярные участки несут по два Ca^{2+} -связывающих домена. (б) Структурная перестройка Ca^{2+} /кальмодулина при связывании с белком-мишенью (в данном случае с пептидом, представляющим собой Ca^{2+} /кальмодулин-связывающий домен Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы). Обратите внимание, что Ca^{2+} /кальмодулин сложился вдвое и окружил белок. При связывании других мишеней он может принимать другие конформации. (а, на основе данных рентгеновской кристаллографии из Y. S. Babu et al., *Nature* 315: 37–40, 1985. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.; б, на основе данных рентгеновской кристаллографии из W. E. Meador, A. R. Means and F. A. Quiocho, *Science* 257: 1251–1255, 1992, и данных ЯМР из M. Ikura et al., *Science* 256: 632–638, 1992. С любезного разрешения издательства AAAS.)

лин сам по себе не обладает ферментативной активностью — он действует за счет связывания и активации других белков. В некоторых случаях кальмодулин служит постоянной регуляторной субъединицей ферментного комплекса, но обычно связывание Ca^{2+} позволяет кальмодулину связываться с различными белками-мишенями клетки и изменять их активность.

Когда активированная молекула Ca^{2+} /кальмодулина связывается с белком-мишенью, конформация кальмодулина опять изменяется в зависимости от конкретного белка-мишени (см. рис. 15.43, б). Среди мишеней кальмодулина можно выделить ферменты и мембранные транспортные белки. Например, Ca^{2+} /кальмодулин связывает и активирует Ca^{2+} -насос плазматической мембраны, использующий энергию гидролиза АТФ для откачки кальция из клетки (см. рис. 15.41). Таким образом, при увеличении концентрации Ca^{2+} в цитозоле активируется насос, способствующий возвращению концентрации цитоплазматического Ca^{2+} к уровню в покое.

Однако механизм действия Ca^{2+} может быть менее прямым и опосредоваться фосфорилированием белков, катализируемым семейством серин-треониновых протеинкиназ, носящих название **Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых киназ (СаМ-киназ)**. Некоторые СаМ-киназы фосфорилируют белки-регуляторы генов, например белок CREB (см. рис. 15.36), и таким образом активируют или ингибируют транскрипцию определенных генов.

Одной из наиболее изученных СаМ-киназ является СаМ-киназа II, которая встречается во всех животных клетках, но особенно много ее содержится в нервной системе. В некоторых областях мозга она составляет до 2% всей массы белка, и ее очень много в синапсах. У СаМ-киназы II есть два очень важных свойства, связанных между собой. Во-первых, она может служить молекулярным устройством памяти, т.е. она активируется под действием Ca^{2+} /кальмодулина и может оставаться активной даже после затухания кальциевого сигнала. Этот эффект объясняется тем, что киназа фосфорилирует сама себя (этот процесс называется *автофосфорилированием*) и другие белки при активации Ca^{2+} /кальмодулином. В автофосфорилированном состоянии фермент сохраняет активность даже в отсутствие Ca^{2+} , что увеличивает продолжительность киназной активности после исходного активирующего кальциевого сигнала. Фермент сохраняет активность до тех пор, пока серин-треониновые протеинфосфатазы не дефосфорилируют белок и не подавят его активность (рис. 15.44). Активация СаМ-киназы II, таким образом, является памятью о прошедшем всплеске Ca^{2+} . По-видимому, этот процесс играет роль в некоторых типах памяти и обучения в нервной системе позвоночных. У мутантных мышей, у которых отсутствует специфичная для мозга форма фермента, наблюдаются дефекты способности запоминать расположение предметов.

Второе удивительное свойство СаМ-киназы II вытекает из первого: фермент способен использовать свой внутренний механизм запоминания для расшифровки частоты колебаний Ca^{2+} . Считают, что это свойство особенно важно для синапсов нервных клеток, где изменения внутриклеточного уровня Ca^{2+} в постсинаптической клетке в результате нервной активности могут привести к долговременным изменениям последующей эффективности синапса (см. главу 11). Если СаМ-киназу II иммобилизовать на твердой подложке и подвергнуть с разной частотой действию протеинфосфатазы и регулярным всплескам Ca^{2+} /кальмодулина, имитирующим процессы в реальной клетке, зависимость активности фермента от частоты всплесков будет монотонно возрастающей (рис. 15.45). Более того, частота ответа мульти-субъединичного фермента зависит от его субъединичного состава, что позволяет

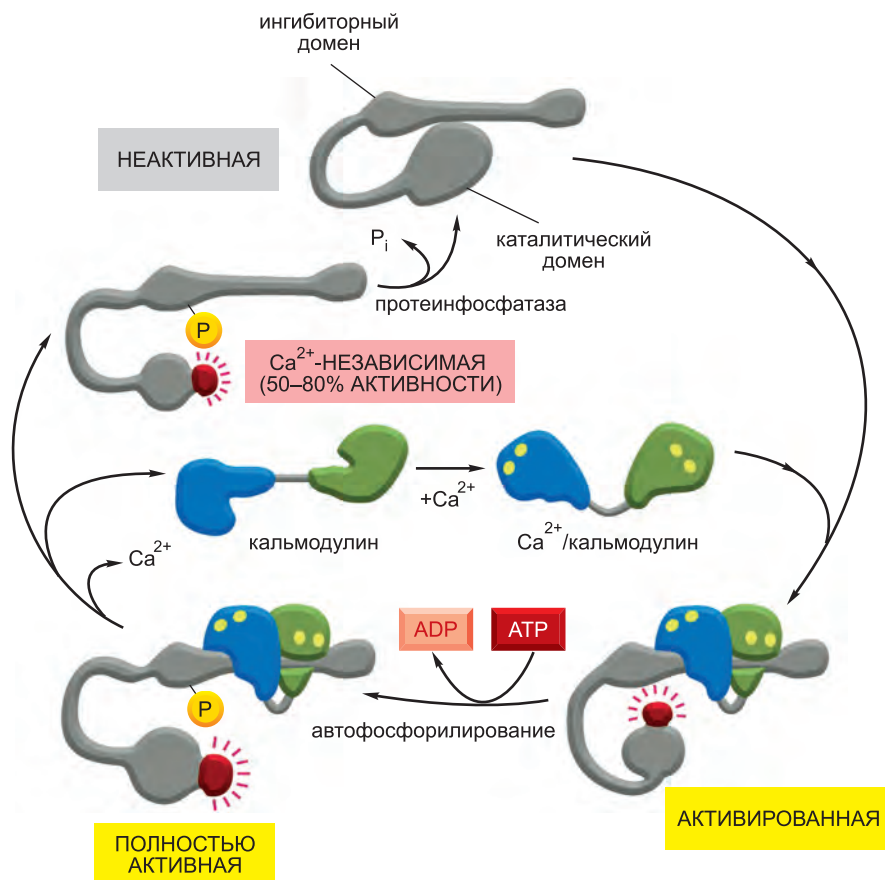


Рис. 15.44. Ступенчатая активация СаМ-киназы II. Фермент представляет собой крупный белковый комплекс, состоящий из 12 субъединиц, но для наглядности показана только одна (*серая*). В отсутствие Ca^{2+} /кальмодулина фермент неактивен за счет взаимодействия между ингибиторным и каталитическим доменами. Связывание Ca^{2+} /кальмодулина изменяет конформацию белка и частично его активирует. Каталитические домены комплекса фосфорилируют ингибиторные домены, а также другие белки клетки (не показано). Автофосфорилирование ферментного комплекса (за счет взаимного фосфорилирования его субъединиц) полностью активирует фермент, а также по двум механизмам продлевает его активность. Во-первых, за счет автофосфорилирования Ca^{2+} /кальмодулин удерживается до тех пор, пока концентрация цитоплазматического Ca^{2+} не вернется на исходный уровень, по крайней мере на 10 секунд (не показано). Во-вторых, автофосфорилирование переводит фермент в Ca^{2+} -независимую форму, т. е. киназа остается активной даже после диссоциации от нее Ca^{2+} /кальмодулина. Активность сохраняется до тех пор, пока протеинфосфатазы не снимут автофосфорилирование.

клетке подгонять ответ на колебания Ca^{2+} под свои нужды, меняя строение синтезируемой СаМ-киназы II.

Связывание Ca^{2+} /кальмодулина с ферментом усиливается автофосфорилированием СаМ-киназы II (дополнительная форма положительной обратной связи). В результате ответ фермента на повторные пики Ca^{2+} имеет ярко выраженный пороговый характер (см. выше). (Из Р. I. Hanson, T. Meyer, L. Stryer and H. Schulman, *Neuron* 12: 943–956, 1994. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

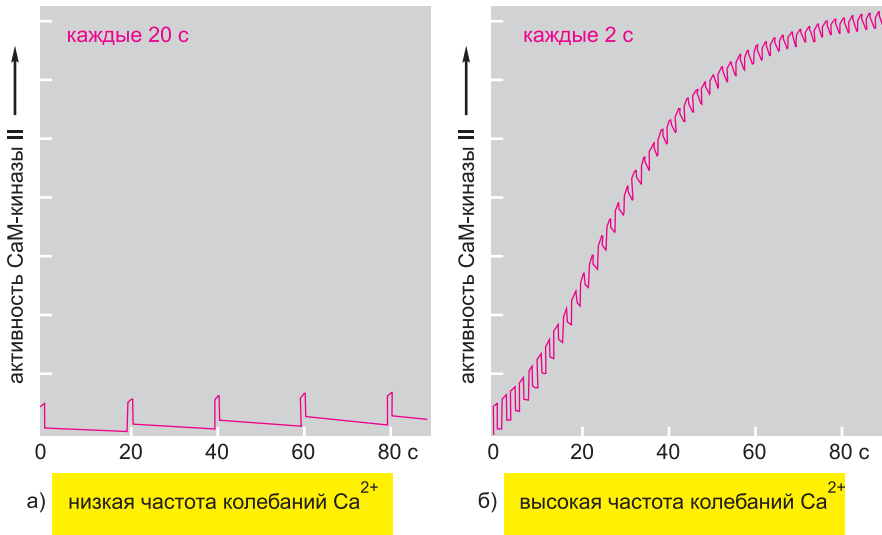


Рис. 15.45. СаМ-киназа II расшифровывает частоту колебаний Ca^{2+} . (а) При низкой частоте пиков Ca^{2+} фермент становится неактивным после каждого пика, поскольку вызванное связыванием Ca^{2+} /кальмодулина автофосфорилирование не способно поддерживать активность фермента весь промежуток времени до следующего пика. (б) Однако при более высокой частоте пиков фермент не инактивируется полностью между всплесками Ca^{2+} , и его активность возрастает с каждым следующим пиком. Если частота пиков достаточно велика, такое постепенное увеличение активности фермента будет продолжаться до тех пор, пока фермент не будет автофосфорилирован по всем субъединицам и, следовательно, полностью активирован. На рисунке не показано, но когда автофосфорилировано достаточное число субъединиц фермента, он может сохранять высокую активность при относительно низкой частоте пиков Ca^{2+} (форма клеточной памяти).

15.2.8. Некоторые G-белки напрямую регулируют ионные каналы

Действие G-белков основано не только на регуляции активности мембраносвязанных ферментов, изменяющих концентрацию циклического АМР или Ca^{2+} в цитозоле. α -субъединица одного из типов G-белков (носящего название G_{12}), например, активирует фактор обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF), который, в свою очередь, активирует регулирующий активный цитоскелет мономерную GTPазу семейства *Rho* (см. ниже и в главе 16).

В некоторых случаях G-белки напрямую активируют или инактивируют ионные каналы плазматической мембраны клетки-мишени, изменяя таким образом ионную проницаемость и, следовательно, электрическую возбудимость мембраны. Например, ацетилхолин, выделяемый блуждающим нервом, снижает частоту и силу сокращений клеток сердечной мышцы (см. рис. 15.9, б). Это действие опосредуется особым классом ацетилхолиновых рецепторов, активирующих упоминавшийся ранее G_i -белок. После активации α -субъединица G_i ингибирует аденилилизклазу (как описано выше), а γ -комплекс связывает и открывает K^+ -каналы в плазматической мембране клеток сердечной мышцы. В результате открывания K^+ -каналов клетку становится сложнее деполяризовать, следовательно, этот эффект вносит вклад в ингибирующее действие ацетилхолина на сердце. (Данные ацетилхолиновые рецепторы, активирующиеся также грибным алкалоидом мускарином, называются *мускариновыми ацетилхолиновыми рецепторами*, что отличает их от *никотиновых*

ацетилхолиновых рецепторов — сопряженных с ионными каналами рецепторов скелетных мышц и нервных клеток, активирующихся в результате связывания никотина и ацетилхолина.)

Другие G-белки регулируют активность ионных каналов косвенно за счет стимуляции фосфорилирования каналов (ферментами РКА, РКС и СаМ-киназой, например) или за счет активации синтеза или разрушения циклических нуклеотидов, напрямую активирующих или инактивирующих ионные каналы. Далее мы обсудим роль таких *регулируемых циклическими нуклеотидами ионных каналов* в обонянии и зрении.

15.2.9. Зрение и обоняние зависят от GPCR, действующих на регулируемые циклическими нуклеотидами ионные каналы

Человек при помощи специализированных обонятельных нейронов, выстилающих носовые пазухи, способен различать более 10 тысяч различных запахов. Эти нейроны несут особые GPCR, носящие название **обонятельных рецепторов**; рецепторы расположены на поверхности специальных ресничек, выходящих из каждой клетки (**рис. 15.46**). Действие рецепторов опосредовано циклическим АМР. При связывании пахучего вещества они активируют специфические обонятельные G-белки (известные как G_{olf} , от англ. olfactory — обонятельный), которые, в свою очередь, активируют аденилициклазу. В результате повышение концентрации циклического АМР приводит к открыванию *циклических АМР-управляемых катионных каналов*, входу Na^+ в клетку и деполяризации обонятельного нейрона, который передает нервный импульс в мозг.

У мыши около 1000 различных обонятельных рецепторов, у человека — около 350. Каждый из рецепторов кодируется собственным геном и узнает определенный набор пахучих молекул. Обонятельные нейроны несут какой-нибудь один тип ре-

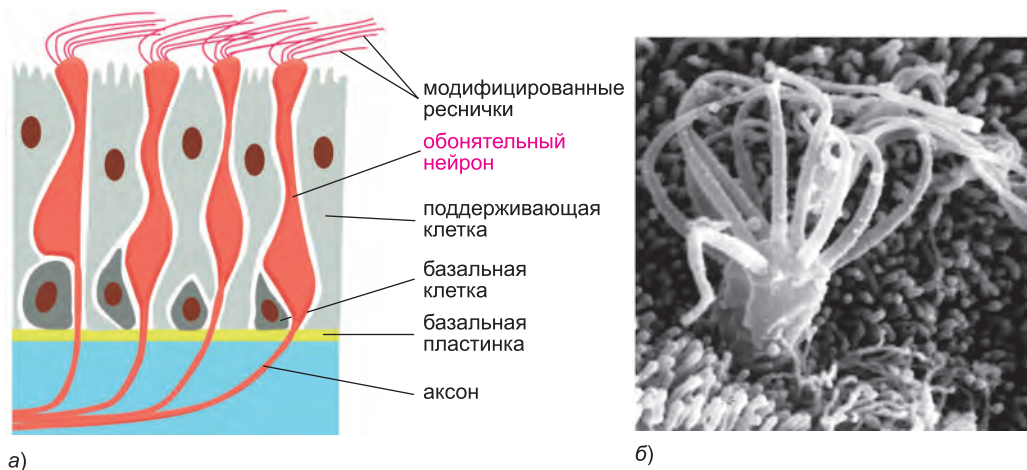


Рис. 15.46. Обонятельные сенсорные нейроны. (а) Срез обонятельного эпителия носа. Обонятельные нейроны несут модифицированные реснички, выступающие с поверхности эпителия и несущие обонятельные рецепторы и аппарат преобразования сигнала. Аксон, выходящий с противоположной стороны сенсорного нейрона, передает электрические сигналы в мозг, когда клетка активируется пахучим веществом. По крайней мере у грызунов базальные клетки являются стволовыми, на всем протяжении жизни дифференцирующимися в новые сенсорные нейроны, заменяющие погибшие. (б) Сканирующая электронная микрофотография ресничек на поверхности обонятельного нейрона. (б, из Е. Е. Morrison and R. M. Costanzo, *J. Comp. Neurol.* 297: 1–13, 1990. С любезного разрешения издательства Wiley-Liss.)

цепторов (см. **стр. 453**); нейрон отвечает на определенный набор запахов посредством своего рецептора, и каждое пахучее вещество активирует свой собственный характерный набор обонятельных нейронов. Те же самые рецепторы направляют рост аксона развивающегося нейрона в сторону нейронов мозга, с которыми он будет соединен. Другой набор GPCR сходным образом опосредует ответ на *феромоны* — химические сигналы, регистрирующиеся в другой части носа и используемые для коммуникации между представителями одного вида. Однако у людей функциональные рецепторы феромонов отсутствуют.

Зрение позвоночных основано на сходном сложном, высокочувствительном процессе регистрации сигнала. Здесь также участвуют управляемые циклическими нуклеотидами ионные каналы, но ключевым нуклеотидом является **циклический GMP** (**рис. 15.47**), а не циклический AMP. Как и в случае циклического AMP, концентрация циклического GMP в цитозоле регулируется процессами быстрого синтеза (*гуанилилциклазой*) и быстрого расщепления (*сGMP-фосфодиэстеразой*).

При ответе на зрительный сигнал, который является самым быстрым опосредованным G-белками ответом у позвоночных, активация рецепторов светом приводит к падению, а не повышению концентрации циклического нуклеотида. Лучше всего изучен сигнальный путь **фоторецепторов палочек** сетчатки позвоночных. Палочки отвечают за черно-белое зрение при слабом освещении, тогда как *фоторецепторы колбочки* отвечают за цветное зрение при ярком освещении. Фоторецепторы палочки — это высокоспециализированные клетки, состоящие из наружного и внутреннего сегментов, тела клетки и синаптической области, в которой происходит передача сигнала на нервную клетку сетчатки (**рис. 15.48**). Эти нервные клетки передают сигнал на другие нервные клетки сетчатки, которые, в свою очередь, передают сигнал в мозг (см. рис. 23.16).

Процесс фототрансдукции (преобразования света в нервные импульсы) протекает во внешнем сегменте палочек, содержащем стопки *дисков*. Диски — это замкнутые мембранные мешочки, несущие множество трансмембранных молекул фоточувствительного **родопсина**. Плазматическая мембрана, окружающая внешний сегмент, содержит *управляемые циклическим GMP катионные каналы*. Связанный с этими каналами циклический GMP не позволяет им закрываться в темноте. Как ни странно, свет вызывает гиперполяризацию (ингибирующую синаптическую передачу), а не деполяризацию (которая бы стимулировала синаптическую сигнализацию) плазматической мембраны. Гиперполяризация (т. е. мембранный потенциал принимает более отрицательные значения, см. главу 11) происходит потому, что вызванная светом активация молекул родопсина в мембране дисков снижает концентрацию циклического GMP и закрывает катионные каналы в окружающей плазматической мембране (**рис. 15.49**).

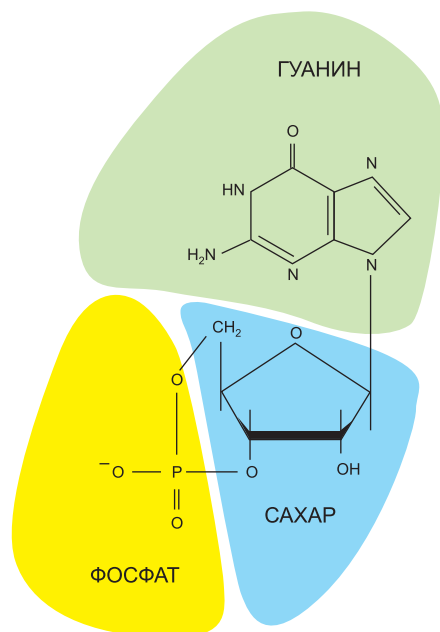
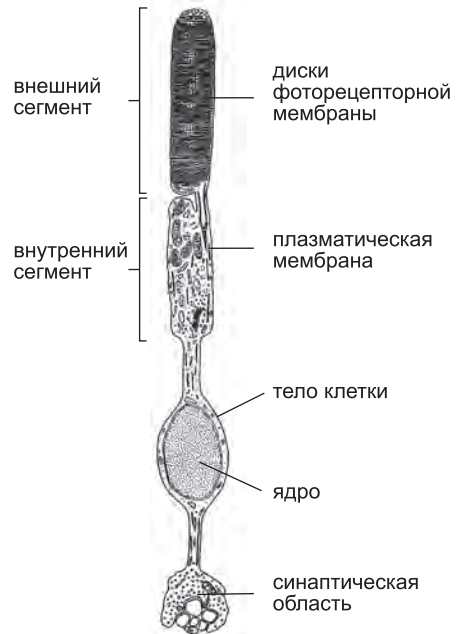


Рис. 15.47. Циклический GMP.

Рис. 15.48. Фоторецепторная клетка палочка. Во внешнем сегменте содержится около 1000 дисков. Мембраны дисков не сообщаются с плазматической мембраной. Внутренний и внешний сегменты представляют собой специализированные части первичных ресничек (см. главу 16); как упомянуто ранее, первичные реснички расположены на поверхности большинства клеток позвоночных и выполняют функцию сигнальных органелл.



Родопсин принадлежит к семейству GPCR, но в качестве активирующего внеклеточного сигнала для него служит не молекула, а фотон света. Молекулы родопсина несут ковалентно связанный хромофор — 11-*цис*-ретиноаль, который при поглощении одного фотона почти мгновенно изомеризуется в *транс*-ретиноаль. Изомеризация изменяет форму ретиноаля, что приводит к конформационной перестройке белка (опсина). Активированная молекула родопсина изменяет конформацию G-белка *транс-дуцина* (G_t), α -субъединица которого затем активирует **сGMP-фосфодиэстеразу**. Фосфодиэстераза гидролизует циклический GMP, и его концентрация в цитозоле падает. Это приводит к уменьшению количества циклического GMP, связанного с катионными каналами плазматической мембраны и, следовательно, закрыванию управляемых GMP катионных каналов. Таким образом, сигнал быстро передается от мембраны диска на плазматическую мембрану, и световой сигнал преобразуется в электрический посредством гиперполяризации плазматической мембраны палочек.

В палочках существует несколько механизмов, позволяющих клеткам быстро вернуться в покое, темное состояние после вспышки света, что необходимо для восприятия продолжительности вспышки. Родопсин-специфическая киназа, носящая название *родопсинкиназы* (*Rodopsin Kinase, RK*), фосфорилирует цитоплазматический хвост активированного родопсина по нескольким серинам, частично ингибируя способность родопсина активировать трансдуцин. Затем ингибиторный белок *аррестин* связывается с фосфорилированным родопсином, еще сильнее ингибируя его активность. У мышей и людей, несущих мутацию, инактивирующую кодирующий RK ген, наблюдается увеличение продолжительности ответа на свет, и их палочки в конце концов погибают.

Одновременно с ингибированием родопсина аррестином белок RGS (см. **стр. 896**) связывает активированный трансдуцин, вынуждая его гидролизовать связанный с ним GTP до GDP и вернуться в неактивное состояние. Более того, катионные каналы, закрывающиеся в ответ на свет, проницаемы для Ca^{2+} (а также Na^{+}), поэтому, когда они закрываются, нормальный входящий ток Ca^{2+} останавливается и концентрация Ca^{2+} в цитозоле падает. Это стимулирует гуанилилциклазу, которая начинает восстанавливать концентрацию GMP в цитозоле до уровня, который наблюдался до включения света. Специфический Ca^{2+} -чувствительный белок опосредует активацию гуанилилциклазы в ответ на падение уровня Ca^{2+} . В отличие от кальмодулина, этот белок неактивен, когда с ним связан Ca^{2+} , и активен, когда

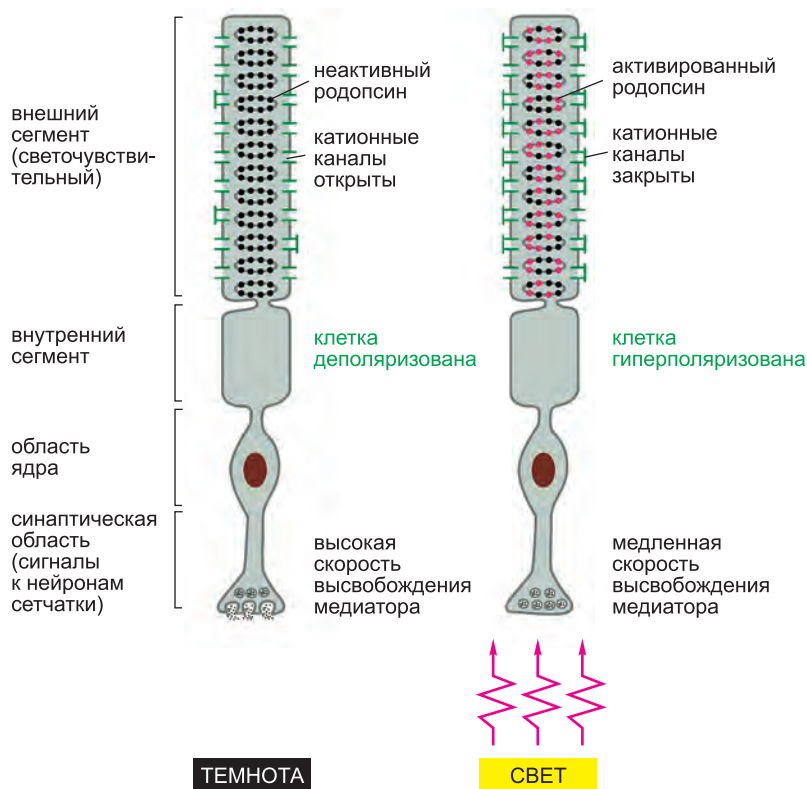


Рис. 15.49. Ответ фоторецептора палочки на свет. Молекулы родопсина в дисках внешнего сегмента поглощают свет. Поглощение фотона закрывает катионные каналы плазматической мембраны и снижает скорость высвобождения нейромедиатора в синаптической области. Поскольку нейромедиатор ингибирует многие постсинаптические нейроны сетчатки, его удаление приводит к снятию ингибирования и, следовательно, к возбуждению нейронов.

свободен от Ca^{2+} . Таким образом, он стимулирует гуанилилциклазу при падении концентрации Ca^{2+} после ответа на свет.

Механизмы отрицательных обратных связей не только возвращают палочки в состояние покоя после вспышки света, они также помогают палочкам *адаптироваться*, снижая ответ, когда палочки непрерывно подвергаются воздействию света. Адаптация, как рассматривалось выше, позволяет рецептору функционировать в качестве чувствительного детектора *изменений* интенсивности стимула в широком диапазоне базовых уровней стимуляции. Благодаря этому мы способны увидеть вспышку фотоаппарата в солнечный день.

Рассмотренные нами в этой главе G-белки являются представителями четырех крупных семейств, основные свойства которых перечислены в [таблице 15.3](#).

15.2.10. Внутриклеточные медиаторы и ферментные каскады усиливают внеклеточные сигналы

Несмотря на некоторые различия на уровне молекул, запускаемые GPCR внутриклеточные сигнальные пути обладают общими свойствами и подчиняются

Таблица 15.3. Четыре основных семейства тримерных G-белков*

Семейство	Некоторые представители семейства	Субъединицы, опосредующие активность	Некоторые функции
I	G_s	α	активирует аденилилциклазу; активирует Ca^{2+} -каналы
	G_{olf}	α	активирует аденилилциклазу в обонятельных сенсорных нейронах
II	G_i	α	ингибирует аденилилциклазу
	G_o	$\beta\gamma$	активирует K^+ -каналы
		$\beta\gamma$	активирует K^+ -каналы; инактивирует Ca^{2+} -каналы
	G_t (трансдуцин)	α и $\beta\gamma$	активирует фосфолипазу C- β
III	G_q	α	активирует сАМР-фосфодиэстеразу в фоторецепторах палочках позвоночных
	$G_{12/13}$	α	активирует фосфолипазу C- β
IV			активирует семейство Rho мономерных GTPаз (посредством Rho-GEF) для регуляции актинового цитоскелета

*Границы семейств определены по сходству аминокислотных последовательностей α -субъединиц. В таблице приведены только некоторые примеры. У человека описано около 20 α -субъединиц и по крайней мере 6 β -субъединиц и 11 γ -субъединиц.

сходным принципам. Они зависят от цепей внутриклеточных сигнальных белков и малых внутриклеточных медиаторов. В отличие от более прямых сигнальных путей, используемых рассмотренными ранее ядерными рецепторами, эти цепи передачи сигнала обладают многочисленными точками, где возможно усиление ответа на внеклеточные сигналы. Например, в каскаде зрительной передачи единственная активированная молекула родопсина катализирует активацию сотен молекул трансдуцина со скоростью примерно 1000 молекул трансдуцина в секунду. Каждая активированная молекула трансдуцина активирует одну молекулу сGMP-фосфодиэстеразы, которая гидролизует около 4000 молекул циклического GMP в секунду. Этот каталитический каскад продолжается около 1 секунды и приводит к гидролизу более 10^5 молекул циклического GMP на один поглощенный фотон света. Падение концентрации циклического GMP приводит к временному закрыванию сотен катионных каналов плазматической мембраны (рис. 15.50). В результате палочка способна отвечать даже на единственный фотон света, причем ее ответ воспроизводим как по времени, так и по величине.

Точно так же, когда внеклеточная сигнальная молекула связывает рецептор, косвенно активирующий аденилилциклазу посредством G_s , каждый рецепторный белок может активировать несколько молекул белка G_s . Молекула G_s активирует молекулу циклазы, которая может катализировать превращение множества молекул АТФ в циклический АМР. Сходное усиление происходит и в инозитолфосфолипидном пути. Таким образом, наномолярное (10^{-9} М) изменение концентрации внеклеточного сигнала может привести к микромолярным (10^{-6} М) изменениям концентрации малого внутриклеточного медиатора, например циклического АМР или Ca^{2+} . Поскольку эти медиаторы служат аллостерическими эффекторами, активирующими специфические ферменты или ионные каналы, единственная внекле-



Рис. 15.50. Усиление вызванного светом каталитического каскада в палочках позвоночных. Красными стрелками отмечены этапы, на которых происходит усиление. Толщина стрелки условно указывает на величину усиления.

точная сигнальная молекула способна изменить несколько тысяч белков клетки-мишени.

Любой каскад усиления стимулирующих сигналов требует на каждом этапе уравновешивающих механизмов для возвращения системы в состояние покоя после окончания стимуляции. Как отмечалось ранее, ответ на стимуляцию может быть быстрым только если механизмы инактивации также быстры. Поэтому у клеток есть эффективные механизмы быстрого разрушения (и повторного синтеза) циклических нуклеотидов и забуферивания и удаления цитоплазматического Ca^{2+} , а также инактивации активированных сигналом ферментов и ионных каналов. Это необходимо не только для выключения сигнала, но и для определения состояния покоя, в котором начинается ответ.

В цепи передачи сигнала регулироваться может каждый белок, включая сам рецептор, что мы сейчас и обсудим.

15.2.11. Десенсibilизация GPCR зависит от фосфорилирования рецепторов

Если клетки-мишени продолжительное время подвергаются воздействию больших концентраций стимулирующего лиганда, они могут стать *десенсibilизированными*, или, иными словами, *адаптироваться*. Для этого существует несколько механизмов. Важным классом таких механизмов является изменение количества или состояния рецепторных молекул.

Для GPCR существует несколько режимов десенсibilизации (см. рис. 15.29): (1) При *инактивации* рецепторы изменяются таким образом, что больше не могут взаимодействовать с G-белками. (2) При *депонировании* рецепторы временно перемещаются внутрь клетки (интернализуются) и становятся недоступными для лиганда. (3) При *даун-регуляции* рецепторы разрушаются в лизосомах после интернализации.

В любом случае, десенсibilизация GPCR основывается на их фосфорилировании ферментами PKA, PKC или представителями семейства **GPCR-киназ (GPCR Kinase, GRK)**, в число которых входит родопсин-специфическая киназа RK, участвующая в описанной выше десенсibilизации фоторецепторов палочек.

GRK фосфорилируют серины и треонины на GPCR, но только после того, как связывание лиганда привело к активации рецептора. Это объясняется тем, что активированный рецептор аллостерически активирует GRK. Как и в случае родопсина, после фосфорилирования рецептора он с высоким сродством связывается с одним из белков семейства **аррестинов** (рис. 15.51).

Связанный аррестин может вносить вклад в процесс десенсибилизации двумя способами. Во-первых, он не дает активированному рецептору взаимодействовать с G-белками. Во-вторых, он служит адаптерным белком, способствующим связыванию рецептора с клатрин-зависимой машинерией эндоцитоза (см. главу 13) и индуцирующим рецептор-опосредованный эндоцитоз. Судьба интернализованных комплексов GPCR-аррестин зависит от других белков в комплексе. В некоторых случаях рецептор дефосфорилируется и возвращается в плазматическую мембрану для повторного использования. Иногда он убиквитинируется и разрушается в лизосомах (см. ниже).

Эндоцитоз рецепторов не всегда мешает рецептору сигнализировать. В некоторых случаях связанный аррестин рекрутирует другие сигнальные белки, передающие сигнал от интернализованного GPCR по новым путям.

Заключение

GPCR посредством G-белков косвенно активируют или инактивируют связанные с плазматической мембраной ферменты и ионные каналы. Когда активированный рецептор стимулирует G-белок, этот белок претерпевает конформационные перестройки, активирующие его α - и $\beta\gamma$ -субъединицы, которые способны напрямую регулировать активность белков-мишеней плазматической мембраны. Некоторые GPCR активируют или инактивируют аденилициклазу, изменяя таким образом внутриклеточную концентрацию малого внутриклеточного медиатора циклического AMP. Другие GPCR активируют фосфоинозитид-специфическую фосфолипазу C (PLC β), которая гидролизует

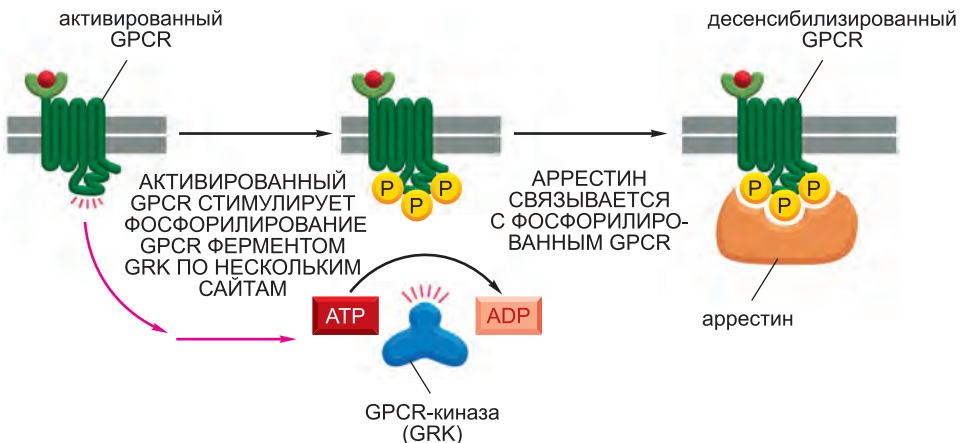


Рис. 15.51. Роль GPCR-киназ (GRK) и аррестинов в десенсибилизации GPCR. GRK фосфорилирует только активированные рецепторы, поскольку сама она активируется активным GPCR. Связывание аррестина с фосфорилированным рецептором не дает рецептору связывать G-белки и индуцирует его эндоцитоз (не показано). У мышей, у которых отсутствует одна форма аррестина, не наблюдается, например, десенсибилизации в ответ на морфин, что указывает на важную роль аррестинов в этом процессе.

фосфатидилинозитол-4,5-бисфосфат [$PI(4,5)P_2$] с образованием двух малых внутриклеточных медиаторов: инозитол-1,4,5-трисфосфата (IP_3) и диацилглицерина. IP_3 высвобождает Ca^{2+} из ЭР и, следовательно, повышает концентрацию Ca^{2+} в цитозоле. Диацилглицерин остается в плазматической мембране и способствует активации протеинкиназы C (PKC). Увеличение внутриклеточной концентрации циклического АМР или Ca^{2+} действует на клетку в основном за счет стимуляции протеинкиназы А (PKA) и Ca^{2+} /кальмодулин-зависимых протеинкиназ (CaM-киназ) соответственно.

PKC, PKA и CaM-киназы фосфорилируют определенные белки-мишени по серинам и треонинам и, таким образом, изменяют активность белков. В каждом типе клеток содержится свой характерный набор белков-мишеней, регулируемых таким образом. Это позволяет клетке по-своему отвечать на малые внеклеточные медиаторы. Активируемые GPCR внутриклеточные сигнальные каскады значительно усиливают ответ, в результате чего связывание одной молекулы лиганда с рецептором приводит к изменению тысяч молекул белков-мишеней.

Ответы, опосредуемые GPCR, быстро затухают после удаления внеклеточного сигнала: α -субъединица G-белка стимулируется своим белком-мишенью или RGS и инактивируется за счет гидролиза связанного GTP до GDP; IP_3 быстро дефосфорилируется липидфосфатазой или фосфорилируется липидкиназой; циклические нуклеотиды гидролизуются фосфодиэстеразами; Ca^{2+} быстро откачивается из цитозоля; и фосфорилированные белки дефосфорилируются протеинфосфатазами. Активированные GPCR фосфорилируются ферментами GRK, что индуцирует связывание с ними аррестинов. Связанный аррестин предотвращает взаимодействие рецепторов с G-белками и индуцирует их эндоцитоз, что приводит к десенситилизации или продолжению сигнализации посредством рекрутированных аррестином сигнальных белков.

15.3. Сигнализация посредством сопряженных с ферментами поверхностных рецепторов

Как и GPCR, **сопряженные с ферментами рецепторы** — это трансмембранные белки, лиганд-связывающий домен которых располагается на внешней поверхности цитоплазматической мембраны. Однако вместо цитоплазматического домена, сопряженного с тримерным G-белком, их цитоплазматический домен сам по себе обладает ферментативной активностью или напрямую связывается с ферментом. Если GPCR имеют семь трансмембранных сегментов, то каждая субъединица сопряженного с ферментом рецептора обычно имеет один. GPCR и сопряженные с ферментами рецепторы часто активируют одни и те же сигнальные пути, и часто неочевидно, почему данный внеклеточный сигнал активирует один класс рецепторов, а не другой.

Существует шесть основных классов сопряженных с ферментами рецепторов:

1. *Тирозинкиназные рецепторы* напрямую фосфорилируют определенные тирозины на самих себе и небольшом наборе внутриклеточных сигнальных белков.
2. *Связанные с тирозинкиназами рецепторы* сами по себе не обладают ферментативной активностью, но напрямую рекрутируют цитоплазматические тирозинкиназы для передачи сигнала.

3. *Рецепторные серин-треониновые киназы* напрямую фосфорилируют определенные серины или треонины на самих себе и на неактивных белках-регуляторах генов, с которыми они связаны.

4. *Связанные с гистидинкиназами рецепторы* активируют двухкомпонентный сигнальный путь, в котором киназа фосфорилирует саму себя по гистидину и затем быстро переносит фосфорильную группу на второй внутриклеточный сигнальный белок.

5. *Гуанилилциклазные рецепторы* напрямую катализируют в цитозоле синтез циклического GMP, служащего, как и циклический AMP, малым внутриклеточным медиатором.

6. *Рецептор-подобные тирозинфосфатазы* удаляют фосфатные группы с тирозинов специфических сигнальных белков. (Они называются «рецептор-подобными» потому, что до сих пор не были обнаружены их лиганды, и, следовательно, их рецепторная функция остается под вопросом.)

Мы сконцентрируем наше рассмотрение на первых четырех классах и начнем с тирозинкиназных рецепторов — наиболее распространенных сопряженных с ферментами рецепторов.

15.3.1. Активированные тирозинкиназные рецепторы (RTK) фосфорилируют сами себя

Множество внеклеточных сигнальных молекул действует посредством тирозинкиназных рецепторов (Rеceptor Tyrosine Kinase, RTK). В других разделах данной книги упоминаются *эпидермальный фактор роста* (Epidermal Growth Factor, EGF), *тромбоцитарный фактор роста* (Platelet-Derived Growth Factor, PDGF), *фактор роста фибробластов* (Fibroblast Growth Factor, FGF), *фактор роста гепатоцитов* (Hepatocyte Growth Factor, HGF), *инсулин, инсулиноподобный фактор роста-1* (Insulin-like Growth Factor-1, IGF1), *фактор роста эндотелия сосудов* (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF), *колониестимулирующий фактор макрофагов* (Macrophage-Colony-Stimulating Factor, MCSF) и *нейротрофины*, включая *фактор роста нервов* (Nerve Growth Factor, NGF).

Многие связанные с поверхностью клетки внеклеточные сигнальные белки также воздействуют на RTK. **Эфрины** — это самый крупный класс таких мембраносвязанных лигандов; у человека их было обнаружено восемь. Помимо других функций, они, стимулируя ответы притягивания или отталкивания, способствуют направлению миграции клеток и аксонов вдоль определенных путей в процессе развития животных (смотри ниже и в главе 22). Рецепторы эфринов, носящие название **Eph-рецепторов**, также являются одними из наиболее многочисленных RTK; в человеческом геноме они кодируются тринадцатью генами. Эфрины и Eph-рецепторы необычны тем, что они могут одновременно играть роль как лиганда, так и рецептора: при связывании с Eph-рецептором некоторые эфрины не только активируют рецептор, но и сами активируются и передают сигнал внутрь экспрессирующей эфрин клетки; таким образом, изменяется поведение как клетки-мишени, так и сигнализирующей клетки. Такая *двунаправленная сигнализация* между эфринами и Eph-рецепторами необходима, например, чтобы не дать некоторым соседним группам клеток смешаться друг с другом в процессе эмбрионального развития.

У человека около 60 генов кодирует RTK. Эти рецепторы можно подразделить на 16 и более структурных подсемейств, каждое из которых обладает собственным

комплементарным набором белковых лигандов. На **рис. 15.52** представлены семейства RTK, встречающиеся у животных, а в **таблице 15.4** перечислены некоторые их лиганды и функции. Связывание сигнального белка лиганд-связывающим доменом снаружи клетки позволяет внутриклеточному тирозинкиназному домену фосфорилировать определенные боковые цепи тирозина на самом рецепторе и на внутриклеточных сигнальных белках, которые последовательно связываются с фосфорилированными тирозинами рецептора.

Как связывание внеклеточного лиганда активирует киназный домен на другой стороне плазматической мембраны? В случае GPCR считается, что связывание лиганда приводит к изменению ориентации нескольких трансмембранных α -спиралей относительно друг друга, в результате чего изменяется относительное положение цитоплазматических петель. Однако сложно представить, как конформационная перестройка могла бы распространиться через липидный бислой посредством единственной трансмембранной α -спирали. Поэтому в случае многих RTK связывание лиганда вызывает димеризацию рецептора, и киназные домены двух рецепторов сближаются (пример рассмотренного выше *индуцированного сближения*) и активируются за счет перекрестного фосфорилирования по нескольким тирозинам. Этот процесс носит название *трансавтофосфорилирования* (**рис. 15.53, а**).

Благодаря тому что для активации рецептора необходима его димеризация, достаточно просто инактивировать конкретный RTK и определить его роль в клеточном ответе. Для этого клетки трансформируются при помощи ДНК, кодирующей

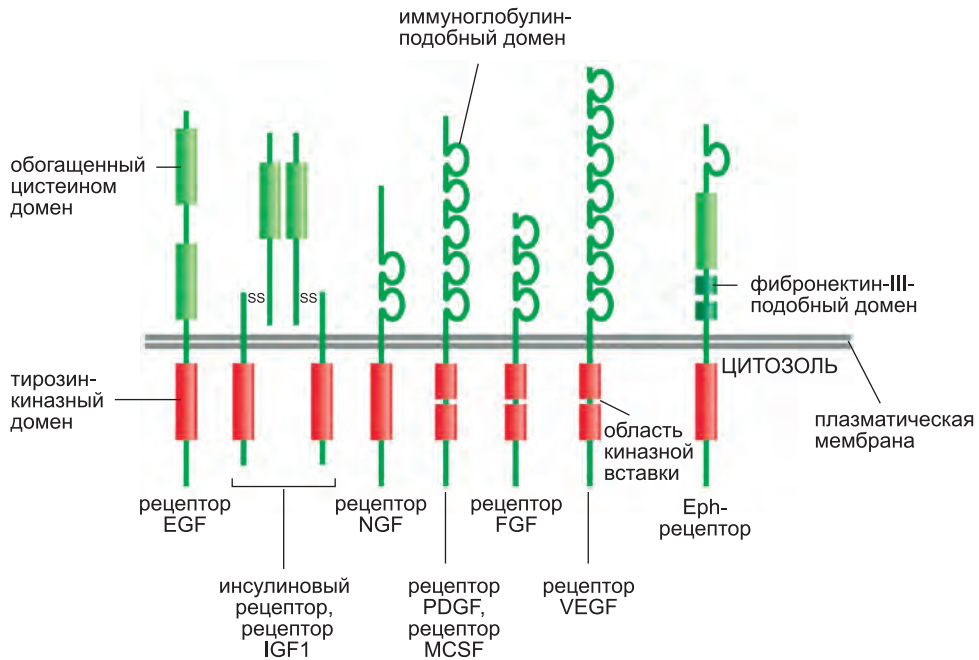


Рис. 15.52. Некоторые подсемейства RTK. Представлены только один или два представителя каждого подсемейства. Обратите внимание, что тирозинкиназный домен у некоторых подсемейств прерывается «областью киназной вставки». Функциональные роли большинства обогащенных цистеином, иммуноглобулин-подобных и фибронектин-III-подобных доменов до сих пор неизвестны. Некоторые лиганды и характерные ответы представленных рецепторов перечислены в таблице 15.4.

Таблица 15.4. Некоторые сигнальные белки, действующие посредством RTK

Сигнальный белок	Рецепторы	Некоторые характерные ответы
Эпидермальный фактор роста (EGF)	рецепторы EGF	стимулирует выживание, рост, пролиферацию или дифференциацию различных типов клеток; служит индуктивными сигналами при развитии
Инсулин	инсулиновый рецептор	стимулирует расщепление углеводов и синтез белков
Инсулиноподобные факторы роста (IGF1 и IGF2)	IGF-рецептор-1	стимулируют выживание и рост многих типов клеток
Фактор роста нервов (NGF)	Trk A	стимулирует выживание и рост некоторых нейронов
Тромбоцитарные факторы роста (PDGF AA, BB, AB)	рецепторы PDGF (α и β)	стимулируют выживание, рост, пролиферацию и миграцию различных типов клеток
Колонiestимулирующий фактор макрофагов (MCSF)	рецептор MCSF	стимулирует пролиферацию и дифференциацию моноцитов/макрофагов
Факторы роста фибробластов (от FGF1 до FGF24)	рецепторы FGF (FGFR1–FGFR4 и их многочисленные изоформы)	стимулируют пролиферацию различных типов клеток; ингибируют дифференциацию некоторых клеток-предшественников; служат индуктивными сигналами при развитии
Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF)	рецепторы VEGF	стимулируют ангиогенез
Эфрины (A и B типов)	Eph-рецепторы (A и B типов)	стимулируют ангиогенез; направляя миграцию клеток и аксонов

мутантную форму рецептора, который нормально димеризуется, но его киназный домен неактивен. При совместной экспрессии в большом количестве с нормальными рецепторами мутантный рецептор действует по *доминантно-негативному* механизму, ингибируя нормальные рецепторы за счет образования с ними неактивных комплексов (рис. 15.53, б).

15.3.2. Фосфорилированные тирозины на RTK служат сайтами докинга внутриклеточных сигнальных белков

Перекрестное фосфорилирование прилегающих цитоплазматических хвостов RTK вносит вклад в активацию рецептора двумя путями. Во-первых, фосфорилирование тирозинов в пределах киназного домена усиливает киназную активность фермента. Во-вторых, фосфорилирование тирозинов вне киназного домена создает места докинга для связывания с высоким сродством специфических внутриклеточных сигнальных белков. Поскольку сигнальные белки несут специфические фосфотирозин-связывающие домены, они связываются с определенными фосфорилированными сайтами на активированных рецепторах. Эти домены, помимо фосфотирозинов, также узнают структуру полипептидной цепи вблизи сайта докинга.

После связывания активированной RTK сигнальный белок сам может быть фосфорилирован по тирозинам и, следовательно, активирован. Однако часто для активации связанного сигнального белка достаточно только докинга, в результате которого происходят конформационные изменения белка, или белок просто

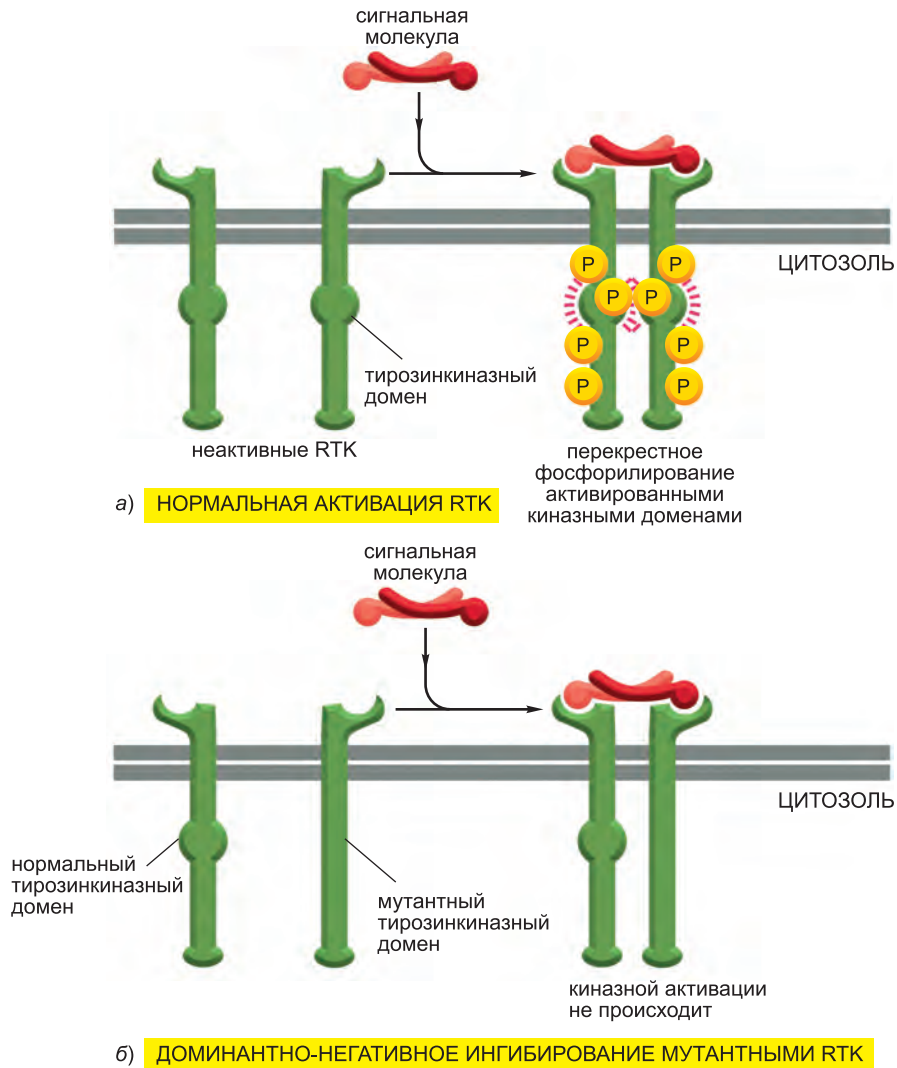


Рис. 15.53. Активация и инактивация RTK посредством димеризации. (а) Нормальные рецепторы в ответ на связывание лиганда димеризуются. Два киназных домена перекрестно фосфорилируют друг друга, в результате чего усиливается их активность, и они фосфорилируют другие сайты на рецепторах. (б) Мутантный рецептор с инактивированным киназным доменом способен нормально димеризоваться, но не способен перекрестно фосфорилировать нормальный рецептор в димере. Поэтому, если мутантные рецепторы присутствуют в избытке, они будут блокировать сигнализацию нормальных рецепторов — этот процесс называется *доминантно-негативной регуляцией*. Клеточные биологи часто используют такой подход для ингибирования в клетке определенного типа RTK и установления его нормальной функции. Сходные стратегии применимы для ингибирования других различных типов рецепторов и внутриклеточных сигнальных белков, функционирующих в составе димеров или крупных олигомеров.

сближается со следующим белком сигнального пути. Таким образом, трансавтофосфорилирование служит переключателем, запускающим временную сборку внутриклеточного сигнального комплекса, который затем может передать сигнал,

часто по нескольким путям, к другим эффекторам (рис. 15.54). Поскольку различные RTK связывают различные сочетания сигнальных белков, они запускают различные ответы.

Рецепторы инсулина и IGF1 работают по несколько другому механизму. Они представляют собой тетрамеры (см. рис. 15.52), и предполагают, что связывание лигандов приводит к перестройке их трансмембранных рецепторных цепей, в результате чего киназные домены сближаются. Более того, большинство образовавшихся в результате связывания лигандов фосфотирозиновых сайтов докинга расположено не на самом рецепторе, а на специализированном стыковочном белке — *субстрате инсулинового рецептора-1* (Insulin Receptor Substrate-1, *IRS1*). Сначала активированный рецептор трансавтофосфорилирует свои киназные домены, которые затем фосфорилируют *IRS1* по нескольким тирозинам. В результате образуется значительно больше сайтов докинга, чем было бы только на самом рецепторе (см. рис. 15.22). Некоторые другие RTK также используют стыковочные белки для увеличения размера сигнального комплекса.

15.3.3. Белки, несущие SH2-домен, связывают фосфорилированные тирозины

С фосфотирозинами на активированных RTK (или стыковочными белками, например *IRS1*) могут связываться разнообразные внутриклеточные сигнальные белки. Они способствуют передаче сигнала внутрь клетки в основном за счет последовательных белок-белковых взаимодействий, опосредованных модульными доменами взаимодействия (см. выше). Часть связавшихся белков представляет собой ферменты, как например, **фосфолипаза C-γ (PLCγ)**, действующая так же,

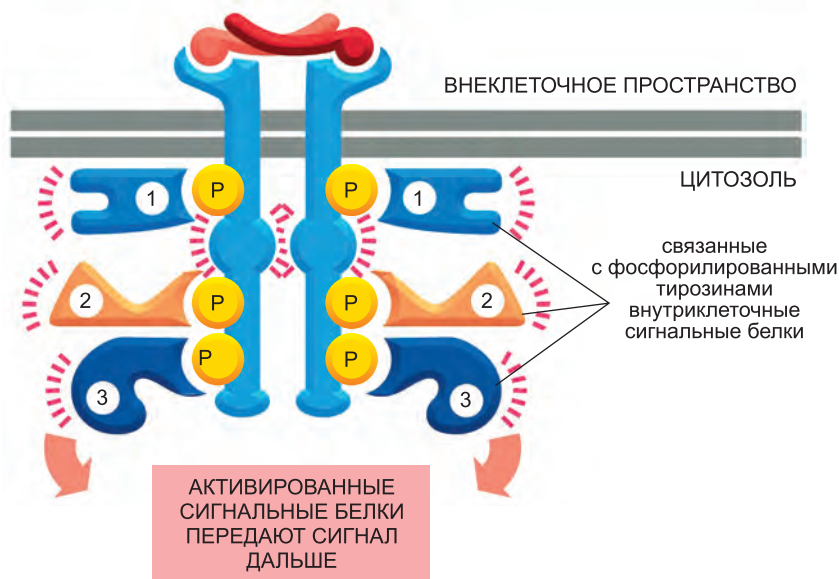


Рис. 15.54. Связывание внутриклеточных сигнальных белков с фосфотирозинами на активированных RTK. Активированный рецептор и связанные с ним сигнальные белки образуют сигнальный комплекс, передающий сигнал по множественным сигнальным путям.

как фосфолипаза С-β, путем активации инозитолфосфолипидного сигнального пути (см. рис. 15.38 и 15.39). Посредством этого пути RTK способны увеличить концентрацию цитоплазматического Ca^{2+} и активировать РКС. Другим ферментом, связывающимся с этими рецепторами, является цитоплазматическая тирозинкиназа *Src*, которая фосфорилирует другие сигнальные белки по тирозинам. Еще один фермент — это *фосфоинозитид-3-киназа (PI3-киназа)*, в основном фосфорилирующая липиды, а не белки; как мы обсудим дальше, фосфорилированные липиды служат сайтами докинга для привлечения различных сигнальных белков к плазматической мембране.

Внутриклеточные сигнальные белки, связывающиеся с фосфотирозинами на активированных RTK или стыковочных белках, имеют различную структуру и выполняют различные функции. Однако обычно они несут высококонсервативные фосфотирозин-связывающие домены: **SH2-домены** (от англ. *Src homology region* — область гомологии с *Src*) или, реже, **PTB-домены** (от англ. *phosphotyrosine-binding* — фосфотирозин-связывающие). Узнавая определенные фосфорилированные тирозины, эти небольшие домены взаимодействия позволяют несущим их белкам связываться с активированными RTK и многими другими внутриклеточными сигнальными белками, временно фосфорилированными по тирозинам (рис. 15.55). Как отмечено выше, многие сигнальные белки также несут домены взаимодействия, позволяющие им специфически взаимодействовать с другими белками в процессе сигнализации. В число таких доменов входит **SH3-домен**, связывающий обогащенные пролином мотивы внутриклеточных белков (см. рис. 15.33). Человеческий геном кодирует около 115 SH2-доменов и около 295 SH3-доменов.

Не все белки, связывающие активированные RTK посредством SH2-доменов, передают сигнал дальше внутрь клетки. Некоторые, наоборот, ослабляют процесс сигнализации, создавая отрицательные обратные связи. Одним из таких белков является *c-Cbl-белок*, который способен связываться с некоторыми активированными рецепторами и убиквитинировать их, ковалентно присоединяя одну молекулу убиквитина к одному или нескольким сайтам на рецепторе (этот процесс называют *моноубиквитинированием*, тогда как при *полиубиквитинировании* к белку добавляется одна или несколько длинных цепей убиквитина). Моноубиквитинирование индуцирует эндоцитоз и деградацию рецепторов в лизосомах — это пример даун-регуляции рецепторов (см. рис. 15.29). Эндоцитозные белки, содержащие *мотивы взаимодействия с убиквитином* (*Ubiquitin-interaction Motifs, UIM*), узнают моноубиквитинированные RTK и направляют их сначала в клатриновые везикулы, а затем в лизосомы (см. главу 13). Мутации, инактивирующие *c-Cbl*-зависимую даун-регуляцию RTK, приводят к продолжительной сигнализации RTK и, следовательно, развитию рака.

Как и в случае GPCR, индуцированный лигандом эндоцитоз RTK не всегда ослабляет сигнализацию. В некоторых случаях RTK эндоцитируются вместе со связанными сигнальными белками и продолжают сигнализировать из эндосом или других внутриклеточных компартментов. Например, благодаря этому механизму *фактор роста нервов (NGF)* связывается со своим специфическим RTK (носящим название *TrkA*) на конце длинного аксона нервной клетки и посылает сигналы в тело клетки на большом расстоянии. В данном случае сигнальные эндоцитозные пузырьки, содержащие *TrkA* со связанными внутри NGF и сигнальными белками на цитоплазматической стороне, транспортируются вдоль аксона в тело клетки, где они сигнализируют о выживании клетки.

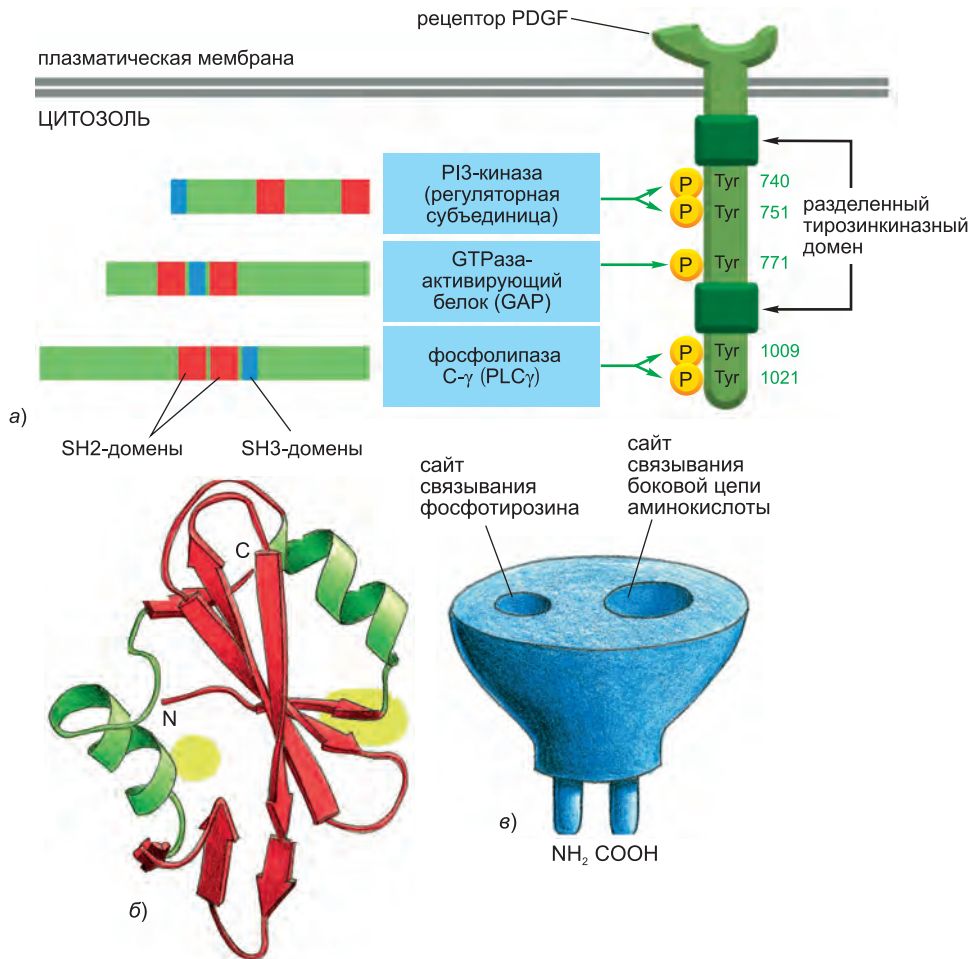


Рис. 15.55. Связывание содержащих SH2-доменов внутриклеточных сигнальных белков с активированным рецептором PDGF. (а) Рецептор PDGF содержит пять фосфотирозиновых сайтов докинга: три — в области киназной вставки и два — на С-конце. С этими сайтами, как показано, связываются три сигнальных белка. Числа справа указывают на положения тирозинов в полипептидной цепи. Сайты докинга идентифицированы методами рекомбинантных ДНК путем мутаций определенных тирозинов на рецепторе. Мутации тирозинов 1009 и 1021, например, препятствуют связыванию и активации PLCγ, т.е. рецептор перестает стимулировать инозитолфосфолипидный сигнальный путь. Показаны положения доменов SH2 (красные) и SH3 (голубые) в трех сигнальных белках. (Дополнительные фосфотирозиновые сайты докинга на рецепторе, включая сайты связывания цитоплазматической тирозинкиназы и двух адаптерных белков, не показаны.) Неизвестно, сколько сигнальных белков может одновременно связываться с рецептором. (б) Определенная методом рентгеновской кристаллографии трехмерная структура SH2-домена. «Карман», связывающий фосфотирозин, показан справа желтым, а «карман» связывания определенной аминокислотной боковой цепи (в данном случае изолейцина) — желтым слева (см. также рис. 3.39). (в) SH2-домен напоминает шпатель, он способен встраиваться практически в любой участок белка без нарушения его структуры или функции (см. главу 3). Поскольку каждый домен несет отдельные сайты для узнавания фосфотирозина и определенной аминокислотной боковой цепи, различные SH2-домены узнают фосфотирозины в контексте различных окружающих их аминокислотных последовательностей. (б, основано на данных из G. Waksman et al., *Cell* 72: 779–790, 1993. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Некоторые сигнальные белки почти полностью состоят из доменов SH2 и SH3 и служат *адаптерами* для сопряжения фосфорилированных по тирозину белков с другими белками, не несущими собственного SH2-домена (см. рис. 15.22). Такого типа адаптерные белки способствуют сопряжению активированных RTK с важным сигнальным белком *Ras*. *Ras* — это мономерная GTPаза, способная активировать многочисленные сигнальные пути, которые мы сейчас и обсудим.

15.3.4. Белок *Ras* относится к крупному семейству мономерных GTPаз

Суперсемейство *Ras* состоит из различных семейств мономерных GTPаз, но только семейства *Ras* и *Rho* передают сигналы от поверхностных рецепторов (таблица 15.5). Взаимодействуя с различными внутриклеточными сигнальными белками, единственный представитель семейств *Ras* или *Rho* способен скоординированно распространить сигнал по нескольким различным сигнальным путям. Таким образом, белки *Ras* и *Rho* выполняют функцию *распределителей сигнала*.

У человека обнаружено три основных близкородственных белка *Ras* (H-, K- и N- *Ras* — см. таблицу 15.5). Несмотря на то что они выполняют немного различные функции, считается, что они действуют по одному и тому же механизму, поэтому мы будем называть их просто ***Ras***. Как и многие другие мономерные GTPазы, *Ras* содержит одну или несколько ковалентно связанных липидных групп, заякоривающих белок на цитоплазматической стороне той мембраны, в которой он функционирует. Как правило, *Ras* встречаются в плазматической мембране, откуда они передают сигналы в другие области клетки. *Ras* часто используются, например, когда от RTK поступает сигнал, требующий изменения экспрессии генов, как бывает при стимуляции пролиферации или дифференциации клеток. Если ингибировать функционирование *Ras* путем микроинъекции нейтрализующих анти-*Ras* антител или доминантно-негативной мутантной формы *Ras*, клеточные пролиферация и дифференциация, в норме индуцируемые активированными RTK, не происходят.

Таблица 15.5. Суперсемейство *Ras* мономерных GTPаз

Семейство	Некоторые представители семейства	Некоторые функции
<i>Ras</i>	H- <i>Ras</i> , K- <i>Ras</i> , N- <i>Ras</i> Rheb	передача сигналов от RTK активирует mTOR для стимуляции клеточного роста
	Rep1	активирует cAMP-зависимый GEF; влияет на адгезию клеток за счет активации интегринов
<i>Rho</i> *	<i>Rho</i> , <i>Rac</i> , <i>Cdc42</i>	передают сигналы от поверхностных рецепторов на цитоскелет и другие органеллы
ARF*	ARF1–ARF6	регулируют сборку белковой каймы на внутриклеточных пузырьках
Rab*	Rab1–60	регулирует внутриклеточный везикулярный транспорт
Ran*	Ran	регулирует сборку митотического веретена деления и ядерный транспорт РНК и белков

*Семейство *Rho* обсуждается в главе 16, белки ARF и Rab — в главе 13, Ran — в главах 12 и 17. Трехмерная структура *Ras* изображена на рис. 3.72.

30% опухолей в человеческом организме несут гиперактивную мутантную форму Ras, вносящую вклад в неограниченную пролиферацию раковых клеток.

Как и другие GTP-связывающие белки, Ras действуют как молекулярные переключатели и имеют два различных конформационных состояния: активное — при связанном GTP и неактивное — при связанном GDP (см. рис. 15.18, б). Как обсуждалось выше, активность мономерных GTPаз, в том числе Ras, регулируется двумя классами сигнальных белков, влияющих на переход между активным и неактивным состояниями (см. рис. 15.19). *Факторы обмена гуаниновых нуклеотидов Ras (Ras-GEF)* стимулируют диссоциацию GDP и последующий захват GTP из цитозоля, то есть активируют Ras. *GTPаза-активирующие белки Ras (Ras-GAP)* увеличивают скорость гидролиза связанного GTP, т.е. инактивируют Ras. Гипер-активные мутантные формы Ras устойчивы к GAP-опосредованной GTPазной стимуляции и постоянно находятся в активном состоянии со связанным GTP, что также способствует развитию рака.

Но как RTK в норме активируют Ras? В принципе, они могут либо активировать Ras-GEF, либо ингибировать Ras-GAP. Несмотря на то что некоторые GAP напрямую связываются (своими SH2-доменами) с активированными RTK (см. рис. 15.55, а), а GEF обычно связываются опосредованно, именно не прямое связывание рецептора с Ras-GEF переводит Ras в активное состояние. В самом деле, потеря функции Ras-GEF приводит к тем же эффектам, как и потеря функции самого Ras. Активация других белков суперсемейства Ras, включая представителей семейства Rho, также происходит посредством GEF. Конкретный GEF определяет, в какой мембране активируется GTPаза и, так как он служит каркасом, какие сигнальные белки GTPаза будет активировать.

Белки Ras и регулирующие их белки высококонсервативны. Генетический анализ белков *Drosophila* и *C. elegans* предоставил первую информацию о том, как RTK активируют Ras. Особенно полезными оказались исследования развития фоторецепторных клеток глаза *Drosophila*.

15.3.5. RTK активируют Ras посредством адаптеров и GEF: исследования развития глаза *Drosophila*

Фасеточный глаз *Drosophila* содержит примерно 800 одинаковых единиц, носящих название *омматидий*, каждая из которых состоит из 8 фоторецепторных клеток (R1-R8) и 12 дополнительных клеток (рис. 15.56). Глаз развивается из одного слоя эпителиальных клеток, и клетки, составляющие один омматидий, рекрутируются из слоя в строго определенной последовательности посредством межклеточных

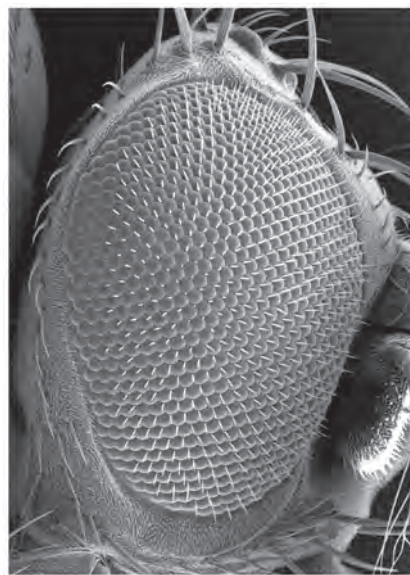


Рис. 15.56. Сканирующая электронная микрофотография фасеточного глаза *Drosophila*. Глаз состоит примерно из 800 идентичных единиц (омматидий), каждая из которых несет линзу, фокусирующую свет на восемь фоторецепторных клеток в ее основании. (С любезного разрешения Kevin Moss.)

200 мкм

взаимодействий. Развитие начинается с фоторецептора R8, и затем каждая дифференцирующаяся клетка воздействует на своих недифференцированных соседей и индуцирует их дифференциацию и сборку омматидия (рис. 15.57).

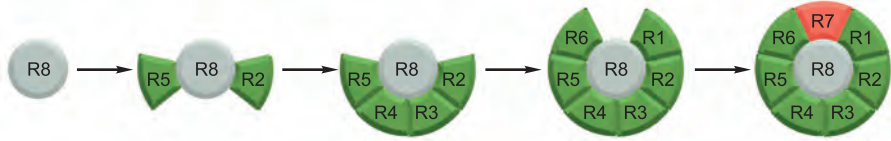


Рис. 15.57. Сборка фоторецепторных клеток в развивающемся омматидии *Drosophila*. Клетки последовательно рекрутируются и становятся фоторецепторами, начиная с R8 и заканчивая R7.

Развитие фоторецептора R7, необходимого для регистрации ультрафиолетового света, наиболее изучено. Сначала был описан мутант *Sevenless* (*Sev*, «без седьмого»), у которого отсутствие R7 — единственный наблюдаемый дефект. Таких мутантов легко отобрать на основе их слепоты по отношению к ультрафиолетовому свету. Показано, что нормальный ген *Sev* кодирует RTK, экспрессирующуюся в клетках-предшественниках R7. Дальнейший генетический анализ мутантов, у которых блокировано развитие R7, но сам белок *Sev* не нарушен, привел к идентификации гена *Bride-of-sevenless* (*Boss*, «невеста без седьмого»), кодирующего лиганд RTK *Sev*. *Boss* — это семипроходный трансмембранный белок, экспрессирующийся исключительно на поверхности прилегающих клеток R8, и когда он связывает и активирует *Sev*, предшественник клетки R7 дифференцируется в фоторецептор R7. Белок *Sev* также экспрессируется на нескольких других клетках-предшественниках развивающегося омматидия, но эти клетки с R8 не взаимодействуют; таким образом, белок *Sev* не активируется и эти клетки не становятся фоторецепторами R7.

Компоненты внутриклеточного сигнального пути, активируемого *Sev* в клетках-предшественниках R7, оказалось сложнее идентифицировать, чем рецептор и его лиганд, поскольку инактивирующие их мутации оказались летальными. Проблема была решена путем генетического скрининга мушек с частично инактивированным белком *Sev*. Один из идентифицированных генов кодирует белок *Ras*. Мушки, у которых обе копии гена *Ras* инактивируются мутацией, погибают, тогда как мушки только с одной неактивной копией выживают. Но когда мушка несет в развивающихся глазах частично неактивный белок *Sev*, инактивирующая мутация одной копии гена *Ras* приводит к потере R7. Более того, если один из генов *Ras* сделать при помощи мутации гиперактивным, R7 развивается даже в мутантах, у которых одновременно неактивны *Sev* и *Boss*. Эти данные указывают на то, что *Ras* действует в одном сигнальном пути с *Sev*, и его активация в клетках-предшественниках R7 является необходимым и достаточным условием запуска дифференциации R7.

Второй ген, идентифицированный при генетическом скрининге, называется *Son-of-sevenless* (*Sos*, «сын без седьмого»). Он кодирует *Ras*-GEF, необходимую для того, чтобы *Sev* RTK активировала *Ras*. Третий ген (носящий название *Drk*) кодирует адаптерный белок, сопрягающий рецептор *Sev* и белок *Sos*; SH2-домен адаптера *Drk* связывает активированный *Sev*, а его SH3-домены связывают *Sos* (рис. 15.58). Такой тип генетического скрининга, при котором организмы с частично нарушенными компонентами генетического пути используются для идентификации

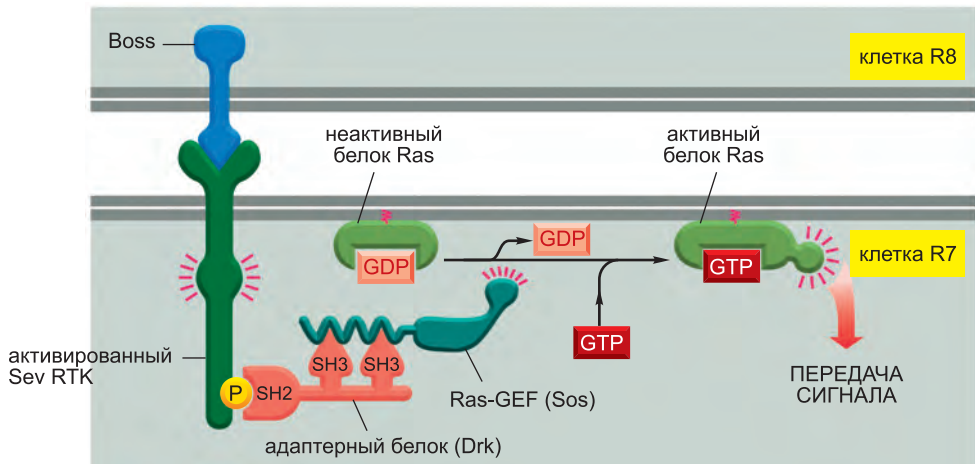


Рис. 15.58. Как Sev RTK активирует Ras в глазу мушки. Активация Sev на поверхности клетки-предшественника R7 белком Boss, расположенным на поверхности R8, активирует Ras-GEF Sos посредством адаптерного белка Drk. Drk при помощи SH2-домена узнает определенный фосфорилированный тирозин на белке Sev и взаимодействует с Sos посредством двух SH3-доменов. Sos заставляет неактивный белок Ras обменять связанный GDP на GTP, что приводит к активации Ras и передаче сигнала дальше внутрь клетки. В результате клетка-предшественник R7 дифференцируется в УФ-чувствительную фоторецепторную клетку.

генов, кодирующих другие белки пути, в настоящее время широко и успешно используется для решения разнообразных задач.

Биохимические и молекулярно-биологические исследования показали, что в клетках млекопитающих сопряжение RTK и Ras происходит по сходному механизму. Адаптерный белок в данном случае называется **Grb2**, а Ras-GEF тоже называется Sos (см. рис. 15.22). Интересно, что у млекопитающих, когда Sos активирует Ras, Ras еще сильнее стимулирует Sos, и образуется простая положительная обратная связь.

Не только RTK активируют Ras. Ca^{2+} и диацилглицерин, например, активируют Ras-GEF, располагающуюся в мозге; эта Ras-GEF способна независимо от Sos сопрягать GPCR с активацией Ras.

В активном состоянии Ras, как мы обсудим дальше, активирует различные сигнальные белки, передающие сигнал дальше внутрь клетки.

15.3.6. Ras активирует MAP-киназный сигнальный модуль

Фосфорилирование тирозина и активация Ras активированными RTK обычно непродолжительны (**рис. 15.59**). *Тирозин-специфичные протеинфосфатазы* быстро снимают фосфорилирование, а GAP индуцируют инактивацию активированных Ras за счет гидролиза GTP до GDP. Чтобы стимулировать дифференциацию или пролиферацию клеток, эти короткоживущие сигнальные процессы должны быть преобразованы в долгоживущие, способные поддерживать сигнал и передавать его дальше в ядро для изменения профиля экспрессии генов. Одним из ключевых используемых для этого механизмов является система белков, носящая название *митоген-активируемого протеинкиназного модуля* (**Mitogen-activated Protein**

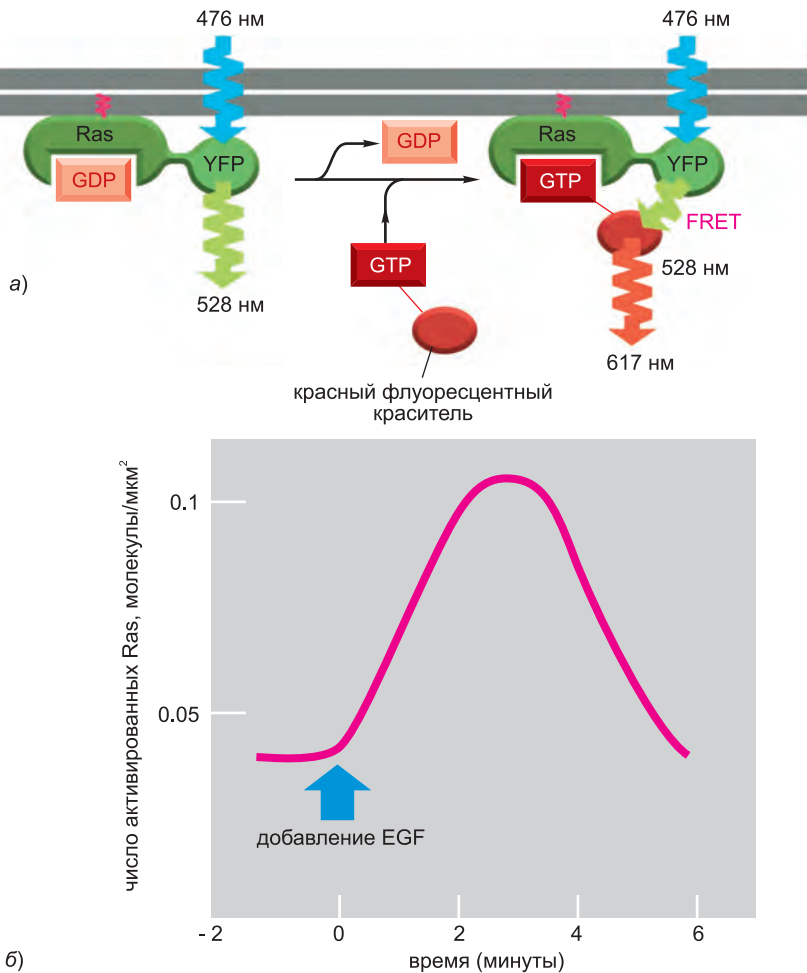


Рис. 15.59. Нестационарная активация Ras, наблюдаемая при помощи резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET). (а) Схема экспериментального подхода. Методами генной инженерии клетки клеточной линии рака человека модифицируют таким образом, чтобы они экспрессировали белок Ras, ковалентно связанный с желтым флуоресцентным белком (YFP). В те же клетки вводят меченый красным флуоресцентным красителем GTP. Затем клетки стимулируют внеклеточным сигнальным белком эпидермальным фактором роста (EGF), и отдельные флуоресцирующие молекулы Ras-YFP на внутренней поверхности плазматической мембраны наблюдают посредством флуоресцентной видеомикроскопии индивидуальных клеток. Когда флуоресцентная молекула Ras-YFP активируется, она обменивает немеченый GDP на флуоресцентно меченый GTP; желто-зеленый свет, испускаемый YFP, активирует флуоресцентный GTP, который начинает светиться красным. Таким образом, активацию отдельных молекул Ras можно наблюдать по изменению желто-зеленой флуоресценции вблизи плазматической мембраны на красную. Как показано на (б), активацию молекул Ras можно зарегистрировать примерно через 30 секунд после стимуляции EGF. Пик красного сигнала приходится на 3–4 минуты, и затем сигнал за 6 минут снижается до нулевого уровня. Поскольку Ras-GAP обнаруживается в тех же участках плазматической мембраны, что и Ras, можно предположить, что он играет важную роль в быстром подавлении сигнала Ras. (Модифицировано из Н. Murakoshi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101: 7317–7322, 2004. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

Kinase Module, **МАР-киназный модуль**) (рис. 15.60). Три компонента этой системы образуют высококонсервативный сигнальный модуль, практически неизменный на всем протяжении от дрожжей до людей, и использующийся, с небольшими вариациями, в различных сигнальных процессах.

Все три компонента представляют собой протеинкиназы. Последнюю киназу в последовательности называют МАР-киназой (МАРК). Перед ней — киназа МАР-киназы (МАРКК): она фосфорилирует и, следовательно, активирует МАР-киназу. Первый компонент, активирующийся непосредственно Ras, называется киназой киназы МАР-киназы (МАРККК): она фосфорилирует и активирует МАРКК. В **Ras-МАР-кинажном пути** млекопитающих эти три киназы называются короче: Raf (= МАРККК), Mek (= МАРКК) и Erk (= МАРК).

После активации МАР-киназа передает сигнал дальше путем фосфорилирования различных белков клетки, включая белки-регуляторы генов и другие протеинкиназы (см. рис. 15.60). МАР-киназа Erk, например, входит в ядро и фосфорилирует один или несколько компонентов регуляторного комплекса генов. В результате

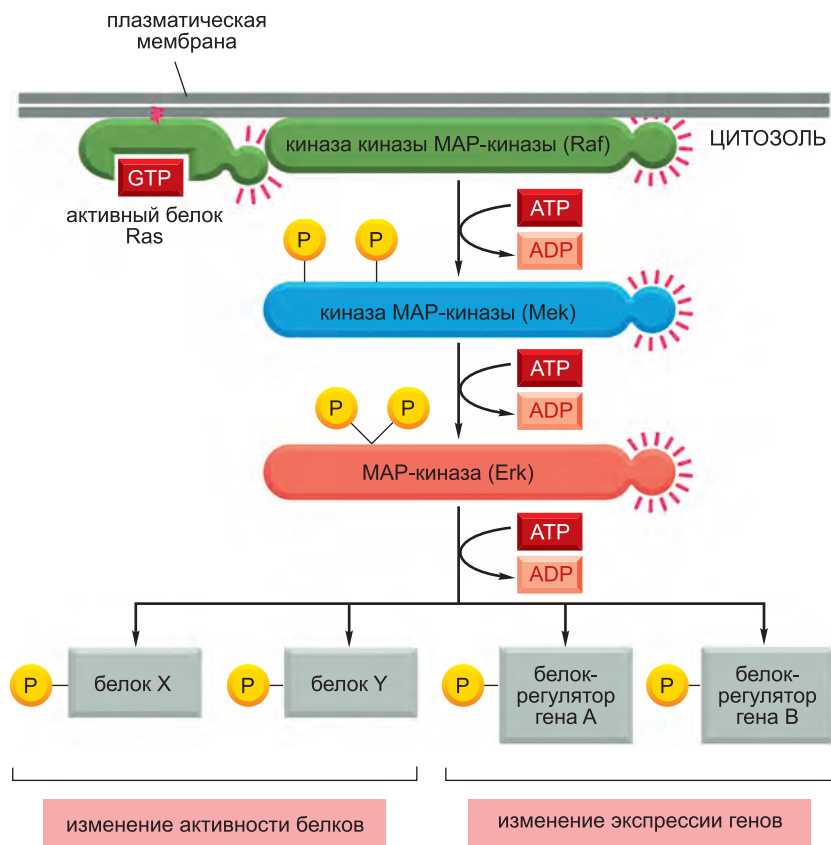


Рис. 15.60. МАР-киназный серин-треониновый модуль фосфорилирования, активируемый Ras. Трех-компонентный модуль начинается с киназы киназы МАР-киназы Raf. Ras рекрутирует Raf к плазматической мембране и способствует ее активации. Затем Raf активирует киназу МАР-киназы Mek, которая в свою очередь активирует МАР-киназу Erk. Erk затем фосфорилирует различные сигнальные белки, включая другие протеинкиназы и белки-регуляторы генов в ядре. В результате изменения экспрессии генов и активности белков приводят к сложным перестройкам функционирования клетки.

активируется транскрипция набора предданных генов, носящих такое название потому, что они активируются в течение минут после получения RTK внеклеточного сигнала, даже если синтез белка искусственно блокирован лекарствами. Некоторые из этих генов кодируют другие белки-регуляторы генов, которые, в свою очередь, включают другие гены. Этот процесс требует белкового синтеза и продолжительного времени. (Такие взаимоотношения между предданными и поздними генами похожи на взаимоотношения между первичными и вторичными генами ответа, активируемыми рассмотренными ранее ядерными рецепторами — см. рис. 15.15.).

Таким образом, Ras-MAP-киназный сигнальный путь передает сигнал с поверхности клетки в ядро и изменяет профиль экспрессии генов. В этом пути активируются гены, стимулирующие клеточную пролиферацию, например, гены, кодирующие *G₁-циклины* (см. главу 17).

Внеклеточные сигналы обычно активируют MAP-киназы только временно, и это время влияет на ответ. Например, когда EGF активирует свой рецептор в клеточной линии предшественников нервных клеток, активность MAP-киназы Erk максимальна в течение 5 минут, после чего она быстро падает, и позднее клетки начинают делиться. С другой стороны, когда в тех же клетках NGF активирует свой рецептор, активность Erk поддерживается на высоком уровне в течение многих часов, и клетки перестают пролиферировать и дифференцироваться в нейроны. На продолжительность сигнального ответа действует множество факторов, включая положительные и отрицательные обратные связи (см. рис. 15.28).

MAP-киназы участвуют как в положительных, так и в отрицательных обратных связях, разные сочетания которых дают постепенные или «переключательные», короткие или продолжительные ответы. В представленном ранее примере, на рис. 15.24, MAP-киназа активирует сложную положительную обратную связь, которая при стимуляции созревания ооцитов лягушки посредством короткого воздействия внеклеточной сигнальной молекулой прогестероном приводит к необратимому ответу по принципу «все или ничего». Во многих клетках MAP-киназы активируют отрицательную обратную связь путем увеличения концентрации *протеинфосфатазы двойной специфичности*, удаляющей фосфаты с тирозинов и треонинов и инактивирующей таким образом MAP-киназу (которая фосфорилируется по тирозинам и треонинам MAPKK). Увеличение концентрации фосфатазы происходит из-за увеличения транскрипции фосфатазного гена и стабилизации фермента против расщепления. В представленном на рис. 15.61 Ras-MAP-кинажном сигнальном пути Erk также фосфорилирует и инактивирует Raf, создавая еще одну отрицательную обратную связь, способствующую отключению MAP-киназного модуля.

15.3.7. Каркасные белки не дают пересекаться параллельным MAP-киназным модулям

Трехкомпонентные MAP-киназные модули функционируют во всех эукариотических клетках. Различные ответы опосредуются различными модулями. В почкующихся дрожжах, например, один модуль опосредует ответ на феромон спаривания, другой — ответ на голодание, третий — на осмотический шок. Некоторые из этих MAP-киназных модулей используют одну или несколько общих киназ, но, несмотря на это, активируют различные эффекторные белки и, следовательно, различные ответы. Как обсуждалось ранее, одним из механизмов предотвращения пересечения параллельных сигнальных путей и обеспечения специфичности

ответа является использование каркасных белков (см. рис. 15.21, а). В клетках дрожжей такие каркасные белки связывают все или некоторые киназы каждого MAP-киназного модуля в комплекс, обеспечивая таким образом специфичность ответа (рис. 15.61).

Клетки млекопитающих также используют такую стратегию для предотвращения пересечения между MAP-киназными модулями. В этих клетках могут одновременно функционировать по крайней мере 5 параллельных MAP-киназных модулей.

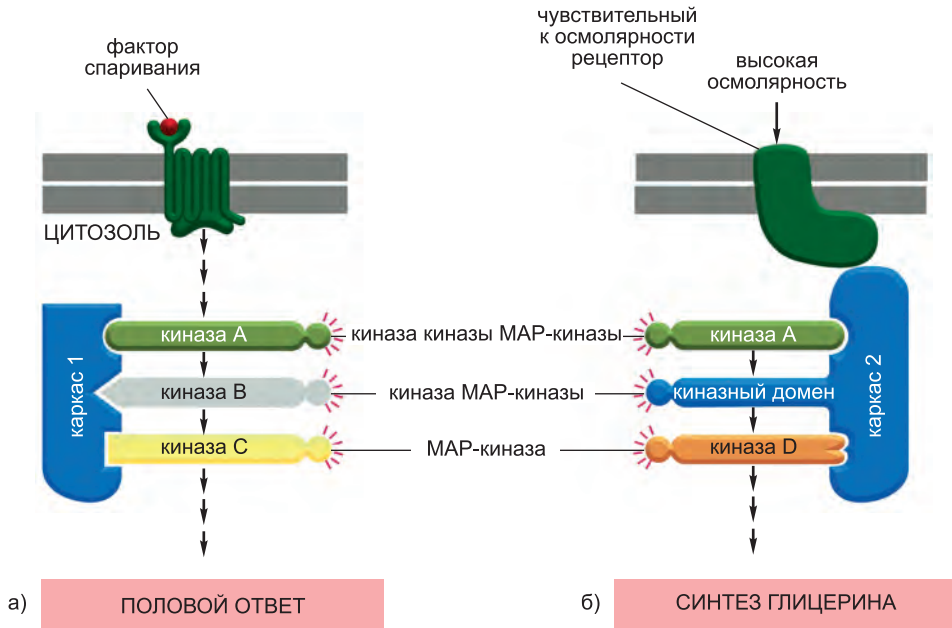


Рис. 15.61. Устройство двух MAP-киназных модулей на каркасных белках в почкующихся дрожжах. В почкующихся дрожжах содержится по крайней мере шесть трехкомпонентных MAP-киназных модулей, участвующих в различных биологических процессах, включая два проиллюстрированных здесь примера — ответы на фактор спаривания и высокую осмоларность. (а) Половой ответ запускается, когда GPCR связывается фактор спаривания, секретированный дрожжевой клеткой противоположного типа спаривания. G-белок активируется, и его $\beta\gamma$ -комплекс опосредованно активирует киназу киназы MAP-киназы (киназу А), которая затем передает сигнал дальше. Активированная MAP-киназа (киназа С) фосфорилирует и, следовательно, активирует несколько белков, опосредующих половой ответ, при котором дрожжевая клетка перестает делиться и подготавливается к слиянию. Три киназы данного модуля связаны с каркасным белком 1. (б) При втором ответе дрожжевая клетка подвергается воздействию окружающей среды с высокой осмоларностью, что приводит к синтезу глицерина для увеличения внутренней осмоларности. Ответ опосредуется трансмембранным чувствительным к осмоларности рецепторным белком и MAP-киназным модулем, связанным со вторым каркасным белком. (Обратите внимание, что в данном модуле киназный домен каркасного белка 2 служит киназой MAP-киназы.) Несмотря на то что в обоих модулях используется одна и та же киназа киназы MAP-киназы (киназа А, зеленая), пересечения между модулями не происходит, поскольку эти киназы связаны с различными каркасными белками, и осмосенсор связан с тем же каркасом, что и активируемая им киназа. Удивительно, но каркасный белок 1 будет функционировать, даже если его лишить (методами генной инженерии) способности выстраивать в ряд или аллостерически регулировать три связанные с ним киназы. По-видимому, его роль заключается лишь в сближении киназ и увеличении, таким образом, частоты их взаимодействий друг с другом, т. е. увеличении скорости реакции за счет связывания белков (см. рис. 3.80, в).

В этих модулях содержится не менее 12 MAP-киназ, 7 киназ MAP-киназ и 7 киназ киназ MAP-киназ. Два из этих модулей (оканчивающиеся на MAP-киназах JNK и p38) активируются различными клеточными стрессами, например УФ-радиацией, тепловым шоком и осмотическим стрессом, а также воспалительными цитокинами; другие MAP-киназные модули в основном опосредуют ответы на сигналы, приходящие от других клеток.

Несмотря на то что каркасные белки обеспечивают точность и препятствуют пересечениям, они ограничивают усиление и распространение сигнала в другие части клетки, поскольку для этого хотя бы несколько компонентов пути должны диффундировать (см. рис. 15.17). Неясно, насколько во время активации процесса отдельные компоненты MAP-киназного модуля способны диссоциировать от каркаса для усиления сигнала. Именно поэтому мы называем их модулями, а не каскадами.

15.3.8. Семейство GTPаз Rho функционально сопрягает поверхностные рецепторы с цитоскелетом

Помимо белков Ras, сигналы от поверхностных рецепторов передает другой класс GTPаз суперсемейства Ras — крупное **семейство Rho** (см. таблицу 15.5). Мономерные GTPазы семейства Rho регулируют актиновый цитоскелет и микротрубочки, контролируя форму, полярность, подвижность и адгезию клеток (см. главу 16); они также регулируют клеточный цикл, транскрипцию генов и мембранный транспорт. Они играют ключевую роль в направлении клеточной миграции и роста аксонов нервов, опосредуя ответы цитоскелета на активацию специальных рецепторов направления. Здесь мы сконцентрируемся на этой функции семейства Rho.

Лучше всего охарактеризованы три представителя семейства: сам **Rho**, **Rac** и **Cdc42**, каждый из которых влияет на несколько белков-мишеней. Как и в случае Ras, GEF активируют, а GAP инактивируют GTPазы семейства Rho; у человека обнаружено более 60 Rho-GEF и более 70 Rho-GAP. Некоторые из GEF и GAP специфичны к какому-либо определенному представителю семейства, тогда как другие менее специфичны. В отличие от Ras, которые связаны с мембраной даже в неактивном состоянии (при связанном GDP), неактивные GTPазы семейства Rho в цитозоле часто связаны с *ингибиторами диссоциации гуаниновых нуклеотидов* (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitors, *GDI*), не дающими GTPазам взаимодействовать с Rho-GEF в плазматической мембране.

Несмотря на то что поверхностные рецепторы активируют GTPазы Rho путем активации Rho-GEF, во многих случаях непонятно, как рецептор активирует GEF. Одним из исключений является RTK *Eph* (см. рис. 15.52) на поверхности двигательных нейронов, способствующий направлению мигрирующего кончика аксона (носящего названия *конуса роста*) к мышце-мишени. Связывание поверхностного белка *эфрина* активирует рецептор *Eph*, что приводит к разрушению (коллапсу) конуса роста. Это не дает аксону взаимодействовать с неправильными областями и удерживает его на правильном пути. Ответ зависит от белка Rho-GEF, носящего название *эфексина*, который связан с цитоплазматическим участком *Eph*-рецептора. Когда эфрин связывается с *Eph*-рецептором, рецептор активирует цитоплазматическую тирозинкиназу, фосфорилирующую эффексин по тирозину. Это усиливает способность эффексина активировать белок RhoA. Затем активированный RhoA (RhoA-GTP) регулирует различные белки-мишени, включая некоторые эффекторные белки, управляющие актиновым цитоскелетом и разрушающие конус роста (рис. 15.62).

Эфрины — это одни из наиболее подробно охарактеризованных *белков направления (белков-гидов)*. Они выполняют множество функций как в нервной системе, так и за ее пределами. Например, одна из их функций заключается в создании нервной «карты» зрительного поля мозга (см. главу 22). Но направление роста аксона — это сложная задача, и для ее решения привлекаются и другие рецепторы направления (см. главу 22). Однако считают, что все эти рецепторы направляют движение клеток, воздействуя на цитоскелет, т.е. посредством представителей семейства Rho.

Теперь, когда мы обсудили, как RTK используют GEF и мономерные GTPазы для передачи сигнала в клетку, рассмотрим вторую используемую RTK стратегию, зависящую от совсем других внутриклеточных механизмов передачи.

15.3.9. PI3-киназа создает в плазматической мембране липидные сайты докинга

Как упоминалось выше, одним из белков, связывающихся с внутриклеточным хвостом молекул RTK, является связанный с плазматической мембраной фермент **фосфоинозитид-3-киназа (PI3-киназа)**. Эта киназа фосфорилирует липиды, а не белки и активируется RTK или GPCR. Она играет центральную роль в выживании и росте клеток.

Фосфатидилинозитол (PI) является уникальным мембранным липидом, поскольку он может быть обратимо фосфорилирован по нескольким сайтам на его инозитольной головке с образованием многочисленных фосфорилированных PI-липидов **фосфоинозитидов** (см. рис. 15.37). Активированная PI3-киназа катализирует фосфорилирование по третьему положению инозитольного кольца с образованием нескольких фосфоинозитидов (рис. 15.63). Наиболее важным является синтез $PI(3,4,5)P_3$, поскольку этот липид может служить сайтом докинга для различных внутриклеточных сигнальных белков, собирающихся в сигнальные комплексы и передающих сигнал от цитоплазматической поверхности плазматической мембраны в клетку (см. рис. 15.21, в).

Обратите внимания на различие между описанным здесь использованием фосфоинозитидов и описанным ранее, при котором $PI(4,5)P_2$ расщепляется ферментами PLC β (в случае GPCR) или PLC γ (в случае RTK) с образованием растворимого IP_3 и мембраносвязанного диацилглицерина (см. рис. 15.38 и 15.39). Здесь $PI(3,4,5)P_3$ не расщепляется PLC. Он синтезируется из $PI(4,5)P_2$ и остается в плазматической мембране до тех пор, пока специфические *фосфоинозитидфосфатазы* его не дефосфорилируют. Одной из наиболее важных фосфоинозитидфосфатаз является PTEN, которая дефосфорилирует положение 3 инозитольного кольца. Мутации PTEN характерны для многих видов рака: продолжительная сигнализация PI3-киназы способствует неконтрольному росту клеток.

Существуют различные типы PI3-киназ. PI3-киназы, активируемые RTK и GPCR, принадлежат к классу I. Они представляют собой гетеродимеры, состоящие из общей для всех каталитической субъединицы и различных регуляторных субъединиц. RTK активируют *класс Ia PI3-киназ*, в которых регуляторная субъединица представляет собой адаптерный белок, связывающий посредством двух SH2-доменов два фосфотирозина на активированном RTK (см. рис. 15.55, а). GPCR активируют *класс Ib PI3-киназ*, регуляторные субъединицы которых связывают $\beta\gamma$ -комплекс активированного тримерного G-белка при активации GPCR

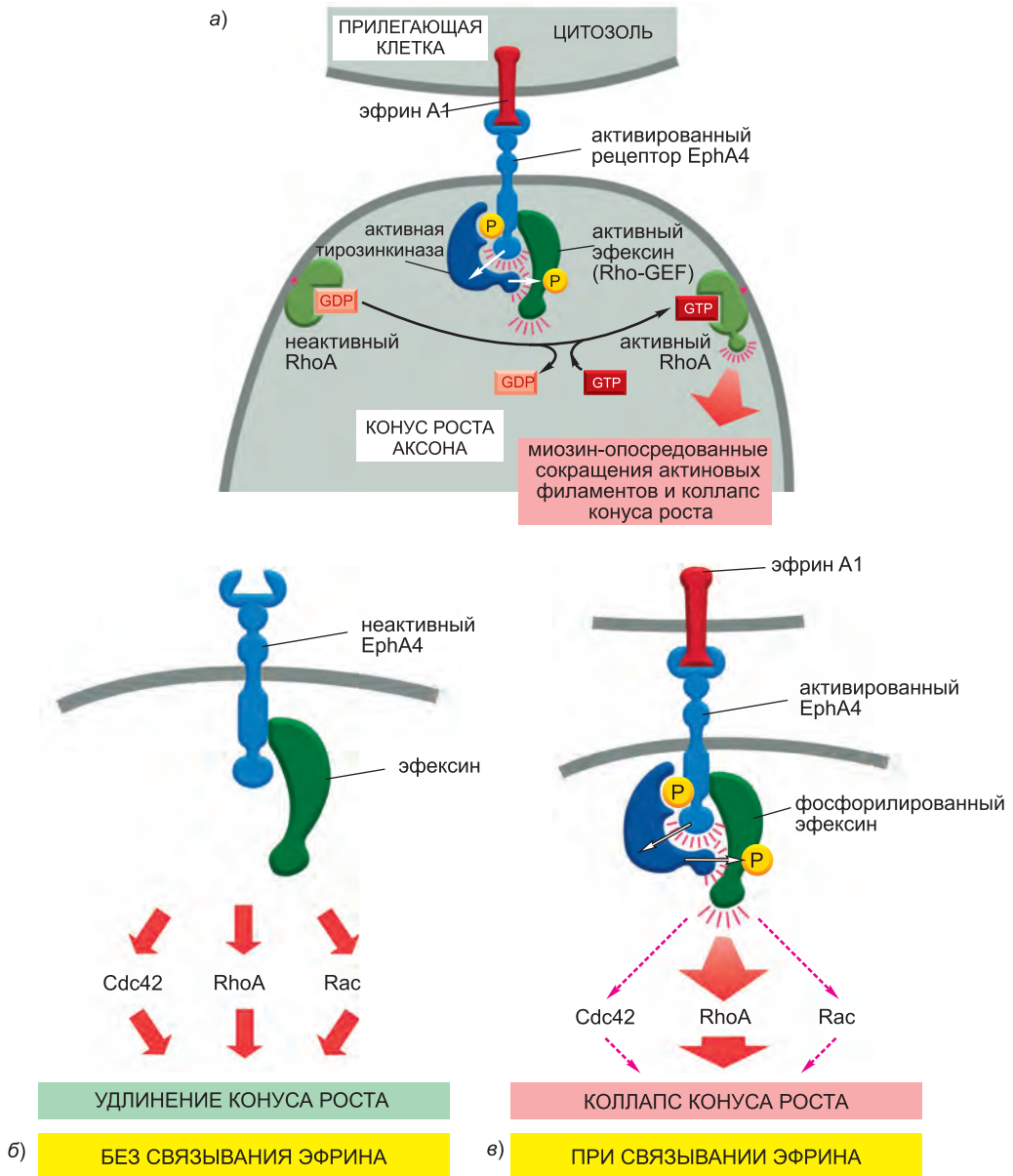


Рис. 15.62. Коллапс конуса роста, опосредованный GTPазами семейства Rho. (а) Связывание трансмембранного белка эфрина A1 на соседней клетке активирует RTK EphA4 на конусе роста аксона по механизму, представленному на рис. 15.53, а. Фосфотирозины активированного рецептора Eph рекрутируют и активируют цитоплазматическую тирозинкиназу, которая фосфорилирует связанный с рецептором Rho-GEF эффектин. Это усиливает способность эффектина активировать GTPазу RhoA. Затем RhoA индуцирует коллапс конуса роста путем стимуляции миозин-зависимых сокращений актинового цитоскелета. (б) Когда эфрин A1 не связан с рецептором EphA4, эффектин в равной степени активирует трех различных представителей семейства Rho (Cdc42, Rac и RhoA), что способствует дальнейшему продвижению конуса роста. (в) Связывание эфрина A1 с EphA4 изменяет активность эффектина таким образом, что он начинает активировать в основном RhoA, что приводит к коллапсу конуса роста.

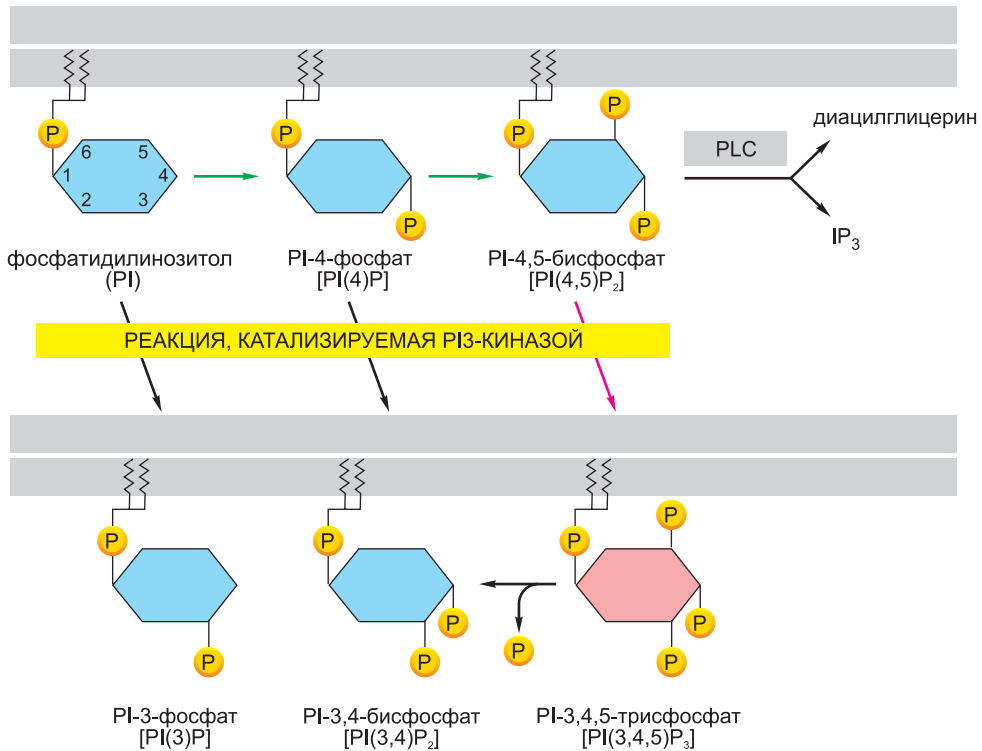


Рис. 15.63. Образование фосфоинозитидных сайтов докинга PI3-киназой. PI3-киназа фосфорилирует инозитольное кольцо по атому углерода 3 с образованием фосфоинозитидов, показанных внизу рисунка (в результате чего они уходят с пути, ведущего к IP₃ и диацилглицерину). Наиболее важным актом фосфорилирования (показан красным) является превращение PI(4,5)P₂ в PI(3,4,5)P₃. PI(3,4,5)P₃ может служить сайтом докинга для сигнальных белков, несущих RPR₃-связывающий домен. Другие инозитол-фосфолипидные киназы катализируют акты фосфорилирования, показанные зеленым.

внеклеточным лигандом. Связывание этих киназ с Ras может активировать общую для класса I каталитическую субъединицу.

Внутриклеточные сигнальные белки связываются с PI(3,4,5)P₃, синтезированным активированной PI3-киназой, посредством специфического домена взаимодействия, например, упоминавшегося ранее **домена гомологии к плекстрину (РН-домена)**, который впервые обнаружен в тромбоцитарном белке плекстрине. РН-домены в основном выполняют функцию межбелковых доменов взаимодействия. Малая их часть связывает RPR₃; некоторые из них, помимо RPR₃, также узнают специфический мембраносвязанный белок, что значительно увеличивает специфичность их связывания и помогает объяснить, почему не все сигнальные белки, несущие RPR₃-связывающий домен, взаимодействуют с сайтами PI(3,4,5)P₃. РН-домены встречаются примерно в 200 человеческих белках, включая рассмотренный ранее Ras-GEF Sos (см. рис. 15.22).

Одним особенно важным белком, несущим РН-домен, является серин-треониновая протеинкиназа *Akt*. *Сигнальный путь PI3-киназа-Akt* — это основной путь, активируемый гормоном *инсулином*. Он также играет ключевую роль в выживании и росте клеток многих типов позвоночных и беспозвоночных, что мы и обсудим дальше.

15.3.10. Сигнальный путь PI3-киназа-Akt стимулирует выживание и рост животных клеток

Чтобы многоклеточный организм вырос, его клетки должны накапливать массу и увеличиваться в размерах. Если клетки будут просто делиться без роста, они будут становиться все меньше, и размер целого организма меняться не будет. Как обсуждалось ранее, для роста, деления и выживания животных клеток обычно требуются внеклеточные сигналы (см. рис. 15.8). Представители семейства сигнальных белков *инсулиноподобных факторов роста (IGF)*, например, стимулируют выживание и рост различных типов животных клеток. Они связывают специфические RTK (см. рис. 15.52), активирующие PI3-киназу, синтезирующую $PI(3,4,5)P_3$. PIP_3 рекрутирует к плазматической мембране две несущие PH-домены протеинкиназы — **Akt** (также известную как *протеинкиназа B*, или *PKB*) и *фосфоинозитид-зависимую протеинкиназу 1* (Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1, *PDK1*), что приводит к активации Akt (рис. 15.64). Активированная Akt фосфорилирует различные белки-мишени плазматической мембраны, цитозоля и ядра. В основном, действие Akt заключается в инактивации белков, но в результате это приводит к усилению выживания и роста клеток.

Например, Akt фосфорилирует цитоплазматический белок, носящий название *Bad*, который в нефосфорилированном состоянии стимулирует апоптоз — запрограммированную клеточную смерть (см. главу 18). Фосфорилирование Bad киназой Akt создает фосфосериновые сайты связывания каркасного белка *14-3-3*, который депонирует фосфорилированный Bad и блокирует его. В результате происходит стимуляция выживания клеток (см. рис. 15.64).

Сигнальный путь PI3-киназа-Akt сигнализирует клетке расти посредством более сложного механизма, зависящего от крупной серин-треониновой киназы **TOR** (*Target of Rapamycin* — мишень *рапамицина*, бактериального токсина, инактивирующего эту киназу и используемого в медицине в качестве иммуносупрессора и противоракового лекарства). TOR обнаружили в дрожжах при генетическом скрининге в поисках устойчивости к рапамицину; в клетках млекопитающих она называется **mTOR**. TOR в клетках существует в двух функционально различных мультибелковых комплексах. В клетках млекопитающих *mTOR-комплекс 1* содержит белок *raptor*; этот комплекс чувствителен к рапамицину и стимулирует рост клеток, способствуя синтезу рибосом и белков и ингибируя деградацию белков. Комплекс 1 также способствует росту и выживанию клеток за счет стимуляции захвата питательных веществ и метаболизма. *mTOR-комплекс 2* содержит белок *ricator* и не чувствителен к рапамицину; он способствует активации Akt (см. рис. 15.64) и регулирует актиновый цитоскелет через Rho-семейство GTPаз.

mTOR-комплекс 1 обрабатывает входящие сигналы от нескольких источников, включая внеклеточные сигнальные белки *факторы роста* и питательные вещества, например аминокислоты, способствующие активации mTOR и стимулирующие рост клеток. Факторы роста активируют mTOR, как правило, в сигнальном пути PI3-киназа-Akt. Akt опосредованно активирует mTOR комплекса 1 путем фосфорилирования и, следовательно, ингибирования белка GAP, носящего название Tsc2. Tsc2 воздействует на мономерную родственную Ras GTPазу **Rheb** (см. таблицу 15.5, стр. 926). В активной форме Rheb (Rheb-GTP) активирует mTOR. Таким образом, Akt активирует mTOR и способствует росту клеток (рис. 15.65). Мы рассмотрим, как mTOR стимулирует синтез рибосом и белков в главе 17 (см. рис. 17.65).

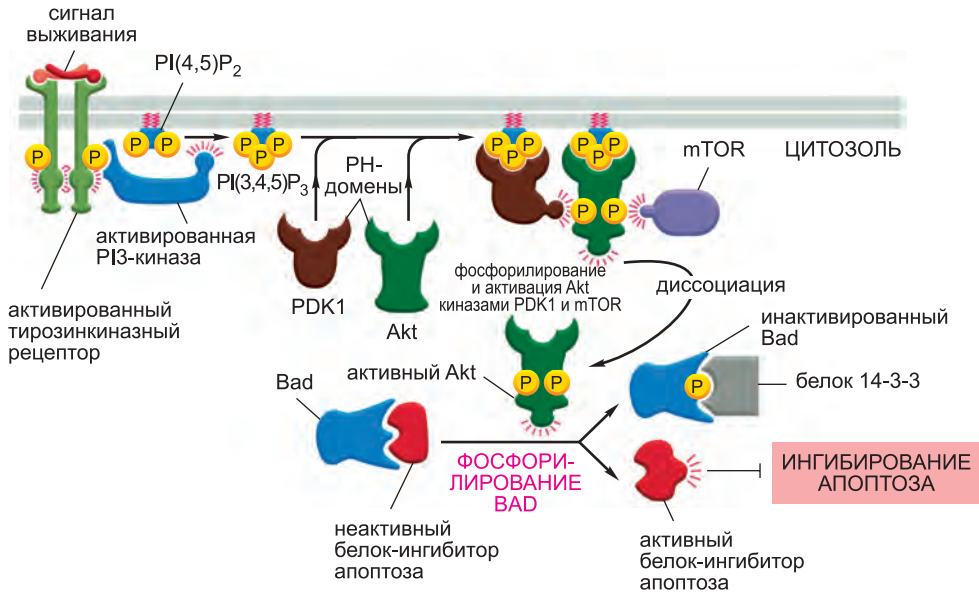


Рис. 15.64. Один из путей стимуляции выживания клеток PI3-киназой. Внеклеточный сигнал выживания активирует RTK, которая рекрутирует и активирует PI3-киназу. PI3-киназа синтезирует PI(3,4,5)P₃, который служит сайтом докинга двух серин-треониновых киназ, несущих PH-домены Akt и фосфоинозитол-зависимой киназы PDK1. В результате эти киназы сближаются около плазматической мембраны. Akt фосфорилируется по серину третьей киназой (обычно mTOR), которая изменяет конформацию Akt таким образом, что PDK1 теперь может фосфорилировать Akt по треонину и активировать ее. Активированная Akt диссоциирует от плазматической мембраны и фосфорилирует различные белки-мишени, включая белок Bad. Нефосфорилированный Bad удерживает один или несколько белков-ингибиторов апоптоза (семейства Bcl2 — см. главу 18) в неактивном состоянии. После фосфорилирования Bad высвобождает ингибиторные белки, которые начинают блокировать апоптоз и стимулировать таким образом выживание клетки. Как показано, фосфорилированный Bad связывается с универсальным цитоплазматическим белком 14-3-3, который блокирует активность Bad.

15.3.11. Сигнальные пути, активируемые RTK и GPCR, пересекаются

Ранее упоминали, что RTK и GPCR активируют несколько общих внутриклеточных сигнальных путей. Например, оба типа рецепторов могут активировать инозитолфосфолипидный путь, запускаемый фосфолипазой C. Более того, даже если они активируют разные пути, эти пути могут пересекаться на некоторых белках-мишенях. На **рис. 15.66** показаны оба типа сигнальных пересечений и суммированы пять параллельных внутриклеточных сигнальных путей, которые мы обсудили: один из них запускается GPCR, два — RTK и два — обоими типами рецепторов.

15.3.12. Активность связанных с тирозинкиназами рецепторов зависит от цитоплазматических тирозинкиназ

Активность многих поверхностных рецепторов зависит от фосфорилирования по тирозину, несмотря на то что сами эти рецепторы не несут собственного тирозинкиназного домена. Они зависят от **цитоплазматических тирозинкиназ**, которые связываются с рецепторами и фосфорилируют различные белки-мишени, включая

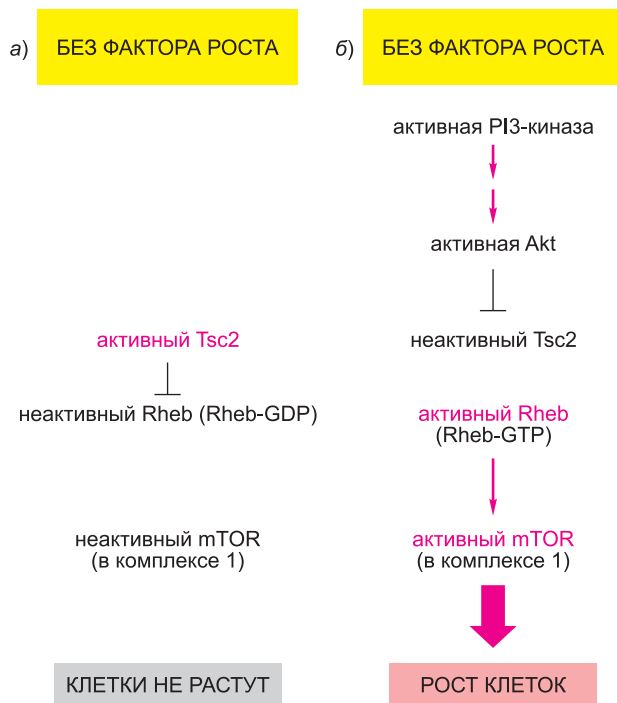


Рис. 15.65. Активация mTOR в сигнальном пути PI3-киназа-Akt. (а) В отсутствие внеклеточных факторов роста Tsc2 (Rheb-GAP) блокирует Rheb; mTOR-комплекс 1 неактивен, и клетки не растут. (б) В присутствии факторов роста активированная Akt фосфорилирует и ингибирует Tsc2, способствуя активации Rheb. Активированный Rheb (Rheb-GTP) стимулирует активацию mTOR-комплекса 1, который в свою очередь способствует росту клеток. На рис. 15.64 показано, как факторы роста (или сигналы выживания) активируют Akt.

MAP-киназа Erk (см. рис. 15.60) также может фосфорилировать и ингибировать Tsc2 и, следовательно, активировать mTOR. Таким образом, сигнальные пути PI3-киназа-Akt и Ras-MAP-киназа сливаются на mTOR комплекса 1 и стимулируют рост клеток.

Tsc2 — это сокращение от tuberous sclerosis protein 2 (белок туберозного склероза 2). Tsc2 и Tsc1 образуют гетеродимер (не показано); название этих белков объясняется тем, что мутации

в каком-либо из их генов приводит к развитию генетического заболевания *туберозного склероза*, при котором в мозге и других частях тела образуются доброкачественные опухоли, содержащие очень крупные клетки.

несущие лиганд рецепторы. Таким образом, механизм действия **связанных с тирозинкиназами рецепторов** похож на механизм действия RTK, за исключением того, что их киназный домен кодируется другим геном и нековалентно связан с полипептидной цепью рецептора. К данной категории рецепторов относятся разнообразные классы белков, включая рецепторы антигенов и интерлейкинов лимфоцитов (см. главу 25), рецепторы интегринов (см. главу 19) и рецепторы различных цитокинов и некоторых гормонов. Как и RTK, многие рецепторы этого типа либо исходно образуют димеры (**рис. 15.67**) либо димеризуются при связывании лиганда.

Некоторые рецепторы данного типа зависят от представителей самого крупного семейства цитоплазматических тирозинкиназ млекопитающих — **семейства Src** (см. рис. 3.10 и 3.69), в которое входят *Src*, *Yes*, *Fgr*, *Fyn*, *Lck*, *Lyn*, *Hck* и *Blk*. Все эти протеинкиназы несут домены SH2 и SH3 и располагаются на цитоплазматической стороне плазматической мембраны, где они удерживаются частично за счет взаимодействия с трансмембранными рецепторами, частично — за счет ковалентного связывания с липидными цепями. Различные представители семейства связаны с различными рецепторами и фосфорилируют перекрывающиеся, но разграниченные наборы белков-мишеней. Например, *Lyn*, *Fyn* и *Lck* характерны для лимфоцитов, но связываются с различными наборами рецепторов (см. главу 25). В любом случае киназа активируется, когда внеклеточный лиганд связывается с соответствующим рецепторным белком. *Src* и некоторые другие члены семейства способны также

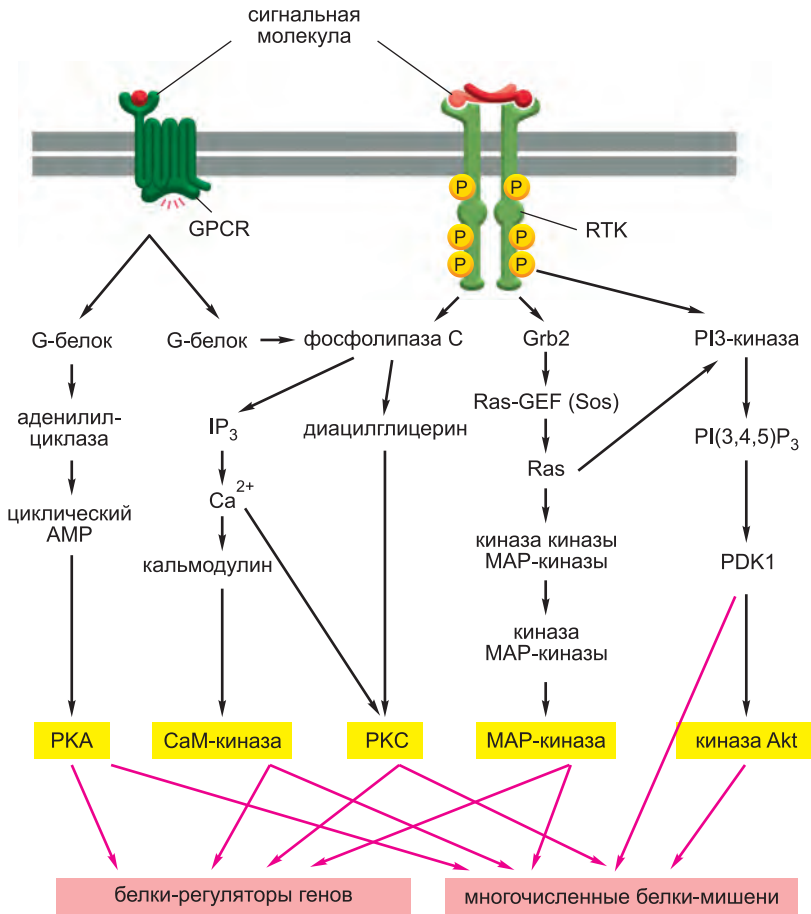


Рис. 15.66. Пять параллельных внутриклеточных сигнальных путей, активируемых RTK и GPCR. В данном гипотетическом примере пять киназ (желтые) в конце каждого сигнального пути фосфорилируют белки-мишени (красные), многие из которых фосфорилируются несколькими киназами. Фосфолипазы C, активируемые двумя типами рецепторов, относятся к разным типам: GPCR активируют PLC β , а RTK — PLC γ (не показано). Некоторые GPCR также могут активировать Ras, но делают это независимо от Grb2 посредством Ras-GEF, активируемого Ca²⁺ и диацилглицерином (не показано).

связывать активированные RTK; в этом случае рецептор и цитоплазматическая киназа стимулируют каталитическую активность друг друга, что приводит к усилению сигнала и увеличению его продолжительности (см. рис. 15.62). Некоторые G-белки (G_s и G_i) также способны активировать Src — это один из механизмов, благодаря которым активность GPCR может приводить к фосфорилированию по тирозину внутриклеточных сигнальных белков и белков-эффекторов.

Другой тип цитоплазматических тирозинкиназ связывается с интегринами — основными рецепторами, служащими для связывания клетки с внеклеточным матриксом (см. главу 19). Связывание компонентов матрикса с интегринами активирует внутриклеточные сигнальные пути, изменяющие поведение клетки. Когда интегрины образуют кластеры в местах контакта с матриксом, они способствуют инициации сборки фокальных контактов — участков адгезии между матриксом и клеткой.

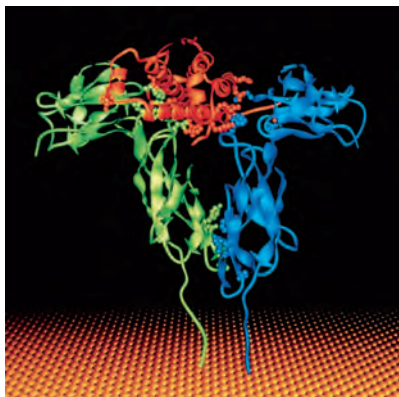


Рис. 15.67. Трехмерная структура связанного с рецептором человеческого гормона роста. Рецептор представляет собой гомодимер, и гормон (красный) связывается с обеими субъединицами (одна показана синим, вторая — зеленым), узнающими различные участки мономерного гормона. Предположительно докинг гормона приводит к перестройке субъединиц и активации цитоплазматической тирозинкиназы, связанной с цитозольными доменами рецептора (не показано). Представленная на рисунке структура расшифрована посредством рентгеновской кристаллографии комплексов, образующихся между гормоном и полученными методами рекомбинантных ДНК внеклеточными доменами рецептора. (Из A. M. deVos, M. Ultsch and A. A. Kossiakoff, *Science* 255: 306–312, 1992. С любезного разрешения издательства AAAS.)

В эти сайты рекрутируются белки, среди них цитоплазматическая тирозинкиназа **киназа фокальной адгезии** (*Focal Adhesion Kinase*, **FAK**), которая при помощи других белков связывает цитоплазматический домен одной из субъединиц интегринов. В кластере молекулы FAK перекрестно фосфорилируют друг друга, создавая фосфотирозиновые сайты докинга для киназы Src. Затем Src и FAK фосфорилируют друг друга и другие белки, рекрутируемые к месту контакта, включая сигнальные белки RTK. Таким образом, две тирозинкиназы сигнализируют клетке о том, что она прикрепилась к подходящему субстрату, где она может функционировать, расти, делиться, мигрировать и так далее.

Самым крупным и наиболее разнообразным классом рецепторов, передача сигналов в клетку которыми зависит от цитоплазматических тирозинкиназ, являются *рецепторы цитокинов*, которые мы рассмотрим дальше.

15.3.13. Рецепторы цитокинов активируют сигнальный путь JAK-STAT, создавая быстрый путь в ядро

Крупное семейство **рецепторов цитокинов** включает в себя рецепторы разнообразных локальных медиаторов (объединенных названием *цитокины*) и рецепторы некоторых гормонов, например *гормона роста* (см. рис. 15.67) и *пролактина*. Эти рецепторы связаны с цитоплазматическими тирозинкиназами, носящими название **янус-киназ** (*Janus Kinases*, **JAK**) в честь двуликого римского бога. JAK фосфорилируют и активируют белки-регуляторы генов **STAT** (*Signal Transducers and Activators of Transcription* — *переносчики сигнала и активаторы транскрипции*). Белки STAT расположены в цитозоле, и их часто называют *латентными белками-регуляторами генов*, поскольку они мигрируют в ядро и регулируют транскрипцию генов только после активации.

Несмотря на то что многие внутриклеточные сигнальные пути ведут от поверхностных рецепторов в клеточное ядро, где они изменяют транскрипцию генов (см. рис. 15.66), **сигнальный путь JAK-STAT** является одним из наиболее прямых. Рецепторы цитокинов представляют собой димеры или тримеры, связанные с одной или двумя известными JAK (JAK1, JAK2, JAK3 или Tyk2). Связывание цитокина приводит к сближению двух JAK и их взаимному фосфорилированию, что усиливает активность их тирозинкиназных доменов. Затем JAK фосфорилируют тирозины на рецепторах цитокинов, создавая фосфотирозиновые сайты докинга для STAT

(рис. 15.68). С некоторыми из этих сайтов также могут связываться адаптерные белки, сопрягая рецепторы цитокинов с рассмотренным ранее Ras-МАР-киназным сигнальным путем, но здесь мы на этом останавливаться не будем.

Существует по крайней мере шесть STAT млекопитающих. Все они несут домен SH2, выполняющий две функции. Во-первых, он опосредует связывание белка STAT с фосфотирозиновым сайтом докинга на активированном рецепторе цитокина. После связывания JAK фосфорилирует STAT по тирозинам, и STAT диссоциирует от рецептора. Во-вторых, домен SH2 на высвобожденном STAT опосредует его связывание с фосфотирозином на другой молекуле STAT с образованием гомодимера или гетеродимера. Затем димер STAT переносится в ядро, где он вместе с другими белками-регуляторами генов связывает специфическую последовательность ДНК в различных генах и стимулирует их транскрипцию (см. рис. 15.68). Например, в ответ на гормон пролактин, стимулирующий образование молока в клетках грудных желез, активированный STAT инициирует транскрипцию генов, кодирующих белки молока. В таблице 15.6 перечислено более 30 цитокинов и гормонов, активирующих сигнальный путь JAK-STAT за счет связывания рецепторов цитокинов; также в таблице приведены названия участвующих в процессе JAK и STAT.

Некоторые белки STAT также несут SH2-домен, позволяющий им присоединяться к определенным фосфотирозинам на активированных RTK. Эти рецепторы способны напрямую активировать связанные STAT независимо от JAK. Нематода *C. elegans* использует STAT для сигнализации, но не синтезирует JAK или рецепторы цитокинов. Это указывает на то, что STAT эволюционировали раньше, чем JAK и цитокиновые рецепторы.

Опосредованные сигнальным путем JAK-STAT ответы регулируются отрицательными обратными связями. Помимо активации генов, кодирующих белки ответа на цитокины, димеры STAT могут также активировать гены, кодирующие ингибиторные белки, способствующие затуханию ответа. Некоторые из этих белков присоединяют и инактивируют фосфорилированные JAK и связанные с ними рецепторы, другие связывают фосфорилированные димеры STAT и не дают им связываться с ДНК-мишенями. Однако таких отрицательных обратных связей недостаточно для отключения ответа. Для полной инактивации активированных JAK и STAT необходимо дефосфорилирование их фосфотирозинов.

15.3.14. Тирозинфосфатазы снимают фосфорилирование по тирозинам

Во всех сигнальных путях, в которых используется фосфорилирование по тирозинам, дефосфорилирование производится **тирозинфосфатазами**. Фосфатазы играют не меньшую роль в процессе сигнализации, чем тирозинкиназы, присоединяющие фосфат. Если всего несколько типов *серин-треониновых протеинфосфатазных каталитических субъединиц* удаляют фосфатные группы с фосфорилированных серинов и треонинов, то в человеческом геноме кодируется около 100 тирозинфосфатаз, включая *фосфатазы двойной специфичности*, которые также дефосфорилируют серины и треонины.

Как и тирозинкиназы, тирозинфосфатазы бывают цитоплазматическими и трансмембранными, причем ни те, ни другие структурно не родственны серин-треониновым протеинфосфатазам. Предполагают, что некоторые трансмембранные фосфатазы служат поверхностными рецепторами, но так как эта точка зрения

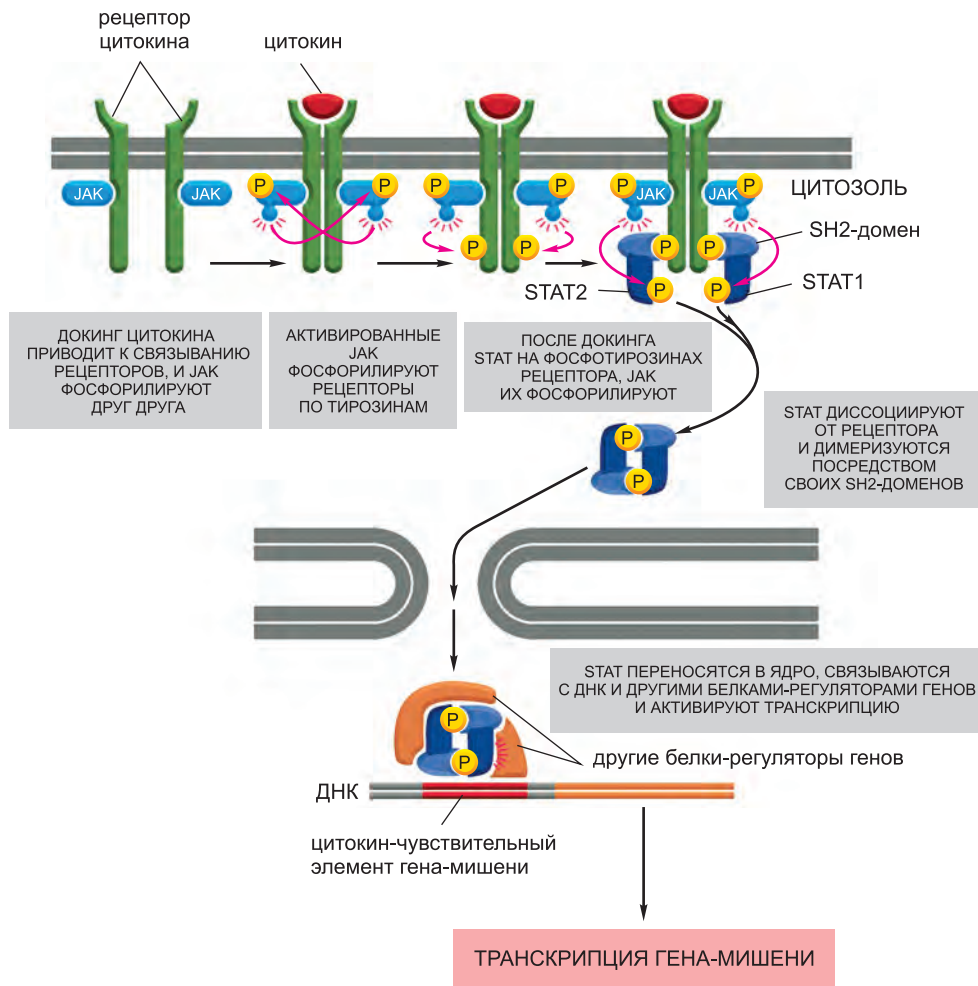


Рис. 15.68. Активируемый цитокинами сигнальный путь JAK-STAT. Связывание цитокина приводит к димеризации двух полипептидных цепей рецепторов (как показано) или вызывает изменение ориентации рецепторных цепей в существующем димере. В любом случае, связанные JAK сближаются и перекрестно фосфорилируют друг друга по тирозинам, в результате чего запускается процесс сигнализации. В некоторых случаях активный рецептор представляет собой тример, а не димер.

не является общепринятой, их обычно называют рецептор-подобными тирозинфосфатазами.

В отличие от серин-треониновых протеинфосфатаз, которые обычно обладают широкой специфичностью, большинство тирозинфосфатаз высокоспецифичны по отношению к своим субстратам и удаляют фосфатные группы только с определенных фосфотирозинов ограниченного набора белков. Благодаря фосфатазам фосфорилирование по тирозинам продолжается недолго, и его уровень в покоящейся клетке очень низок. Однако они не просто непрерывно противодействуют активности тирозинкиназ; часто благодаря регуляции они функционируют при сигнализации или в цикле клеточного деления (см. главу 17) только в определенное время и в определенном месте.

Таблица 15.6. Некоторые внеклеточные сигнальные белки, действующие через рецепторы цитокинов и сигнальный путь JAK-STAT

Сигнальный белок	Связанный с рецептором JAK	Активируемые STAT	Некоторые ответы
γ-интерферон α-интерферон	JAK1 и JAK2 Tyk2 и JAK2	STAT1 STAT1 и STAT2	активация макрофагов повышение устойчивости клеток к вирусной инфекции
Эритропоэтин	JAK2	STAT5	стимуляция образования эритроцитов
Пролактин	JAK1 и JAK2	STAT5	стимуляция образования молока
Гормон роста	JAK2	STAT1 и STAT5	стимуляция роста за счет инициации синтеза IGF1
GM-CSF	JAK2	STAT5	стимуляция образования гранулоцитов и макрофагов

Обсудив ключевую роль фосфорилирования и дефосфорилирования по тирозинам во внутриклеточных сигнальных путях, активируемых многочисленными сопряженными с ферментами рецепторами, обратимся к классу рецепторов, зависящих исключительно от серин-треонинового фосфорилирования. *Рецепторные серин-треониновые киназы* активируют еще более быстрый сигнальный путь в ядро, чем путь JAK-STAT. Они напрямую фосфорилируют латентные белки-регуляторы генов *Smads*, которые затем переносятся в ядро и активируют транскрипцию.

15.3.15. Действие сигнальных белков суперсемейства TGFβ опосредовано рецепторными серин-треониновыми киназами и белками Smads

Суперсемейство трансформирующего фактора роста-β (*Transforming Growth Factor-β*, TGFβ) состоит из большого числа (30–40 у человека) структурно родственных секретируемых димерных белков. Они служат гормонами или, чаще, локальными медиаторами и регулируют широкий спектр биологических функций во всех животных. Во время развития они регулируют образование трехмерных структур и влияют на различные аспекты поведения клетки, включая пролиферацию, специализацию и дифференциацию, синтез внеклеточного матрикса и клеточную смерть. У взрослых особей они участвуют в восстановлении тканей и иммунной регуляции, а также во многих других процессах. Суперсемейство включает в себя семейство TGFβ/*активин* и более крупное семейство *костных морфогенных белков* (*Bone Morphogenic Protein*, BMP).

Действие всех белков суперсемейства опосредовано сопряженными с ферментами рецепторами, представляющими собой однопроходные трансмембранные белки с серин-треониновым киназным доменом на цитоплазматической стороне плазматической мембраны. Существует два класса **рецепторных серин-треониновых киназ**: *тип I* и *тип II*. Эти типы структурно родственны и являются гомодимерами. Представители суперсемейства TGFβ связываются с характерной парой димерных рецепторов типа I и типа II, что приводит к сближению киназных доменов и фосфорилированию и активации рецептором типа II рецептора типа I. Таким образом, образуется активный тетрамерный рецепторный комплекс.

Стратегия быстрой передачи сигнала в ядро активным комплексом очень похожа на путь JAK-STAT цитокиновых рецепторов. Активированный рецептор типа I напрямую связывает и фосфорилирует латентный белок-регулятор гена **семейства Smad** (названного так в честь первых двух идентифицированных белков семейства — Sma из *C. elegans* и Mad из *Drosophila*). Активированные рецепторы TGF β /активин фосфорилируют Smad2 и Smad3, а активированные рецепторы BMP — Smad1, Smad5 или Smad8. Фосфорилированные *рецептор-активированные Smad* (R- Smad) диссоциируют от рецептора и связываются со Smad4 (также известным как *co-Smad*), который способен образовывать комплекс с любым из пяти R- Smad. Затем комплекс Smad переносится в ядро, где он связывается с другими белками-регуляторами генов и регулирует транскрипцию специфичных генов-мишеней (**рис. 15.69**). Поскольку ядерные белки-партнеры могут быть разными в зависимости от типа клетки и ее состояния, гены-мишени также варьируют.

Активированные рецепторы TGF β и связанные с ними лиганды эндоцитируются по двум механизмам, один из которых ведет к их активации, а второй — к инактивации. Путь активации зависит от клатриновых везикул и ведет в ранние эндосомы (см. главу 13), где происходит активация большинства Smad. Якорный белок *SARA* (*Smad Anchor for Receptor Activation* — якорь Smad для активации рецептора) играет важную роль в этом пути: его много в ранних эндосомах, и он связывает активированные рецепторы TGF β и Smad, увеличивая эффективность рецептор-опосредованного фосфорилирования Smad. Путь инактивации зависит от *кавеол* (см. главу 13) и приводит к убиквитинированию и деградации рецепторов в протеасомах.

Некоторые представители суперсемейства TGF β в процессе развития служат градиентными морфогенами, вызывая в клетке различные ответы в зависимости от своей концентрации (см. рис. 15.10 и главу 22). Их эффективная внеклеточная концентрация часто регулируется секретируемыми ингибиторными белками, которые напрямую связываются с сигнальными молекулами и не дают им активировать рецепторы клетки-мишени. Белки *noggin* (ноггин) и *chordin* (хордин), например, ингибируют BMP, а *фоллистатин* ингибирует активины. Некоторые ингибиторы, как и большинство представителей семейства TGF β , секретируются в форме неактивных предшественников, которые затем активируются посредством протеолитического расщепления.

В процессе ответа на сигнал Smad непрерывно перемещаются между цитоплазмой и ядром: в ядре они дефосфорилируются, что приводит к их экспорту в цитоплазму, где они рефосфорилируются активированными рецепторами. Таким образом, относительное воздействие на гены-мишени отражает концентрацию внеклеточного сигнала и время, в течение которого он взаимодействует с поверхностными рецепторами (часто несколько часов). В клетке, подвергаемой продолжительному воздействию морфогена или его высокой концентрации (или того и другого), будет включаться один набор генов, а в клетке, на которую морфоген действует в меньшей концентрации или меньшее время, — другой.

Как и в случае пути JAK-STAT, путь Smad регулируется отрицательными обратными связями. В состав генов-мишеней комплексов Smad входят гены, кодирующие *ингибиторные Smad* — Smad6 или Smad7. Smad7 (и, возможно, Smad6) связывается с активированным рецептором и ингибирует его сигнальную способность по крайней мере по трем механизмам: 1) он конкурирует с R- Smad за сайты связывания рецептора, снижая фосфорилирование R-Smad; 2) он рекру-

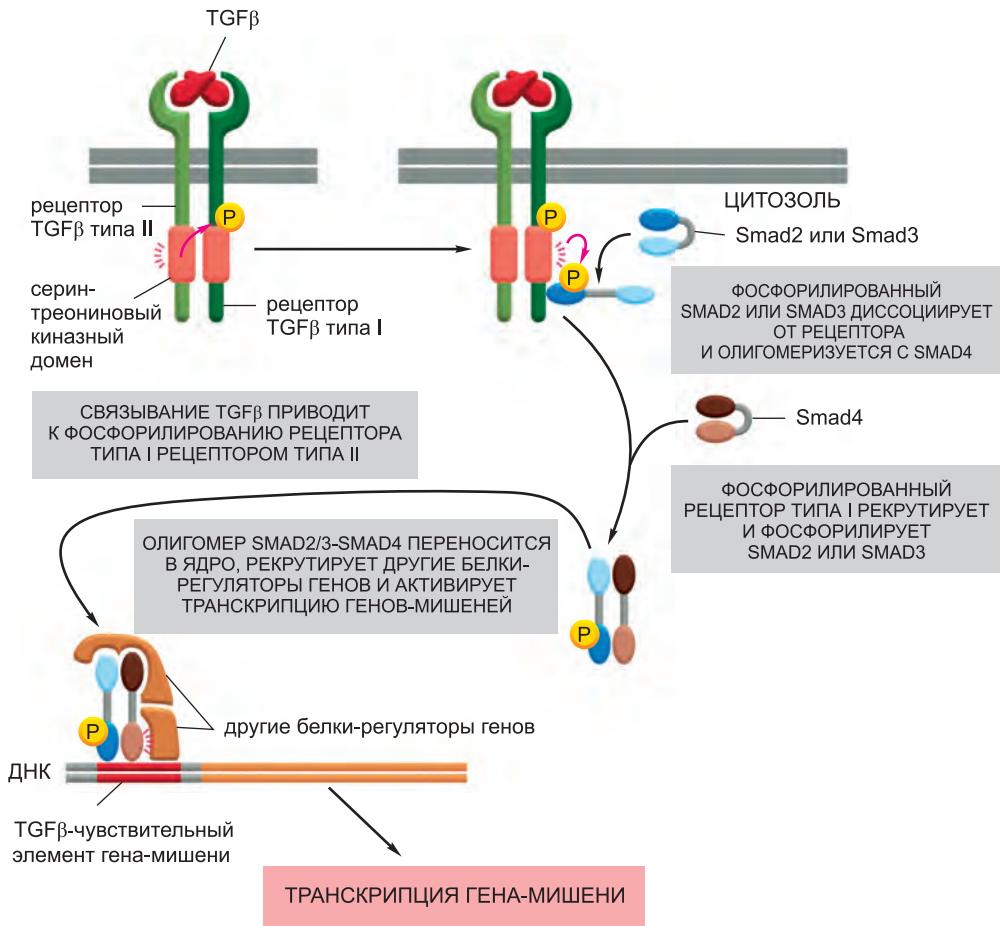


Рис. 15.69. Активируемый TGFβ Smad-зависимый сигнальный путь. Обратите внимание, что TGFβ — это димер, и что фосфорилированные Smad меняют конформацию, открывая поверхность димеризации. Для простоты на рисунке опущены следующие свойства пути. (1) Рецепторные белки типа I и типа II являются гомодимерами. (2) В норме рецепторы типа I связаны с ингибиторным белком, который диссоциирует, когда рецептор типа I фосфорилируется рецептором типа II. (3) Предполагают, что индивидуальные Smad являются тримерами. (4) В основном, якорный белок SARA способствует рекрутированию Smad2 или Smad3 к активированному рецептору типа I в эндосомах.

тирует убиквитинлигазу *Smurf*, которая убиквитинирует рецептор, что приводит к его интернализации и деградации (поскольку *Smurf* также убиквитинирует Smad и способствует их деградации, он называется *Smad Ubiquitylation Regulatory Factor* — регуляторным фактором убиквитинирования Smad, или *Smurf*); и (3) он рекрутирует протеинфосфатазу, которая дефосфорилирует и инактивирует рецептор. Более того, ингибиторные Smad связывают и ингибируют co-Smad (Smad4) либо за счет предотвращения его связывания с R-Smad, либо за счет стимуляции его убиквитинирования и деградации.

Несмотря на то что рецепторные серин-треониновые киназы в основном функционируют через путь Smad, они также способны влиять на другие внутриклеточные

сигнальные пути. Более того, сигнальные белки других путей могут фосфорилировать Smad и, таким образом, влиять на сигнализацию в пути Smad.

15.3.16. Структуры серин-треониновых и тирозиновых протеинкиназ похожи

Все рассмотренные нами сигнальные пути, активируемые GPCR и сопряженными с ферментами рецепторами, зависят от серин-треониновых и тирозиновых протеинкиназ. Эти киназы структурно родственны (рис. 15.70).

Сбивающая с толку запутанность пересекающихся и регулирующих друг друга сигнальных путей и обратных связей — это не просто случайный клубок, но высокоорганизованная система обработки и интерпретации невероятного объема сигналов, поступающих в животные клетки. Всю молекулярную регуляторную сеть, от рецепторов на поверхности клетки до генов в ядре, можно рассматривать как вычислительное устройство; и, как и другое вычислительное устройство — мозг, она ставит перед нами одни из самых сложных биологических вопросов. Мы можем идентифицировать составляющие и узнать, как они работают по отдельности. Мы можем понять, как небольшие наборы компонентов работают вместе в качестве регуляторных единиц. Но систему как целое понять гораздо сложнее. Не потому, что система сложная, а потому, что ее поведение зависит от количественных характеристик молекулярных взаимодействий, а для большинства животных клеток мы располагаем лишь приблизительной качественной информацией.

В бактериальных клетках сигнальные пути менее запутаны, и для них проще получить точные количественные данные. Это дает возможность подробно описать работу целой сигнальной системы, по крайней мере для одного конкретного аспекта поведения бактериальной клетки и контролирующих его сигналов. Здесь мы рассмотрим один такой пример, в котором бактерия реагирует на внешние сигналы, воздействие которых опосредуется сопряженными с ферментами рецепторами. Эти рецепторы, как и описанные выше, представляют собой киназы, но другого типа.

15.3.17. Бактериальный хемотаксис зависит от двухкомпонентного сигнального пути, активируемого связанными с гистидинкиназой рецепторами

Предположительно, многие механизмы химической сигнализации между клетками многоклеточных животных эволюционировали от механизмов, использующихся одноклеточными организмами для ответа на химические изменения окружающей среды. В самом деле, оба типа организмов используют некоторые общие внутриклеточные медиаторы, например циклические нуклеотиды и Ca^{2+} . Одним из наиболее изученных ответов одноклеточных организмов на внеклеточные сигналы являются *хемотаксические ответы*, при которых движение клеток происходит в сторону источника химического соединения или от него. Мы закончим раздел о сопряженных с ферментами рецепторах рассмотрением **бактериального хемотаксиса**, который ярко иллюстрирует роль адаптации в ответе на химические сигналы. Хемотаксический ответ опосредуется **сопряженными с гистидинкиназами рецепторами**, активирующими *двухкомпонентный сигнальный путь*. Этот путь также используется дрожжами и растениями, но, по-видимому, не животными.

Подвижные бактерии типа *E. coli* плывут в сторону увеличения концентрации питательных веществ (*аттрактантов*), например сахаров, аминокислот и не-

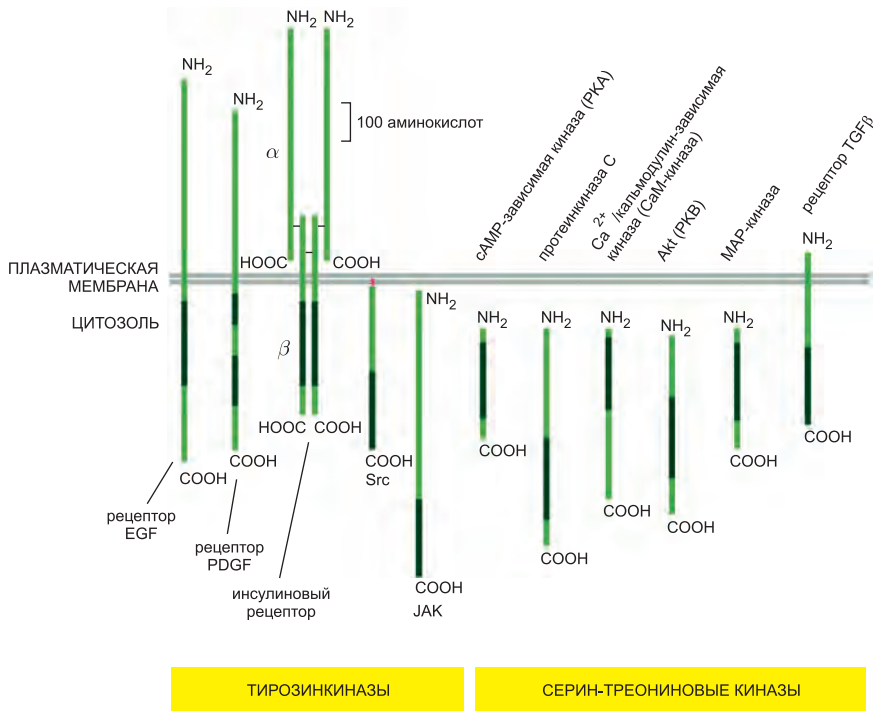


Рис. 15.70. Некоторые рассмотренные в данной главе протеинкиназы. Показаны размер и расположение каталитических доменов (темно-зеленые). Во всех случаях длина каталитического домена составляет около 250 аминокислот. Эти домены во всех аминокислотных последовательностях похожи, вероятно, они произошли от одной первичной киназы (см. также рис. 3.66). Обратите внимание, что все представленные тирозинкиназы связаны с плазматической мембраной (JAK связаны через рецепторы цитокинов — см. рис. 15.68), а большинство серин-треониновых киназ расположено в цитозоле.

больших пептидов, но избегают повышенных концентраций различных ядовитых соединений (*репеллентов*). Функцию движения у бактерий выполняют от четырех до шести жгутиков, каждый из которых посредством короткого гибкого крюка прикреплен к небольшому белковому диску в бактериальной мембране. Этот диск является частью микроскопического мотора, использующего запасенную в транс-мембранном градиенте H^+ энергию для быстрого вращения и поворота спирального жгутика (рис. 15.71). Поскольку жгутики на поверхности бактерий обладают свойством «праворукости» или «леворукости», различное направление вращения по-разному влияет на движение. Жгутики большую часть времени вращаются против часовой стрелки, благодаря чему они образуют переплетенный клубок, и бактерия плывет в одном направлении. В отсутствие внешнего стимула примерно раз в секунду один или несколько моторов временно меняют направление вращения. В результате прикрепленный к мотору жгутик отходит от остальных, и бактерия передвигается хаотически, не продвигаясь вперед (рис. 15.72). Такая последовательность создает характерный профиль движения, при котором плавное продвижение вперед прерывается резким переворачиванием.

Нормальное движение бактерий модифицируется под действием хемотаксических аттрактантов или репеллентов, которые связывают определенные рецепторные

белки и влияют на частоту переворачиваний за счет увеличения или уменьшения времени между последовательной сменой направления вращения жгутиков. Когда бактерия плывет в предпочтительном направлении (к источнику аттрактанта или от источника репеллента), они переворачиваются реже, чем когда плывут в невыгодном направлении (или когда градиент отсутствует). Поскольку периоды плавного движения длиннее, когда бактерия плывет в выгодном направлении, она постепенно достигнет цели — питательных веществ или избегания ядовитого вещества.

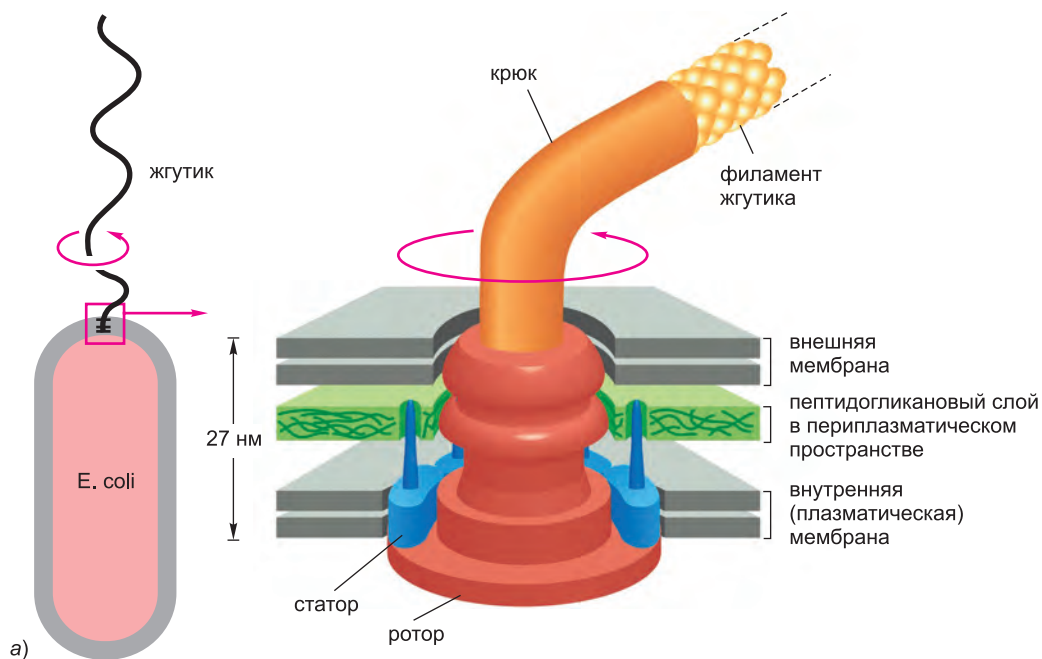


Рис. 15.71. Бактериальный жгутиковый мотор. (а) Схема структуры. Жгутик связан с гибким крюком. Крюк прикреплен к набору белковых колец (оранжевые), встроенных во внешнюю и внутреннюю (плазматическую) мембраны. Кольца образуют ротор, который вращает жгутик со скоростью около 100 оборотов в секунду. Вращение обеспечивается потоком протонов через внешнее кольцо белков, статор (голубой) встроен во внутреннюю мембрану и стабилизирован пептидогликановым слоем. Статор также содержит белки, отвечающие за изменение направления вращения. (б) Реконструкция жгутикового мотора по электронным микрофотографиям. (а, согласно данным из T. Kubori et al., *J. Mol. Biol.* 226: 433–446, 1992, с любезного разрешения издательства Academic Press, и N. R. Francis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 6304–6308, 1992, с любезного разрешения Национальной академии наук США; б, из D. Thomas, D. G. Morgan and D. J. DeRosier, *J. Bacteriol.* 183: 6404–6412, 2001. С любезного разрешения Американского общества микробиологов.)

Эти ответы опосредуются сопряженными с гистидинкиназами **хемотаксическими рецепторами**, которые обычно представляют собой трансмембранные белки, связывающие специфические аттрактанты или репелленты на поверхности плазматической мембраны. Цитоплазматический домен рецептора связан с гистидинкиназой *CheA* через адаптерный белок *CheW* (рис. 15.73). Связывание репеллента активирует рецепторы, тогда как связывание аттрактанта их инактивирует; один рецептор способен связывать оба типа молекул с противоположными последствиями. Связывание репеллента с рецептором активирует *CheA*, который автофосфорилируется по гистидину и практически мгновенно под действием регуляторного белка *CheY* переносит фосфорильную группу на аспарагиновую кислоту. Фосфорилированный *CheY* диссоциирует от рецептора, диффундирует по цитозолю, связывается с мотором жгутика и заставляет его вращаться по часовой стрелке, и бактерия меняет направление движения. *CheY* обладает фосфатазной активностью и автодефосфорилируется в процессе, ускоряемом белком *CheZ* (см. рис. 15.73).

15.3.18. Адаптация бактериального хемотаксиса происходит за счет метилирования рецепторов

Изменение частоты переворачиваний в ответ на увеличение концентрации аттрактанта или репеллента происходит менее чем за секунду, но только временно. Даже если повышенная концентрация лиганда поддерживается, через несколько минут бактерия все равно *адаптируется* (десенситбилизируется) к стимулу. Адаптация — ключевая составляющая ответа, она позволяет бактерии сравнивать окружающие условия в данный момент времени с недавним прошлым и, таким образом, реагировать на *изменения* в концентрации лиганда, а не на его стационарное значение.

Адаптация опосредуется ковалентным метилированием (катализируемым *метилтрансферазой*) или деметилированием (катализируемым *метилазой*) хемотаксических рецепторов. Ковалентная модификация приводит к изменению их способности отвечать на связывание лиганда. Например, когда с хемотаксическим рецептором связывается аттрактант, происходят два события: (1) снижается способность рецептора активировать *CheA* (что снижает частоту переворачиваний), и (2) рецептор медленно (в течение минут) изменяется, что делает возможным его метилирование метилтрансферазой. Метилирование восстанавливает способность рецептора активировать *CheA*. Таким образом, неметилированный рецептор в отсутствие лиганда об-

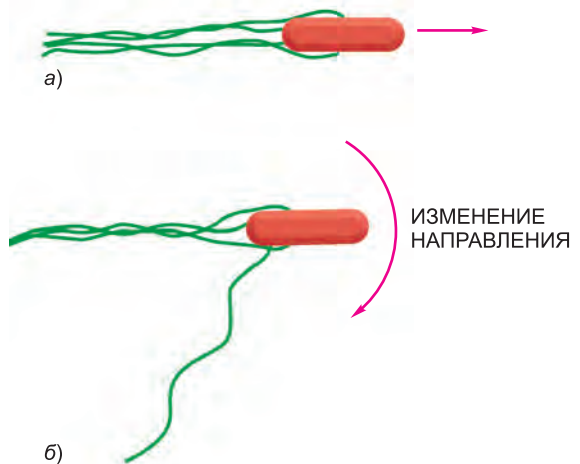


Рис. 15.72. Положение жгутиков *E. coli* в процессе движения. (а) Когда жгутики вращаются против часовой стрелки (если смотреть в клетку со стороны жгутика), они образуют пучок, который служит гребным винтом для плавного движения. (б) Когда один или несколько моторов изменяют направление вращения, прикрепленные к ним жгутики отходят от пучка и бактерия переворачивается.

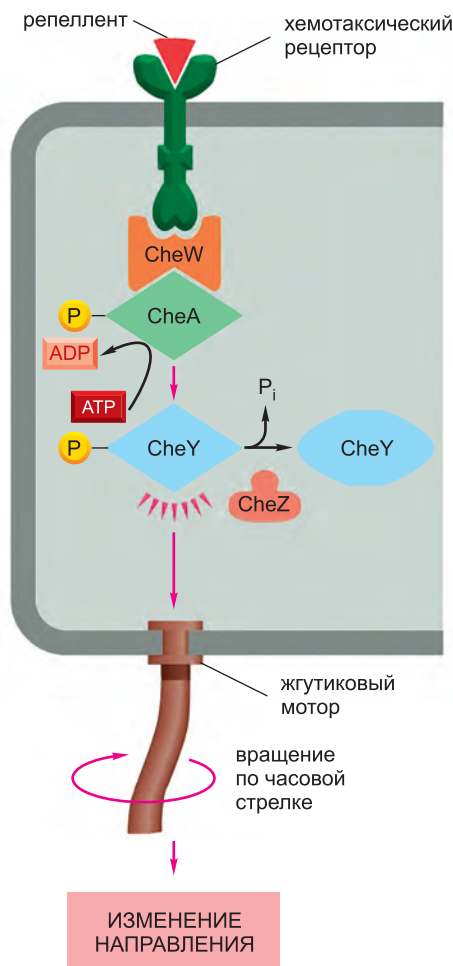


Рис. 15.73. Двухкомпонентный сигнальный путь, позволяющий хемотаксическим рецепторам контролировать моторы жгутиков при бактериальном хемотаксисе. Гистидинкиназа CheA связана с рецептором через адаптерный белок CheW. Рецепторы и связанные с ними белки располагаются в одном конце клетки (см. рис. 15.74). Связывание репеллента усиливает активность рецептора, который стимулирует автофосфорилирование CheA по гистидину. CheA быстро переносит ковалентно связанную высокоэнергетическую фосфорильную группу на регулятор ответа CheY с образованием CheY-фосфата, который затем диффундирует по цитозоллю, связывается со жгутиковым мотором и вызывает его вращение по часовой стрелке, что приводит к изменению направления движения. Связывание аттрактанта приводит к противоположному результату: он снижает активность рецептора и, следовательно, фосфорилирования CheA и CheY, что приводит к вращению против часовой стрелки и плавному движению. CheZ ускоряет автодефосфорилирование CheY-фосфата, инактивируя CheY. Время полужизни фосфорилированных интермедиатов меньше секунды, что позволяет бактерии очень быстро реагировать на изменения в окружении (см. рис. 15.11).

ладает такой же активностью, как метилированный рецептор со связанным лигандом. Частота изменения направления бактерией в этих случаях одинакова.

Димерные рецепторы несут восемь сайтов метилирования, и число метилированных сайтов увеличивается с увеличением концентрации аттрактанта (при более высоких концентрациях рецептор дольше остается в связанном с лигандом состоянии). Когда аттрактант исчезает, метилаза деметилюет рецептор. Несмотря на то что уровень метилирования рецепторов изменяется в процессе хемотаксического ответа, он остается постоянным после адаптации бактерии, поскольку достигается равновесие между скоростями метилирования и деметилюрования. Согласно простой модели поведения рецептора при бактериальном хемотаксисе, метилирование и связывание репеллента сжимают структуру мультисубъединичного рецептора и связанных с ним сигнальных белков, усиливая сигнализацию и увеличивая частоту переворачиваний. С другой стороны, деметилюрование рецептора и связывание аттрактанта расслабляет структуру комплекса, ослабляя сигнализацию и снижая частоту смены направления. Считается, что чувствительность ответа значительно усиливается кооперативными эффектами, являющимися результатом сближения цитоплазматических доменов соседних рецепторов в мембране (рис. 15.74).

Идентифицировали все гены и белки, участвующие в бактериальном хемотаксисе, и подробно изучили их взаимодействия. Поэтому возможно, что хемотаксис станет первой полностью описанной на молекулярном уровне сигнальной

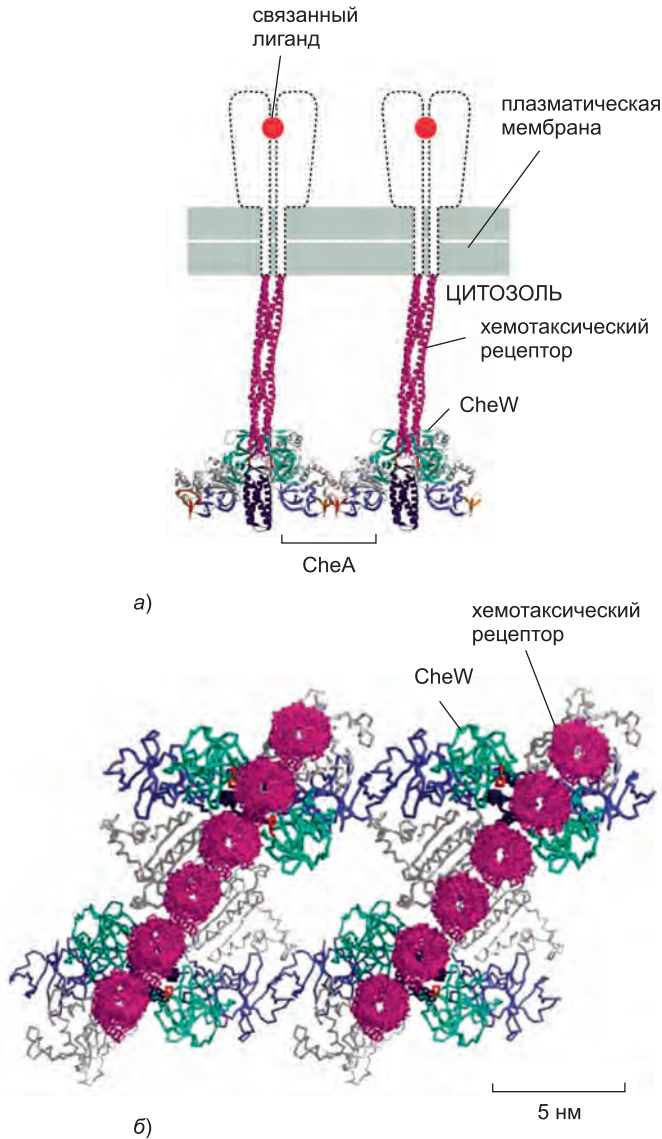


Рис. 15.74. Структурная модель формирования кластеров хемотаксических рецепторов в бактериальной плазматической мембране. Показан кластер из двух рецепторов. Отдельный рецептор — это гомодимер, мономер которого несет две длинные цитоплазматические α -спирали, закручивающиеся вокруг друг друга. Таким образом, каждая субъединица вносит две спирали в четырехспиральный пучок. Для получения представленной модели измерения расстояния между белковыми доменами методом импульсного электронного спинового резонанса объединили с известной трехмерной структурой белка. Образование комплексами рецептор-CheA-CheW такого рода кластеров приводит к кооперативным взаимодействиям между комплексами, что значительно усиливает чувствительность сигнального процесса. (а) Продольный вид на структуру вблизи плазматической мембраны. Внеклеточный домен рецептора изображен схематически. (б) Та же структура, если смотреть на плоскость плазматической мембраны. (Адаптировано из S. Y. Park et al., *Nat. Struct. Biol.* 13: 400–407, 2006. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

системой. Однако даже в случае данной относительно простой сигнальной сети для понимания того, как происходит ее координирование, требуется компьютерное моделирование. Клеточные сигнальные пути обеспечат работой новое поколение биологов-теоретиков, поскольку их свойства невозможно понять без компьютерных исследований.

Как упомянуто ранее, существуют поверхностные рецепторы, не входящие в состав трех рассмотренных нами классов — сопряженных с ионными каналами, сопряженных с G-белками и сопряженных с ферментами рецепторов. В следующем разделе мы рассмотрим поверхностные рецепторы, активирующие сигнальные пути, зависящие от протеолиза и контролирующие активность латентных белков-регуляторов генов. Эти пути играют ключевую роль в развитии животных и восстановлении и обновлении тканей.

Заключение

Существует несколько классов сопряженных с ферментами рецепторов, включая рецепторные тирозинкиназы (RTK), связанные с тирозинкиназами рецепторы, рецепторные серин-треониновые киназы и связанные с гистидинкиназами рецепторы. Первые два класса чаще всего встречаются у млекопитающих.

Связывание лиганда с RTK приводит к перекрестному фосфорилированию цитоплазматических доменов рецепторов по нескольким тирозинам. Такое трансавтофосфорилирование стимулирует киназы и приводит к образованию фосфотирозинов, служащих сайтами докинга для внутриклеточных сигнальных белков. Связывание сигнальных белков с рецептором опосредуется доменами SH2 (или PTV). Один из сигнальных белков служит адаптером, сопрягающим некоторые активированные рецепторы с Ras-GEF (Sos), активирующим мономерную GTPазу Ras; Ras, в свою очередь, активирует трехкомпонентный сигнальный MAP-киназный модуль, передающий сигнал в ядро за счет фосфорилирования белков-регуляторов генов. Другим важным сигнальным белком, связывающимся с RTK, является PI3-киназа, фосфорилирующая определенные фосфоинозитиды с образованием на плазматической мембране липидных сайтов докинга для сигнальных белков с фосфоинозитид-связывающими PH-доменами, включая серин-треониновую киназу Akt (PKB), которая играет важную роль в выживании и росте клеток. Многие классы рецепторов, включая некоторые RTK, активируют семейство мономерных GTPаз Rho, которое функционально сопрягает рецепторы с цитоскелетом.

Действие связанных с тирозинкиназами рецепторов опосредуется различными цитоплазматическими тирозинкиназами. К этим киназам относятся представители семейства Src, связывающиеся с различными типами рецепторов, и киназа фокальной адгезии (FAK), которая связывается с интегринами в фокальных контактах. Затем цитоплазматические тирозинкиназы фосфорилируют сигнальные белки для дальнейшей передачи сигнала. Самым крупным семейством рецепторов данного класса являются рецепторы цитокинов. После связывания лиганда эти рецепторы активируют цитоплазматические тирозинкиназы JAK, фосфорилирующие белки STAT. Затем STAT димеризуются, переносятся в ядро и активируют транскрипцию определенных генов. Рецепторные серин-треониновые киназы, активируемые сигнальными белками суперсемейства TGF β , действуют сходным образом: они напрямую фосфорили-

руют и активируют *Smad*, которые затем олигомеризуются с другими *Smad*, переносятся в ядро и активируют транскрипцию генов.

Сигнальный путь, регулирующий бактериальный хемотаксис, очень хорошо изучен. Он управляется связанными с гистидинкиназой хемотаксическими рецепторами, активирующими двухкомпонентный сигнальный путь. При активации репеллентом хемотаксический рецептор стимулирует автофосфорилирование связанной с ним гистидинкиназы по гистидину. Затем гистидинкиназа переносит фосфорильную группу на белок-регулятор ответа, который передает сигнал на жгутиковый мотор и изменяет направление движения бактерии. Аттрактанты действуют на киназу и, следовательно, направление движения противоположным образом. Эти ответы в значительной степени зависят от опосредованной обратимым метилированием адаптации рецепторов.

15.4. Сигнальные пути, основанные на регулируемом протеолизе латентных белков-регуляторов генов

Потребность в межклеточной сигнализации наиболее велика в процессе развития животных. Клетки зародыша должны быть направлены по одному или другому пути развития в зависимости от их истории, расположения и свойств соседних клеток. На каждом этапе клетки должны обмениваться сигналами, координируя свое поведение и обеспечивая правильное число и состав клеток в ткани или органе. Большинство рассмотренных выше сигнальных путей широко используется в развитии, контролируя выживание, рост, пролиферацию, адгезию, специализацию, дифференциацию и миграцию клеток.

Однако существуют другие сигнальные пути, играющие не меньшую роль в контроле процессов развития, но передающие сигналы от поверхностных рецепторов внутрь клетки иными способами. Несколько таких путей основывается на регулируемом протеолизе и контролирует активность и локализацию латентных белков-регуляторов генов, которые входят в ядро и активируют транскрипцию определенных генов-мишеней только после получения соответствующего сигнала. Несмотря на то что рассмотренные выше белки *STAT* и *Smad* также представляют собой латентные регуляторы, они активируются фосфорилированием в ответ на внеклеточные сигналы, а не высокоселективной деградацией белков. Основной функцией сигнальных путей, использующих латентные регуляторные белки, является создание для внеклеточных сигналов относительно прямого пути регуляции экспрессии генов, особенно в случае контроля клеточной судьбы.

Несмотря на то что большинство описанных в данном разделе путей обнаружены при изучении *Drosophila*, они высококонсервативны и используются в развитии различных тканей разнообразных животных. Как мы обсудим в главе 23, они также играют ключевую роль во многих процессах, протекающих в зрелых тканях и органах, в которых непрерывно происходит образование новых клеток.

В данном разделе мы рассмотрим четыре сигнальных пути: путь, опосредованный рецепторным белком *Notch*; путь, активируемый секретирруемыми белками *Wnt*; путь, активируемый секретирруемыми белками *Hedgehog*; и путь, активирующий латентный белок-регулятор генов *NFκB*. Эти пути играют важную роль в развитии животных, и значение сигнализации *Notch*, *Wnt* и *Hedgehog* в эмбриональном развитии мы подробно рассмотрим в главе 22.

15.4.1. Рецепторный белок Notch – это латентный белок-регулятор генов

Сигнализация через рецептор **Notch**, возможно, является наиболее распространенным сигнальным путем в развитии млекопитающих. В большинстве тканей она участвует в контроле выбора клеточной судьбы и регуляции формирования пространственных структур, а также в непрерывном обновлении тканей, например, выстилки кишечника. Однако наиболее изучена ее роль в образовании нервных клеток *Drosophila*, которые обычно возникают как отдельные изолированные клетки в пределах слоя клеток-предшественников. Во время этого процесса клетка-предшественник, которая должна стать нервной клеткой, сигнализирует своим непосредственным соседям не становиться нейронами. В результате ингибированные клетки становятся эпидермальными. Этот процесс, носящий название *латерального ингибирования*, основан на контакт-зависимом механизме сигнализации, активируемом однопроходным трансмембранным сигнальным белком **Delta**, расположенным на поверхности будущей нервной клетки. Связываясь с рецептором Notch на соседней клетке, Delta сигнализирует соседу не становиться нервной клеткой (рис. 15.75). Когда данный процесс сигнализации нарушен, соседние клетки также становятся нейронами, и равновесие между нервными и эпидермальными клетками нарушается, что приводит к гибели организма.

Сигнализация между соседними клетками посредством Notch и Delta (или Delta-подобных лигандов) регулирует выбор клеточной судьбы во многих тканях животных. Часто она опосредует латеральное ингибирование для контроля образования смеси различных типов клеток в пределах одной ткани, как в нервной системе мушек. Однако в некоторых случаях она действует противоположным образом, стимулируя, а не ингибируя, определенную судьбу клетки и заставляя соседние клетки поступать таким же образом. Маловероятно, что в процессе развития существуют клеточные функции, не регулируемые в одной или другой ткани Notch-сигнализацией.

Notch – это однопроходный трансмембранный белок, для функционирования которого необходим протеолиз. Он служит латентным белком-регулятором генов и создает самый простой и быстрый сигнальный путь от поверхностных рецепторов в ядро. При активации связыванием Delta другой клетки связанная с плазматической мембраной протеаза отщепляет цитоплазматический хвост Notch, который переносится в ядро и активирует транскрипцию набора Notch-чувствительных генов. Действие фрагмента цитоплазматического домена Notch основывается на взаимодействии с ДНК-связывающим белком, что превращает его из репрессора транскрипции в активатор. Мы увидим, что в сигнальных путях Wnt и Hedgehog используется сходная стратегия переключения репрессора транскрипции в активатор для регуляции клеточной судьбы. Наборы генов, регулируемые Notch-сигнализацией, варьируют в зависимости от ткани и обстоятельств, но основными мишенями в большинстве клеток являются представители семейства генов, известного (в млекопитающих) как *Hes*. Эти гены кодируют ингибиторные белки-регуляторы генов. В нервной системе, например, продукты генов *Hes* блокируют экспрессию генов, необходимых для дифференциации в нейроны.

Рецептор Notch претерпевает три последовательные стадии протеолиза, но только две последние зависят от связывания Delta. При его биосинтезе он расщепляется в аппарате Гольджи с образованием гетеродимера, который затем транспортируется

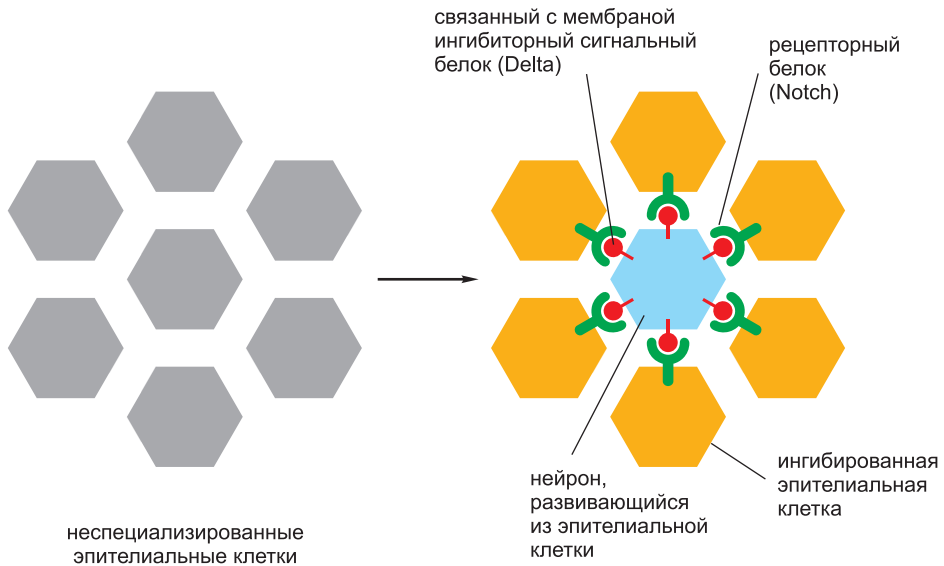


Рис. 15.75. Опосредованное Notch и Delta латеральное ингибирование в процессе развития нервных клеток *Drosophila*. Когда отдельные клетки эпителия начинают становиться нервными, они сигнализируют своим соседям не поступать так же. Такая ингибиторная контакт-зависимая сигнализация опосредуется лигандом Delta, который появляется на поверхности будущей нервной клетки и связывается с рецепторными белками Notch соседних клеток. Во многих тканях все клетки скопления исходно экспрессируют как Notch, так и Delta, что приводит к конкуренции. Побеждает одна клетка, наиболее стабильно экспрессирующая Delta и ингибирующая остальные клетки (см. рис. 22.60). В других случаях на Notch или Delta воздействуют другие факторы, делающие некоторые клетки чувствительными к латеральному ингибированию, а другие — устойчивыми к нему.

в плазматическую мембрану в форме зрелого рецептора. Связывание Delta с Notch приводит к второму отщеплению во внеклеточном домене, после чего высвобождается цитоплазматический домен активированного рецептора (рис. 15.76). Обратите внимание, что, в отличие от активации большинства рецепторов, активация Notch необратима: после связывания лиганда белок не может быть снова использован.

Последний протеолиз Notch происходит в трансмембранном сегменте и опосредуется протеазным комплексом *γ-секретазой*, которая также отвечает за внутримембранное расщепление других белков. Одной из ее важнейших субъединиц является *пресенилин (Presenilin)*, названный так потому, что мутации кодирующего его гена являются частой причиной раннего развития наследственной болезни Альцгеймера, разновидности предстарческого слабоумия, также известной как пресенильная деменция. Считают, что протеазный комплекс вносит вклад в эту и другие формы болезни Альцгеймера за счет синтеза внеклеточных пептидных фрагментов трансмембранного нейронального белка; фрагменты в избытке накапливаются и образуют агрегаты неправильно свернутого белка, носящие название амилоидных бляшек. Амилоидные бляшки могут повреждать нервные клетки и способствовать их дегенерации и гибели.

Notch и Delta — это гликопротеины, и их взаимодействие регулируется гликозилированием Notch. Семейство *Fringe* гликозилтрансфераз присоединяет дополнительные сахара к O-связанному олигосахариду (см. главу 13) белка Notch,

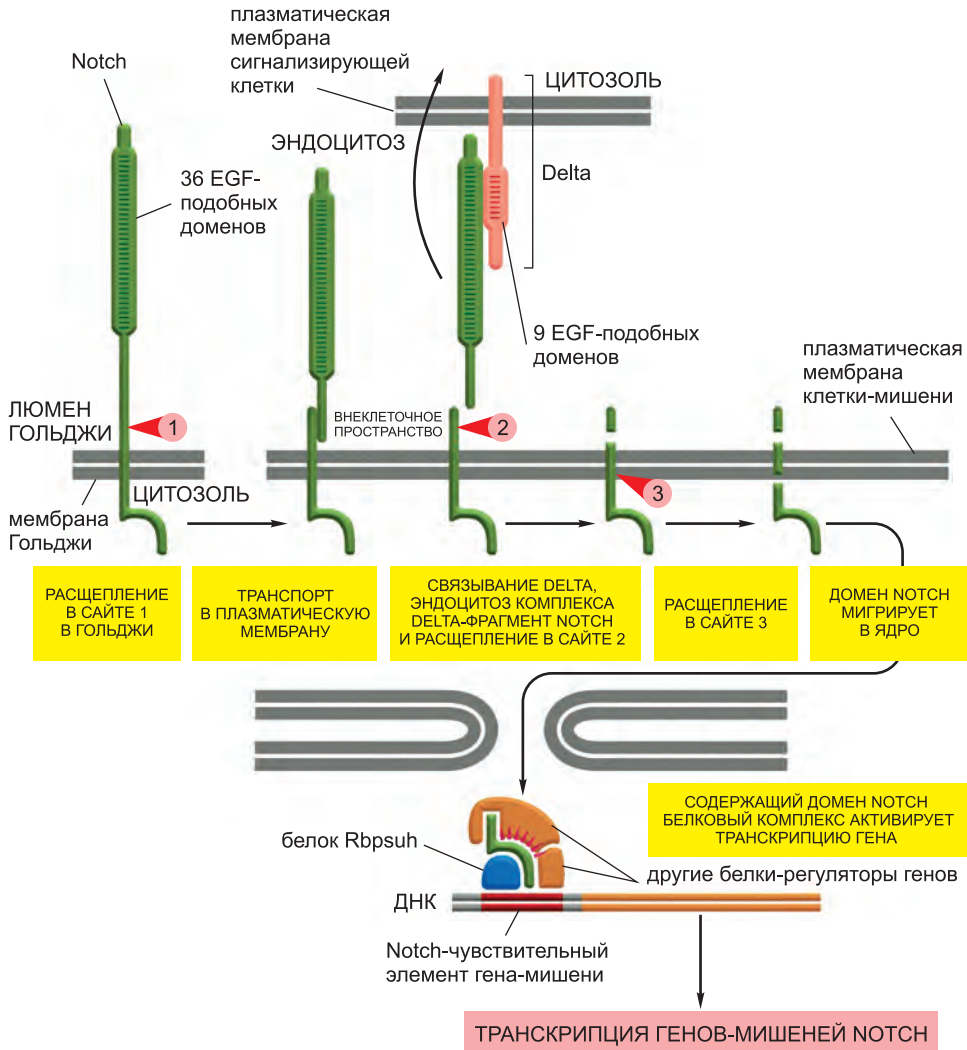


Рис. 15.76. Процессинг и активация Notch протеолитическим расщеплением. Пронумерованные красные стрелки указывают на сайты протеолитического расщепления. Первый этап протеолитического процессинга происходит в транс-сети Гольджи с образованием зрелого гетеродимерного рецептора Notch, который затем транспортируется на поверхность клетки. Связывание Delta, расположенного на соседней клетке, запускает следующие два этапа протеолитического расщепления: комплекс Delta и связанной с ним субъединицы Notch эндоцитируется экспрессирующей Delta клеткой, делая доступным внеклеточный сайт протеолиза трансмембранной субъединицы Notch. Обратите внимание, что Notch и Delta взаимодействуют посредством EGF-подобных доменов.

что изменяет специфичность Notch к лигандам. Это первый обнаруженный случай модуляции лиганд-рецепторной сигнализации посредством гликозилирования рецептора.

Высвобожденный хвост Notch мигрирует в ядро, где он связывает белок Rbpsiuh и превращает его из репрессора в активатор транскрипции.

15.4.2. Белки Wnt связываются с рецепторами Frizzled и ингибируют деградацию β -катенина

Белки Wnt — это секретируемые сигнальные молекулы, служащие локальными медиаторами и морфогенами и контролирующими разнообразные аспекты развития во всех исследованных животных. Они независимо обнаружены в мушках и мышах: в *Drosophila* ген *Wingless* («бескрылый», *Wg*) обратил на себя внимание благодаря своей функции морфогена в процессе развития крыльев (см. главу 22); в мышах ген *Int1* обнаружили потому, что он способствовал развитию опухолей молочных желез при его активации за счет встраивания рядом с ним вируса. Wnt — это необычные секретируемые белки, поскольку на N-конце они несут ковалентно связанную жирнокислотную цепь, усиливающую их взаимодействие с клеточной поверхностью. У человека обнаружено 19 Wnt, которые выполняют специфичные, но часто пересекающиеся, функции.

Wnt способны активировать по крайней мере три типа внутриклеточных сигнальных путей: (1) *Wnt/β-катениновый путь* (также известный как *канонический Wnt-путь*) зависит от латентного белка-регулятора генов β -катенина; (2) *путь полярности* координирует поляризацию клеток в плоскости развивающегося эпителия (см. главы 19 и 22) и зависит от семейства GTPаз Rho; (3) *Wnt/Ca²⁺-путь* стимулирует повышение концентрации внутриклеточного Ca²⁺, и его последствия сходны с описанными ранее для других сигнальных путей. Все три пути начинаются со связывания Wnt с поверхностными рецепторами семейства **Frizzled** — семи-проходными трансмембранными белками, напоминающими по структуре GPCR. У человека семь рецепторов Frizzled. После активации связыванием Wnt они рекрутируют каркасный белок **Dishevelled**, необходимый для передачи сигнала по всем трем сигнальным путям. Здесь мы рассмотрим первый путь.

Действие **Wnt/β-катенинового пути** основано на протеолизе многофункционального белка **β-катенина** (или *Armadillo* у мушек), который участвует в межклеточной адгезии (см. главу 19) и регуляции генов. В этом пути (но не в других Wnt-путях) Wnt связывается с белком Frizzled и корецепторным белком, родственным рецепторному белку липопротеинов низкой плотности (LDL) и носящему название **белка, родственного LDL-рецептору** (*LDL-Receptor-Related Protein, LRP*). В эпителиальных клетках большинство β -катенинов расположено в межклеточных адгезионных контактах, где они связаны с кадгеринами — трансмембранными белками межклеточной адгезии. β -катенин в контактах способствует связыванию кадгеринов с актиновым цитоскелетом (см. главу 19). Во всех клетках β -катенин, не связанный с кадгеринами, быстро разрушается в цитоплазме.

Разрушение цитоплазматического β -катенина зависит от крупного белкового *комплекса деградации*, который связывает β -катенин и не дает ему попасть в ядро, одновременно способствуя его деградации. Комплекс содержит еще по крайней мере четыре белка: серин-треониновую киназу *казеинкиназу 1* (*Casein Kinase 1, CK1*), которая фосфорилирует β -катенин по серину и подготавливает его к дальнейшему фосфорилированию другой серин-треониновой киназой *киназа-3-гликогенсинтазой* (*Glycogen Synthase Kinase 3, GSK3*); последний акт фосфорилирования помечает белок для убиквитинирования и быстрой деградации в протеасомах. Два каркасных белка *аксин* и белок *аденоматозного полипоза толстой кишки* (*Adenomatous Polyposis Coli, APC*) удерживают белки в комплексе (**рис. 15.77, а**). APC назван таким образом потому, что мутация в кодирующем его гене свойственна добро-

качественной опухоли (аденоме) толстой кишки; опухоль выступает в просвет в форме полипа и может стать злокачественной. (Данный APC не нужно путать со стимулирующим анафазу комплексом — Anaphase promoting complex, или APC, который играет ключевую роль в селективной деградации белков в клеточном цикле — см. рис. 17.20, а).

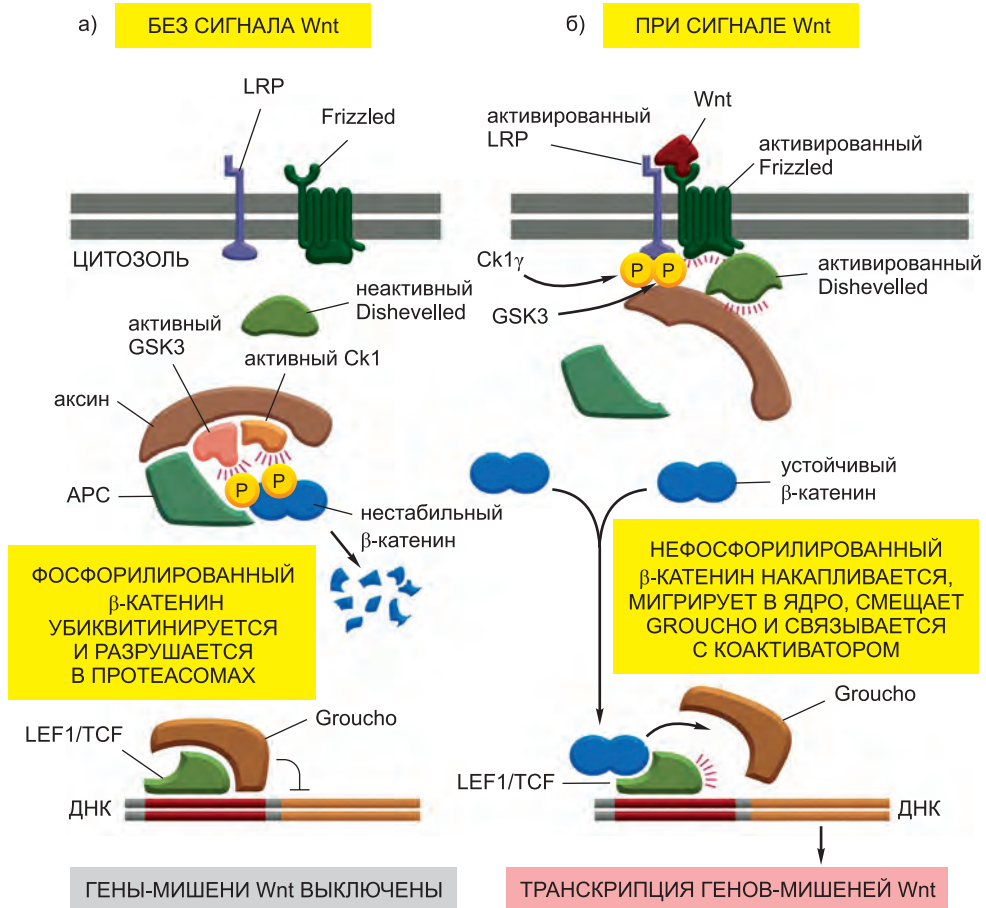


Рис. 15.77. Сигнальный путь Wnt/β-катенин. (а) В отсутствие сигнала Wnt, β-катенин, не связанный с цитоплазматическим доменом белков кадгеринов (не показано), связывается с комплексом деградации, содержащим APC, аксин, GSK3 и CK1. В этом комплексе β-катенин последовательно фосфорилируется киназами CK1 и GSK3, что запускает его убиквитинирование и деградацию в протеасомах. Корепрессорный белок Groucho, связанный с белком-регулятором генов LEF1/TCF, инактивирует Wnt-чувствительные гены. (б) Связывание Wnt с Frizzled и LRP сближает рецепторы, что приводит к рекрутированию комплекса деградации к плазматической мембране и фосфорилированию цитоплазматического домена LRP киназами GSK3 и CK1γ. Аксин связывается с фосфорилированным LRP и инактивируется и/или разрушается. Потеря комплексом деградации аксина инактивирует его и, следовательно, блокирует фосфорилирование и убиквитинирование β-катенина. В результате нефосфорилированный β-катенин накапливается и переносится в ядро. Для работы пути необходимы Dishevelled и, возможно, G-белок; оба связываются с Frizzled, и Dishevelled фосфорилируется (не показано), но функциональные роли этих белков не известны. Попав в ядро, β-катенин связывается с LEF1/TCF, вытесняет ко-репрессор Groucho, и действует в качестве коактиватора транскрипции генов-мишеней Wnt.

Связывание белка Wnt с рецепторами Frizzled и LRP сближает их и они образуют комплекс. В малоизученном процессе две протеинкиназы, GSK3 и затем SK1 γ фосфорилируют цитоплазматический хвост рецептора LRP, позволяя LRP рекрутировать и инактивировать аксин, нарушая таким образом в цитоплазме структуру комплекса деградации. В результате фосфорилирование и деградация β -катенина ингибируются, что позволяет нефосфорилированному β -катенину постепенно накапливаться и переноситься в ядро, где он изменяет профиль транскрипции генов (рис. 15.77, б).

В отсутствие Wnt-сигнализации, Wnt-чувствительные гены молчат под действием ингибиторного комплекса белков-регуляторов генов. В комплекс входят белки семейства *LEF1/TCF*, связанные с корепрессорным белком семейства *Groucho* (см. рис. 15.77, а). В ответ на сигнал Wnt 7-катенин входит в ядро и связывает белки *LEF1/TCF*, вытесняя *Groucho*. β -катенин становится коактиватором, запускающим транскрипцию генов-мишеней Wnt (см. рис. 15.77, б). Таким образом, как и в случае сигнализации Notch, Wnt/ β -катениновая сигнализация вызывает переключение между репрессией и активацией транскрипции.

Одним из активируемых β -катенином генов является *c-Myc*, кодирующий белок (с-Мус), служащий сильным стимулятором роста и пролиферации клеток (см. главу 17). Мутации гена *Apc* встречаются в 80% раков толстой кишки (см. главу 20). Эти мутации ингибируют способность белка связывать β -катенин, в результате чего β -катенин накапливается в ядре и стимулирует транскрипцию *c-Myc* и других генов-мишеней Wnt даже в отсутствие Wnt-сигнализации. В результате неконтролируемый рост и пролиферация клеток приводят к развитию рака.

Различные секретируемые ингибиторные белки регулируют Wnt-сигнализацию в процессе развития. Некоторые связываются с рецепторами LRP и способствуют их даун-регуляции, другие конкурируют с рецепторами Frizzled за секретируемые Wnt. Wnt, по крайней мере в *Drosophila*, активируют петли отрицательных обратных связей, в которых гены-мишени Wnt кодируют белки, способствующие затуханию ответа; некоторые из этих белков ингибируют Dishevelled, другие — секретируемые ингибиторы.

15.4.3. Белки Hedgehog связывают Patched, снимая ингибирование Smoothened

Белки Hedgehog и Wnt действуют сходным образом. И те, и другие представляют собой секретируемые сигнальные молекулы, служащие локальными медиаторами и морфогенами при развитии тканей позвоночных и беспозвоночных. Оба типа белков модифицированы ковалентно присоединенными липидами, зависят от секретируемых или связанных с поверхностью клетки гепарансульфатпротеогликанов (см. главу 19) и активируют латентные белки-регуляторы генов путем ингибирования их протеолиза. Hedgehog и Wnt инициируют переключение между репрессией и активацией транскрипции, и в зрелых клетках избыточная сигнализация в связанных с ними путях может привести к раку. Они даже используют одни и те же внутриклеточные сигнальные белки и иногда вместе опосредуют ответ.

Белки Hedgehog обнаружены в *Drosophila*, где их семейство состоит из одного белка. Мутация гена *Hedgehog* приводит к формированию личинки, покрытой колючими выростами, напоминающими иголки ежа (hedgehog — еж). У позвоночных по крайней мере три гена кодируют белки Hedgehog: *Sonic*, *Desert* и *Indian*

hedgehog (Sonic hedgehog — герой компьютерной игры, Desert hedgehog и Indian hedgehog — виды ежей, ушастый и индийский ежи соответственно). Активные формы всех белков Hedgehog, помимо жирнокислотной цепи, также несут ковалентно связанный холестерин. Холестерин присоединяется при необычном процессинге, когда белок-предшественник расщепляет сам себя с образованием небольшого несущего холестерин сигнального белка. Почти все, что нам известно о сигнальном пути, активируемом Smoothened, относится к мушкам, поэтому именно путь *Drosophila* мы и будем рассматривать.

Три трансмембранных белка — Patched, Smoothened и iHog — опосредуют ответы на белки Hedgehog. Предполагают, что **Patched** 12 раз пересекает плазматическую мембрану и, несмотря на то, что его много во внутриклеточных везикулах, некоторое его количество на поверхности клетки связывает белок Hedgehog. Белки **iHog** несут четыре или пять иммуноглобулин-подобных доменов и два или три фибронектин-3-подобных домена; они расположены на поверхности клетки и, по-видимому, также служат рецепторами белков Hedgehog. Вероятно, iHog выполняют функцию корецепторов для Patched. **Smoothened** — это семипроходный трансмембранный белок, структура которого очень похожа на структуру рецептора Frizzled. В отсутствие сигнала Hedgehog, Patched по неизвестному на данный момент механизму удерживают Smoothened во внутриклеточных везикулах в неактивном состоянии. Связывание Hedgehog с iHog и Patched ингибируют активность Patched и приводит к их эндоцитозу и деградации. В результате Smoothened фосфорилируется, переносится на поверхность клетки и передает сигнал в клетку.

Передачу сигнала опосредует латентный белок-регулятор генов **Cubitus interruptus (Ci)**. В отсутствие сигнала Hedgehog, Ci убиквитинируется и протеолитически расщепляется в протеасомах. Однако он не полностью разрушается, а образует небольшой белок, накапливающийся в ядре и служащий репрессором транскрипции, способствуя молчанию Hedgehog-чувствительных генов. Протеолитический процессинг белка Ci зависит от его фосфорилирования тремя серин-треониновыми киназами — PKA и двумя киназами пути Wnt, а именно GSK3 и CK1. Как и в Wnt-пути, протеолитический процессинг протекает в мультибелковом комплексе, состоящем из серин-треониновой киназы *Fused* и каркасного белка *Costal2*. Этот каркасный белок связывает Ci, рекрутирует остальные три киназы и присоединяет комплекс к микротрубочкам, не давая нерасщепленному Ci попасть в ядро (рис. 15.78, а).

Когда путь Hedgehog активируется, оказавшийся в плазматической мембране Smoothened рекрутирует белковые комплексы, содержащие Ci, Fused и Costal2. Costal2 теряет способность связывать остальные три киназы, и Ci не расщепляется. Теперь Ci может мигрировать в ядро и активировать транскрипцию белков-мишеней Hedgehog (рис. 15.78, б). Одним из активируемых Ci генов является *Patched*; в результате накопление белка Patched на поверхности клетки ингибирует дальнейшую Hedgehog-сигнализацию, т. е. возникает петля отрицательной обратной связи.

В понимании Hedgehog-сигнализации еще много пробелов. Например, неизвестно, как Patched удерживает Smoothened в неактивном состоянии внутри клетки. Поскольку структура Patched напоминает структуру трансмембранного белка-переносчика, предполагают, что он может транспортировать в клетку малую молекулу, не дающую Smoothened покинуть везикулы.

Еще меньше известно о более сложном пути Hedgehog позвоночных. Помимо того что у позвоночных по крайней мере три типа белков Hedgehog, у них обна-

ружено три Сi-подобных белка-регулятора генов (*Gli1*, *Gli2* и *Gli3*), следующих за Smoothened. Только *Gli3* подвергается свойственному Сi протеолитическому процессингу и служит либо транскрипционным активатором, либо репрессором. *Gli1* и *Gli2*, по-видимому, являются исключительно активаторами. Более того, у позвоночных Smoothened после активации локализуется на особом участке плазматической мембраны — на первичной ресничке, которая выступает с поверхности большинства клеток позвоночных (см. главу 16). Таким образом, первичная ресничка служит центром сигнального пути Hedgehog, и в ней также концентрируются белки Gli. Благодаря этому, по-видимому, увеличиваются скорость и эффективность сигнального процесса.

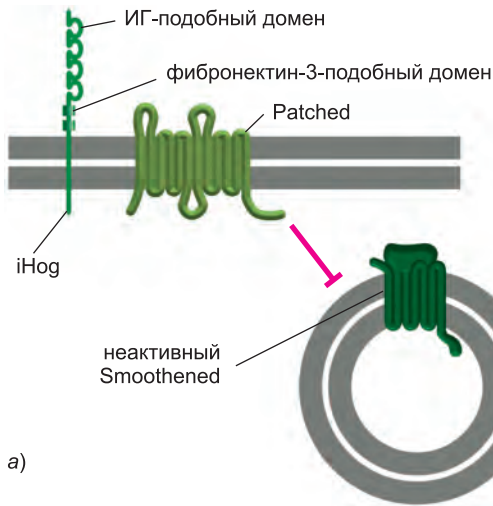
Hedgehog-сигнализация способствует пролиферации клеток, и избыточная активность пути может привести к раку. Например, инактивирующие мутации одного из двух генов *Patched* человека, приводящие в избыточной Hedgehog-сигнализации, часто встречаются при *базально-клеточной карциноме* кожи — самой распространенной форме рака у представителей европеоидной расы. Малая молекула *циклопамин*, синтезирующаяся луговой лилией, используется для лечения раков, связанных с повышенной Hedgehog-сигнализацией. Циклопамин блокирует путь Hedgehog за счет связывания Smoothened и блокировки его активности. Впервые его обнаружили благодаря тому, что он вызывает серьезные дефекты потомства у овец, питающихся такими лилиями. Одним из таких нарушений является развитие единственного центрального глаза (*циклопия*), которое также встречается у мышей с пониженной Hedgehog-сигнализацией.

15.4.4. Многие стрессовые и воспалительные стимулы опосредованы NFκB-зависимым сигнальным путем

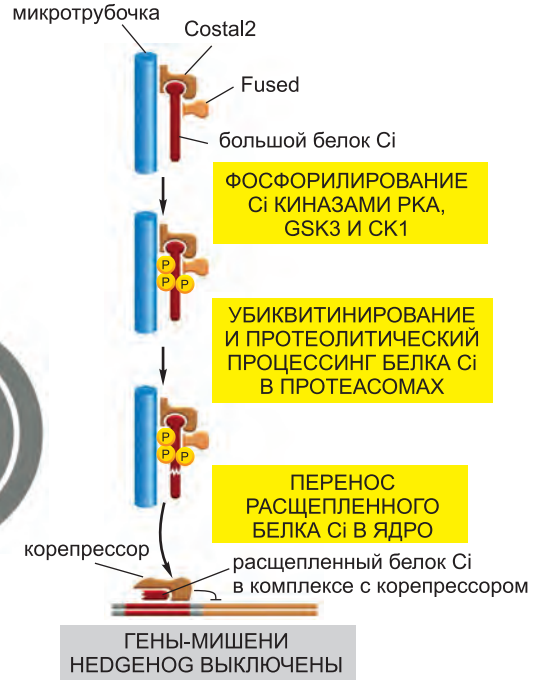
Белки NFκB — это латентные регуляторы генов, встречающиеся почти во всех животных клетках и играющие центральную роль во многих стрессовых, воспалительных и врожденных иммунных ответах. Эти ответы являются реакцией на инфекцию или травму и способствуют защите находящихся в состоянии стресса многоклеточных организмов и их клеток (см. главу 24). У животных чрезмерный или несоответствующий обстоятельствам воспалительный ответ способен повредить ткани и вызвать боль, а хроническое воспаление может привести к раку; как и в случае сигнализации Wnt и Hedgehog, повышенная активность NFκB-сигнализации свойственна нескольким видам рака человека. Белки NFκB также играют важную роль в нормальном развитии животных. Например, представитель семейства NFκB *Drosophila*, белок *Dorsal*, играет ключевую роль в формировании дорсо-вентральной оси развивающегося зародыша мушки (см. главу 23).

В животных клетках сигнальный путь NFκB активируется различными поверхностными рецепторами. Рецепторы *Toll Drosophila* и *Toll-подобные рецепторы* позвоночных, например, узнают патогены и активируют данный путь за счет запуска ответов врожденного иммунитета (см. главу 24). Этот путь также активируется рецепторами *фактора некроза опухоли α* (*Tumor Necrosis Factor α*, TNFα) и *интерлейкином-1* (IL-1) — цитокинами позвоночных, играющими ключевую роль в запуске воспалительного ответа. IL-1, Toll и Toll-подобные рецепторы относятся к одному белковому семейству, тогда как TNF принадлежит другому семейству; однако все они активируют NFκB по сходным механизмам. В активированном состоянии они запускают мультибелковый каскад убиквитинирования и фосфо-

БЕЗ СИГНАЛА HEDGEHOG



а)



ПРИ СИГНАЛЕ HEDGEHOG

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ И ДЕГРАДАЦИЯ PATCHED В ЛИЗОСОМАХ

SMOOTHENED ФОСФОРИЛИРУЕТСЯ КИНАЗАМИ PKA И CK1 И РЕКРУТИРУЕТСЯ (ПУТЕМ СЛИЯНИЯ ВЕЗИКУЛ) В ПЛАЗМАТИЧЕСКУЮ МЕМБРАНУ



ФОСФОРИЛИРОВАННЫЙ SMOOTHENED РЕКРУТИРУЕТ БЕЛКОВЫЙ КОМПЛЕКС И ИНГИБИРУЕТ ПРОТЕОЛИЗ Ci

ИНТАКТНЫЙ Ci ВЫСВОБОЖДАЕТСЯ ИЗ КОМПЛЕКСА

ИНТАКТНЫЙ Ci ПЕРЕНОСИТСЯ В ЯДРО И АКТИВИРУЕТ ТРАНСКРИПЦИЮ



ТРАНСКРИПЦИЯ ГЕНОВ HEDGEHOG

б)

Рис. 15.78 (слева). Hedgehog-сигнализация в *Drosophila*. (а) В отсутствие Hedgehog, белок Patched удерживает Smoothened во внутриклеточных везикулах в неактивном состоянии. Белок Ci в цитоплазме связан с комплексом деградации белков, включающим в себя серин-треониновую киназу Fused и каркасный белок Costal2. Costal2 рекрутирует три другие протеинкиназы (PKA, GSK3 и CK1), фосфорилирующие Ci. Фосфорилированный Ci убиквитинируется и расщепляется в протеасомах (не показано) с образованием репрессора транскрипции, накапливающегося в ядре и инактивирующего гены-мишени Hedgehog. (б) Связывание Hedgehog с iHog и Patched снимает ингибирование Smoothened. Smoothened фосфорилируется киназами PKA и CK1 и переносится в плазматическую мембрану, где он рекрутирует Fused и Costal2. Costal2 высвобождает три другие киназы и нерасщепленный Ci. Полноразмерный белок Ci накапливается в ядре и активирует транскрипцию генов-мишеней Hedgehog. Белки iHog млекопитающих называются VOS и CDO. Многие тонкости пути малоизучены, включая роль Fused.

рирования, высвобождающий NFκB из ингибиторного белкового комплекса. В результате, NFκB переносится в ядро и включает транскрипцию сотен генов, участвующих в воспалительном и врожденных иммунных ответах.

У млекопитающих обнаружено пять белков NFκB (*RelA*, *RelB*, *c-Rel*, *NFκB1* и *NFκB2*), образующих разнообразные гомодимеры и гетеродимеры, каждый из которых активирует свой собственный специфический набор генов. Ингибиторные белки IκB связываются с димерами и удерживают их в неактивном состоянии в цитоплазме покоящейся клетки. У млекопитающих встречается три основных белка IκB (IκB α, β и ε), и сигналы, высвобождающие димеры NFκB, инициируют сигнальный путь, приводящий к фосфорилированию, убиквитинированию и последующей деградации белков IκB. Фосфорилирование IκB опосредуется *IκB-киназой* (IKK) — мультибелковым комплексом, содержащим две серин-треониновые киназы (IKKα и IKKβ) и регуляторный белок *NEMO* (*NFκB Essential Modifier* — основной модификатор NFκB), или IKKγ (рис. 15.79).

Среди генов, активируемых высвобожденным NFκB, — ген, кодирующий IκBα, одну из трех изоформ, инактивирующих NFκB в цитозоле покоящихся клеток. Такая активация приводит к повторному синтезу белка IκBα, который связывает NFκB и вновь его инактивирует, создавая петлю отрицательной обратной связи (рис. 15.80, а). Эксперименты по изучению вызываемых TNFα ответов и их компьютерное моделирование показали, что отрицательная обратная связь приводит к образованию двух типов NFκB-ответов в зависимости от продолжительности стимула TNFα. Короткий стимул (меньше часа) вызывает непродолжительную активацию NFκB, не зависящую от продолжительности стимула TNFα; отрицательная обратная связь через IκBα отключает ответ примерно через час. Более длительное действие TNFα, с другой стороны, приводит к медленным колебаниям активации NFκB, при которых за активацией следует опосредованная IκBα инактивация, затем разрушение IκBα и реактивация NFκB, и так далее; колебания сохраняются несколько часов и затем затухают, даже при поддержании стимула. Важно отметить, что для двух типов ответов характерны разные профили экспрессии генов, поскольку некоторые гены-мишени NFκB активируются только при продолжительной колебательной активации NFκB (рис. 15.80, б, в и г). Отрицательная обратная связь через IκBα необходима для обоих типов ответов: в клетках, в которых IκBα отсутствует, даже короткое воздействие TNFα приводит к постоянной неколебательной активации NFκB и экспрессии всех NFκB-чувствительных генов.

До сих пор мы рассматривали межклеточную сигнализацию животных с небольшими отклонениями в сторону дрожжей и бактерий. Но внутриклеточная сиг-

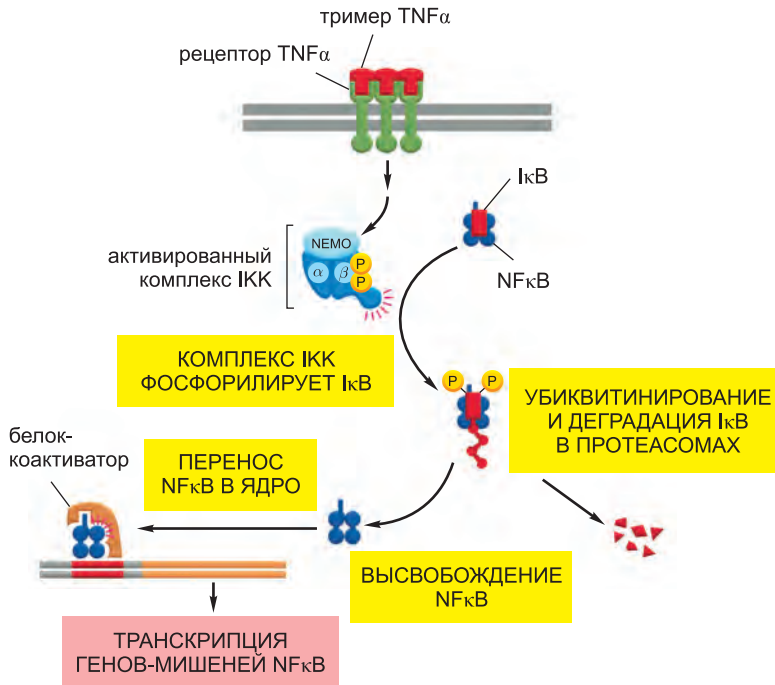


Рис. 15.79. Активация NFκB-пути белком TNFα. TNFα и его рецепторы представляют собой тримеры. Связывание TNFα приводит к перестройке кластера цитоплазматических доменов рецепторов, которые начинают рекрутировать различные сигнальные белки. Это приводит к активации серин-треониновой протеинкиназы, фосфорилирующей и активирующей IκB-киназу (IKK). IKK — это гетеротример, состоящий из двух киназных субъединиц (IKKα и IKKβ) и регуляторной субъединицы NEMO. IKKβ фосфорилирует IκB по двум серинам, что помечает белок для убиквитинирования и деградации в протеасомах. Высвобожденный NFκB переносится в ядро, где вместе с белками-коактиваторами стимулирует транскрипцию своих генов-мишеней.

нализация для растений не менее важна, хотя механизмы и молекулы значительно отличаются от животных, как мы увидим дальше.

Заключение

Некоторые сигнальные пути, играющие особенно важную роль в развитии животных, зависят от протеолиза как метода контроля активности и локализации латентных белков-регуляторов генов. Рецепторы Notch сами по себе являются латентными регуляторами, активируемыми расщеплением, когда с ними связывается белок Delta (или родственный ему лиганд) другой клетки. Отщепленный цитоплазматический домен Notch мигрирует в ядро и стимулирует транскрипцию Notch-чувствительных генов. С другой стороны, в Wnt/β-катениновом сигнальном пути протеолиз латентного белка-регулятора гена β-катенина ингибируется, когда секретируемый белок Wnt связывается с рецепторными белками Frizzled и LRP; в результате β-катенин накапливается в ядре и активирует транскрипцию генов-мишеней Wnt.

Hedgehog-сигнализация у мушек похожа на Wnt-сигнализацию. В отсутствие сигнала, бифункциональный цитоплазматический белок-регулятор генов

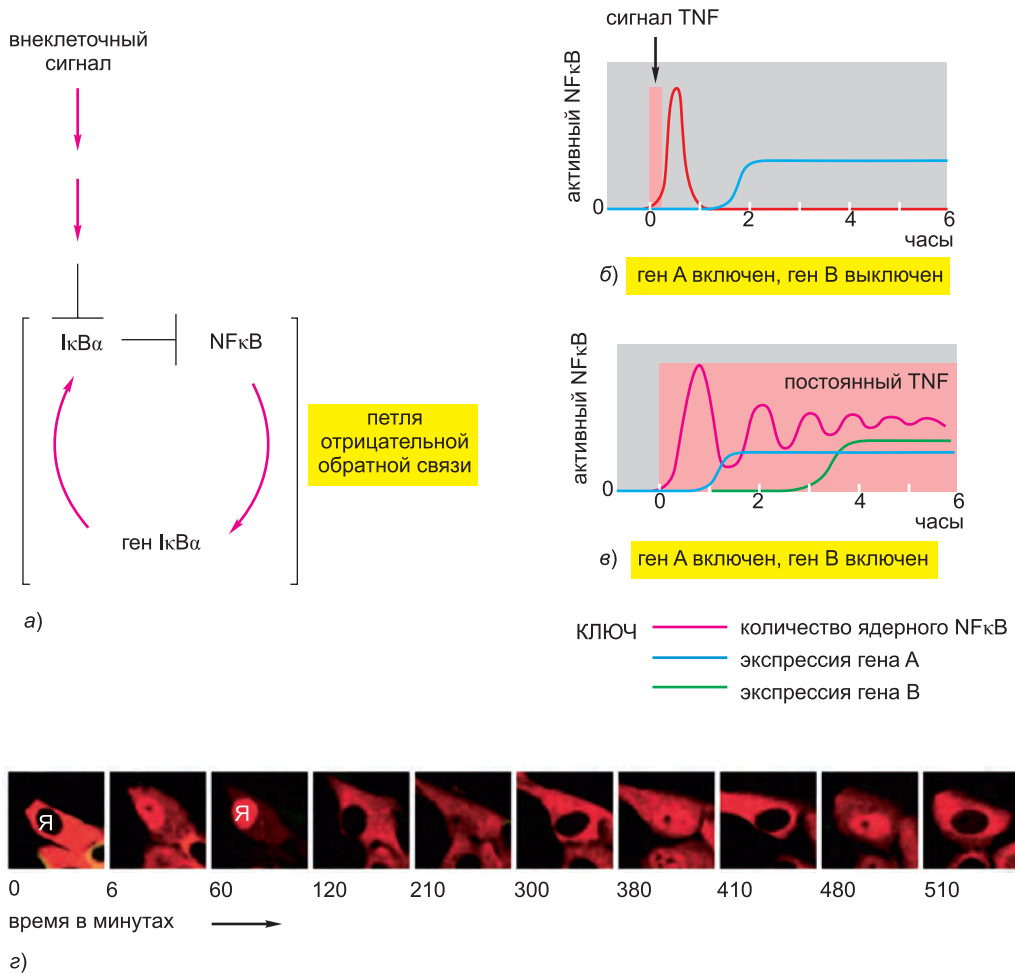


Рис. 15.80. Отрицательная обратная связь в сигнальном пути NFκB вызывает колебания активации NFκB. (а) Схема того, как активированный NFκB стимулирует транскрипцию IκBα, белковый продукт которого удерживает NFκB в цитоплазме; если стимул постоянен, новосинтезированный белок IκBα будет впоследствии убиквитинирован и разрушен, что приведет к высвобождению NFκB, его возвращению в ядро и активации транскрипции (см. рис. 15.79). (б) Короткий стимул TNFα вызывает единственный непродолжительный пик активации NFκB, нарастающий в течение минут и затухающий примерно через час. Этот ответ запускает транскрипцию гена A, но не гена B. (в) Постоянное воздействие TNFα в течение 6 часов приводит к затухающим со временем колебаниям активации NFκB. Этот ответ запускает транскрипцию обоих генов; ген B включается только через несколько часов, т. е. для его транскрипции требуется продолжительная активация NFκB. Причины этого явления неизвестны. (г) Полученные в другом исследовании стимуляции TNFα конфокальные флуоресцентные микрофотографии показывают колебания NFκB в культуре клеток: химерный белок, состоящий из красного флуоресцентного белка и NFκB, периодически мигрирует в ядро (Я). В клетке в верхней половине микрофотографий NFκB активен в ядре в моменты времени 6, 60, 210, 380 и 480 минут, но в 0, 120, 300, 410 и 510 минут он локализован в цитоплазме. (а–в, согласно данным из A. Hoffmann et al., *Science* 298: 1241–1245, 2002, и адаптировано по A. Y. Ting and D. Endy, *Science* 298: 1189–1190, 2002; г, из D.E. Nelson et al., *Science* 306: 704–708, 2004. Все с разрешения издательства AAAS.)

Ci протеолитически расщепляется с образованием репрессора транскрипции, поддерживающего молчание *Hedgehog*-чувствительных генов. Связывание *Hedgehog* с его рецепторами (*Patched* и *iHog*) ингибирует протеолитический процессинг *Ci*; в результате нерасщепленная форма *Ci* накапливается в ядре и активирует транскрипцию генов-мишеней *Hedgehog*. При сигнализации *Notch*, *Wnt* и *Hedgehog* внеклеточный сигнал приводит к переключению между репрессией и активацией транскрипции.

Сигнализация посредством латентного белка-регулятора генов *NFκB* также зависит от протеолиза. Белок *NFκB* в норме поддерживается в цитоплазме в неактивном состоянии ингибиторными белками *IκB*. Различные внеклеточные стимулы, включая противовоспалительные цитокины, инициируют фосфорилирование и убиквитинирование *IκB*, направляя его на деградацию; это позволяет *NFκB* мигрировать в ядро и активировать транскрипцию генов-мишеней. *NFκB* также активирует транскрипцию гена, кодирующего *IκBα*, в результате чего формируется отрицательная обратная связь, способная создавать продолжительные колебания активности *NFκB* при постоянной внеклеточной сигнализации.

15.5. Сигнализация в растениях

В растениях, как и в животных, клетки постоянно обмениваются сигналами друг с другом. Растительные клетки взаимодействуют для того, чтобы координировать свою активность в ответ на изменения освещения и температуры, которые управляют циклами роста, цветения и плодоношения. Растительные клетки взаимодействуют и для того, чтобы координировать процессы в корнях, побегах и листьях. В данном разделе мы рассмотрим, как растительные клетки сигнализируют друг другу и как они реагируют на свет. О рецепторах и внутриклеточных сигнальных механизмах растений известно меньше, чем о тех же аспектах жизнедеятельности животных, и мы в основном сосредоточимся на различиях процессов у растений и животных. Некоторые подробности развития растений рассматриваются в главе 22.

15.5.1. Многоклеточность и межклеточная сигнализация в растениях и животных эволюционировали независимо

Несмотря на то что растения и животные — эукариоты, они эволюционировали независимо более миллиарда лет назад. Предположительно их последний общий предок был одноклеточным эукариотическим организмом, содержащим митохондрии, но лишенным хлоропластов; растения приобрели хлоропласты после расхождения растительной и животной линий. Самые древние ископаемые многоклеточные животные и растения датируются 600 миллионами лет назад. Таким образом, по-видимому, растения и животные стали многоклеточными независимо и когда-то эволюционировали из разных одноклеточных эукариот между 1,6 и 0,6 миллиардами лет назад (рис. 15.81).

Если многоклеточность развилась у растений и животных независимо, то молекулы и механизмы клеточной коммуникации также должны были эволюционировать независимо и должны различаться. Однако некоторые свойства должны быть похожи, поскольку гены растений и животных произошли от генов их последнего общего предка. Таким образом, и растения, и животные используют для сигнализации оксид азота, циклический GMP, Ca^{2+} и семейство GTPаз Rho, но в геноме

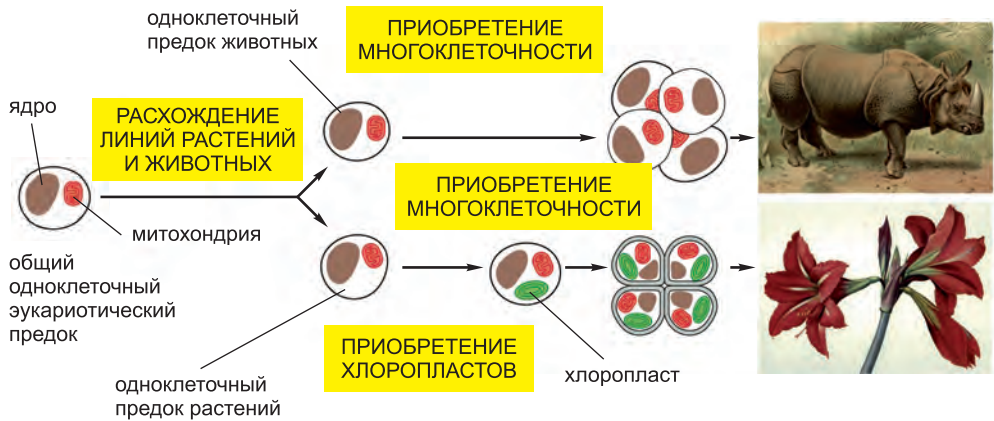


Рис. 15.81. Предположительное расхождение линий растений и животных от общего одноклеточного эукариотического предка. Линия растений приобрела хлоропласты после расхождения царств. Обе линии независимо привели к многоклеточным организмам – растениям и животным. (Рисунки — собственность John Innes Foundation.)

небольшого цветущего растения *Arabidopsis thaliana* нет гомологов семейства ядерных рецепторов, Ras, JAK, STAT, TGF β , Notch, Wnt или Hedgehog. Точно так же растения, по-видимому, не используют для внутриклеточной сигнализации циклический AMP.

Многое из того, что известно о молекулярных механизмах сигнализации у растений, стало результатом генетических исследований *Arabidopsis*. Несмотря на то что молекулы, используемые для межклеточной коммуникации в растениях, отличаются от аналогичных молекул у животных, общие принципы очень похожи. Например, и те, и другие используют сопряженные с ферментами рецепторы.

15.5.2. Рецепторные серин-треониновые киназы — самый крупный класс поверхностных рецепторов растений

Если основные поверхностные рецепторы животных — это рецепторы, сопряженные с G-белками (GPCR), то у растений чаще встречаются сопряженные с ферментами рецепторы. Более того, если у животных основным классом сопряженных с ферментами рецепторов являются тирозинкиназы (RTK), у растений они очень редки. Однако у растений много цитоплазматических тирозинкиназ, и фосфорилирование и дефосфорилирование по тирозину играют важную роль в клеточной сигнализации. Вместо RTK, растения полагаются на разнообразные трансмембранные *рецепторные серин-треониновые киназы*. Несмотря на то что они значительно отличаются от соответствующих животных рецепторов, они несут типичные цитоплазматический серин-треониновый киназный домен и внеклеточный лиганд-связывающий домен. Самый распространенный тип таких рецепторов содержит тандемный повтор внеклеточных обогащенных лейцином последовательностей (**рис. 15.82**) и носит название **рецепторных киназ с повторами, обогащенными лейцином** (*Leucine-rich Repeat Receptor Kinases*, **LRR**).

В геноме *Arabidopsis* закодировано около 175 рецепторных киназ LRR. Одной из наиболее подробно изученных киназ является *рецепторный комплекс*

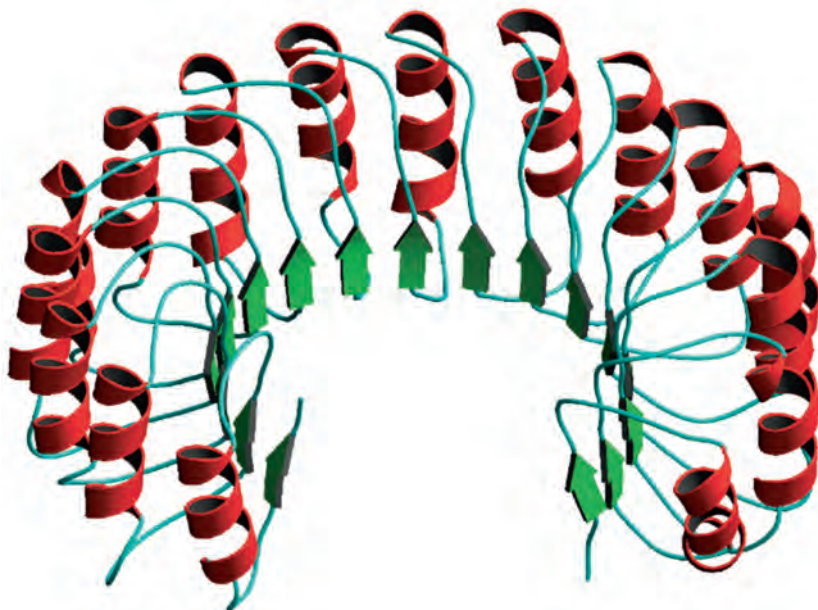


Рис. 15.82. Трехмерная структура обогащенных лейцином последовательностей, сходных с последовательностями, обнаруженными в рецепторных серин-треониновых киназах LRR. Многочисленные копии таких повторов содержатся во внеклеточном домене рецепторной киназы LRR, где они участвуют в связывании сигнальной молекулы. (С любезного разрешения David Lawson.)

Clavata1/Clavata2 (Clv1/Clv2). Мутации, инактивирующие одну из двух субъединиц рецептора, приводят к формированию цветков с дополнительными цветковыми органами и пропорционально увеличенными корневыми и цветковыми *меристемами* — группами самообновляющихся стволовых клеток, дающих начало побегам, листьям и цветкам (см. главу 22). Предполагают, что связывающейся с рецептором внеклеточной сигнальной молекулой служит небольшой белок *Clv3*, секретируемый соседними клетками. Связывание *Clv3* с рецептором *Clv1/Clv2* подавляет рост меристемы за счет ингибирования деления клеток или, что более вероятно, за счет стимуляции клеточной дифференциации (**рис. 15.83, а**).

Внутриклеточный сигнальный путь от рецептора *Clv1/Clv2* до клеточного ответа малоизучен, но в нем принимает участие серин-треониновая протеинфосфатаза, ингибирующая сигнализацию. Также в ответе участвуют GTPазы семейства Rho и ядерный регуляторный белок, являющийся дальним родственником животных гомеодоменных белков. Мутации, инактивирующие этот белок-регулятор генов, действуют противоположным образом по сравнению с мутациями, инактивирующими *Clv1/Clv2*: клеточное деление в корневой меристеме снижается, а у цветков образуется меньше цветковых органов, чем в норме. Таким образом, активируемый *Clv1/Clv2* внутриклеточный сигнальный путь, по-видимому, стимулирует дифференциацию клеток за счет ингибирования белка-регулятора генов, который в норме ингибирует дифференциацию клеток (**рис. 15.83, б**).

Другая рецепторная киназа LRR *Arabidopsis*, носящая название *Bri1*, является частью поверхностного рецептора стероидных гормонов. Растения синтезируют класс

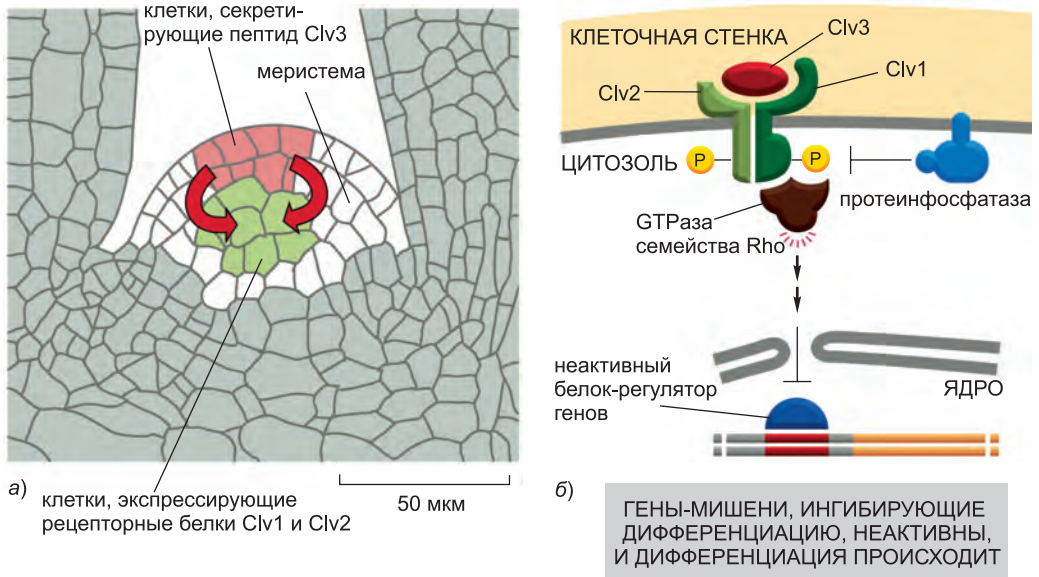


Рис. 15.83. Гипотетическая модель регуляции рецептором Clv1/Clv2 и белком Clv3 клеточной пролиферации и/или дифференциации в корневой меристеме. (а) Клетки во внешнем слое меристемы (светло-красные) секретируют пептид Clv3, который связывает рецепторный белок Clv1/Clv2 клетки-мишени в прилегающей, более центральной области меристемы (зеленая) и стимулирует дифференциацию клеток. (б) Некоторые части внутриклеточного сигнального пути, активируемого связыванием Clv3. После активации связыванием Clv3, Clv1 фосфорилирует рецепторные белки по серинам и треонинам, активируя рецепторный комплекс и стимулируя активацию семейства GTPаз Rho. Дальнейшие этапы пути малопонятны, но они приводят к ингибированию в ядре белка-регулятора генов Wuschel. Поскольку в норме Wuschel блокирует транскрипцию генов, необходимых для дифференциации, его ингибирование сигнализацией Clv3 запускает дифференциацию. Протеинфосфатаза дефосфорилирует рецепторные белки и, следовательно, обеспечивает негативную регуляцию сигнального пути.

стероидов, известных как **брассиностероиды**, поскольку изначально они обнаружены у представителей семейства крестоцветных Brassicaceae, в которое входит *Arabidopsis*. Эти растительные сигнальные молекулы регулируют рост и дифференциацию растений в течение их жизненного цикла. Связывание брассиностероида с поверхностной рецепторной киназой Bri1 запускает сигнальный каскад, в котором для регуляции фосфорилирования и деградации определенных белков-регуляторов генов в ядре и, следовательно, транскрипции генов, используются протеинкиназа GSK3 и протеинфосфатаза. Мутантные растения, несущие дефекты в рецепторной киназе Bri1, нечувствительны к брассиностероидам и поэтому имеют карликовые размеры.

Рецепторные киназы LRR — лишь один из многочисленных классов трансмембранных рецепторных серин-треониновых киназ растений. Существует еще по крайней мере шесть дополнительных семейств, каждое из которых характеризуется определенным набором внеклеточных доменов. *Лектиновые рецепторные киназы*, например, несут внеклеточные домены, связывающие углеводные сигнальные молекулы. Геном *Arabidopsis* кодирует более 300 рецепторных серин-треониновых киназ, что делает их самым крупным семейством растительных рецепторов. Многие из них участвуют в защите от патогенов.

15.5.3. Этилен блокирует в ядре деградацию определенных белков-регуляторов генов

Различные **регуляторы роста** (также называемые **растительными гормонами**) координируют развитие растений. В их число входят *этилен*, *ауксин*, *цитокины*, *гиббереллины* и *абсцизовая кислота*, а также брассиностероиды. Регуляторы роста — это малые молекулы, синтезируемые большинством растительных клеток. Они легко диффундируют через клеточную стенку, могут служить локальными медиаторами или транспортироваться для стимуляции далеко расположенных клеток. Индивидуальные регуляторы роста могут вызвать различные эффекты. Конкретное их воздействие зависит от окружающих условий, питания растения, чувствительности клеток-мишеней и наличия других регуляторов роста.

Этилен — это один из важнейших регуляторов роста. Эта маленькая газообразная молекула (**рис. 15.84, а**) способна разными путями воздействовать на развитие растений; например, она может способствовать созреванию плодов, сбрасыванию листьев и старению растения. Этилен также служит стрессовым сигналом при повреждении, инфицировании, затоплении и так далее. Например, когда стебель проростка наталкивается на препятствие, скажем, кусочек гальки в почве, растение реагирует на это тремя путями. Во-первых, оно утолщает стебель, который благодаря этому сможет приложить большую силу к препятствию. Во-вторых, оно защищает кончик стебля, увеличивая кривизну специализированной изогнутой структуры. В-третьих, растение снижает стремление стебля расти в противоположном гравитации направлении, что также способствует избеганию препятствия. Такой *тройной ответ* контролируется этиленом (**рис. 15.84, б и в**).

Растения несут разнообразные структурно родственные рецепторы этилена, располагающиеся в эндоплазматическом ретикулуме. Они представляют собой димерные многопроходные трансмембранные белки с медь-содержащим этилен-связывающим доменом и доменом, взаимодействующим с белком *CTR1*, последовательность которого очень похожа на последовательность описанной ранее киназы киназы MAP-киназы Raf (**см. рис. 15.60**). Функция *CTR1* в этиленовой сигнализации зависит от серин-треониновой киназной активности и связывания N-концевого домена с этиленовыми рецепторами. Как ни странно, именно свободные рецепторы активны и поддерживают активность *CTR1*. По неизвестному сигнальному механизму *CTR1* стимулирует убиквитинирование и деградацию в протеасомах ядерного белка-регулятора генов *EIN3*, необходимого для транскрипции этилен-чувствительных генов. Таким образом, свободные, но активные рецепторы и активный *CTR1* поддерживают гены ответа на этилен в отключенном состоянии. Растения, несущие инактивирующую мутацию в гене, кодирующем белок *EIN*, становятся не чувствительными к этилену (*Ethylene Insensitive*), откуда и название *EIN*.

Связывание этилена инактивирует рецепторы, изменяя их конформацию таким образом, что они теряют способность связывать *CTR1*. В результате *CTR1* инактивируется, и сигнальный путь, идущий от него, блокируется; останавливаются убиквитинирование и деградация белка *EIN3*, и он активирует транскрипцию многочисленных этилен-чувствительных генов (**рис. 15.85**).

Регуляция *ауксин-чувствительных генов* протекает по другому механизму. Далее мы увидим то, как ауксин контролирует направление и структуру роста растений, что не имеет аналогов в животном мире.

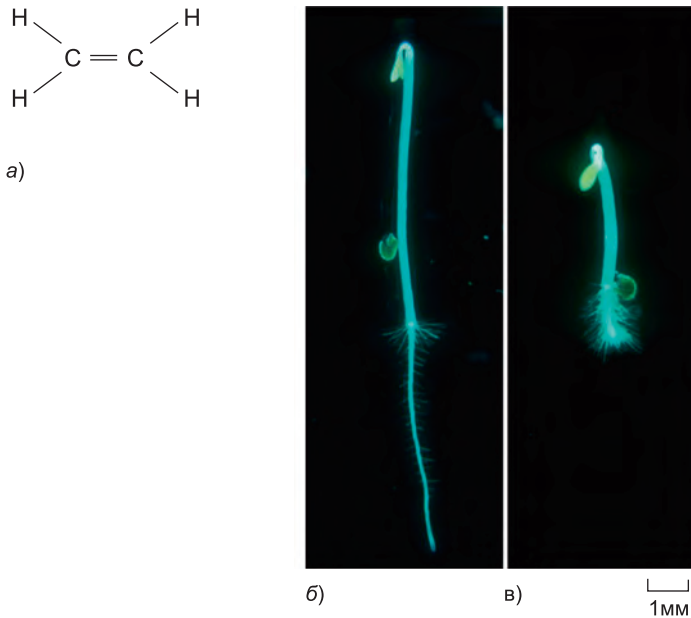


Рис. 15.84. Этилен-опосредованный тройной ответ, протекающий, когда стебель проростка наталкивается под землей на препятствие. (а) Структура этилена. (б) До столкновения с препятствием растущий вверх стебель длинный и тонкий. (в) После столкновения стебель утолщается и для защиты кончика стебля увеличивается кривизна защитного изгиба (на *верхушке*). Стебель также изменяет направление роста, стремясь избежать препятствия (не показано). (С любезного разрешения Melanie Webb.)

15.5.4. Регулируемое распределение транспортеров ауксина направляет рост растения

Растительный гормон **ауксин**, который обычно представляет собой индол-3-уксусную кислоту (**рис. 15.86, а**), связывается с рецепторными белками в ядре. Он способствует росту растений в сторону света, росту вверх, а не в стороны (как при ветвлении), и росту корней вниз. Он также регулирует закладку и расположение органов и помогает растениям цвести и плодоносить. Как и этилен, он влияет на экспрессию генов путем контроля деградации ядерных белков-регуляторов генов. Но он не блокирует убиквитинирование и разрушение белков-регуляторов, необходимых для экспрессии ауксин-чувствительных генов, а стимулирует убиквитинирование и деградацию репрессорных белков, блокирующих транскрипцию этих генов в покоящихся клетках (**рис. 15.86, б и в**).

Транспорт ауксина уникален. В отличие от животных гормонов, которые обычно секретируются специализированными эндокринными органами и транспортируются в клетки-мишени по кровеносной системе, у ауксина есть своя собственная транспортная система. Специфические связанные с плазматической мембраной *белки-переносчики* (*influx transporter proteins*) и «насосы» (*efflux transporter proteins*) транспортируют ауксин в клетку и из нее соответственно. Переносчики и насосы кодируются разными семействами генов, и два семейства белков регулируются независимо. Насосы состоят из *белков Pin*, которые клетки могут асимметрично распределять в плазматической мембране, делая транспорт ауксина

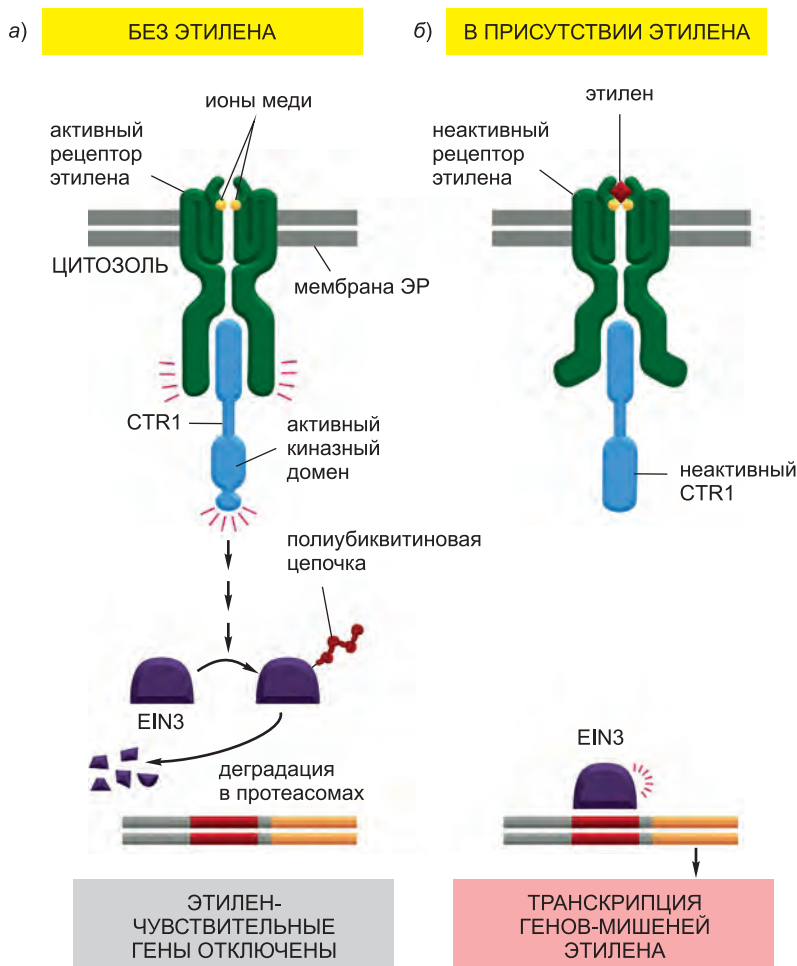


Рис. 15.85. Современные представления о сигнальном пути этилена. (а) В отсутствие этилена рецепторы и CTR1 активны, что приводит к убиквитинированию и разрушению белка EIN3 — ядерного регулятора генов, отвечающего за транскрипцию этилен-чувствительных генов. (б) Связывание этилена инактивирует рецепторы и нарушает их взаимодействие с CTR1. Белок EIN3 не деградирует и, следовательно, активирует транскрипцию этилен-чувствительных генов.

направленным. Одномерный ряд клеток, в которых насосы ауксина расположены в базальной плазматической мембране, например, будет транспортировать ауксин сверху вниз.

В некоторых участках растения локализация ауксиновых транспортеров и, следовательно, направление потока ауксина быстро меняются и регулируются. Клетка способна быстро изменить расположение транспортеров, влияя на транспорт содержащих их везикул. Например, белки-переносчики ауксинов в норме рециркулируют между внутриклеточными везикулами и плазматической мембраной. Клетка может изменить их распределение на поверхности, ингибируя эндоцитоз в одном домене плазматической мембраны, что приведет к накоплению в данном участке переносчиков. Такое происходит в корнях, где гравитация влияет на на-

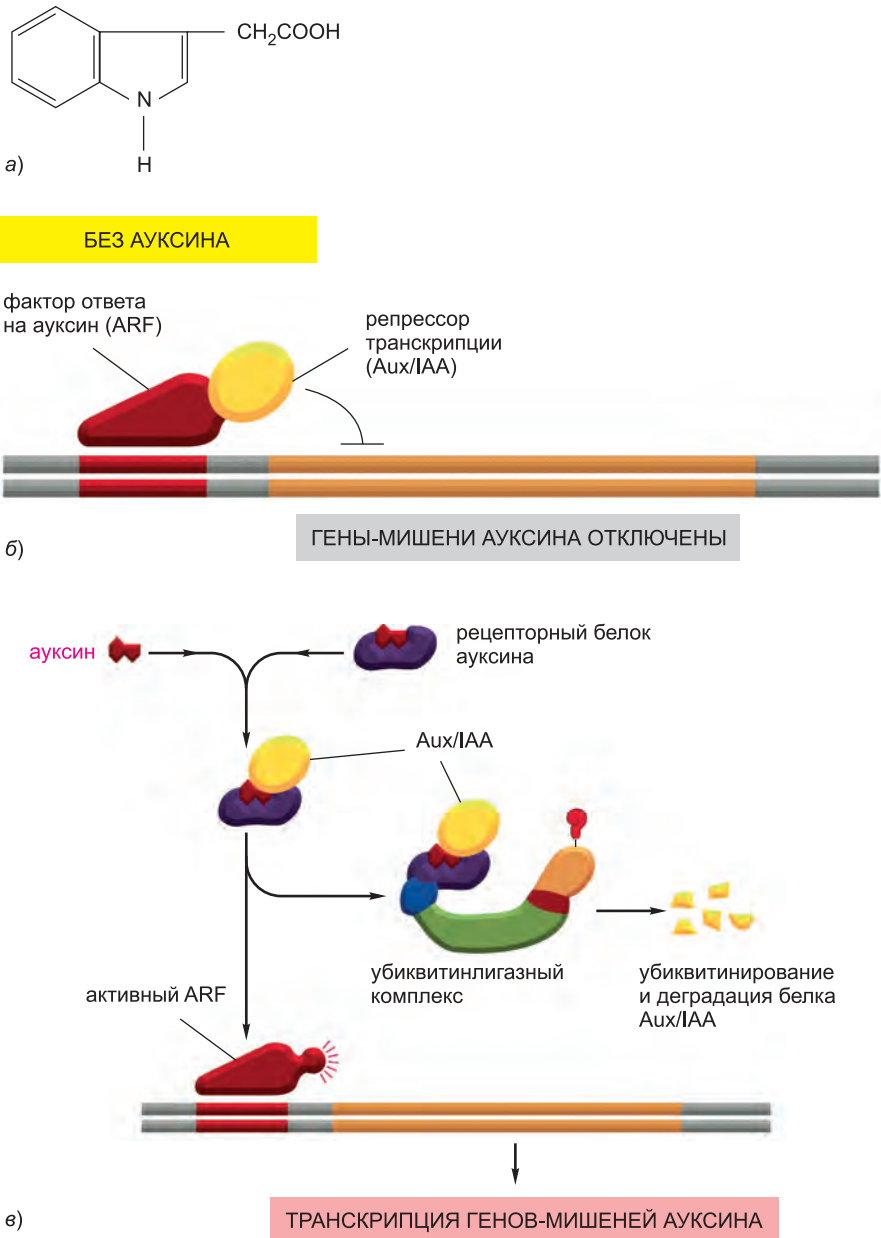


Рис. 15.86. Сигнальный путь ауксина. (а) Структура ауксина индолил-3-уксусной кислоты. (б) В отсутствие ауксина белок-репрессор транскрипции Aux/IAA связывает и блокирует белок-регулятор генов фактор ответа на ауксины (ARF), необходимый для транскрипции ауксин-чувствительных генов. (в) Рецепторные белки ауксинов в основном расположены в ядре, где они входят в состав убиквитинлигазных комплексов (не показано). При активации связыванием ауксина комплексы рецептор-ауксин рекрутируют убиквитинлигазные комплексы, убиквитинирующие белки Aux/IAA и помечающие их для деградации в протеасомах. В результате ARF активирует транскрипцию ауксин-чувствительных генов. Таким образом действуют множество белков ARF, Aux/IAA и ауксиновых рецепторов.

правление роста. Насосы ауксина в норме в клетках корневого чехлика распределены симметрично. Однако в течение минут после изменения вектора гравитации насосы концентрируются в одной части клетки таким образом, чтобы ауксин откачивался в направлении роста кончика корня вниз. Поскольку ауксин ингибирует элонгацию клеток, такое изменение направления транспорта ауксина приводит к переориентации кончика корня, и он снова начинает расти вниз (**рис. 15.87**).

В апикальных меристемах стебля распределение насосов ауксина также динамично и регулируется. Здесь направленный транспорт ауксина способствует регулярной закладке листьев и цветков (см. рис. 22.122).

15.5.5. Фитохромы улавливают красный свет, а криптохромы — синий

Условия окружающей среды очень сильно влияют на развитие растений. В отличие от животных, растения не могут изменить местообитание, когда условия становятся неблагоприятными; они должны адаптироваться или умереть. Самым важным фактором среды для растений является свет, который служит им источником энергии и играет важную роль на протяжении всего жизненного цикла от прорастания и образования семян до цветения и старения. В течение эволюции у растений появилось множество светочувствительных белков для оценки количества, качества, направления и продолжительности освещения. Обычно такие белки называют *фоторецепторами*. Однако, поскольку термин «фоторецептор» также используют для описания светочувствительных клеток сетчатки животных (см. рис. 15.48), мы будем называть их *фотобелками*.

Все фотобелки регистрируют свет при помощи ковалентно связанного светопоглощающего хромофора, изменение формы которого в ответ на свет приводит к изменению конформации белка.

Наиболее хорошо изученными растительными фотобелками являются **фитохромы**, которые содержатся во всех растениях и некоторых водорослях, но отсутствуют у животных. Это димерные цитоплазматические серин-треониновые киназы, которые дифференцированно и обратимо реагируют на красный и дальний красный свет: красный свет обычно активирует киназную активность фитохрома, а дальний красный — инактивирует. Считается, что при активации красным светом фитохром автофосфорилируется и затем фосфорилирует другие белки клетки. При некоторых ответах на свет активированный фитохром переносится в ядро, где он активирует белки-регуляторы и изменяет транскрипцию генов (**рис. 15.88**). В других случаях активированный фитохром в цитоплазме активирует латентный белок-регулятор генов, который затем мигрирует в ядро и регулирует транскрипцию генов. Иногда фотобелок в цитоплазме запускает сигнальные пути, изменяющие поведение клетки без влияния на ядро.

Несмотря на то что фитохромы обладают серин-треониновой киназной активностью, некоторые участки их структуры напоминают гистидинкиназы, участвующие в рассмотренном ранее бактериальном хемотаксисе. Этот факт указывает на то, что растительные фитохромы эволюционировали от бактериальных гистидинкиназ и только позднее их специфичность переключилась с гистидина на серин и треонин.

Растения воспринимают синий свет при помощи фотобелков двух типов: фототропина и криптохромов. **Фототропин** связан с плазматической мембраной и участвует в *фототропизме* — росте растений в направлении источника света. Фототропизм основан на направленной элонгации клеток, стимулируемой ауксином, но промежуточные звенья между фототропином и ауксином не известны.

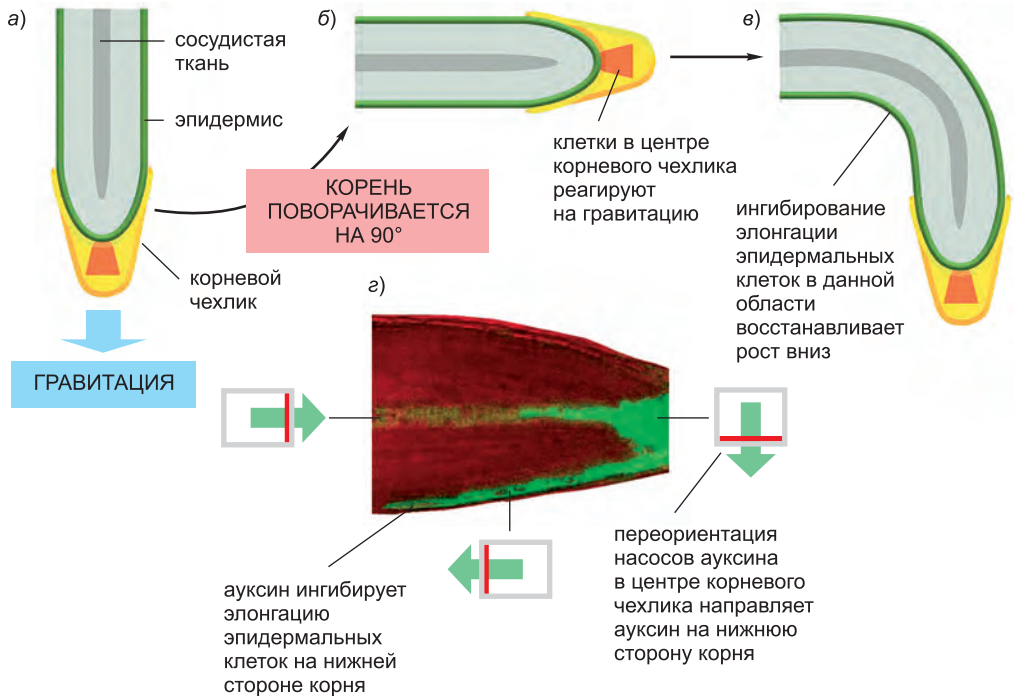


Рис. 15.87. Транспорт ауксинов и гравитропизм корней. (а–в) Корни чувствуют поворот вектора гравитации на 90° и изменяют направление роста таким образом, чтобы снова расти вниз. Клетки, реагирующие на гравитацию, располагаются в центре корневого чехлика, но снижается скорость элонгации расположенных выше клеток эпидермиса. (г) В ответ на изменение положения корня чувствительные к гравитации клетки в корневом чехлике перераспределяют насосы ауксинов. В результате поток ауксина становится направленным в нижнюю часть горизонтально расположенного корня, где ауксин ингибирует элонгацию клеток. Здесь в корне *Arabidopsis* косвенно визуализировано асимметричное распределение ауксина при помощи ауксин-чувствительного репортерного гена, кодирующего белок, сшитый с зеленым флуоресцентным белком (GFP); эпидермальные клетки на нижней стороне корня окрашены зеленым, тогда как расположенные выше клетки бесцветны, что отражает асимметричное распределение ауксина. Распределение насосов ауксина в различных областях корня (серые прямоугольники) показано красным, а направление потока ауксина — зелеными стрелками. (Флуоресцентная фотография на г приведена по статье T. Paciorek et al., *Nature* 435: 1251–1256, 2005. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

Криптохромы — это флавопротеины, чувствительные к синему свету. Они структурно родственны ферментам фотолиазам, которые также способны улавливать синий свет и участвуют в восстановлении вызванных ультрафиолетом повреждений ДНК во всех организмах, за исключением большинства млекопитающих. В отличие от фитохромов, криптохромы встречаются у животных, где они играют важную роль в циркадных ритмах, свойственных большинству клеток и имеющих период, равный 24 часам (см. главу 7). Несмотря на то что криптохромы, по-видимому, эволюционировали из фотолиаз, они не участвуют в восстановлении ДНК.

В этой главе мы рассмотрели, как внеклеточные сигналы влияют на поведение клетки. Одной из ключевых мишеней этих сигналов является цитоскелет, определяющий форму клетки и отвечающий за ее движение. Цитоскелету посвящена следующая глава.

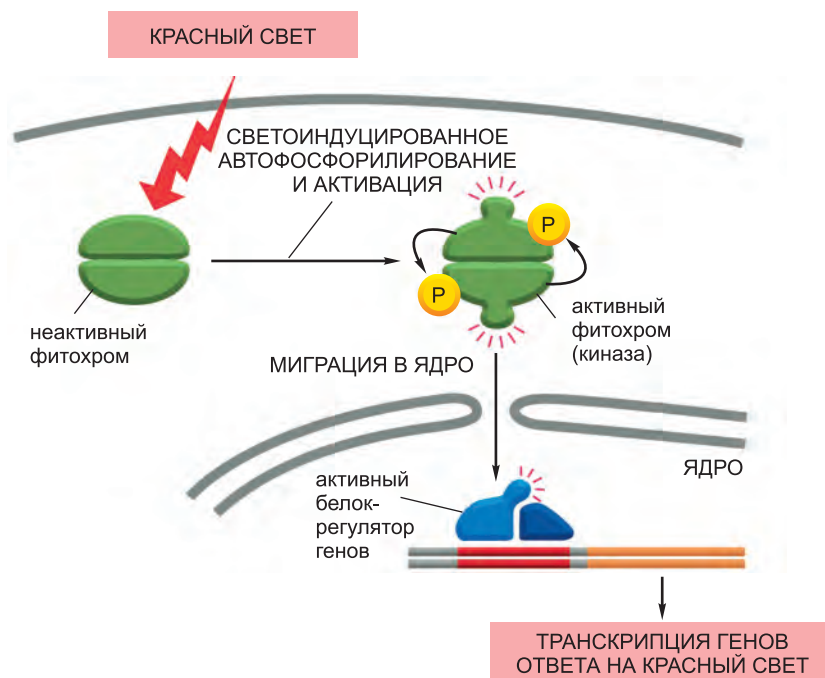


Рис. 15.88. Современные представления об одном из механизмов опосредованного фитохромами ответа на свет в растительных клетках. При активации красным светом фитохром, представляющий собой димерную протеинкиназу, автофосфорилируется и переносится в ядро, где он активирует белки-регуляторы генов и стимулирует транскрипцию чувствительных к красному свету генов.

Заключение

Растения и животные, предположительно, приобрели многоклеточность и механизмы межклеточной коммуникации независимо. Две линии произошли от разных одноклеточных эукариот, имевших общего одноклеточного эукариотического предка. Таким образом, неудивительно, что механизмы межклеточной сигнализации животных и растений обладают как сходствами, так и различиями. Например, если животные полагаются в основном на GPCR, растения используют сопряженные с ферментами рецепторы типа рецепторных серин-треониновых киназ, которые часто несут внеклеточные обогащенные лейцином повторы. Различные растительные гормоны, или регуляторы роста, включая этилен и ауксин, способствуют координации развития растений. Действие этилена опосредовано внутриклеточными рецепторами и направлено на остановку деградации определенных ядерных белков-регуляторов генов, активирующих транскрипцию этилен-чувствительных генов. Рецепторы некоторых других растительных гормонов, включая ауксин, также регулируют деградацию белков-регуляторов генов, хотя и по немного отличающимся механизмам. Ауксиновая сигнализация уникальна тем, что ауксин обладает собственной системой транспорта, в которой динамическое распределение связанных с плазматической мембраной транспортеров ауксина регулирует направление потока этого гормона, что приводит к регуляции направления

роста растения. Свет играет важную роль в регуляции развития растений. Световые ответы опосредуются различными светочувствительными фотобелками, включая фитохромы, улавливающие красный свет, и криптохромы и фототропин, поглощающие синий свет.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности?

Объясните почему

15.1. Рецепторы, участвующие в паракринной, синаптической и эндокринной сигнализации, обладают высоким сродством к своим сигнальным молекулам.

15.2. Все малые внутриклеточные медиаторы (вторичные мессенджеры) растворимы в воде и свободно диффундируют по цитозолю.

15.3. При регуляции молекулярных переключателей протеинкиназы и факторы обмена гуаниновых нуклеотидов (GEF) всегда «включают» белки, а протеинфосфатазы и GTPаза-активирующие белки (GAP) всегда их «выключают».

15.4. В отличие от более прямых сигнальных путей, используемых ядерными рецепторами, каталитические каскады внутриклеточных медиаторов создают множество возможностей для усиления ответов на внеклеточные сигналы.

15.5. Связывание внеклеточных лигандов с рецепторными тирозинкиназами активирует внутриклеточный каталитический домен за счет распространения конформационных перестроек единственной α -спирали через липидный бислой.

15.6. Тирозинфосфатазы высокоспецифичны по отношению к своим субстратам, тогда как серин-треониновые фосфатазы обладают широкой специфичностью.

15.7. Несмотря на то что растения и животные независимо приобрели многоклеточность, для межклеточной сигнализации они используют практически одинаковые сигнальные белки и вторичные мессенджеры.

Решите следующие задачи

15.8. Пусть концентрация циркулирующего гормона равна 10^{-10} М, а K_d его связывания с рецептором равна 10^{-8} М. Сколько рецепторов (в процентах от общего числа) свяжет гормон? Если физиологический ответ происходит, когда 50% рецепторов связывает гормон, насколько должна вырасти концентрация гормона для запуска ответа? Доля рецепторов (R), связанных с гормоном (H) с образованием гормон-рецепторного комплекса (H-R), равна $[H-R]/([R] + [H-R]) = [H-R]/[R]_{\text{общ}} = [H]/([H] + K_d)$.

15.9. Коммуникация клеток друг с другом напоминает общение между людьми. Определите, какие из следующих форм человеческого общения соответствуют аутокринной, паракринной, эндокринной и синаптической сигнализациям.

- а. Разговор по телефону
- б. Общение с людьми на вечеринке
- в. Объявление по радио
- г. Беседа с самим собой

15.10. Почему сигнальные ответы, основанные на изменении существующих белков клетки, протекают за миллисекунды и секунды, а ответы, для которых требуется изменение экспрессии генов, занимают минуты и часы?

15.11. Почему различные клетки, даже если они несут одинаковые рецепторы, могут по-разному отвечать на одну и ту же сигнальную молекулу?

15.12. Как вы считаете, почему фосфорилирование/дефосфорилирование, а не, например, аллостерическое связывание малых молекул, стало играть такую важную роль в активации и инактивации белков в сигнальных путях?

15.13. Рассмотрите сигнальный путь, состоящий из трех последовательно активируемых фосфорилированием протеинкиназ. В одном случае киназы удерживаются каркасным белком в сигнальном комплексе; в другом киназы свободно диффундируют (**рис. Q15.1**). Какими свойствами обладают эти два типа организации с точки зрения усиления сигнала, скорости и возможности пересечения сигнальных путей?

15.14. Опишите три механизма, по которым постепенный ответ на внеклеточный сигнал может стать резким или протекать по принципу «все или ничего».

15.15. Активация («созревание») ооцитов лягушки опосредована сигнализацией через MAP-киназный сигнальный модуль. Увеличение концентрации гормона прогестерона активирует модуль путем стимуляции трансляции мРНК Mos, которая служит у лягушек киназой киназы MAP-киназы (**рис. Q15.2**). Созревание легко оценить визуально по белому пятну на коричневой поверхности ооцита (см. **рис. Q15.2**). Чтобы построить кривую «доза-ответ» для индуцированной прогестероном активации MAP-киназы, вы помещаете в шесть пластиковых чашек Петри по 16 ооцитов и добавляете различные концентрации прогестерона. После двенадцати-часовой инкубации вы разрушаете ооциты, приготавливаете экстракт и определяете уровень фосфорилирования (и, следовательно, активации) MAP-киназы при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (**рис. Q15.3, а**). Анализ показывает постепенный ответ MAP-киназы на увеличение концентрации прогестерона.

До того, как вы разрушили ооциты, вы заметили, что не на всех ооцитах в чашках видны белые пятна. Возможно, некоторые ооциты претерпели лишь частичную активацию и не достигли стадии белого пятна? Чтобы ответить на этот вопрос, вы повторяете эксперимент, но в этот раз вы анализируете MAP-киназную активность отдельных ооцитов. К своему удивлению, вы обнаруживаете, что по отдельности все ооциты несут либо полностью активированную, либо полностью неактивную

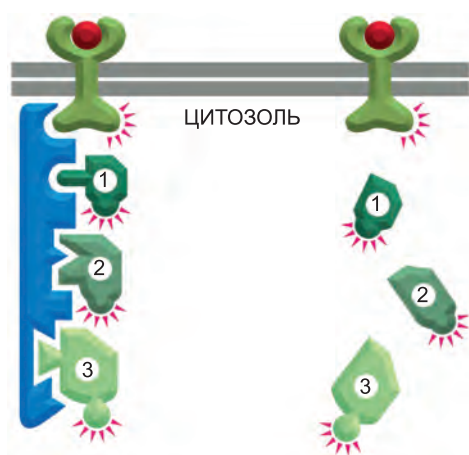


Рис. Q15.1. Каскад протеинкиназ, упорядоченный каркасным белком, или содержащий свободно диффундирующие компоненты (задача 15.13).

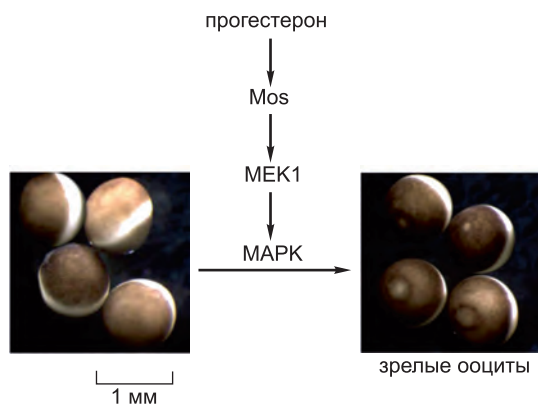
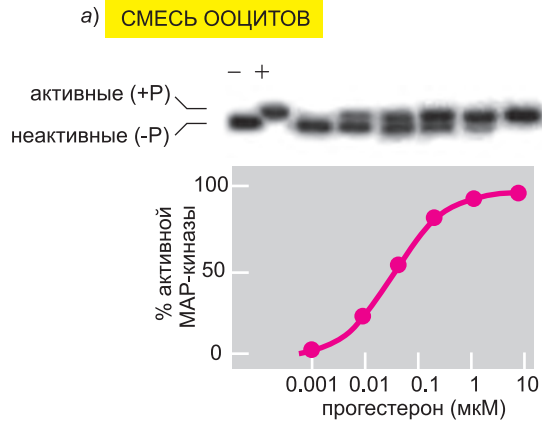


Рис. Q15.2. Прогестерон-зависимая активация MAP-киназы, приводящая к созреванию ооцитов (задача 15.15). (С любезного разрешения Helfrid Hochegger.)

Рис. Q15.3. Активация ооцитов лягушки (задача 15.15). (а) Фосфорилирование MAP-киназы в смеси ооцитов. (б) Фосфорилирование MAP-киназы в отдельных ооцитах. MAP-киназу регистрировали методом иммуноблоттинга с использованием MAP-киназа-специфичного антитела. Первые две дорожки в геле содержат нефосфорилированную, неактивную MAP-киназу (–) и фосфорилированную, активную MAP-киназу (+). (Из J. E. Ferrell, Jr., and E. M. Machleder, *Science* 280: 895–898, 1998. С любезного разрешения издательства AAAS.)



MAP-киназу (рис. Q15.3, б). Как ответ по принципу «все или ничего» отдельных ооцитов может привести к постепенному ответу популяции?

15.16. Предложите типы мутаций гена регуляторной субъединицы РКА, которые могли бы привести к постоянной активации или инактивации РКА.

15.17. Киназа фосфорилации объединяет сигналы сАМР-зависимого и Ca^{2+} -зависимого

сигнальных путей, контролирующих расщепление гликогена в клетках печени и мышц (рис. Q15.4). Киназа фосфорилации состоит из четырех субъединиц. Одна из них — это протеинкиназа, катализирующая присоединение фосфата к гликогенфосфорилазе и активирующая ее способность расщеплять гликоген. Остальные три субъединицы — это регуляторные белки, контролирующие активность катали-

б) ОТДЕЛЬНЫЕ ООЦИТЫ

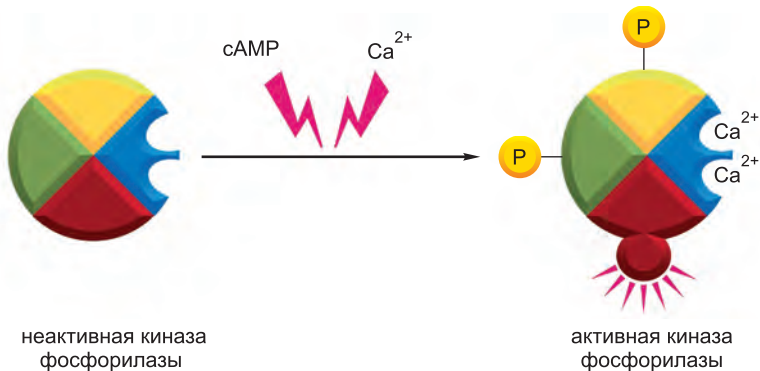
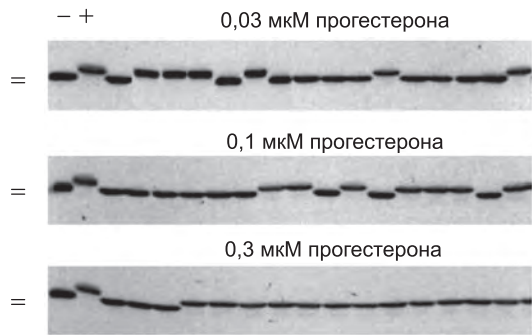


Рис. Q15.4. Объединение сАМР-зависимого и Ca^{2+} -зависимого путей киназой фосфорилации в клетках печени и мышц (задача 15.17).

тической субъединицы. Две из них несут сайты фосфорилирования киназой PKA, активируемой циклическим AMP. Третья субъединица — это кальмодулин, связывающий Ca^{2+} при увеличении его концентрации в цитозоле. Регуляторные субъединицы контролируют равновесие между активной и неактивной конформациями каталитической субъединицы. Как такой механизм позволяет киназе фосфоорилазы выполнять роль белка-интегратора различных сигнальных путей, стимулирующих расщепление гликогена?

15.18. В принципе, концентрация активированной связанной с GTP формы Ras может быть увеличена за счет активации фактора обмена гуаниновых оснований (GEF) или инактивации GTPаза-активирующего белка (GAP). Как вы считаете, почему в Ras-опосредованных сигнальных путях концентрация Ras-GTP увеличивается за счет активации GEF, а не инактивации GAP?

15.19. Благодаря сигнальному пути полярности Wnt каждая клетка крыльев *Drosophila* несет по одному волоску. Вызванная промотором теплового шока (*hs-Fz*) повышенная экспрессия гена *Frizzled* приводит к тому, что на клетках крыльев вырастает по несколько волосков (рис. Q15.5, а). Данный фенотип подавляется, если *hs-Fz* объединяется с гетерозиготной делецией (*Dsh^Δ*) гена *Dishevelled* (рис. Q15.5б). Позволяют ли эти данные определить взаимную последовательность *Frizzled* и *Dishevelled* в сигнальном пути? Если да, то в каком порядке они идут? Объясните ваш ответ.

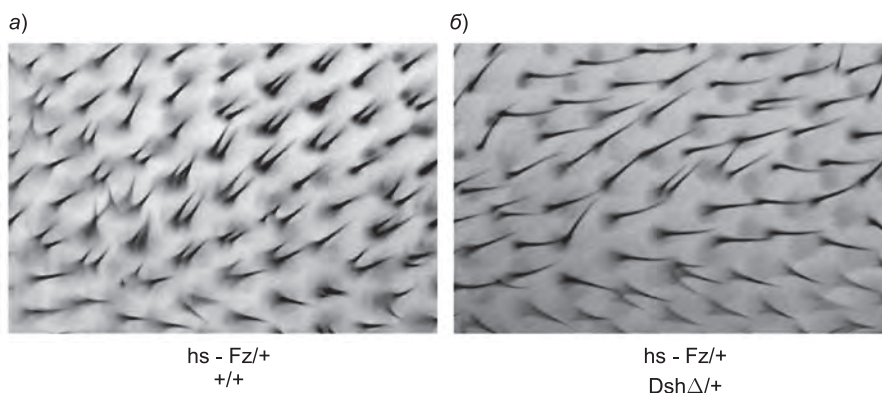


Рис. Q15.5. Рост волосков на клетках крыльев генетически отличной *Drosophila* (задача 15.19). (Из С. G. Wintter et al., Cell 105: 81–91, 2001. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Литература

Общая

Bradshaw R. A. & Dennis E. A. (eds.) (2003) Handbook of Cell Signaling. Elsevier: St Louis. Science's Signal Transduction Knowledge Environment (Stke): www.stke.org

Общие принципы клеточной коммуникации

Ben-Shlomo I., Yu Hsu S., Rauch R. et al. (2003) Signaling receptome: a genomic and evolutionary perspective of plasma membrane receptors involved in signal transduction. *Sci. STKE* 187: RE9.

Bourne H. R. (1995) GTPases: a family of molecular switches and clocks. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 349: 283–289.

Ferrell J. E. Jr. (2002) Self-perpetuating states in signal transduction: positive feedback, double-negative feedback and bistability. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14: 140–148.

Mangelsdorf D. J., Thummel C., Beato M. et al. (1995) The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 83: 835–839.

Murad F. (2006) Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. *N. Engl. J. Med.* 355: 2003–2011.

Papin J. A., Hunter T., Palsson B. O. & Subramaniam S. (2005) Reconstruction of cellular signalling networks and analysis of their properties. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 99–111.

Pawson T. & Scott J. D. (2005) Protein phosphorylation in signaling—50 years and counting. *Trends Biochem. Sci.* 30: 286–290.

Pires-daSilva A. & Sommer R. J. (2003) The evolution of signaling pathways in animal development. *Nature Rev. Genet.* 4: 39–49.

Robinson-Rechavi M., Escriva Garcia H. & Laudet V. (2003) The nuclear receptor superfamily. *J. Cell Sci.* 116: 585–586.

Seet B. T., Dikic I., Zhou M. M. & Pawson T. (2006) Reading protein modifications with interaction domains. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 473–483.

Singla V. & Reiter J. F. (2006) The primary cilium as the cell's antenna: signaling at a sensory organelle. *Science* 313: 629–633.

Сигнализация посредством G-белков, связанных с рецепторами на поверхности клетки и малыми внутриклеточными медиаторами

Berridge M. J. (2005) Unlocking the secrets of cell signaling. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 1–21.

Berridge M. J., Bootman M. D. & Roderick H. L. (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 4: 517–529.

Breer H. (2003) Sense of smell: recognition and transduction of olfactory signals. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 113–116.

Burns M. E. & Baylor D. A. (2001) Activation, deactivation, and adaptation in vertebrate photoreceptor cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 24: 779–805.

Cooper D. M. (2005) Compartmentalization of adenylate cyclase and cAMP signalling. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 1319–1322.

Hoeflich K. P. & Ikura M. (2002) Calmodulin in action: diversity in target recognition and activation mechanisms. *Cell* 108: 739–742.

Hudmon A. & Schulman H. (2002) Structure-function of the multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Biochem. J.* 364: 593–611.

Kamenetsky M., Middelhaufe S., Bank E. M. et al. (2006) Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems. *J. Mol. Biol.* 362: 623–639.

Luttrell L. M. (2006) Transmembrane signaling by G protein-coupled receptors. *Methods Mol. Biol.* 332: 3–49.

McConnachie G., Langeberg L. K. & Scott J. D. (2006) AKAP signaling complexes: getting to the heart of the matter. *Trends Mol. Med.* 12: 317–323.

Parker P. J. (2004) The ubiquitous phosphoinositides. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 893–898.

Pierce K. L., Premont R. T. & Lefkowitz R. J. (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 639–650.

Reiter E. & Lefkowitz R.J. (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol. Metab.* 17: 159–165.

Rhee S.G. (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 281–312.

Robishaw J.D. & Berlot C.H. (2004) Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 206–209.

Shaywitz A.J. & Greenberg M.E. (1999) CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 821–861.

Сигнализация посредством сопряженных с ферментами поверхностных рецепторов

Baker M.D., Wolanin P.M. & Stock J.B. (2006) Signal transduction in bacterial chemotaxis. *BioEssays* 28: 9–22.

Dard N. & Peter M. (2006) Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *BioEssays* 28: 146–156.

Darnell J.E. Jr., Kerr I.M. & Stark G.R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264: 1415–1421.

Downward J. (2004) PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 177–182.

Jaffe A.B. & Hall A. (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 247–269.

Massague J. & Gomis R.R. (2006) The logic of TGF β signaling. *FEBS Lett.* 580: 2811–2820.

Mitin N., Rossman K.L. & Der C.J. (2005) Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* 15: R563–574.

Murai K.K. & Pasquale E.B. (2003) Eph'ective signaling: forward, reverse and crosstalk. *J. Cell Sci.* 116: 2823–2832.

Pawson T. (2004) Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116: 191–203.

Qi M. & Elion E.A. (2005) MAP kinase pathways. *J. Cell Sci.* 118: 3569–3572.

Rawlings J.S., Rosier K.M. & Harrison D.A. (2004) The JAK/STAT signaling pathway. *J. Cell Sci.* 117: 1281–1283.

Roskoski R. Jr. (2004) Src protein-tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 1155–1164.

Schlessinger J. (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211–225.

Sahin M., Greer P.L., Lin M.Z. et al. (2005) Eph-dependent tyrosine phosphorylation of ephexini modulates growth cone collapse. *Neuron* 46: 191–204.

Schwartz M.A. & Madhani H.D. (2004) Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 38: 725–748.

Shaw R.J. & Cantley L.C. (2006) Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 44: 424–430.

Wassarman D.A., Therrien M. & Rubin G.M. (1995) The Ras signaling pathway in *Drosophila*. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5: 44–50.

Wullschleger S., Loewith R. & Hall M.N. (2006) TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124: 471–484.

Сигнальные пути, основанные на регулируемом протеолизе латентных белков-регуляторов генов

Bray S.J. (2006) Notch signalling: a simple pathway becomes complex. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 678–689.

Clevers H. (2006) Wnt β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127: 469–480.

Hoffmann A. & Baltimore D. (2006) Circuitry of nuclear factor κ B signaling. *Immunol. Rev.* 210: 171–186.

Huangfu D. & Anderson K.V. (2006) Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development* 133: 3–14.

Сигнализация в растениях

Benavente L.M. & Alonso J.M. (2006) Molecular mechanisms of ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Biosyst.* 2: 165–173.

Chen M., Chory J. & Fankhauser C. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* 38: 87–117.

Dievart A. & Clark S.E. (2004) LRR-containing receptors regulating plant development and defense. *Development* 131: 251–261.

Teale W.D., Paponov I.A. & Palme K. (2006) Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 847–859.

Цитоскелет

Чтобы клетки нормально функционировали, они должны ориентировать себя в пространстве и механически взаимодействовать с окружающей средой. Они должны обладать правильной формой, быть физически жесткими и структурированными. Многим необходимо периодически изменять форму и перемещаться. Все клетки должны быть способны перестраивать свои внутренние компоненты по мере роста, деления и адаптации к изменяющимся условиям. У эукариотических клеток пространственные и механические функции высоко развиты и основаны на удивительной системе филаментов — **цитоскелете** (рис. 16.1).

Цитоскелет растаскивает хромосомы при митозе и затем разделяет клетку на две дочерние. Он служит движущей и направляющей силой внутриклеточного транспорта органелл, перенося вещество из одной части клетки в другую. Цитоскелет поддерживает хрупкую плазматическую мембрану и создает механические сочленения, позволяющие клетке, не повреждаясь, выдерживать напряжение и растяжение, накладываемые изменениями окружающей среды. Благодаря цитоскелету такие клетки, как например, сперматозоиды, способны плавать, а фибробласты и белые клетки крови могут ползать по поверхностям. Он формирует аппарат сокращения мышечных клеток и удлинения аксонов и дендритов нервных клеток, направляет рост растительной клеточной стенки и контролирует удивительное разнообразие форм эукариотических клеток.

Разнообразные функции цитоскелета зависят от поведения трех семейств белковых молекул, которые полимеризуются с образованием трех основных типов филаментов. Каждый тип филаментов обладает характерными механическими свойствами, динамикой и биологической ролью, но в основе их функционирования лежат общие фундаментальные принципы. Эти принципы формируют основу понимания того, как работает цитоскелет и как взаимодействуют его различные элементы. Точно так

же как человеку для нормальной жизнедеятельности необходима скоординированная работа связок, костей и мышц, три системы цитоскелетных филаментов должны работать вместе, для того чтобы придать клетке жесткость, форму и способность к движению.

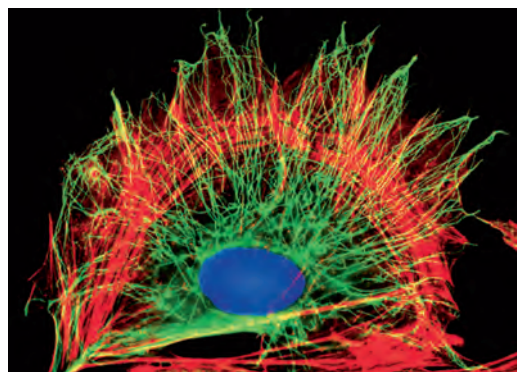


Рис. 16.1. Цитоскелет. Культуру клеток фиксировали и окрасили, для того чтобы показать две основные системы цитоскелета — микротрубочки (зеленые) и актиновые филаменты (красные). ДНК в ядре окрашена синим. (С любезного разрешения Albert Tousson.)

Мы начнем главу с описания трех основных типов филаментов, фундаментальных принципов, лежащих в основе их сборки и разборки, и свойств, отличающих их друг от друга. Затем мы рассмотрим, как другие белки взаимодействуют с тремя основными филаментными системами, позволяя клетке поддерживать внутренний порядок, изменять свою форму и поверхность, направленно перемещать органеллы и, когда необходимо, перемещаться самой.

16.1. Самосборка и динамическая структура филаментов цитоскелета

Большинство животных клеток несет три типа цитоскелетных филаментов, отвечающих за пространственную организацию и механические свойства. *Промежуточные филаменты* придают клеткам механическую жесткость. *Микротрубочки* определяют расположение мембранных органелл и направляют внутриклеточный транспорт. *Актиновые филаменты* определяют форму клеточной поверхности и необходимы для движения клетки как целого. Но филаменты цитоскелета были бы неэффективны без сотен дополнительных белков, связывающих филаменты с другими компонентами клетки и друг с другом. Такие многочисленные *ассоциированные с цитоскелетом белки* необходимы для контролируемой сборки филаментов в определенных участках клетки. Среди них стоит выделить *двигательные белки*, удивительные молекулярные машины, преобразующие энергию гидролиза АТФ в механическую силу, способную перемещать органеллы вдоль филаментов или сами филаменты относительно друг друга.

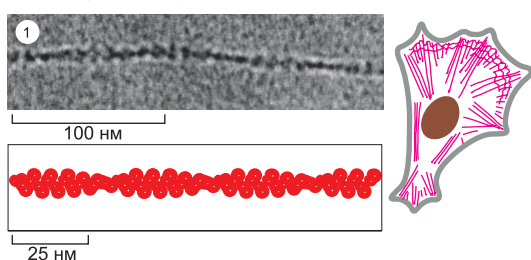
В данном разделе мы обсудим свойства белков, входящих в состав филаментов и цитоскелета. Мы сконцентрируемся на их способности образовывать полярные и самоорганизующиеся структуры. Увидим, что благодаря механизмам, обеспечивающим динамичность цитоскелетных филаментов, клетка способна быстро реагировать на любые непредвиденные обстоятельства.

16.1.1. Филаменты цитоскелета динамичны и быстро адаптируются

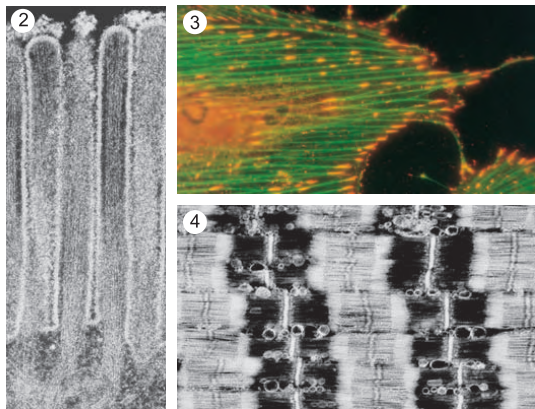
Системы цитоскелета динамичны и быстро адаптируются, они больше похожи на муравьиные тропы, чем на скоростные автомагистрали. Отдельная муравьиная тропа, соединяющая муравейник с местом пикника, может сохраняться в течение нескольких часов, но муравьи, пользующиеся ею, отнюдь не статичны. Если муравьи-разведчики обнаруживают новый источник пищи, или если участники пикника собирают вещи и уходят, динамическая структура с удивительной скоростью перестраивается. Точно так же крупномасштабные цитоскелетные структуры способны по необходимости изменяться или сохраняться. Время их существования изменяется от нескольких десятков секунд до времени жизни клетки. Но отдельные макромолекулярные составляющие этих структур находятся в постоянном движении. Таким образом, как и перепланировка муравьиных троп, структурная перестройка клетки при изменении условий требует дополнительной энергии.

Регуляция динамического поведения и сборки филаментов цитоскелета позволяет эукариотическим клеткам создавать огромное число структур на основе трех филаментных систем. На микрофотографиях в [приложении 16.1](#) показаны некоторые из этих структур. Микротрубочки, часто образующие похожую на звезду цитоплазматическую структуру, распространяющуюся из центра интерфазной

АКТИНОВЫЕ ФИЛАМЕНТЫ

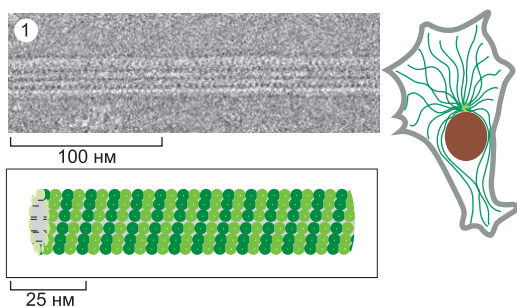


Актиновые филаменты (также известные как *микрофиламенты*) — это двуцепочечные спиральные полимеры белка актина. Они представляют собой гибкие структуры диаметром 5–9 нм и образуют разнообразные линейные пучки, двумерные сети и трехмерные гели. Несмотря на то что актиновые филаменты распределены по всей клетке, основная их масса расположена в кортексе, сразу под плазматической мембраной.

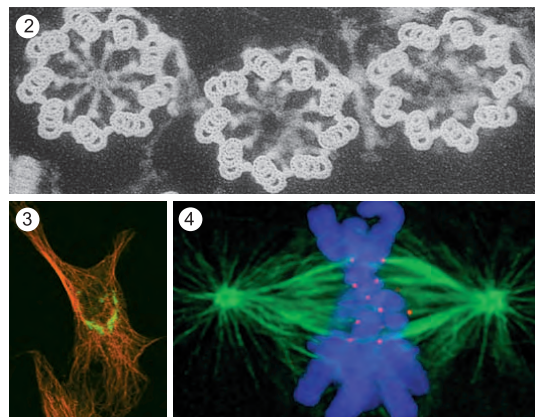


Микрофотографии получены от Roger Craig (1 и 4); P. T. Matsudaira и D. R. Burgess (2); Keith Burrige (3).

МИКРОТРУБОЧКИ

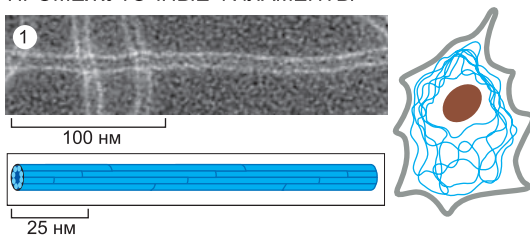


Микротрубочки — это длинные полые цилиндры, состоящие из белка тубулина. Их внешний диаметр составляет 25 нм, поэтому они значительно жестче актиновых филаментов. Микротрубочки длинные и прямые, и обычно один их конец связан с единственным центром организации микротрубочек (МТОС), носящим название *центросомы*.

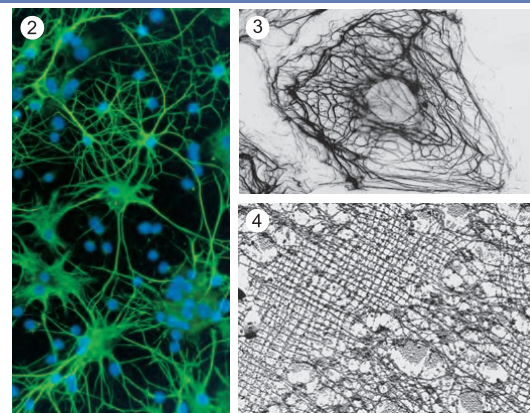


Микрофотографии получены от Richard Wade (1); D. T. Woodrow and R. W. Linck (2); David Shima (3); A. Desai (4).

ПРОМЕЖУТОЧНЫЕ ФИЛАМЕНТЫ



Промежуточные филаменты — это похожие на канат волокна диаметром около 10 нм; они образованы промежуточными филаментными белками, составляющими крупное и неоднородное семейство. Один тип промежуточных филаментов образует сеть, носящую название ядерной ламина и расположенную под ядерной мембраной. Другие типы распределены по всей цитоплазме и придают клетке механическую прочность. В эпителиальной ткани они проходят по всей цитоплазме от одного межклеточного контакта до другого, таким образом укрепляя весь эпителий.



Микрофотографии получены Roy Quinlan (1); Nancy L. Kedersha (2); Mary Osborne (3); Ueli Aebi (4).

клетки, способны во время деления клетки быстро перестраиваться с образованием биполярного *митотического веретена деления*. Они также способны формировать на поверхности клетки подвижные выросты, носящие названия *ресничек* и *жгутиков*, и плотные пучки, направляющие транспорт веществ по длинным аксонам нейронов. В растительных клетках организованные структуры микротрубочек направляют синтез клеточной стенки.

Актиновые филаменты располагаются под плазматической мембраной животных клеток, придавая жесткость и форму ее тонкому липидному бислою. Они также образуют разнообразные выросты клетки. Некоторые из этих выростов представляют собой динамические структуры, например *ламеллоподии* и *филоподии*, которые служат для изучения окружающей территории и передвижения. Актиновое *сократительное кольцо* временно образуется для разделения клетки надвое; более стабильные структуры позволяют клеткам прикрепляться к субстрату, и обеспечивают сокращение мышц. Регулярные пучки *стереоцилий* на поверхности волосковых клеток внутреннего уха содержат стабильные пучки актиновых филаментов, отклоняющихся в ответ на звук. Сходно организованные *микроворсинки* эпителиальных клеток кишечника значительно увеличивают площадь поверхности апикальных клеток и усиливают всасывание питательных веществ.

Промежуточные филаменты выстилают внутреннюю поверхность ядерной оболочки, защищая ДНК клетки; в цитозоле они образуют толстые пучки, удерживающие вместе слои эпителиальных клеток или способствующие росту длинных и жестких аксонов нервных клеток. Благодаря промежуточным филаментам формируются такие твердые образования, как волосы и ногти.

Важным и ярким примером быстрой перестройки цитоскелета является деление клеток. На **рис. 16.2** показано деление фибробластов, выращиваемых в культуре ткани. После репликации хромосом интерфазная сеть микротрубочек, распространяющаяся по всей цитоплазме, преобразуется в биполярное *митотическое веретено деления*, выполняющее ключевую функцию точного распределения копий реплицированной хромосомы по двум дочерним ядрам. Одновременно специализированные актиновые структуры, позволяющие фибробластам ползать по поверхности чашки Петри, разбираются, и клетка перестает двигаться, округляется и принимает более сферическую форму. Затем актин и ассоциированный с ним двигательный белок миозин образуют перетяжку вокруг центра клетки — *сократительное кольцо*, которое, как маленькая мышца, сокращается и разделяет клетку надвое. Когда деление заканчивается, цитоскелеты двух дочерних фибробластов заново собираются в интерфазную структуру, и округлые клетки превращаются в уменьшенные копии уплощенной и подвижной материнской клетки. В случае фибробластов такая последовательность событий занимает около часа; в некоторых случаях, например, при ранних ядерных делениях в зародыше *Drosophila*, цитоскелет актина и микротрубочек способен полностью перестраиваться менее чем за пять минут (**рис. 16.3**).

Многим клеткам для нормального функционирования быстрые перестройки цитоскелета необходимы и во время интерфазы. Например, *нейтрофилы* — разновидность белых клеток крови, преследуют и поглощают бактерии и клетки грибов, случайно попавшие в стерильные в нормальных условиях части тела через повреждения кожи. Как и большинство ползающих клеток, нейтрофилы перемещаются за счет выростов на ведущем конце клетки, заполненных полимеризованными актиновыми филаментами. Когда бактерия меняет направление, нейтрофил за секунды перестраивает свои поляризованные выросты (**рис. 16.4**). Оба типа быстрых

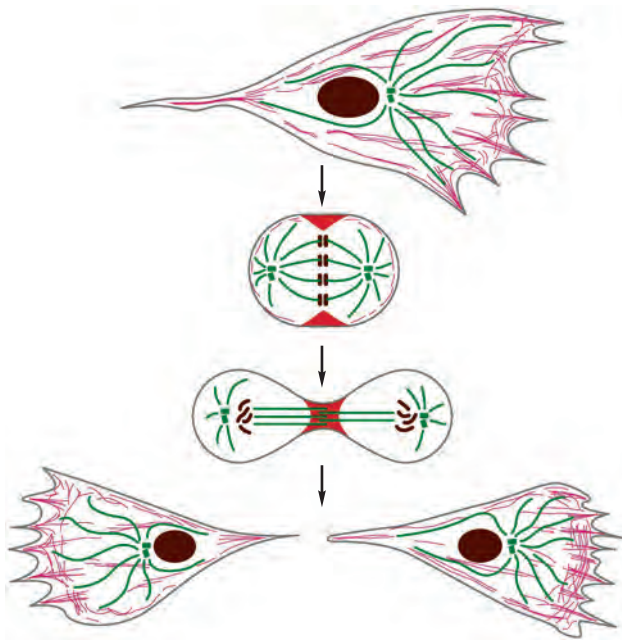


Рис. 16.2. Быстрые изменения организации цитоскелета, связанные с клеточным делением. Изображенный здесь подвижный фибробласт обладает полярным динамичным актиновым цитоскелетом (красный), который собирается для проталкивания ведущего конца направо. Поляризации актинового скелета способствует микротрубочковый цитоскелет (зеленый), состоящий из длинных микротрубочек, выходящих из расположенного вблизи ядра единственного центра. Когда клетка делится, поляризованная сеть микротрубочек перестраивается с образованием митотического веретена деления, отвечающего за выстраивание по экватору клетки и расхождение удвоенных хромосом (коричневые). Актиновые филаменты образуют в центре клетки сократительное кольцо, разделяющее клетку надвое после расхождения хромосом. После завершения клеточного деления две дочерние клетки перестраивают актиновый и микротрубочковый цитоскелеты в уменьшенные копии цитоскелета материнской клетки, что позволяет им начать двигаться в нужном направлении.

перестройка скелета будут более подробно рассмотрены в заключительном разделе данной главы.

16.1.2. Цитоскелет способен образовывать стабильные структуры

В клетках со стабильной, дифференцированной морфологией, например зрелых нейронах или эпителиальных клетках, динамические элементы цитоскелета должны образовывать устойчивые крупные структуры, лежащие в основе организации клетки. На специализированных эпителиальных клетках, выстилающих, например, кишечник и легкие, цитоскелетные выросты поверхности, включая микроворсинки и реснички, сохраняют постоянное расположение, длину и диаметр на протяжении всей жизни клетки. В случае актиновых пучков в центре микроворсинок эпителиальных клеток кишечника это время составляет всего несколько дней. Но актиновые пучки стереоцилий волосковых клеток внутреннего уха должны сохранять стабильную организацию все время жизни животного, поскольку эти клетки не обновляются. Несмотря на это, отдельные актиновые филаменты удивительно динамичны и непрерывно перестраиваются и заменяются примерно каждые

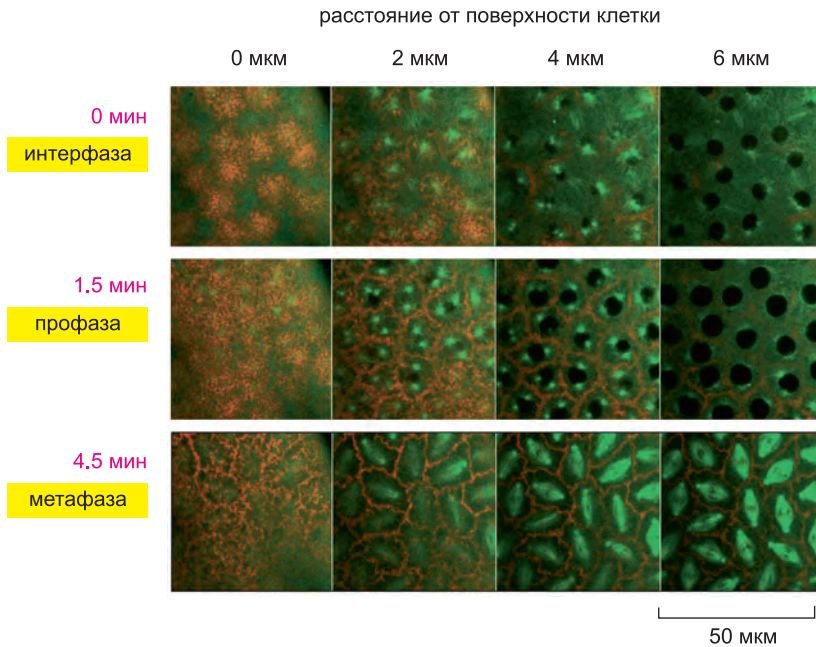


Рис. 16.3. Быстрые изменения структуры цитоскелета, наблюдаемые при развитии раннего эмбриона *Drosophila*. В данной гигантской многоядерной клетке в общей цитоплазме примерно каждые 10 минут происходят ранние ядерные деления. Быстрая перестройка актиновых филаментов (красные) и микротрубочек (зеленые), показанная здесь в живой клетке, необходима для расхождения хромосом в митозе и предотвращения столкновения ядер друг с другом. (С любезного разрешения William Sullivan.)

48 часов даже в пределах этих стабильных поверхностных клеточных структур, поддерживающихся десятилетиями.

Помимо образования стабильных специализированных поверхностных выростов, цитоскелет также отвечает за крупномасштабную полярность клеток, позволяющую клеткам различать верх и низ, перед и зад. Информация о полярности, закодированная в устройстве цитоскелета, часто должна сохраняться всю жизнь

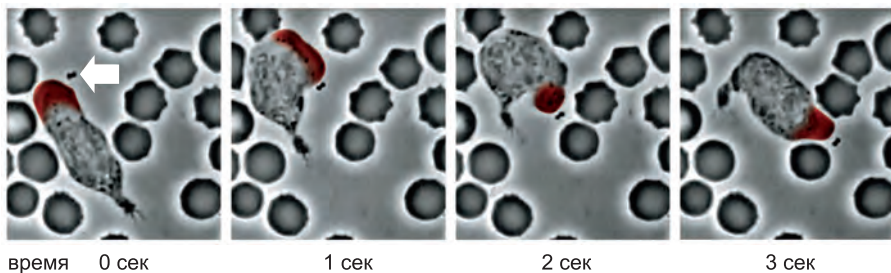


Рис. 16.4. Нейтрофил в погоне за бактерией. В данном препарате человеческой крови нейтрофил близок к поглощению группы бактерий (белая стрелка). По мере движения бактерий нейтрофил быстро перестраивает плотную актиновую сеть на ведущем конце клетки (красная) для движения вслед за бактериями. Быстрая разборка и сборка актинового цитоскелета позволяет нейтрофилу за секунды изменять свою ориентацию и направление движения. (Из видео, записанного David Rogers.)

клетки. Например, выстилающие просвет кишечника полярные эпителиальные клетки используют структурированные сети микротрубочек, актиновых и промежуточных филаментов для поддержания ключевых различий между *апикальной поверхностью*, всасывающей питательные вещества из просвета кишечника, и *базолатеральной поверхностью*, где клетки транспортируют питательные вещества через плазматическую мембрану в кровь. Они также должны поддерживать прочные адгезионные контакты друг с другом, чтобы образовывать единый клеточный слой, служащий эффективным физическим барьером (рис. 16.5).

Даже таким небольшим, морфологически простым клеткам, как почкующиеся дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, необходима крупномасштабная поляризация. Наиболее заметное свойство структуры этих клеток — явная асимметрия, наблюдаемая при их делении почкованием с образованием маленькой дочерней и крупной материнской клеток. Эта асимметрия — результат поляризованной ориентации актинового цитоскелета клетки. Эти клетки несут два типа актиновых структур:

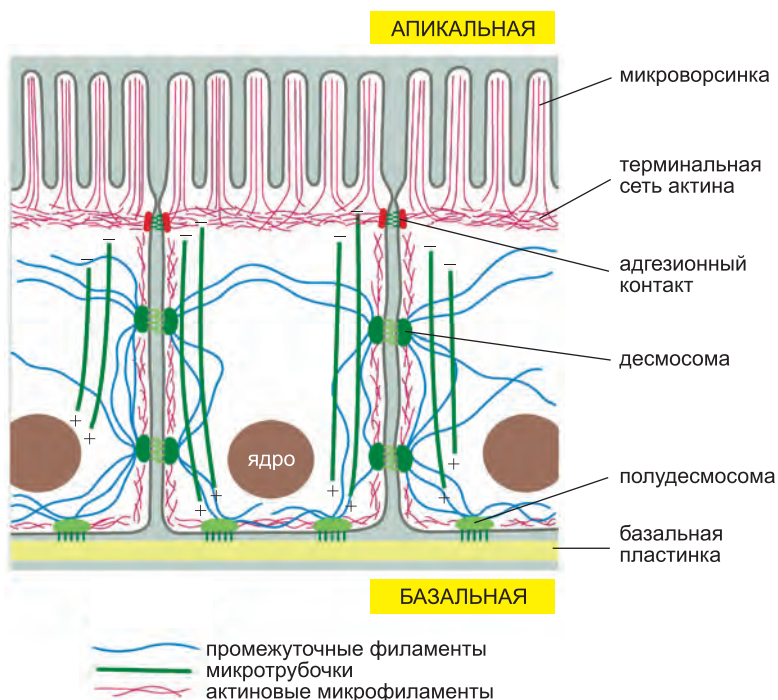


Рис. 16.5. Организация цитоскелета поляризованных эпителиальных клеток. Все компоненты цитоскелета действуют согласованно, создавая характерную форму специализированных клеток, включая эпителиальные клетки, выстилающие тонкий кишечник. На апикальной (верхней) поверхности, обращенной в просвет кишечника, пучки актиновых филаментов (красные) образуют микроворсинки, увеличивающие площадь клеточной поверхности, доступной для всасывания питательных веществ. Прямо под микроворсинками периферическая сеть актиновых филаментов вносит вклад в образование межклеточных контактов, препятствующих попаданию содержимого просвета кишечника в организм. Промежуточные филаменты (голубые) закорены в других адгезионных структурах, включая десмосомы и полудесмосомы, объединяющие эпителиальные клетки в твердый слой и прикрепляющие их к внеклеточному матриксу на базальной стороне клеток; эти важные адгезионные структуры рассмотрены в главе 19. Микротрубочки (зеленые) расположены вертикально сверху вниз; они создают глобальную систему координат, позволяющую клетке направлять новосинтезированные компоненты в соответствующие участки клетки.

актиновые волокна (длинные пучки актиновых филаментов) и актиновые «заплаты» (небольшие группы филаментов, связанные с кортексом клетки и маркирующие сайты актин-зависимого эндоцитоза). Пролиферирующие клетки почкующихся дрожжей должны быть высокополяризованными, чтобы клетка смогла вырастить почку только в одном сайте клеточной поверхности, а не равномерно увеличиваться в размере. Во время этого процесса актиновые заплаты концентрируются на верхушке растущей почки, а актиновые волокна выстраиваются вдоль, и их концы указывают в сторону заплат. Такая организация актина направляет секрецию новой клеточной стенки и других веществ в сайте почкования (рис. 16.6). Полярность актиновых структур, в свою очередь, влияет на ориентацию митотического веретена деления, которое в конце процесса деления переносит в дочернюю клетку полный набор реплицированных хромосом.

16.1.3. Цитоскелетные филаменты состоят из белковых субъединиц

Цитоскелетные структуры часто простираются от одного конца клетки до другого, имея в длину десятки или даже сотни микрометров. Однако размер отдельных белковых молекул цитоскелета обычно составляет всего несколько нанометров. Клетки строят крупные структуры за счет последовательной сборки большого числа маленьких субъединиц, как строители строят небоскреб из кирпичей. Поскольку эти субъединицы малы, они легко диффундируют по цитоплазме, тогда как собранные филаменты обычно остаются на месте. Таким образом, клетки способны претерпевать быстрые структурные перестройки, разбирая филаменты на одном конце клетки и заново собирая на другом (рис. 16.7).

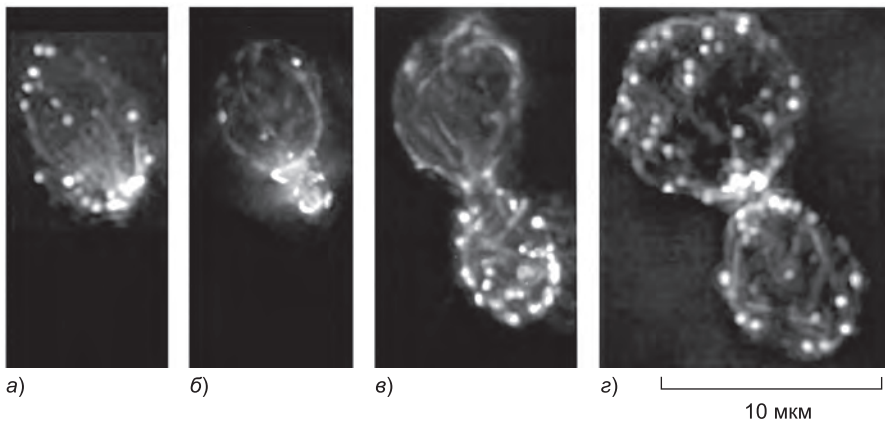


Рис. 16.6. Полярность актиновых заплат и волокон в клеточном цикле дрожжей. В состав актиновых структур дрожжей, окрашенных здесь флуоресцентным красителем фаллоидином, входят актиновые заплаты (яркие круглые пятна) и актиновые волокна (длинные линии). (а) В материнской клетке до образования почки большинство заплат концентрируется на одном конце. Волокна выстраиваются вдоль клетки, и их концы направлены в сторону сайта, откуда вырастет почка. (б) По мере роста маленькой почки большинство заплат остается в ней. Волокна материнской клетки остаются направленными в сторону сайта роста новой клеточной стенки. (в) Заплаты практически равномерно распределены по поверхности полноразмерной почки. Волокна в материнской клетке сохраняют поляризацию. Сразу после клеточного деления материнская и дочерняя клетки образуют новые заплаты, концентрирующиеся вблизи сайта деления, хотя волокна обеих клеток ориентируются произвольно. (Из Т. S. Karpova et al., *J. Cell Biol.* 142: 1501–1517, 1998. С любезного разрешения издательства Rockefeller University Press.)

Промежуточные филаменты состоят из небольших субъединиц, которые сами по себе вытянуты и волокнисты, а актиновые филаменты и микротрубочки собираются из компактных глобулярных субъединиц — *актиновых субъединиц* в случае актиновых филаментов и *тубулиновых субъединиц* в случае микротрубочек. Все три типа цитоскелетных филаментов образуют спиральные структуры субъединиц (см. рис. 3.26), самосборка которых происходит посредством белковых контактов «конец к концу» и «начало к началу». Различия между структурами этих субъединиц и силами притяжения между ними служат причиной ключевых различий в стабильности и механических свойствах филаментов.

Ковалентные связи между субъединицами удерживают вместе многие типы биологических полимеров, включая ДНК, РНК и белки. С другой стороны, слабые нековалентные взаимодействия удерживают вместе субъединицы трех типов цитоскелетных «полимеров». Таким образом, без необходимости образования и разрыва ковалентных связей их сборка и разборка могут протекать очень быстро.

В пределах клетки сотни ассоциированных с цитоскелетом белков регулируют пространственное распределение и динамическое поведение филаментов, преобразуя полученную по сигнальным путям информацию в какое-либо действие цитоскелета. Эти дополнительные белки связывают филаменты или их субъединицы и таким образом определяют сайты сборки новых филаментов, регулируют соотношение между филаментной и субъединичной формами полимерных белков, изменяют кинетику сборки и разборки филаментов, преобразуют энергию для создания механической силы и связывают филаменты друг с другом и другими клеточными структурами, например органеллами и плазматической мембраной. В этих процессах дополнитель-

ные белки подводят цитоскелетные структуры под контроль внеклеточных и внутриклеточных сигналов, включая сигналы, приводящие к протекающим в каждом клеточном цикле значительным трансформациям цитоскелета. Действуя согласованно, дополнительные белки позволяют эукариотическим клеткам поддерживать высокоорганизованную, но гибкую внутреннюю структуру и, во многих случаях, передвигаться.

16.1.4. Филаменты, образующиеся из множества протофиламентов, обладают преимуществами

В общем случае связывание белковых субъединиц друг с другом с образованием

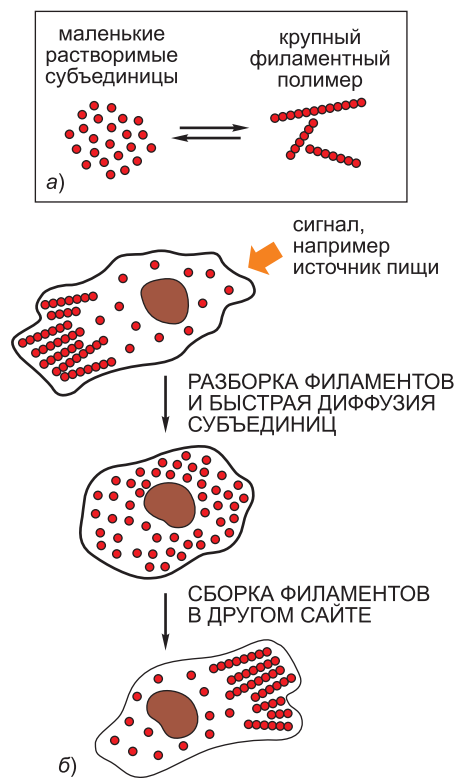


Рис. 16.7. Цитоскелет во время изменения формы клетки. Образование белковых филаментов из маленьких белковых субъединиц позволяет регулируемой сборке и разборке филаментов изменять форму цитоскелета. (а) Образование филаментов из небольшого белка. (б) Быстрая перестройка цитоскелета клетки в ответ на внешний сигнал.

филамента можно рассматривать как простую реакцию ассоциации. Свободная субъединица связывается с концом филамента, содержащего n субъединиц, с образованием филамента длины $n + 1$. Добавление каждой следующей субъединицы к концу полимера создает новый конец, к которому может присоединиться новая субъединица. Однако жесткие цитоскелетные филаменты в живых клетках строятся не просто за счет прикрепления субъединиц друг к другу в одну прямую цепочку. Например, сотни тубулиновых мономеров, уложенных конец к концу, будут простираться на диаметр небольшой эукариотической клетки, но образованному таким образом филаменту, если его субъединицы не будут очень крепко связаны друг с другом, не будет хватать прочности, и он будет разрушен за счет окружающей тепловой энергии. Но слишком сильное связывание субъединиц будет ограничивать скорость разборки филаментов, делая цитоскелет статичной и менее полезной структурой.

Цитоскелетные полимеры обладают прочностью и адаптивностью благодаря тому, что они состоят из множества **протофиламентов** — длинных линейных волокон соединенных конец к концу субъединиц, — объединяющихся латерально. Обычно протофиламенты закручиваются вокруг друг друга в спиральную решетку. Добавление или потеря субъединицы на конце одного из протофиламентов создает или разрушает один узел продольных связей и один или два узла латеральных связей. С другой стороны, разрушение составного филамента посередине требует одновременного разрушения продольных связей в нескольких протофиламентах (**рис. 16.8**). Большая разность энергий между этими двумя процессами позволяет большинству цитоскелетных филаментов противостоять тепловому разрушению, сохраняя динамичность концов, где в любой момент может произойти добавление или удаление субъединиц.

Как и в случае других специфичных белок-белковых взаимодействий, субъединицы цитоскелетных филаментов удерживаются вместе многочисленными гидрофобными взаимодействиями и слабыми нековалентными связями (см. рис. 3.4). Расположение и тип межсубъединичных контактов разнятся для различных филаментов цитоскелета. Промежуточные филаменты, например, собираются за счет образования сильных латеральных контактов между α -спиральными двойными спиралями, чей размер сопоставим с длиной самих волокнистых структур. Поскольку отдельные субъединицы в филаменте относительно подвижны, промежуточные филаменты выдерживают растяжение и сгибание, образуя прочные, похожие на веревку структуры (**рис. 16.9**). С другой стороны, микротрубочки состоят из глобулярных субъединиц, удерживаемых вместе в основном продольными связями, тогда как латеральные связи, удерживающие 13 протофиламентов вместе, относительно слабы. Поэтому микротрубочки при сгибании ломаются гораздо легче, чем промежуточные филаменты.

16.1.5. Нуклеация — это лимитирующая стадия образования цитоскелетного полимера

Сборка цитоскелетных полимеров из нескольких протофиламентов имеет важное дополнительное свойство. Короткие олигомеры, состоящие из нескольких субъединиц, могут собираться самопроизвольно, но они нестабильны и легко разбираются, поскольку каждый мономер связан всего с несколькими другими. Для образования нового крупного филамента субъединицы должны сначала объединиться

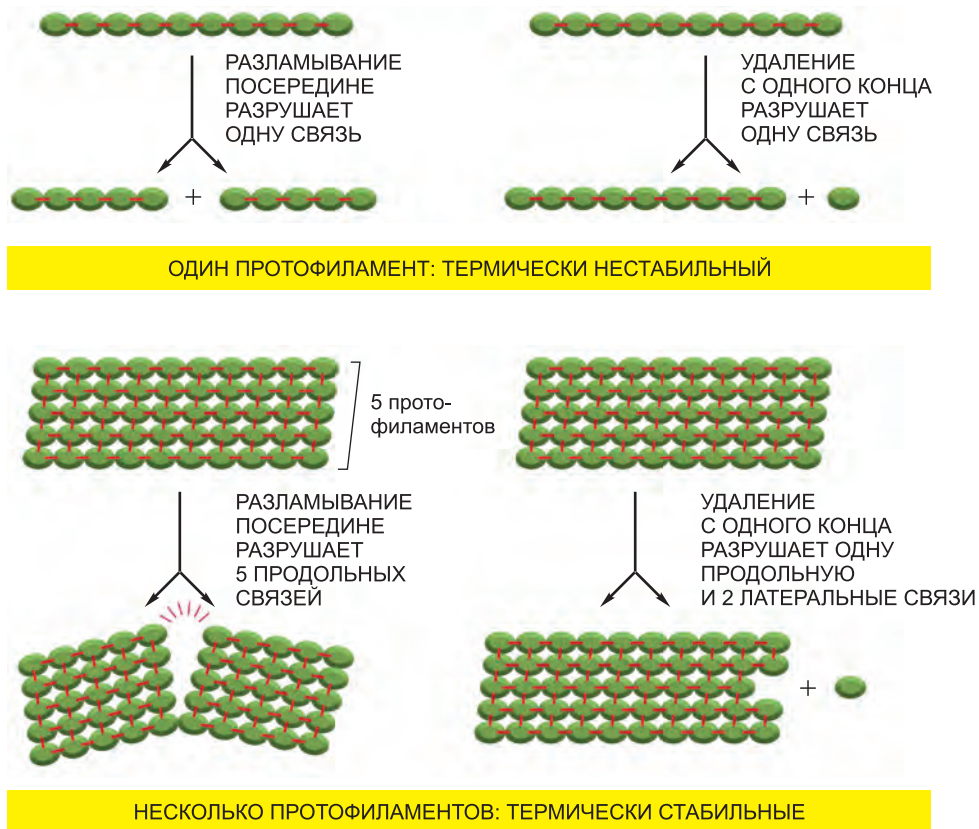


Рис. 16.8. Тепловая устойчивость цитоскелетных филаментов с динамичными концами. Образование цитоскелетных филаментов из нескольких протофиламентов позволяет концам оставаться динамичными, а филаментам быть устойчивыми к тепловому разрушению. В данном гипотетическом примере филамент состоит из пяти протофиламентов. Связи, удерживающие субъединицы вместе, показаны красным.

в крупный агрегат, или зародыш, стабилизируемый многочисленными межсубъединичными контактами. Только после этого полимер будет быстро собираться путем добавления новых субъединиц. Начальный процесс сборки зародыша назван *нуклеацией* (*зарождением*, или *зародышеобразованием*) филамента, и он может продолжаться довольно длительное время в зависимости от того, сколько субъединиц должно сблизиться для образования зародыша.

Неустойчивость маленьких агрегатов создает кинетический барьер нуклеации, который легко наблюдать в растворах актина или тубулина — субъединиц актиновых филаментов и микротрубочек соответственно. Когда полимеризацию инициируют (за счет повышения температуры или концентрации соли) в пробирке, содержащей раствор отдельных субъединиц, сначала наблюдает лаг-фаза, во время которой филаменты не обнаруживаются. Однако в течение лаг-фазы несколько маленьких нестабильных агрегатов переходят в более устойчивую филаментную форму. В результате после этой фазы наблюдают фазу быстрого удлинения филаментов, во время которой субъединицы быстро присоединяются к концам зародышей фи-

подвижные длинные субъединицы: преобладают латеральные контакты

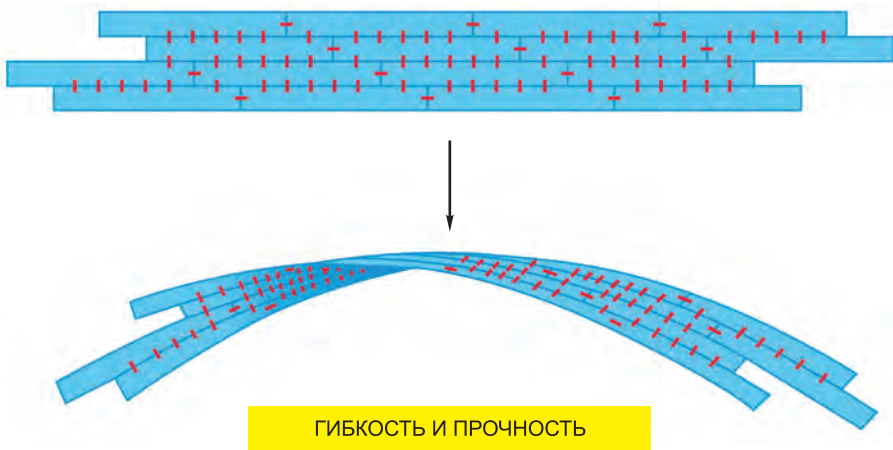


Рис. 16.9. Прочный филамент, состоящий из связанных латерально удлинённых волокнистых субъединиц. Так собираются промежуточные филаменты, которые в результате особенно устойчивы к силам растяжения, но легко гнутся.

ламентов (рис. 16.10, а). Наконец, система достигает стационарного состояния, при котором скорость добавления новых субъединиц к концам филамента уравнивается скоростью диссоциации субъединиц с концов. Стационарная концентрация оставшихся в растворе субъединиц называется *критической концентрацией*, C_c . Как отмечено в [приложении 16.2 \(стр. 978–979\)](#), величина критической концентрации равна константе скорости потери субъединиц, деленной на константу скорости добавления субъединиц, т.е. $C_c = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$.

Лаг-фаза роста филаментов исчезает, если в начале реакции полимеризации к раствору добавить готовые зародыши, например, химически перекрестно сшитые фрагменты филаментов (рис. 16.10, б). Клетка эффективно использует условие нуклеации: специальные ферменты катализируют нуклеацию филаментов в специфических сайтах, что позволяет задавать места сборки новых цитоскелетных структур. В самом деле, регуляция нуклеации филаментов является основным способом контроля их формы и движения.

16.1.6. Для образования полярных филаментов тубулиновые и актиновые субъединицы собираются по принципу «голова к хвосту»

Микротрубочки строятся из белковых субъединиц **тубулина**. Субъединица тубулина — это гетеродимер, образованный двумя нековалентно связанными близкородственными глобулярными белками α - и β -*тубулином* (рис. 16.11). Тубулины существуют только в форме гетеродимера. α - и β -мономер несут по одному сайту связывания молекулы GTP. Связанный с мономером α -тубулина GTP физически заперт на поверхности взаимодействия мономеров и никогда не гидролизуются или обмениваются; таким образом, его можно рассматривать как неотъемлемую часть структуры гетеродимера тубулина. Нуклеотид на β -тубулине, наоборот, может существовать в форме GTP или GDP и при необходимости обменивается. Как

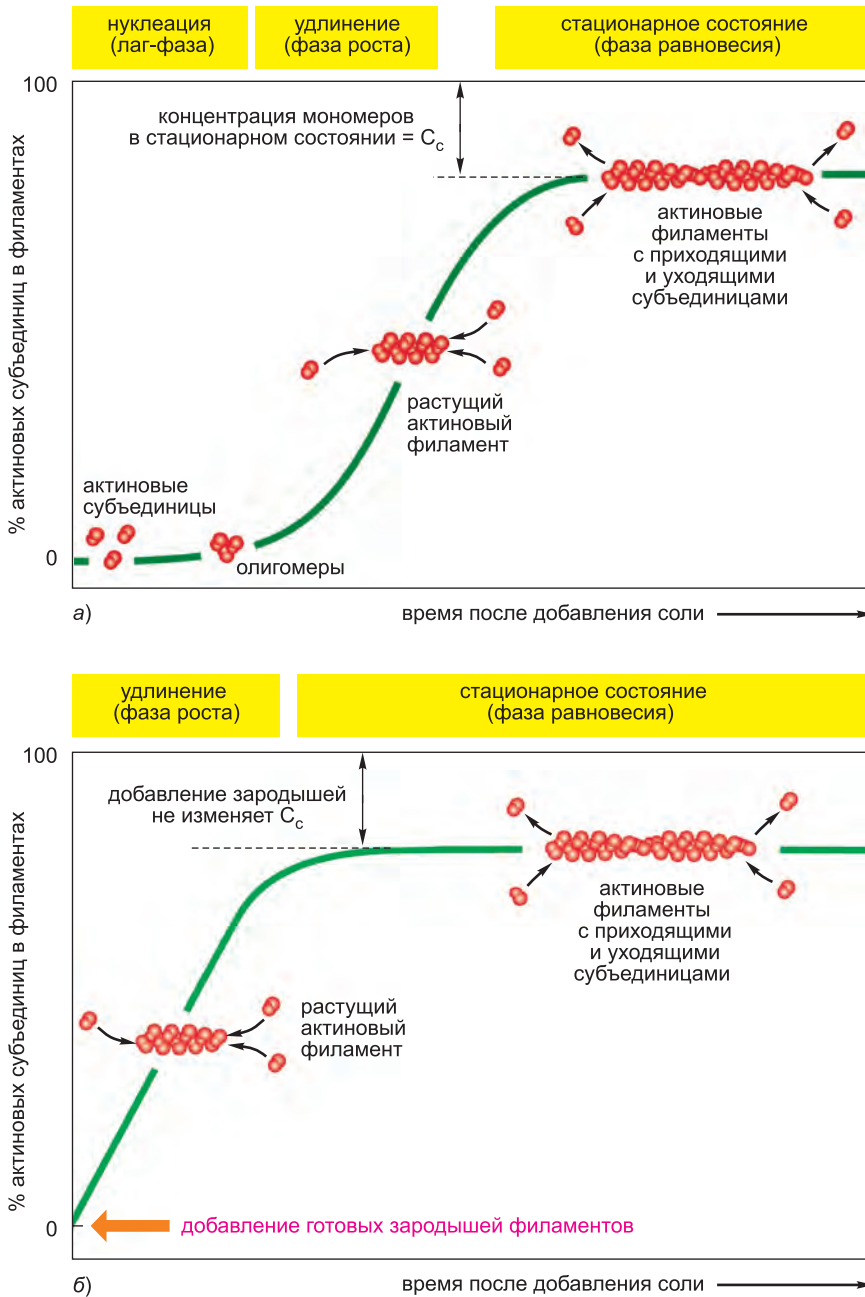


Рис. 16.10. Временная зависимость полимеризации актина в пробирке. Полимеризацию инициируют (а) увеличением концентрации соли в растворе актиновых субъединиц и таким же образом (б), но в растворе содержатся готовые фрагменты филаментов, служащие зародышами для роста новых филаментов. Как показано, % свободных субъединиц отражает критическую концентрацию (C_c), при которой суммарно не происходит изменения длины полимеров.

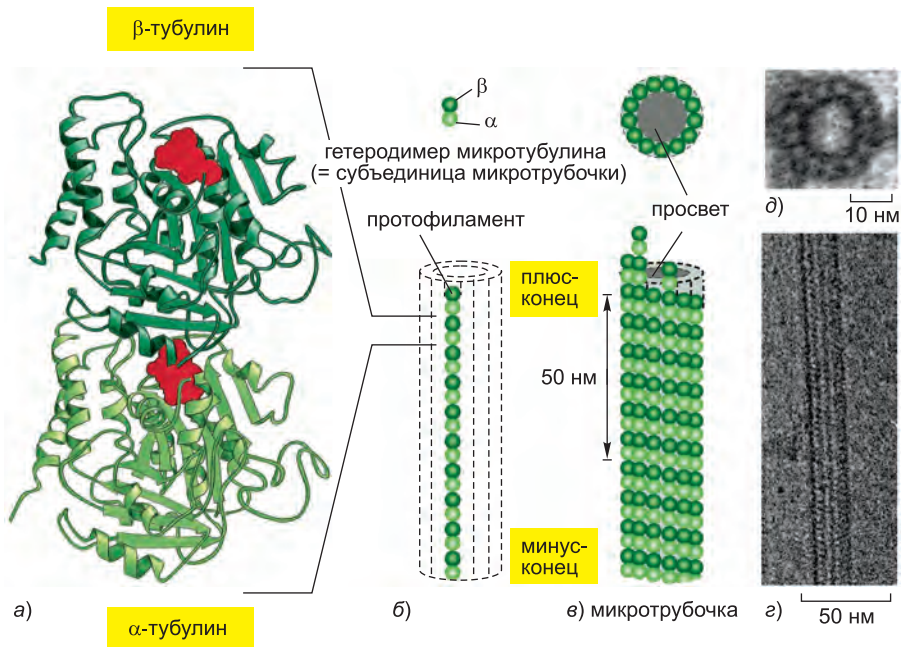


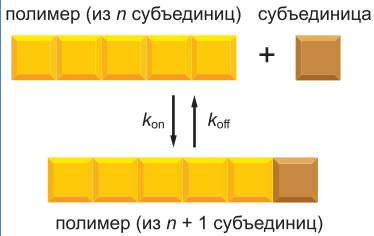
Рис. 16.11. Структура микротрубочки и ее субъединицы. (а) Субъединица каждого микрофиламента — это тубулиновый гетеродимер, образованный крепко связанными мономерами α - и β -тубулина. Молекула GTP на мономере α -тубулина так крепко с ним связана, что ее можно рассматривать как неотъемлемую часть белка. Однако молекула GTP на мономере β -тубулина связана менее крепко и играет важную роль в динамике филамента. Нуклеотиды показаны *красным*. (б) Схематическое изображение одной субъединицы (α - β -гетеродимера) и одного протофиламента. Протофиламент состоит из множества одинаково ориентированных прилегающих друг к другу субъединиц. (в) Микротрубочка — это жесткий полый цилиндр, образованный 13 параллельно уложенными протофиламентами. (г) Электронная микрофотография короткого участка микротрубочки. (д) Электронная микрофотография поперечного среза микротрубочки, на которой видно 13 отдельных протофиламентов. (С любезного разрешения Richard Wade (г) и Richard Linck (д).)

мы увидим, гидролиз GTP в этом сайте с образованием GDP играет важную роль в динамике микротрубочек.

Микротрубочка представляет собой полую цилиндрическую структуру, состоящую из 13 параллельных протофиламентов, каждый из которых образован чередующимися молекулами α - и β -тубулина. Когда гетеродимеры тубулина собираются в полую цилиндрическую микротрубочку, они создают два новых типа белок-белковых контактов. Вдоль продольной оси микротрубочки «верх» молекулы β -тубулина образует поверхность взаимодействия с «низом» молекулы α -тубулина соседнего гетеродимера. Эта поверхность очень похожа на поверхность между α - и β -мономерами димерной субъединицы, и ее энергия связывания очень велика. Перпендикулярно этим взаимодействиям соседние протофиламенты образуют латеральные контакты. В этом измерении основными латеральными контактами являются контакты между мономерами одного типа (α - α , β - β). Продольные и латеральные контакты повторяются в регулярной спиральной решетке микротрубочки. Поскольку множественные контакты в пределах решетки удерживают субъединицы

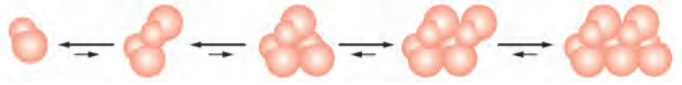
СКОРОСТИ ОБРАЗОВАНИЯ И РАСПАДА

Линейный полимер из белковых молекул, например актиновый филамент или микротрубочка, собирается (полимеризуется) и разбирается (деполимеризуется) за счет добавления или удаления субъединиц к концам полимера. Скорость добавления этих субъединиц (мономеров) определяется константой скорости k_{on} , измеряемой в $M^{-1} s^{-1}$. Скорость потери определяется константой k_{off} (единицы измерения — s^{-1}).



НУКЛЕАЦИЯ

Спиральный полимер стабилизируется многочисленными контактами между соседними субъединицами. В случае актина две молекулы актина относительно слабо связываются друг с другом, но добавление третьего актинового мономера с образованием тримера делает группу значительно более стабильной.



Последующее добавление мономеров может происходить на этом тримере, который, таким образом, служит **зародышем** полимеризации. В случае тубулина зародыш крупнее и имеет более сложную структуру (вероятно, кольцо из 13 или более молекул тубулина), но принцип тот же, что и для актина.

Сборка зародыша — это относительно медленный процесс, что объясняет лаг-фазу, наблюдаемую при полимеризации. Лаг-фазу можно сократить или полностью обойти путем добавления готовых зародышей, например фрагментов уже полимеризованных микротрубочек или актиновых филаментов.

КРИТИЧЕСКАЯ КОНЦЕНТРАЦИЯ

Количество мономеров, присоединяющихся к полимеру (актиновому филаменту или микротрубочке) в секунду будет пропорционально концентрации свободных субъединиц ($k_{on}C$), но субъединицы будут покидать концы полимера с постоянной скоростью (k_{off}), не зависящей от C . По мере роста полимера субъединицы расходятся, и C падает до тех пор, пока не достигнет некоторой постоянной величины, носящей название **критической концентрации** (C_c). При этой концентрации скорость добавления субъединиц равна скорости их потери. При таком равновесии

$$k_{on} C = k_{off}$$

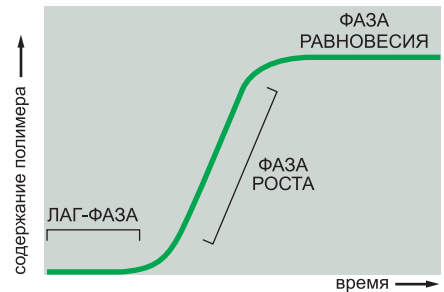
и, следовательно,

$$C_c = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{1}{K}$$

(где K — константа равновесия при соединении субъединиц; см. рис. 3.43).

ВРЕМЕННАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ

Сборка белка в длинный спиральный полимер, например цитоскелетный филамент или бактериальный жгутик, обычно следующим образом зависит от времени



Лаг-фаза соответствует времени нуклеации.

Фаза роста соответствует добавлению мономеров к доступным концам растущего филамента, что приводит к удлинению полимера.

Фаза равновесия, или **стационарное состояние**, достигается тогда, когда рост полимера за счет добавления мономеров точно уравнивается укорочением полимера за счет разборки.

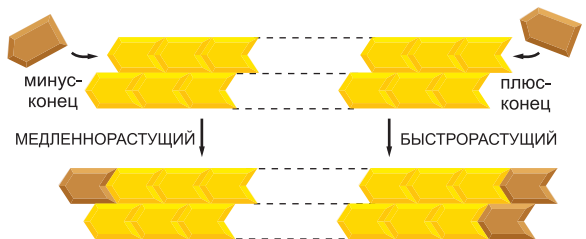
ПЛЮС- И МИНУС-КОНЦЫ

Концы актинового филамента или микротрубочки полимеризуются с разными скоростями. Быстрорастущий конец называется **плюс-концом**, а медленно растущий — **минус-концом**. Разница скоростей роста концов является результатом изменения конформации субъединиц, присоединяющихся к полимеру.



Такая конформационная перестройка влияет на скорости, с которыми субъединицы присоединяются к концам.

Даже если k_{on} и k_{off} будут разными для плюс- и минус-концов полимера, их отношения k_{on}/k_{off} — и, следовательно, C_c — должны быть на концах равными, чтобы протекала простая реакция полимеризации (без гидролиза АТФ или GTP). Это условие вытекает из того, что на концах разрушаются одни и те же связи при потере субъединицы, и конечные состояния субъединиц после дис-

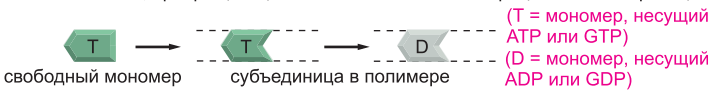


социации идентичны. Таким образом, ΔG для потери субъединицы, определяющее константу равновесия связывания мономеров, одинаково для обоих концов: если плюс-конец растет в четыре раза быстрее, чем минус-конец, он должен и разрушаться в четыре раза быстрее. Следовательно, если $C > C_c$, удлиняются оба конца; если $C < C_c$, оба конца укорачиваются.

Гидролиз нуклеозидтрифосфатов, сопровождающий полимеризацию актина и тубулина, снимает это ограничение.

ГИДРОЛИЗ НУКЛЕОТИДОВ

Молекулы актина несут связанную молекулу ATP, которая гидролизуется до ADP после присоединения актина к полимеру. Аналогично, молекулы тубулина несут связанный GTP, превращающийся в связанный GDP в процессе полимеризации.




Гидролиз связанного нуклеотида снижает сродство субъединицы к соседним субъединицам, в результате чего увеличивается вероятность ее диссоциации с концов филамента (возможный механизм представлен на рис. 16.16). Обычно, к филаменту присоединяется T-форма, а покидает его — D-форма.

Рассмотрим только плюс-конец:



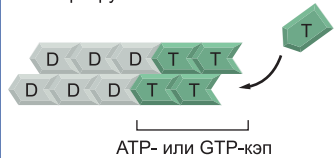
Как и раньше, полимер будет расти до тех пор, пока $C = C_c$. Для простоты пренебрежем k_{on}^D и k_{off}^T , поскольку они обычно очень малы. Следовательно, рост полимера остановится, когда

$$k_{on}^T C = k_{off}^D \quad \text{или} \quad C_c = \frac{k_{off}^D}{k_{on}^T}.$$

Это стационарное состояние и не истинное равновесие, поскольку гидролизуемые ATP и GTP должны быть восстановлены в реакции обмена нуклеотидов на свободных субъединицах ().

АТР-КЭПЫ И ГТР-КЭПЫ

Скорость присоединения субъединиц к растущему актиновому филаменту или микротрубочке может быть больше, чем скорость гидролиза связанных с ними нуклеотидов. В таких условиях конец несет «кэп» (от англ. cap — шапочка) из субъединиц, содержащих нуклеозидтрифосфат — АТР-кэп на актиновом филаменте и ГТР-кэп на микротрубочке.



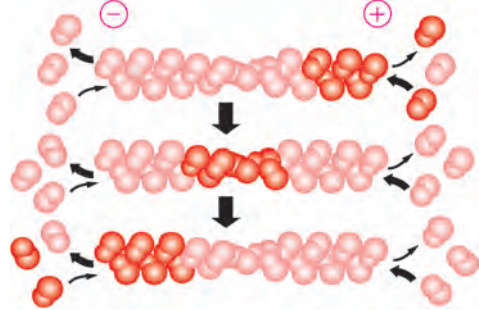
ДИНАМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ и ТРЕДМИЛЛИНГ — два основных свойства цитоскелетных полимеров. Они связаны с гидролизом нуклеозидтрифосфатов. Считается, что динамическая неустойчивость преобладает в микротрубочках, а тредмиллинг — в актиновых филаментах.

ТРЕДМИЛЛИНГ

Одним из последствий гидролиза нуклеотидов, сопровождающего образование полимера, является изменение критической концентрации на двух концах полимера. Поскольку k_{off}^D и k_{on}^T относятся к разным реакциям, их отношения k_{off}^D/k_{on}^T на концах не должны быть равны друг другу, то есть

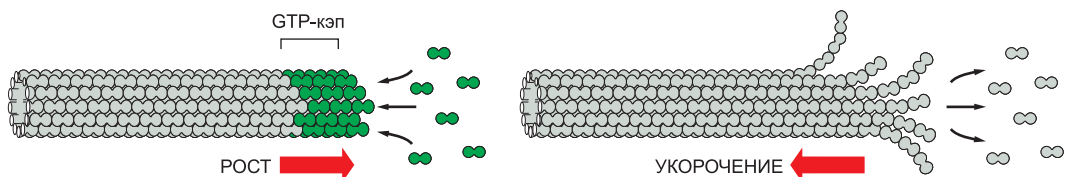
$$C_c \text{ (на минус-конце)} > C_c \text{ (на плюс-конце)}.$$

Таким образом, если оба конца полимера доступны, полимеризация идет до тех пор, пока концентрация свободного мономера на плюс-конце не достигнет величины, превышающей C_c , а на минус-конце — меньшей, чем C_c . В таком стационарном состоянии субъединицы на плюс-конце суммарно присоединяются, а на минус-конце — суммарно диссоциируют, причем скорости этих процессов равны. Несмотря на постоянный суммарный поток субъединиц по полимеру, носящий название тредмиллинга, длина полимера остается постоянной.



ДИНАМИЧЕСКАЯ НЕСТАБИЛЬНОСТЬ

Микротрубочки деполимеризуются примерно в 100 раз быстрее с конца, несущего GDP-тубулин, чем с конца, несущего GTP-тубулин. GTP-кэп способствует росту, но если он теряется, происходит деполимеризация.



У отдельных микротрубочек, таким образом, чередуются периоды медленного роста и быстрой разборки. Это явление называется динамической неустойчивостью.

микротрубочки на одном месте, добавление и потеря субъединиц происходят, как правило, на концах микротрубочки (см. рис. 16.8). Благодаря межсубъединичным контактам микротрубочки жесткие и плохо гнутся. Жесткость филамента можно охарактеризовать его *персистентной длиной* — свойством филамента, характеризующим то, какой должна быть его длина, для того чтобы он изогнулся за счет случайных тепловых флуктуаций. Персистентная длина микротрубочек составляет несколько миллиметров, что делает их самыми жесткими и прямыми структурными элементами большинства животных клеток.

Субъединицы протофиламента микротрубочки направлены в одну сторону, а сами протофиламенты уложены параллельно (например, на рис. 16.11 в гетеродимерах α -тубулин направлен вниз, а β -тубулин — вверх). Таким образом, микротрубочка сама по себе обладает структурной полярностью за счет того, что на одном конце оказываются α -тубулины, а на противоположном — β -тубулины.

Актиновая субъединица — это единственная глобулярная полипептидная цепь и, следовательно, мономер, а не димер. Как и тубулин, актиновые субъединицы несут сайт связывания нуклеотида, но в данном случае ATP (или ADP), а не GTP (или GDP) (рис. 16.12). Актиновые мономеры, так же как тубулиновые, собираются по принципу «голова к хвосту» с образованием филаментов с явной структурной полярностью. Актиновый филамент можно рассматривать как два параллельных протофиламента, закручивающихся вокруг друг друга в правую спираль. Актиновые филаменты легко изгибаются по сравнению с полыми цилиндрическими

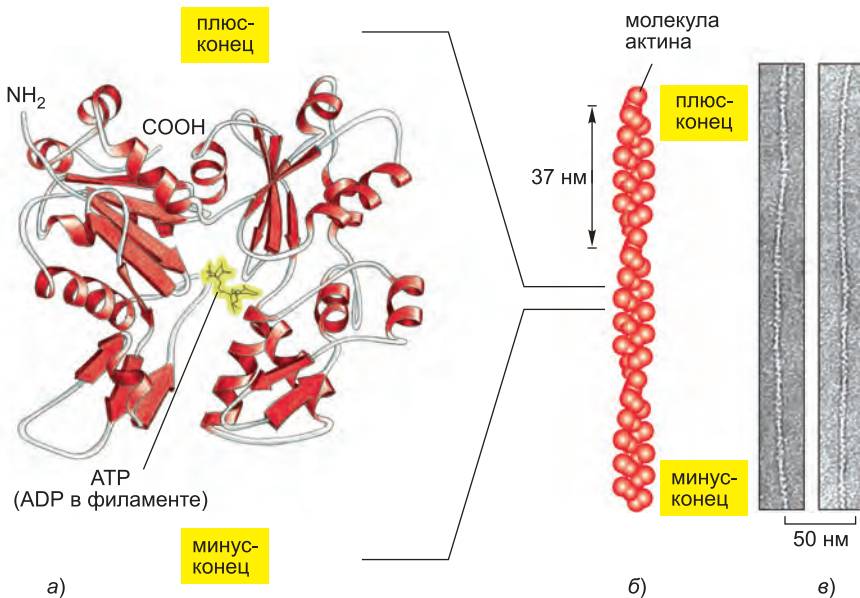


Рис. 16.12. Структура актинового мономера и актинового филамента. (а) В центре молекулы актинового мономера расположен связанный нуклеотид (ATP или ADP). (б) Организация мономеров в филаменте. Несмотря на то что филамент часто описывают как единственную спираль мономеров, его также можно рассматривать как два удерживаемых латеральными контактами протофиламента. Протофиламенты закручиваются вокруг друг друга как две параллельные цепи спиралей с периодом 37 нм. Все субъединицы в филаменте имеют одинаковую ориентацию. (в) Электронные микрофотографии негативно окрашенных актиновых филаментов. (в, с любезного разрешения Roger Craig.)

микротрубочками; их персистентная длина составляет всего несколько десятков микрометров. Но в живой клетке они перекрестно связываются дополнительными белками (см. ниже) и образуют пучки. Такие крупномасштабные актиновые структуры прочнее, чем отдельные актиновые филаменты.

16.1.7. Противоположные концы микротрубочек и микрофиламентов растут с разной скоростью

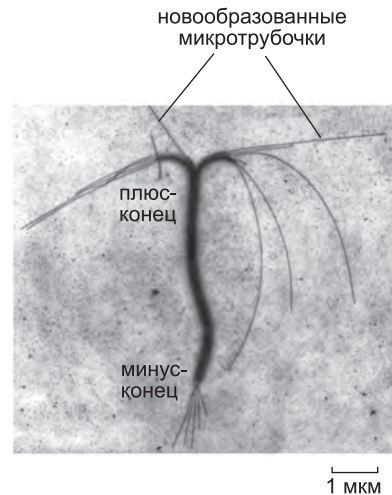
Регулярная, параллельная ориентация субъединиц обеспечивает структурную полярность актиновых филаментов и микротрубочек. Эта ориентация приводит к тому, что концы полимеров различаются, и это значительно влияет на скорость роста филаментов. Присоединение субъединицы к концу филамента, состоящего из n субъединиц, приводит к образованию филамента из $n + 1$ субъединиц. В отсутствие гидролиза АТФ или GTP разности свободных энергий и, следовательно, константы равновесия (и критические концентрации) для присоединения субъединиц к любому из концов должны быть равны. В этом случае отношения констант прямой и обратной реакций, $k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$, должны совпадать на концах, несмотря на то, что абсолютные значения констант скоростей могут различаться.

В структурно полярном филаменте кинетические константы скоростей связывания и диссоциации — k_{on} и k_{off} соответственно — на одном конце значительно выше, чем на другом. Таким образом, если в растворе, содержащем избыток субъединиц, происходит сборка меченых фрагментов заранее приготовленных филаментов, один конец каждого фрагмента будет удлиняться значительно быстрее, чем противоположный (рис. 16.13). Если филаменты быстро разбавить таким образом, что концентрация свободных субъединиц упадет ниже критической концентрации, быстрорастущий конец будет скорее деполимеризоваться, чем медленно растущий. Более динамичный из концов филамента, тот, который растет и укорачивается быстрее, называется **плюс-концом**, а противоположный конец — **минус-концом**.

В микротрубочках α -субъединицы экспонированы на минус-конце, а β -субъединицы — на плюс-конце. В актиновых филаментах АТФ-связывающий «карман» указывает в сторону минус-конца. (Исторически сложилось так, что плюс-конец называется также «оперенным» концом, а минус-конец — «заостренным», поскольку связанные с филаментом головки миозина делают его похожим на наконечник стрелы.)

Удлинение филамента протекает самопроизвольно, когда изменение свободной энергии ΔG присоединения растворимой субъединицы меньше нуля. В этом случае концентрация субъединиц в растворе превышает критическую концентрацию.

Рис. 16.13. Предпочтительный рост микротрубочек на плюс-конце. Микротрубочки и актиновые филаменты растут быстрее с одного конца, чем с другого. В данном случае стабильный пучок микротрубочек, полученных из сердцевины реснички (см. ниже) короткое время инкубировался с тубулиновыми субъединицами в условиях полимеризации. Микротрубочки быстрее росли на плюс-конце — конце, расположенном наверху фотографии. (С любезного разрешения Gary Borisy.)



Точно так же деполимеризация филамента происходит спонтанно, когда изменение свободной энергии больше нуля. Клетка способна сопрягать энергетически невыгодные процессы с такого рода самопроизвольными реакциями; таким образом, клетка может использовать высвобождаемую в процессе спонтанной полимеризации или деполимеризации филаментов свободную энергию для выполнения механической работы, а именно для перемещения «грузов». Например, удлиняющиеся микротрубочки могут способствовать выталкиванию мембран, а укорачивающиеся микротрубочки — растаскиванию митотических хромосом в анафазе. Точно так же удлиняющиеся актиновые филаменты способствуют выпячиванию ведущего конца подвижных клеток (см. ниже).

16.1.8. Тредмиллинг и динамическая нестабильность филаментов — последствия гидролиза нуклеотидов тубулином и актином

До настоящего времени наше рассмотрение динамики филаментов не учитывало один важный факт, касающийся как актиновых филаментов, так и микротрубочек. Помимо способности образовывать нековалентные полимеры, субъединицы актина и тубулина также обладают ферментативной активностью и катализируют гидролиз нуклеозидтрифосфатов — АТФ и ГТФ соответственно. В случае свободных субъединиц гидролиз протекает очень медленно; однако он ускоряется, когда субъединицы встраиваются в филамент. Вскоре после того, как актиновый или тубулиновый мономер присоединился к полимеру, происходит гидролиз нуклеотида; из субъединицы высвобождается фосфатная группа, но нуклеозиддифосфат остается связанным с филаментной структурой. (В тубулине сайт связывания нуклеотида лежит на поверхности между соседними субъединицами — см. рис. 16.11, тогда как в актине нуклеотид расположен глубоко в «кармане» вблизи центра субъединицы — см. рис. 16.12.) Таким образом, может существовать два типа филаментов: филаменты со связанной «Т-формой» нуклеотида (АТФ в случае актина и ГТФ в случае тубулина) и филаменты со связанной «D-формой» (ADP для актина и GDP для тубулина).

Когда нуклеотид гидролизует, большая часть свободной энергии, высвобождаемой в результате расщепления высокоэнергетической фосфат-фосфатной связи, запасается в решетке полимера. Благодаря этому изменение свободной энергии диссоциации субъединицы от полимера D-формы становится более отрицательным, чем изменение свободной энергии диссоциации субъединицы от Т-формы. Следовательно, отношение $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ для D-формы полимера, численно равное критической концентрации $[C_c(D)]$, больше, чем соответствующее отношение для Т-формы. Таким образом, $C_c(D)$ больше, чем $C_c(T)$. В результате для определенных концентраций свободных субъединиц полимеры D-формы будут укорачиваться, а полимеры Т-формы — расти.

В живых клетках большинство свободных субъединиц находится в Т-форме, поскольку концентрация свободных АТФ и ГТФ примерно в десять раз выше, чем концентрация ADP и GDP. Чем дольше субъединица находится в полимерной решетке, тем больше вероятность того, что она гидролизовала связанный нуклеотид. Находится ли субъединица на конце филамента в D- или в Т-форме, зависит от соотношения скорости гидролиза и скорости присоединения субъединиц. Если скорость удлинения филамента большая, т. е. мономеры быстро к нему присоединяются, то с большой вероятностью новая субъединица встроится в полимер до того, как нуклеотид предыдущей добавленной субъединицы гидролизован, т. е. конец полимера

остается в Т-форме. В результате образуется *АТФ-кэп* или *ГТФ-кэп*. Однако, если скорость присоединения субъединиц мала, гидролиз может пройти до того, как добавится следующая субъединица, и конец филамента будет в D-форме.

Скорость присоединения субъединиц к концу филамента представляет собой произведение концентрации свободных субъединиц и константы скорости $k_{\text{он}}$. Из-за структурных различий между концами (см. приложение 16.2) $k_{\text{он}}$ для плюс-конца много выше, чем для минус-конца. При промежуточной концентрации свободных субъединиц скорость присоединения мономеров для плюс-конца может превышать гидролиз нуклеотидов, но для минус-конца быть меньше. В таком случае плюс-конец филамента остается в Т-конформации, а минус-конец принимает D-конформацию. Как было упомянуто ранее, критическая концентрация для D-формы выше, чем для Т-формы. (Другими словами, D-форма быстрее разбирается, тогда как Т-форма быстрее собирается.) Если концентрация свободных субъединиц в растворе находится в промежуточных границах — выше, чем критическая концентрация для Т-формы (т.е. плюс-конца), но ниже, чем критическая концентрация для D-формы (т.е. минус-конца), — филамент растет с плюс-конца и одновременно укорачивается с минус-конца. Это свойство филаментов называется **тредмиллингом** (от англ. *treadmilling* — однообразный, механический труд), или *круговоротом мономеров* (рис. 16.14 и приложение 16.2).

В процессе тредмиллинга субъединицы рекрутируются к находящемуся в Т-форме плюс-концу полимера и уходят с находящегося в D-форме минус-конца. Протекающий одновременно гидролиз АТФ и ГТФ создает разность свободных энергий реакций связывания/диссоциации на плюс- и минус-концах актинового филамента или микротрубочки, что делает тредмиллинг возможным. При определенной промежуточной концентрации субъединиц рост филаментов на плюс-конце уравнивается укорачиванием на минус-конце. В результате субъединицы быстро циркулируют между свободным и связанным в филамент состояниями, а общая длина филамента не изменяется. Такой «стационарный тредмиллинг» требует постоянного поглощения энергии в форме гидролиза нуклеозидтрифосфатов. Активность тредмиллинга внутри клеток точно неизвестна, но тредмиллинг отдельных филаментов наблюдался *in vitro* в случае актина, и похожее явление можно наблюдать в живых клетках в случае отдельных микротрубочек (рис. 16.15).

Кинетические различия между Т- и D-формами — причина еще одного важного свойства филаментов. Если скорость присоединения субъединиц на одном конце по порядку величины равна скорости гидролиза, существует конечная вероятность того, что этот конец сначала будет находиться в Т-форме, но затем гидролиз «догонит» полимеризацию и переведет конец в D-форму. Трансформация внезапна и случайна и характеризуется определенной вероятностью в единицу времени.

Предположим, что концентрация свободных субъединиц имеет промежуточное значение между критическими концентрациями для Т- и D-формы (т.е. находится в тех же границах, в которых происходит тредмиллинг). В результате конец, находящийся в Т-форме, будет расти, а конец в D-форме — укорачиваться. В случае одного филамента конец может некоторое время удлиниться в Т-форме, но затем внезапно перейти в D-форму и начать быстро укорачиваться, даже если концентрация свободных субъединиц остается постоянной. Через некоторое время этот конец может вернуться в Т-форму и опять начать расти. Такой быстрый переход между удлинением и укорочением при постоянной концентрации субъединиц называется **динамической нестабильностью** (рис. 16.16, а). Переключение с роста

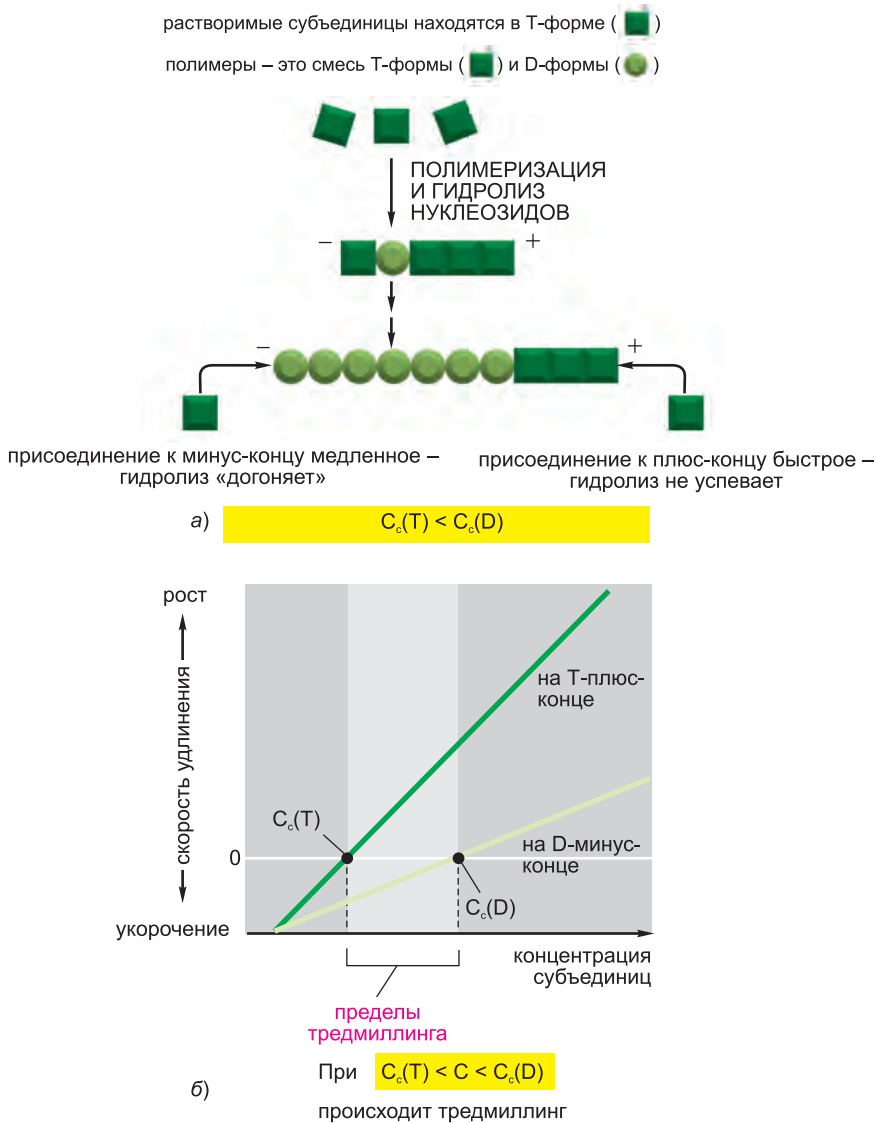
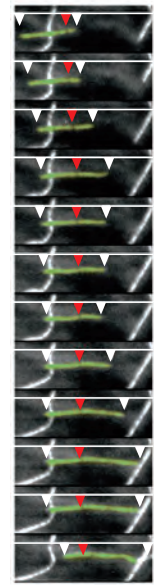


Рис. 16.14. Тредмиллинг актинового филамента или микротрубочки, возможный благодаря гидролизу нуклеозидтрифосфатов после присоединения субъединиц. (а) Объяснение различия критических концентраций (C_c) для плюс- и минус-концов. Субъединицы со связанным нуклеозидтрифосфатом (субъединицы в Т-форме) полимеризуются с обоих концов растущего филамента и затем претерпевают гидролиз нуклеотида в решетке филамента. В данном примере по мере роста филамента на плюс-конце удлинение происходит быстрее, чем гидролиз, и, следовательно, терминальные субъединицы на этом конце всегда находятся в Т-форме. Однако на минус-конце гидролиз быстрее, чем удлинение, и здесь терминальные субъединицы всегда в D-форме. (б) Тредмиллинг происходит при промежуточной концентрации свободных субъединиц. Критическая концентрация полимеризации на конце филамента в Т-форме ниже, чем критическая концентрация для конца в D-форме. Если реальная концентрация субъединиц находится в промежутке между этими двумя значениями, плюс-конец растет, а минус-конец укорачивается. В результате происходит тредмиллинг.

Рис. 16.15. Тредмиллинг микротрубочек в живой клетке. В клетку ввели ковалентно меченный флуоресцентным красителем родамином тубулин таким образом, чтобы примерно 1 субъединица из 20 светилась. Затем флуоресценцию отдельных микротрубочек наблюдали при помощи чувствительной электронной камеры. Кажется, что изображенная на фотографиях микротрубочка движется *слева направо*, но на самом деле ее решетка остается неподвижной (на что указывает маркер в решетке, отмеченный *красной стрелкой*), тогда как плюс-конец (*справа*) удлиняется, а минус-конец (*слева*) укорачивается. Плюс-концу также свойственна динамическая нестабильность. (Из С. М. Waterman-Storer and E. D. Salmon, *J. Cell Biol.* 139: 417–434, 1997. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

время 0 с



время 98 с 10 мкм

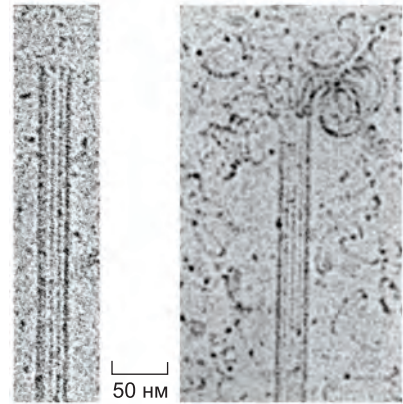
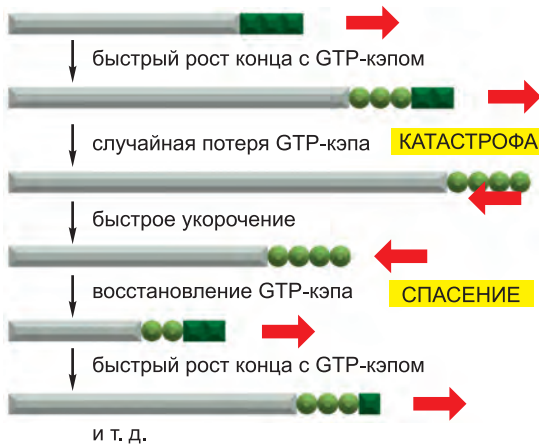
на укорочение называется *катастрофой*, а обратный процесс — *спасением*.

В популяции микротрубочек в любой момент времени часть концов находится в Т-форме, а часть — в D-форме. Их соотношение зависит от скорости гидролиза и концентрации свободных субъединиц. Структурные различия между концом в Т-форме и концом в D-форме очень велики. Тубулиновые субъединицы со связанным с β -мономером GTP образуют прямые протофиламенты, формирующие прочные и регулярные латеральные контакты друг с другом. Но гидролиз GTP до GDP связан с изменением конформации белка, что приводит к изогнутым протофиламентам (рис. 16.16, б). По-видимому, на быстрорастущей микротрубочке GTP-кэп ограничивает изгиб, и концы оказываются прямыми. Но когда терминальные субъединицы гидролизуют свои нуклеотиды, ограничение снимается, и изогнутые протофиламенты расходятся. Такое кооперативное высвобождение энергии гидролиза, запасенной в решетке микротрубочки, приводит к быстрому расслаиванию изогнутых протофиламентов, и на концах деполимеризующихся микротрубочек можно наблюдать кольцевые и закрученные олигомеры GDP-содержащего тубулина (рис. 16.16, в).

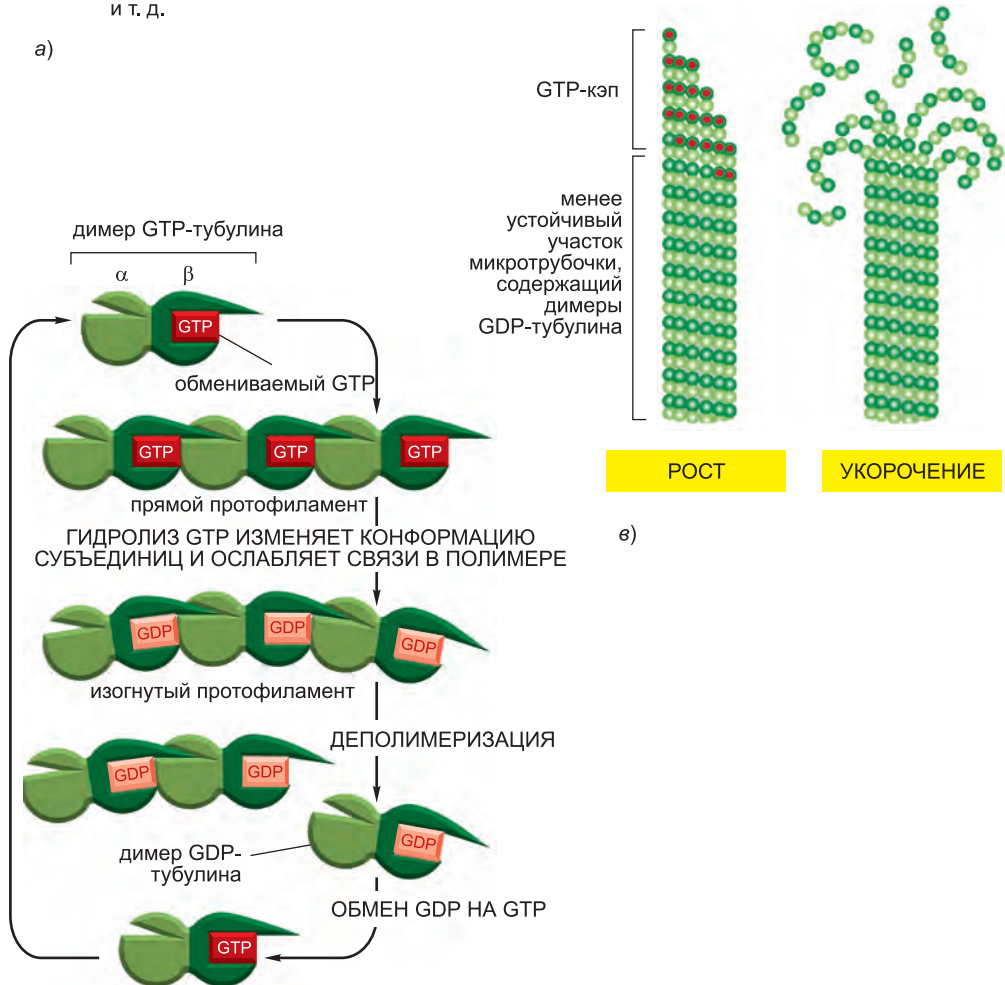
Актиновые филаменты также претерпевают флуктуации длины, но в меньшем масштабе: в стационарном состоянии в течение нескольких минут длина изменяется в пределах микрометра, тогда как для микротрубочек в состоянии динамической нестабильности флуктуации могут достигать десятков микрометров. Считают, что в большинстве эукариотических клеток динамическая нестабильность больше свойственна микротрубочкам, а тредмиллинг — актиновым филаментам.

16.1.9. Тредмиллинг и динамическая нестабильность способствуют быстрой перестройке цитоскелета

Тредмиллинг и динамическая нестабильность позволяют клетке поддерживать постоянное суммарное содержание филаментов, при этом отдельные субъединицы непрерывно циркулируют между филаментами и цитозолем. Насколько динамичны микротрубочки и актиновые филаменты живой клетки? Обычно микротрубочка, чей растущий и укорачивающийся концы структурно различны, переключается между ростом и укорочением каждые несколько минут. Таким образом, динамическую нестабильность концов отдельных микротрубочек можно наблюдать в реальном времени (рис. 16.17). Поскольку актиновые филаменты меньше по размеру и плотнее



а)



в)

б)

упакованы, получить хорошее разрешение их концов в живой клетке затруднительно. Однако при помощи соответствующих методов, основанных на флуоресцентной микроскопии, можно показать, что актиновые филаменты очень быстро циркулируют: отдельные филаменты существуют всего лишь десятки секунд или минуты.

На первый взгляд, динамическое поведение филаментов может показаться бессмысленным расходом энергии. Для поддержания постоянной концентрации актиновых филаментов и микротрубочек, большинство которых претерпевает процессы тредмиллинга или динамической нестабильности, клетка должна гидролизовать большое количество нуклеозидтрифосфатов. Как мы в начале главы объяснили на примере муравьиных троп, преимущество для клетки, по-видимому, заключается в пространственной и временной гибкости, присущей структурированной системе с постоянной циркуляцией. Отдельные субъединицы невелики и способны очень быстро диффундировать; субъединица актина или тубулина диффундирует на расстояние диаметра типичной эукариотической клетки за несколько секунд. Как отмечалось ранее, лимитирующим этапом образования нового филамента является нуклеация, поэтому быстро диффундирующие субъединицы стремятся присоединиться либо к концам уже существующих филаментов, либо к определенным сайтам, где специальные белки катализируют этап зародышеобразования. Новые филаменты в этом случае высокодинамичны и, если только их специфически не стабилизировать, существуют недолго. Контролируя места нуклеации филаментов и селективной стабилизации, клетка может контролировать расположение своих филаментных систем и, следовательно, свою структуру. Возникает ощущение, что клетка непрерывно тестирует многочисленные внутренние структуры, сохраняя только те, которые оказываются полезными. При изменении внешних условий или появлении внутреннего сигнала (например, при переходах в клеточном цикле) клетка должна быстро уравновесить свою внутреннюю структуру (см. рис. 16.2 и 16.4).

Рис. 16.16. Динамическая нестабильность, являющаяся результатом структурных различий между растущим и укорачивающимся концами микротрубочки. (а) Если концентрация свободного тубулина в растворе находится между критическими значениями, указанными на рис. 16.14, б, конец микротрубочки может претерпевать переходы между состояниями роста и укорочения. На этом конце растущая микротрубочка несет GTP-содержащие субъединицы, образующие GTP-кэп. Если гидролиз GTP протекает быстрее, чем присоединение субъединиц, кэп теряется и микротрубочка начинает укорачиваться. Это явление называется «катастрофой». Но к этому концу все равно могут добавляться GTP-содержащие субъединицы, и если их присоединится достаточно для образования нового кэпа, то рост микротрубочки возобновляется. Это явление называется «спасением». (б) Модель структурных изменений, вызванных гидролизом GTP в решетке микротрубочки. Добавление GTP-содержащих тубулиновых субъединиц к концу протофиламента приводит к его росту в линейной конформации, которая может быть быстро встроена в цилиндрическую стенку микротрубочки. Гидролиз GTP после сборки изменяет конформацию субъединиц и способствует приобретению протофиламентами изогнутой формы, которой сложнее встроиться в микротрубочку. (в) В интактной микротрубочке протофиламенты, состоящие из GDP-содержащих субъединиц, принимают линейную форму за счет многочисленных латеральных связей в стенке микротрубочки при условии наличия стабильного GTP-кэпа. Однако потеря GTP-кэпа позволяет GDP-содержащим протофиламентам релаксировать в изогнутую конформацию. Это приводит к разрушению микротрубочки. На расположенных над схемами растущей и укорачивающейся микротрубочек электронных микрофотографиях показаны реальные микротрубочки в этих двух состояниях, приготовленные в стекловидном льде. Обратите внимание на закрученные распадающиеся GDP-содержащие протофиламенты на конце укорачивающейся микротрубочки. (в, результаты Е. М. Mandelkow, Е. Mandelkow and R. A. Milligan, *J. Cell Biol.* 114: 977–991, 1991. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

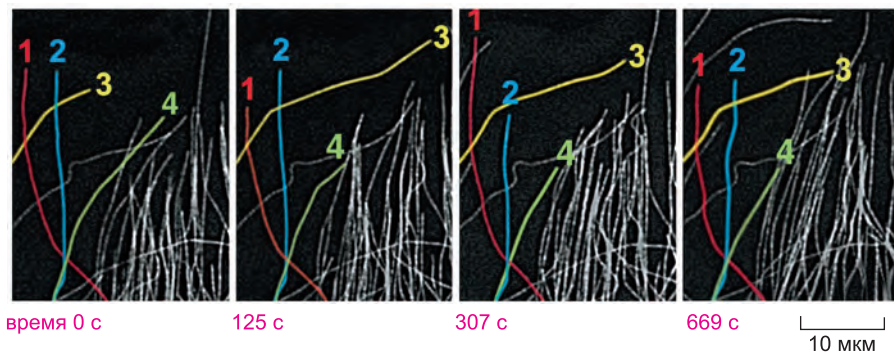


Рис. 16.17. Прямое наблюдение динамической неустойчивости микротрубочек в живой клетке. Микротрубочки в эпителиальной клетке легкого тритона наблюдали после введения в клетку небольшого количества меченного роданином тубулина, как на рис. 16.15. Обратите внимание на динамическую неустойчивость микротрубочек на краю клетки. Для наглядности отмечены четыре отдельные микротрубочки; на каждой из них можно наблюдать переключение между укорочением и ростом. (С любезного разрешения Wendy C. Salmon и Clare Waterman-Storer.)

Эволюция гидролиза нуклеозидтрифосфатов актином и тубулином происходила независимо и позволила филаментам легко деполимеризоваться после сборки. Аминокислотные последовательности актина и тубулина не имеют ничего общего: структура актина родственна ферменту гликолиза гексокиназе, а тубулин является дальним родственником крупного семейства GTPаз, в число которого входят гетеротримерные G-белки и мономерные GTPазы, например Ras (см. главу 3). В обоих белковых семействах сопряжение между гидролизом нуклеотидов и конформационной перестройкой белков, изменяющей белковую функцию, по-видимому, является очень древним; однако назначение такого структурного сопряжения со временем стало включать в себя передачу сигнала, катализ и регуляцию цикла полимеризации/деполимеризации.

В определенных специализированных структурах части цитоскелета становятся менее динамичными. В окончательно дифференцированных клетках, например нейронах, предпочтительнее поддерживать постоянную структуру, и многие актиновые филаменты и микротрубочки в таких клетках стабилизируются за счет связывания с другими белками. Однако когда в мозге возникают новые связи, как происходит при переводе усваиваемой вами в данный момент информации в долговременную память, даже такая стабильная клетка, как нейрон, может сформировать новые отростки и новые синапсы. Для этого нейрону требуются динамические, поисковые свойства его цитоскелетных филаментов.

16.1.10. С эволюционной точки зрения эукариотические тубулин и актин высококонсервативны

Тубулин содержится во всех эукариотических клетках, и существует несколько его изоформ. Аминокислотные последовательности тубулина человека и дрожжей идентичны на 75%. У млекопитающих по крайней мере 6 форм α -тубулина и столько же форм β -тубулина; все они кодируются разными генами. Формы тубулина очень похожи друг на друга, и в пробирке они обычно будут полимеризоваться в одну смешанную микротрубочку. Однако в клетке они могут располагаться в различных

местах и выполнять несколько отличные функции. В качестве яркого примера можно упомянуть специфическую форму β -тубулина, которая образует микротрубочки в шести специализированных чувствительных к прикосновению нейронах нематоды *Caenorhabditis elegans*. Мутации, выключающие этот ген, приводят к потере чувствительности к прикосновению без нарушения других функций.

Как и тубулин, актин встречается по всех эукариотических клетках. У большинства организмов он кодируется несколькими генами; у человека генов актина шесть. Актин эукариот удивительно высококонсервативен. Аминокислотные последовательности актинов различных видов обычно идентичны на 90%. Но, как и тубулин, небольшие различия в аминокислотной последовательности могут привести к значительным функциональным различиям. У позвоночных встречается три изоформы актина, обозначаемые буквами α , β и γ . Они немного различаются по аминокислотной последовательности. α -актин экспрессируется только в мышечных клетках, а β - и γ -актин встречаются вместе почти во всех немышечных клетках. Актины дрожжей и *Drosophila* идентичны на 89%, однако экспрессия дрожжевого актина в мушках приводит к развитию нормально выглядящих, но неспособных летать особей.

Почему аминокислотные последовательности актина и тубулина почти не менялись в процессе эволюции эукариот, тогда как последовательности почти всех остальных цитоскелетных белков, включая белки промежуточных филаментов и крупные семейства связывающих актин и тубулин дополнительных белков, значительно изменились? Вероятное объяснение состоит в том, что взаимодействие большого числа других белков с поверхностью актиновых филаментов и тубулина ограничивает изменчивость этих структур. Генетические и биохимические исследования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показали, что актин напрямую взаимодействует с десятками других белков, а косвенно — с еще большим количеством (рис. 16.18). Таким образом, любая мутация актина, способная привести к благоприятному изменению его взаимодействия с одним белком, может привести к неблагоприятным изменениям во взаимодействии с другими белками, связывающимися вблизи или рядом с исходным сайтом. Со временем эволюционирующие организмы нашли более выгодным постоянство актина и тубулина при изменении их белков-партнеров.

16.1.11. Структура промежуточных филаментов зависит от латерального объединения и скручивания спиралей в суперспираль

У всех эукариот есть актин и тубулин. Но третий основной тип цитоскелетных белков, *промежуточный филамент*, образует цитоплазматические филаменты только в клетках некоторых многоклеточных, включая позвоночных, нематод и моллюсков. Но даже в этих организмах промежуточные филаменты не являются необходимыми для всех типов клеток. Специализированные глиальные клетки (носящие название олигодендритов), синтезирующие миелин в центральной нервной системе позвоночных, не несут промежуточных филаментов. Промежуточных филаментов особенно много в цитоплазме клеток, подвергающихся механическому давлению, и обычно они не встречаются у животных, обладающих жестким внешним цитоскелетом, например у членистоногих и иглокожих. По-видимому, промежуточные филаменты играют важную роль в передаче механической силы в ткани у более «мягких» животных.

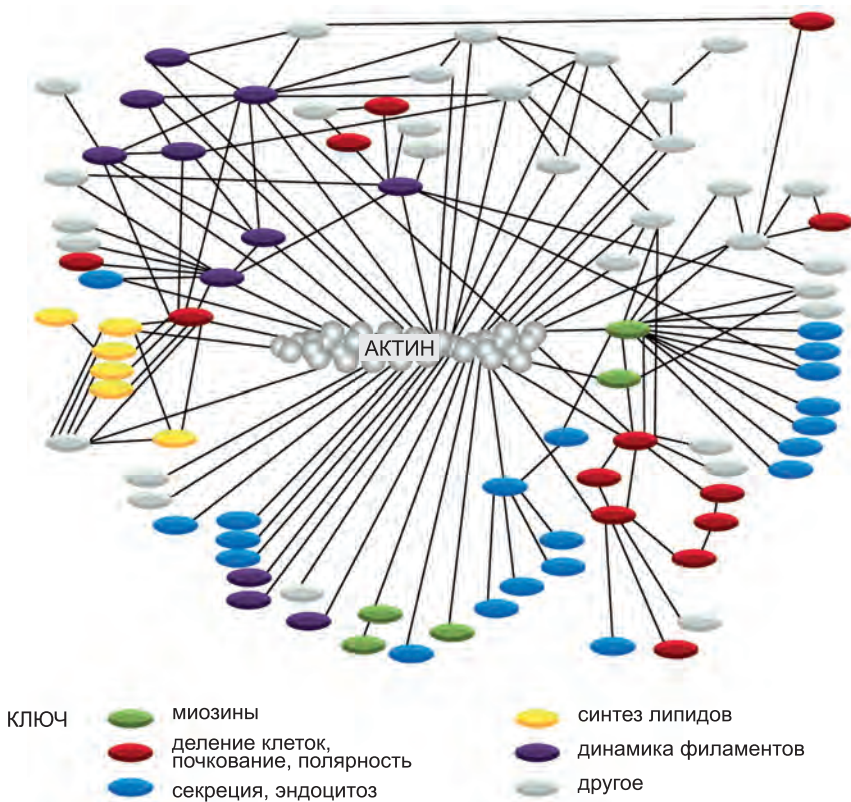


Рис. 16.18. Сеть взаимодействия актина. Во всех эукариотических клетках актин связывается с очень большим числом дополнительных белков. На схеме показано большинство взаимодействий актина в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae*, обнаруженных генетическими и биохимическими методами. Дополнительные белки, участвующие в одном и том же внутриклеточном процессе, показаны одним цветом (см. ключ). (Адаптировано из D. Botstein et al., *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces** [J. R. Broach, J. R. Pringle, E. W. Jones, ред.], Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991.)

Цитоплазматические промежуточные филаменты близкородственны своим предкам, более распространенным *ядерным ламинам*. Ядерные ламины — это белки, относящиеся к промежуточным филаментам. Они образуют сеть, выстилающую внутреннюю мембрану эукариотической ядерной оболочки, и создают сайты заякоривания хромосом и ядерных пор (их динамическое поведение в процессе клеточного деления рассматривается в главе 12). В процессе эволюции многоклеточных гены ламинов, по-видимому, несколько раз дублировались, и копии эволюционировали с образованием похожих на канат цитоплазматических промежуточных филаментов.

Отдельные полипептиды **промежуточных филаментов** представляют собой удлинённые молекулы с центральным α -спиральным доменом, образующим параллельную закрученную спираль с другим мономером. Затем параллельный димер антипараллельно связывается с другим димером с образованием ступенчатого тетрамера. Этот тетрамер представляет собой растворимую субъединицу, аналогичную димеру $\alpha\beta$ -тубулина или мономеру актина (**рис. 16.19**). В отличие от актина

и тубулина, субъединицы промежуточного филамента не несут сайтов связывания нуклеозидтрифосфата.

Поскольку тетрамерные субъединицы состоят из двух димеров, указывающих в противоположных направлениях, их концы идентичны. Таким образом, собранный промежуточный филамент лишен структурной полярности, играющей критическую роль в функционировании актиновых филаментов и микротрубочек. Тетрамеры латерально связываются друг с другом с образованием филамента, в состав которого входит восемь параллельных протофиламентов, состоящих из тетрамеров. Таким образом, в поперечнике каждого промежуточного филамента располагается 32 α -спирали. Такое большое число сложенных вместе полипептидов с сильными латеральными гидрофобными взаимодействиями, типичными для двухспиральных белков, придает промежуточным филаментам сходство с витым канатом. Они легко гнутся (персистентная длина составляет менее одного микрометра по сравнению с несколькими миллиметрами для микротрубочек и около десяти микрометров для актина), но их очень сложно сломать.

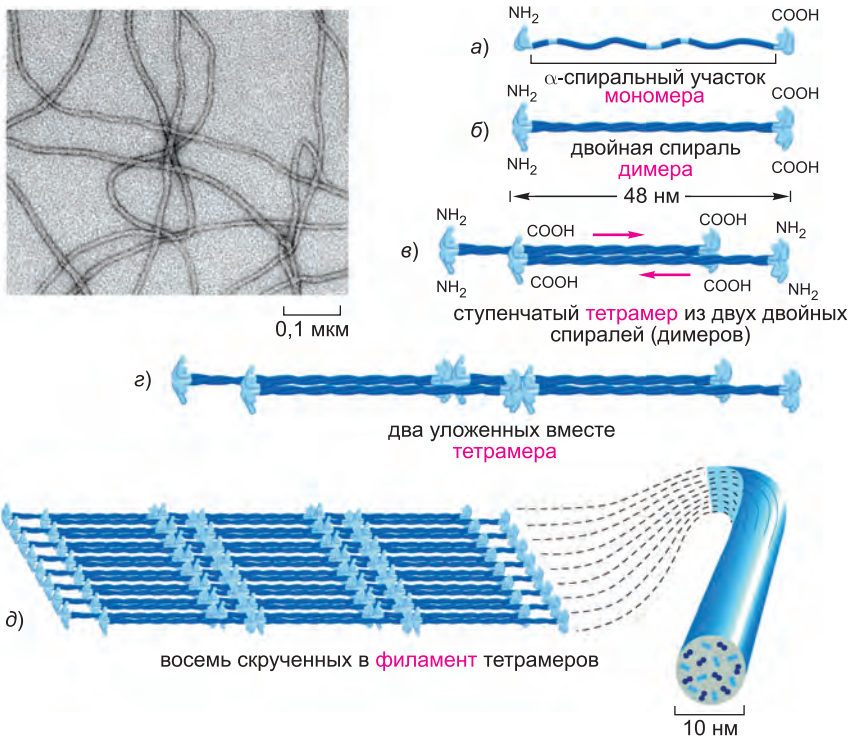


Рис. 16.19. Модель сборки промежуточных филаментов. Изображенный на (а) мономер связывается с идентичным мономером с образованием димера (б), в котором консервативные центральные домены расположены параллельно и образуют двойную спираль. (в) Затем два димера связываются с образованием антипараллельного тетрамера, состоящего из четырех полипептидных цепей. Тетрамер — это растворимая субъединица промежуточных филаментов. (г) В пределах тетрамера димеры смещены относительно друг друга, что позволяет им связаться с другим тетрамером. (д) В конечном, похожем на канат филаменте тетрамеры упакованы в спиральную структуру, несущую в поперечнике 16 димеров (32 спирали). Половина димеров направлена в одну сторону, половина — в противоположную. Электронная микрофотография промежуточных филаментов представлена в левом верхнем углу. (Электронная фотография получена Roy Quinlan.)

О механизме сборки и разборки промежуточных филаментов известно меньше, чем для актиновых филаментов и микротрубочек, но некоторые типы промежуточных филаментов, включая виментин, образуют высокодинамичные структуры в таких клетках, как фибробласты. В нормальных условиях фосфорилирование белков, по-видимому, регулирует разборку точно так же, как фосфорилирование регулирует разборку ядерных ламинов при митозе (см. рис. 12.20). Меченые субъединицы, введенные в культуру клеток ткани, в течение нескольких минут добавляются к существующим промежуточным филаментам, тогда как введение пептидов из спирального участка субъединицы приводит к быстрой разборке сети промежуточных филаментов. Эти эксперименты указывают на быстрый круговорот данного типа цитоскелетных белков. В некоторых случаях при введении пептидов спирального участка также может происходить разборка сетей актиновых филаментов и микротрубочек, что указывает на существование фундаментальной механической интеграции трех типов цитоскелетных систем.

16.1.12. Промежуточные филаменты придают животным клеткам механическую устойчивость

Промежуточные филаменты подразделяются на множество типов с большей изменчивостью последовательностей изоформ субъединиц, чем в случае актина и тубулина. Центральный α -спиральный домен несет около 40 повторяющихся мотивов, состоящих из семи аминокислот и образующих вытянутую двуспиральную структуру (см. рис. 3.9). Этот домен мало отличается у различных изоформ, но N- и C-концевые домены могут значительно различаться.

Различные семейства промежуточных филаментов экспрессируются в разных типах клеток (таблица 16.1). **Кератины** — наиболее разнообразное семейство промежуточных филаментов: в эпителиальных клетках человека содержится около 20 типов, и еще около 10 специфичны для ногтей и волос; анализ последовательности человеческого генома показал существование примерно 50 различных кератинов. Отдельный кератиновый филамент состоит из равной смеси кератиновых цепей типа I (кислая цепь) и типа II (нейтральная/основная цепь); цепи образуют гетеродимеры, два из которых образуют основную тетрамерную субъединицу (см.

Таблица 16.1. Основные типы белков промежуточных филаментов (ПФ) клеток позвоночных

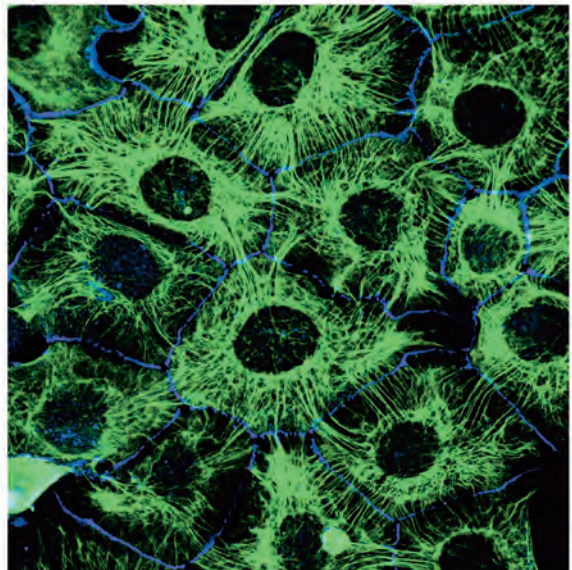
Типы ПФ	Составляющие полипептиды	Локализация
Ядерные	ламины А, В и С	ядерная ламина (внутренняя выстилка ядерной оболочки)
Виментин-подобные	виментин	многие клетки мезенхимального происхождения
	десмин	мышцы
	глиальный фибриллярный кислый белок	глиальные клетки (астроциты и некоторые шванновские клетки)
	периферин	некоторые нейроны
Эпителиальные	кератины типа I (кислые)	эпителиальные клетки и их производные (т.е. волосы и ногти)
	кератина типа II (основные)	
Аксональные	нейрофиламентные белки (NF-L, NF-M и NF-H)	нейроны

рис. 16.19). Поперечно сшитые кератиновые сети, удерживаемые дисульфидными связями, способны пережить даже смерть своей клетки. Они образуют твердые оболочки животных: внешний слой кожи, волосы, ногти, когти и чешуйки. Разнообразие кератинов полезно для медицины — оно используется для диагностики раков эпителия (карцином), поскольку определенный набор экспрессируемых кератинов способен указать на эпителиальную ткань, где исходно возник рак. Такой подход позволяет выбрать правильное направление лечения.

Отдельная эпителиальная клетка может синтезировать различные типы кератинов, полимеризующихся в общую сеть (рис. 16.20). Кератиновые филаменты придают эпителиальным тканям механическую жесткость частично за счет закоривания промежуточных филаментов в сайтах межклеточных контактов, *десмосомах*, или сайтах контакта клеток с матриксом, *полудесмосомах* (см. рис. 16.5). Более подробно мы рассмотрим эти важные адгезионные структуры в главе 19.

Мутации генов кератинов приводят к нескольким генетическим заболеваниям человека. Например, когда дефектные кератины экспрессируются в базальном слое клеток эпидермиса, это приводит к заболеванию, носящему название *буллезного эпидермолиза*. У больных при малейшем механическом нажатии на коже возникают волдыри, вызванные разрывом базальных клеток (рис. 16.21). Подобного рода заболевания, затрагивающие также ротовую полость, пищевод и роговую оболочку глаза, являются результатом мутаций различных кератинов, специфичных для данных тканей. Для всех этих заболеваний свойственен разрыв клеток как следствие механической травмы и дезорганизации или агрегации цитоскелетных кератиновых филаментов. Многие специфические мутации, вызывающие эти заболевания, изменяют концы центрального домена, что указывает на значение этой части белка для правильной сборки филаментов.

Представители второго семейства промежуточных филаментов — **нейрофиламенты** — в больших концентрациях встречаются вдоль аксонов нейронов позвоночных (рис. 16.22). Три типа нейрофиламентных белков (NF-L, NF-M, NF-H) собираются *in vivo* с образованием гетерополимеров, содержащих NF-L и один из белков другого типа. Белки NF-M и NF-H несут длинный С-концевой домен, связывающийся с соседними филаментами и создающий организованные структуры с одинаковым



10 мкм

Рис. 16.20. Кератиновые филаменты в эпителиальных клетках. Иммунофлуоресцентная микрофотография сети кератиновых филаментов (зеленые) в слое эпителиальных клеток в культуре. Филаменты каждой клетки косвенно связаны с филаментами соседних клеток через десмосомы (см. главу 19). Второй белок (синий) окрашен для того, чтобы были видны границы клеток. (С любезного разрешения Kathleen Green и Evangeline Amargo.)

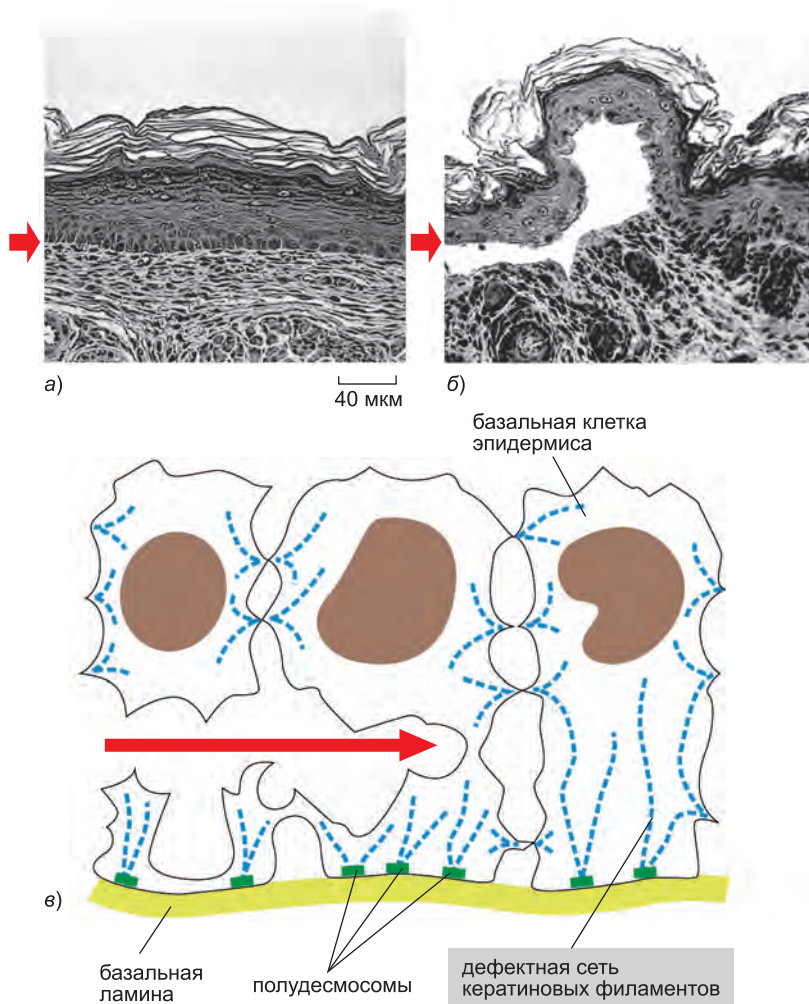


Рис. 16.21. Образование волдырей на коже, вызванное мутантным геном кератина. Мутантный ген, кодирующий укороченный кератин (без N- и C-концевых доменов), экспрессировался в трансгенной мыши. Дефектный белок присоединяется к нормальным кератинам и нарушает сеть кератиновых филаментов базальных клеток кожи. Полученные световым микроскопом микрофотографии поперечных срезов нормальной (а) и мутантной (б) кожи показывают, что волдырь является результатом разрыва клеток базального слоя мутантного эпидермиса (короткие красные стрелки). (в) Набросок наблюдаемых в электронный микроскоп трех клеток базального слоя мутантного эпидермиса. Красная стрелка указывает на разрыв между ядром и полудесмосомами (см. главу 19), соединяющими кератиновые филаменты с нижележащей базальной ламиной. (Из P.A. Coulombe et al., *J. Cell Biol.* 115: 1661–1674, 1991. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

расстоянием между филаментами. Во время роста аксона новые субъединицы нейрофиламентов выстраиваются вдоль аксона в динамическом процессе, при котором субъединицы добавляются как к концам филамента, так и по всей его длине. После того как аксон достиг своей клетки-мишени и соединился с ней, его диаметр может увеличиться в пять раз. По-видимому, уровень экспрессии генов нейрофиламентов

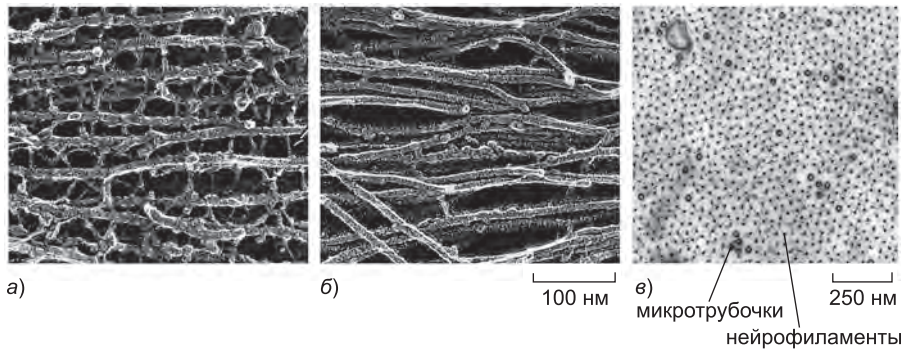


Рис. 16.22. Два типа промежуточных филаментов клеток нервной системы. (а) Полученное при помощи электронной микроскопии по методу замораживания изображение нейрофиламентов аксона нервной клетки показывает многочисленные поперечные «мостики», которые, по-видимому, придают этим клеточным отросткам большую устойчивость к растяжению. Поперечные мостики образованы длинными неспиральными С-концевыми доменами самого крупного нейрофиламентного белка NF-H. (б) Также полученное изображение глиальных клеток показывает, что эти промежуточные филаменты гладкие и почти не имеют поперечных сшивок. (в) Обычная электронная микрофотография поперечного среза аксона, на которой видно регулярное расстояние между нейрофиламентами и их преобладание над микротрубочками. (С любезного разрешения Nobutaka Hirokawa (а и б) и John Hopkins (в).)

напрямую контролирует диаметр аксона, который, в свою очередь, влияет на то, как быстро по аксону передаются электрические сигналы.

Нейродегенеративное заболевание боковой амиотрофический склероз (БАС, или болезнь Лу Герига) связано с накоплением и неправильной сборкой нейрофиламентов в телах моторных нейронов и аксонах, что может нарушить нормальный аксональный транспорт. Дегенерация аксонов приводит к мышечной слабости и атрофии, а затем и к смерти. Избыточная экспрессия человеческих NF-L и NF-H в мышцах приводит к развитию в них БАС-подобного заболевания.

Виментин-подобные филаменты — это третье семейство промежуточных филаментов. Представитель этого семейства десмин экспрессируется в скелетных, сердечной и гладких мышцах. Мыши, у которых десмин отсутствует, сначала развиваются нормально, но у взрослых особей наблюдаются различные патологии мышц, включая неправильно расположенные мышечные волокна.

16.1.13. Токсины могут влиять на полимеризацию филаментов

Поскольку выживание эукариотических клеток зависит от уравновешенной сборки и разборки высококонсервативных цитоскелетных филаментов, образованных актином и тубулином, эти два типа филаментов часто являются мишенью естественных токсинов. Эти токсины, обычно нарушающие реакцию полимеризации филаментов, синтезируются в качестве самозащиты растениями, грибами и губками, которые не хотят быть съеденными хищниками, но не способны убежать. Токсин присоединяется к филаменту или свободной субъединице полимера, смещая равновесие реакции в сторону образования формы, с которой связывается токсин. Например, соединение *латрункулин*, добываемое из морских губок *Latrunculia magnifica*, связывает актиновые мономеры и не дает им собираться в филаменты; так оно вызывает суммарную деполимеризацию актиновых филаментов. С другой стороны,

фаллоидин из грибов *Amanita phalloides* (бледная поганка) связывает и стабилизирует актиновые филаменты, что суммарно увеличивает полимеризацию актина. (Этот привлекательный, но несъедобный гриб также экспрессирует второй смертельный яд — ингибитор РНК-полимеразы II α -аманитин.) Оба изменения актиновых филаментов очень токсичны для клеток. Точно так же *колхицин* из безвременника осеннего связывает и стабилизирует свободный тубулин, приводя к деполимеризации микротрубочек. С другой стороны, *таксол*, выделяемый из коры редкого вида тиса, связывает и стабилизирует микротрубочки, вызывая суммарное увеличение полимеризации тубулина. Эти и некоторые другие природные соединения, используемые биологами для манипуляции цитоскелетом, перечислены в **таблице 16.2**.

Такого рода токсины быстро и эффективно изменяют организацию цитоскелета живых клеток (**рис. 16.23**). Они позволили получить первые представления о том, что цитоскелет является динамичной структурой, поддерживаемой за счет непрерывного быстрого обмена субъединицами между растворимой и филаментной формами. Также они показали, что поток субъединиц необходим для нормального функционирования цитоскелета.

Перечисленные в таблице 16.2 вещества очень полезны биологам, изучающим роль актина и микротрубочек в различных клеточных процессах. Некоторые из них также используются для лечения рака. Деполимеризующие микротрубочки лекарства (например, винбластин) и полимеризующие микротрубочки лекарства (например, таксол) в первую очередь убивают делящиеся клетки, поскольку сборка и разборка микротрубочек играет ключевую роль в правильном функционировании митотического веретена деления (см. ниже в этой главе). Такие лекарства эффективно убивают определенные типы опухолевых клеток человека, но обладают токсичностью по отношению к быстро делящимся нормальным клеткам, включая клетки костного мозга, кишечника и волосных фолликул. Таксол широко используют для лечения раков груди и легких, и он часто эффективен при опухолях, показавших резистентность по отношению к другим химиотерапевтическим агентам.

16.1.14. Организация и деление бактериальных клеток зависят от гомологов эукариотического цитоскелета

В отличие от крупных и морфологически сложных эукариотических клеток, бактериальные клетки обычно по длине не превышают нескольких микрометров и принимают простые формы, например сферическую или палочковидную. У бактерий также

Таблица 16.2. Токсины, влияющие на актиновые филаменты и микротрубочки

Актин-специфичные токсины	
Фаллоидин	связывает и стабилизирует филаменты
Цитохалазин	связывает плюс-концы филаментов
Свинхолид	разъединяет филаменты
Латрункулин	связывает субъединицы и препятствует их полимеризации
Микротрубочки-специфичные токсины	
Таксол	связывает и стабилизирует микротрубочки
Колхицин, колцемид	связывают субъединицы и препятствуют их полимеризации
Винбластин, винкристин	связывают субъединицы и препятствуют их полимеризации
Нокодазол	связывает субъединицы и препятствует их полимеризации

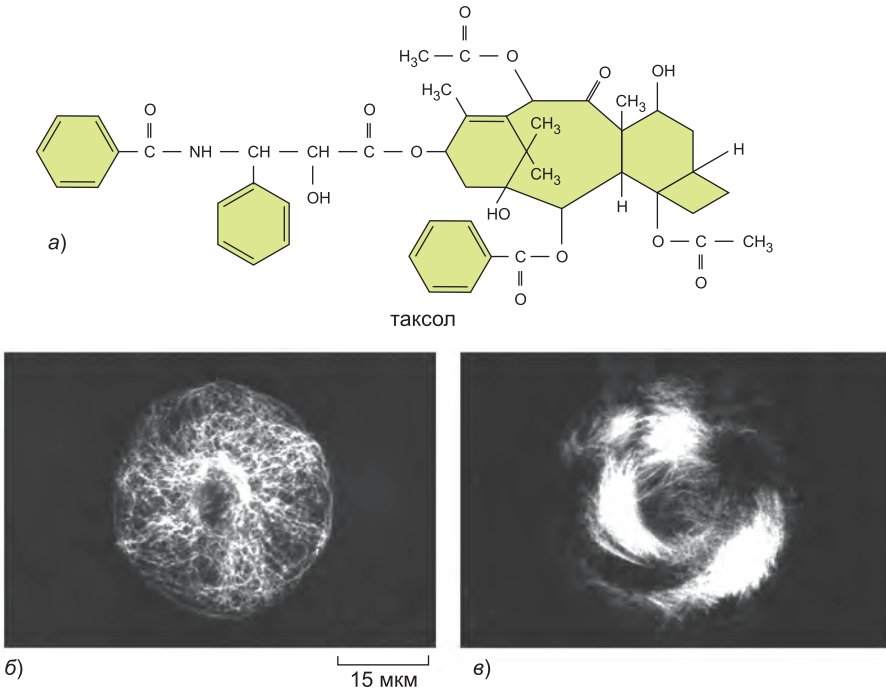
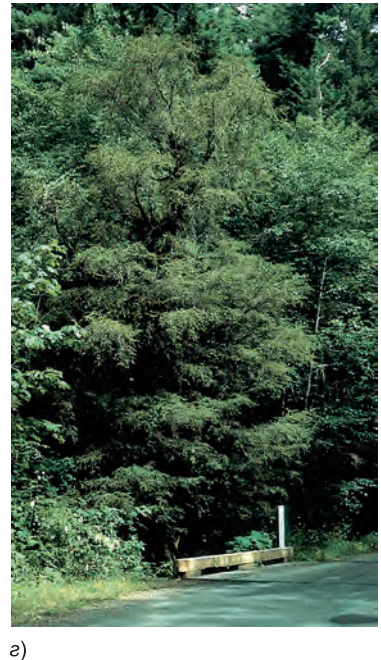


Рис. 16.23. Влияние токсина таксола на организацию микротрубочек. (а) Молекулярная структура таксола. Химики-органики недавно смогли синтезировать эту сложную молекулу, широко используемую для лечения рака. (б) Иммунофлуоресцентная микрофотография, показывающая организацию микротрубочек в эпителиальных клетках печени до добавления таксола. (в) Организация микротрубочек в том же типе клеток после обработки таксолом. Обратите внимание на пучки микротрубочек на периферии клетки. (г) Тихий тис — природный источник таксола. (б, в из N. A. Gloushankova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 8597–8601, 1994. С любезного разрешения Национальной академии наук США; г, с любезного разрешения А. К. Mitchell 2001. © Ее Величество царствующая королева Канады, Канадское лесное хозяйство.)

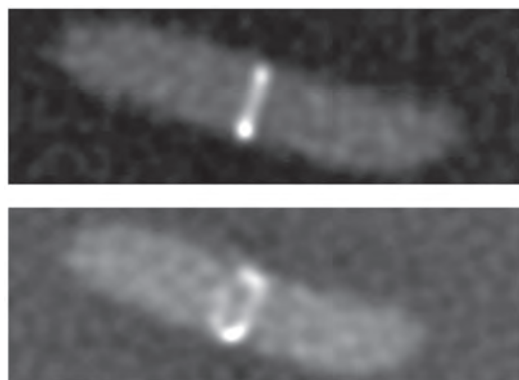
отсутствуют такие сложные сети внутриклеточных мембранных органелл, как эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи. На протяжении долгого времени биологи предполагали, что одной из причин этих различий между царствами эукариот и бактерий является отсутствие у последних цитоскелета. Это предположение поставили под сомнение в начале 90-х гг. XX века, когда обнаружили, что почти все бактерии и многие археи содержат гомолог тубулина FtsZ, способный полимеризоваться в филаменты и образовывать кольцо (носящее название Z-кольца) в месте формирования перетяжки в процессе клеточного деления (рис. 16.24).



Трехмерная структура свернутого белка FtsZ очень похожа на структуру α - или β -тубулина. Более того, как и в случае тубулина, полимеризация инициирует гидролиз GTP, приводящий к конформационным изменениям структуры филамента. Несмотря на то что само по себе Z-кольцо сохраняется в течение многих минут, составляющие его филаменты динамичны, и их время полужизни в среднем составляет около тридцати секунд. По мере деления бактерии Z-кольцо становится все меньше, пока оно полностью не разберется. Считают, что укорочение Z-кольца вносит вклад в инвагинацию мембраны, необходимую для завершения деления клеток. Z-кольцо также может служить сайтом локализации специализированных ферментов синтеза клеточной стенки, участвующих в образовании перетяжки между двумя дочерними клетками. Субъединицы разобранного FtsZ позднее снова собираются в новых сайтах формирования перетяжек в дочерних клетках (рис. 16.25).

Совсем недавно обнаружено, что многие бактерии также содержат гомологи актина. Два из них, MreB и Mbl, встречаются в основном в палочковидных и спиральных клетках, и нарушающие экспрессию этих белков мутации приводят к значительным отклонениям от нормы формы клеток и дефектам расхождения хромосом (рис. 16.26). Филаменты MreB и Mbl *in vivo* полимеризуются с образованием крупных спиралей, занимающих всю длину клетки. Очевидно, они вносят вклад в форму клетки и служат каркасом, направляющим синтез пептидогликановой

клеточной стенки точно так же, как микротрубочки способствуют организации синтеза целлюлозной клеточной стенки высших растений (см. рис. 19.82). Как и в случае FtsZ, филаменты в пределах спиралей MreB и Mbl высокодинамичны, их время полужизни составляет несколько минут; процесс полимеризации, как и у актина, сопровождается гидролизом АТФ.



а)

1 мкм



б)

100 нм

Рис. 16.24. Бактериальный белок FtsZ, прокариотический гомолог тубулина. (а) Полоска белка FtsZ образует кольцо в делящейся бактериальной клетке. Кольцо поместили путем слияния белка FtsZ с зеленым флуоресцентным белком (GFP), что позволило наблюдать в флуоресцентный микроскоп FtsZ в живой клетке *E. coli*. Вверху, вид сбоку показывает кольцо в виде полосы в центре делящейся клетки. Внизу, на повернутом изображении видна кольцевая структура. (б) Филаменты и кольца FtsZ, образованные *in vitro* и визуализированные при помощи электронной микроскопии. Сравните это изображение с микротрубочками, изображенными справа на рис. 16.16, в. (а, из X. Ma, D. W. Ehrhardt and W. Margolin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 12998-13003, 1996; б, из H. A. Erickson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 519–523, 1996. Все с любезного разрешения Национальной академии наук США.)

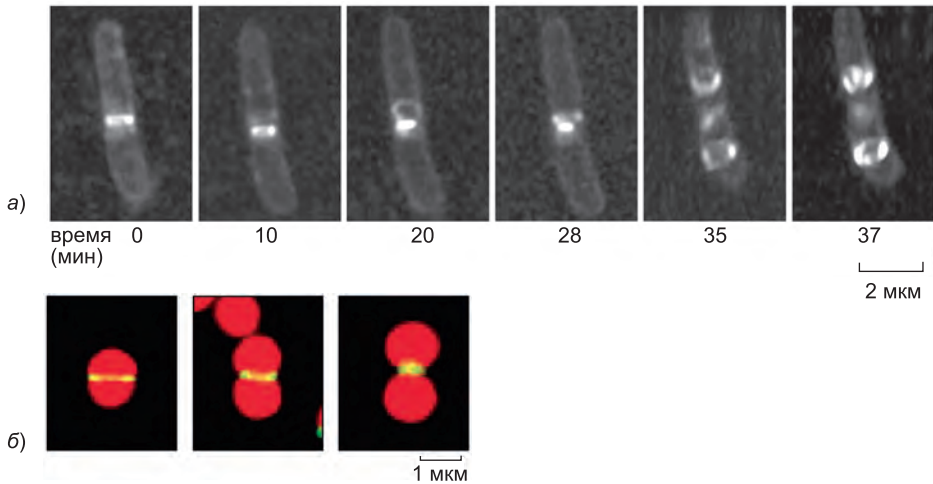


Рис. 16.25. Быстрые перестройки FtsZ в бактериальном клеточном цикле. (а) После завершения расхождения хромосом кольцо, образованное FtsZ в центре клетки, становится все меньше по мере разделения клетки на две. Это похоже на образованное актиновыми и миозиновыми филаментами сократительное кольцо эукариотических клеток. Филаменты FtsZ, разобравшиеся, когда две клетки разделились, снова собираются с образованием двух новых колец в центре дочерних клеток. (б) Делящиеся хлоропласты (красные) красных водорослей также используют состоящее из FtsZ белковое кольцо (желтое) для расщепления. (а, из Q. Sun and W. Margolin, *J. Bacteriol.* 180: 2050–2056, 1998. С любезного разрешения Американского микробиологического общества; б, из S. Miyagishima et al., *Plant Cell* 13: 2257–2268, 2001. С любезного разрешения Американского общества биологов растений.)

Разнообразные родственные MreB и Mbl белки выполняют более специализированные функции. Особенно интересный бактериальный гомолог актина ParM кодируется определенными бактериальными плазмидами, также отвечающими за устойчивость к антибиотикам и часто вызывающими распространение мультилекарственной резистентности при эпидемиях. Бактериальные плазмиды обычно кодируют генные продукты, необходимые для их расхождения, что, скорее всего, является стратегией, обеспечивающей их правильное наследование и распространение в бактериальных хозяевах. *In vivo* ParM собирается в филаментную структуру, связывающуюся с концами кодирующей его плазмиды, и рост филамента ParM растаскивает копии реплицированных плазмид, что напоминает работающее в обратном направлении веретено деления (**рис. 16.27**). Несмотря на то что ParM — это структурный гомолог актина, их динамика различна. Филаменты ParM *in vitro* претерпевают динамическую нестабильность и своим ростом и укорочением больше напоминают микротрубочки, чем актиновые филаменты. Похожая на веретено деления структура, по-видимому, собирается за счет селективной стабилизации филаментов, возникших в результате самопроизвольной нуклеации и связывающихся со специальными рекрутированными в точку начала репликации плазмид белками.

Различные бактериальные гомологи актина обладают сходными молекулярными структурами, но сходство их аминокислотных последовательностей невелико (~10–15% идентичных остатков). Они собираются в филаменты с различной спиральной упаковкой, которые также могут проявлять различное динамическое поведение. Вместо того чтобы использовать один и тот же высококонсервативный

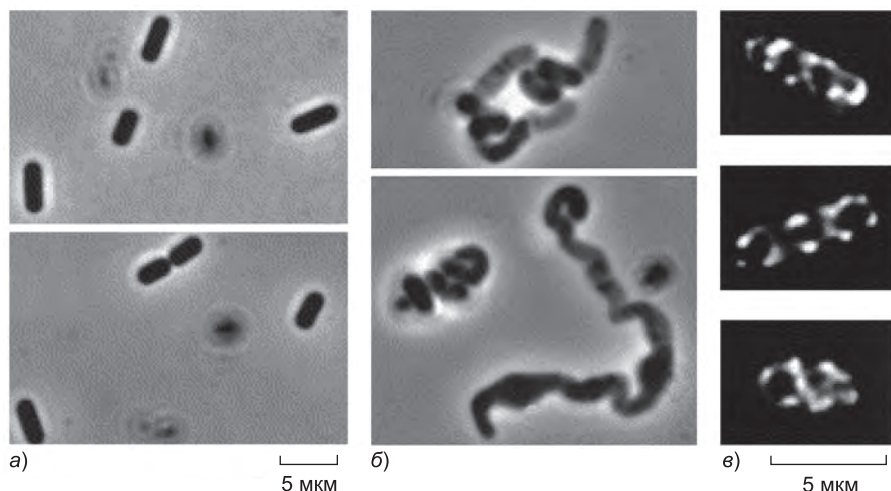


Рис. 16.26. Гомологи актина бактерий определяют форму клеток. (а) Широко распространенная почвенная бактерия *Bacillus subtilis* в норме образует палочковидные клетки. (б) Клетки *B. subtilis*, лишенные гомолога актина Mbl, превращаются в нерегулярные закрученные трубочки и в конце концов погибают. (в) Белок Mbl образует длинные спирали, состоящие из множества коротких филаментов, расположенных вдоль бактериальной клетки и направляющих синтез клеточной стенки. (Из L. J. Jones, R. Carbadillo-Lopez and J. Errington, *Cell* 104: 913–922, 2001. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

актин для различных целей, как делают эукариотические клетки, бактерии предпочитают пролиферировать и специализировать свои актиновые гомологи для выполнения различных функций.

Сейчас стало ясно, что общий принцип организации клеточной структуры за счет ассоциации нуклеотид-связывающих белков в динамические спиральные филаменты используется во всех клетках. Более того, можно с уверенностью сказать, что два основных семейства актина и тубулина возникли еще до расхождения царств эукариот и бактерий. Однако использование цитоскелета бактериями отличается от использования цитоскелета эукариотами. Например, в бактериях тубулин (FtsZ) участвует в *цитокинезе* (разделении клетки на две дочерние), тогда как в эукариотических клетках эту функцию выполняет актин. Сходным образом, эукариотические микротрубочки отвечают за расхождение хромосом, в то время как бактериальные актины (ParM и, возможно, MreB) способствуют разделению реплицированной ДНК бактерий.

По крайней мере один вид бактерий необычной серповидной формы, *Caulobacter crescentus*, несет белок, по структуре сильно напоминающий третий основной класс цитоскелетных белков животных клеток — промежуточные филаменты. Белок кресцентин образует филаментные структуры, которые, по-видимому, влияют на форму клетки; при удалении кодирующих кресцентин генов клетки *Caulobacter* принимают палочковидную форму (рис. 16.28).

Бактерии обладают сложным динамическим цитоскелетом. Тогда почему они остаются такими маленькими и морфологически несложными? До сих пор не обнаружено двигательных белков, перемещающихся вдоль бактериальных филаментов; возможно, именно эволюция двигательных белков стала критическим этапом, позволившим возникнуть сложной морфологии эукариот.

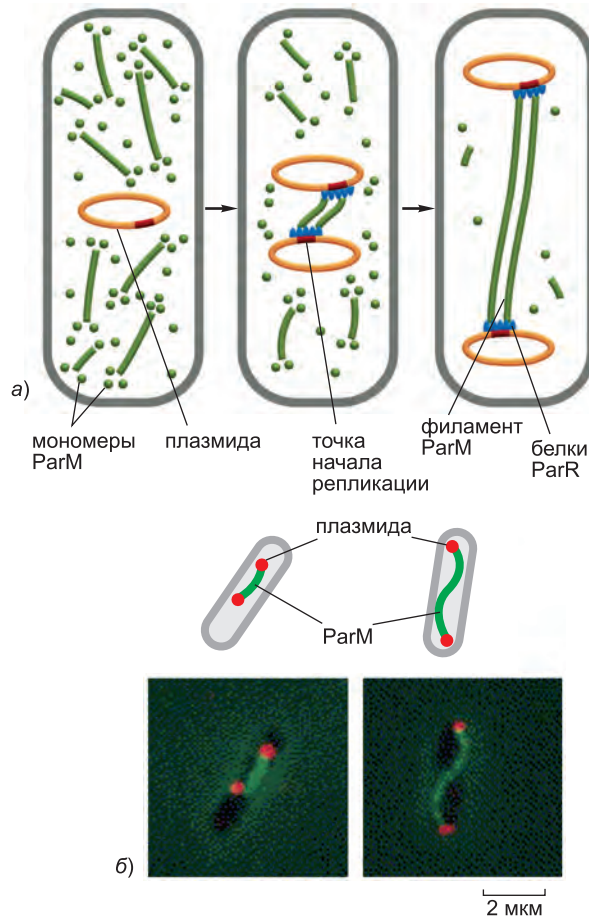


Рис. 16.27. Роль гомолога актина ParM в расхождении плазмид. (а) Некоторые бактериальные устойчивые к лекарствам плазмиды (желтые) кодируют гомолог актина ParM, который в результате самопроизвольной нуклеации образует небольшие динамические филаменты (зеленые) в цитоплазме бактерий. Второй кодируемый плазмидой белок (голубой) связывается со специфическими последовательностями ДНК плазмиды и стабилизирует концы филаментов ParM. Когда плазмида удваивается таким образом, что филаменты ParM стабилизируются с обоих концов, филаменты растут и проталкивают дуплицированные плазмиды в противоположные концы клетки. (б) В этих бактериальных клетках, несущих устойчивую к лекарствам плазмиду, плазмиды помечены красным, а белок ParM — зеленым. Слева, короткий пучок ParM вскоре после дупликации соединяет две дочерние плазмиды. Справа, полностью собранный филамент ParM расталкивает удвоенные плазмиды к полюсам клетки. (а, адаптировано из E. G. Garner, C. S. Campbell and R. D. Mullins, *Science* 306: 1021–1025, 2004. С любезного разрешения издательства AAAS; б, из J. Moller-Jensen et al., *Mol. Cell* 12: 1477–1487, 2003. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Заключение

Пространственная организация цитоплазмы эукариотических клеток обеспечивается сетью белковых филаментов — цитоскелетом. Эта сеть содержит три основных типа филаментов: микротрубочки, актиновые филаменты

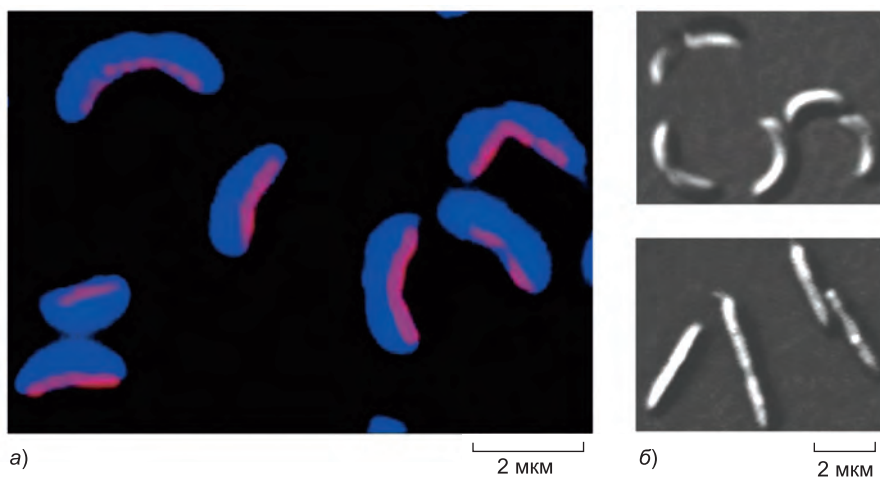


Рис. 16.28. *Caulobacter* и кресцентин. Серповидная бактерия *Caulobacter crescentus* экспрессирует белок кресцентин, чей набор двуспиральных доменов по размеру и организации похож на домены эукариотических промежуточных филаментов. В клетках белок кресцентин образует волокна, выстилающие внутреннюю поверхность изогнутой бактериальной клеточной стенки. Когда ген нарушен, бактерия жизнеспособна, но имеет палочковидную форму. (Из N. Ausmees, J. R. Kuhn and C. Jacobs-Wagner, *Cell* 115: 705–713, 2003. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

и промежуточные филаменты. Все три типа образуют спиральные структуры, состоящие из связывающихся друг с другом за счет латеральных и продольных белковых контактов субъединиц. Различия в структуре субъединиц и способе их самосборки обеспечивают различные механические свойства филаментов. Промежуточные филаменты легко гнутся, но их сложно сломать. Микротрубочки — это прочные и жесткие полые трубки. Актиновые филаменты самые тонкие и легко ломаются.

В живых клетках сборка и разборка субъединиц трех типов цитоскелетных филаментов непрерывно их изменяет. В микротрубочках и актиновых филаментах добавление и потеря субъединиц происходят только на концах. При этом один конец (плюс) растет быстрее, чем другой. Тубулин и актин (субъединицы микротрубочек и актиновых филаментов соответственно) связывают и гидролизуют нуклеозидтрифосфаты (тубулин связывает GTP, а актин — АТФ). Гидролиз нуклеотидов лежит в основе характерного динамического поведения этих двух типов филаментов. Актиновые филаменты в клетках в основном претерпевают предмиллинг, при котором филамент собирается с одного конца и одновременно разбирается с другого. Для микротрубочек более характерна динамическая неустойчивость, при которой филамент переключается между удлинением и укорочением.

Если актин и тубулин мало изменились в течение эволюции, то семейство промежуточных филаментов очень разнообразно. В цитоплазме животных клеток находят многочисленные тканеспецифичные формы, включая кератиновые филаменты в эпителиальных клетках, нейрофиламенты в нейронах и десмино-вые филаменты в мышечных клетках. Во всех этих клетках основная функция промежуточных филаментов — придание механической жесткости.

Бактериальные клетки также содержат гомологи тубулина, актина и промежуточных филаментов, образующие динамические структуры, участвующие в определении формы клеток и в клеточном делении.

16.2. Как клетки регулируют свои цитоскелетные филаменты

Микротрубочки, актиновые филаменты и промежуточные филаменты в клетке более динамичны, чем в пробирке. Клетки регулируют длину и стабильность своих цитоскелетных филаментов, а также их число и геометрию. Это происходит большей частью за счет регуляции прикрепления филаментов друг к другу и другим компонентам клетки, что позволяет им образовывать разнообразные структуры более высокого порядка. Направленная ковалентная модификация субъединиц регулирует некоторые свойства филаментов, но основная регуляция осуществляется широким спектром дополнительных белков, связывающихся с филаментами или их свободными субъединицами. Некоторые важнейшие дополнительные белки микротрубочек и актиновых филаментов представлены в [приложении 16.3 \(стр. 994–995\)](#). В данном разделе мы рассмотрим, как дополнительные белки изменяют динамику и структуру цитоскелетных филаментов. Мы начнем обсуждение с того, как в клетках происходит нуклеация микротрубочек и актиновых филаментов, поскольку этот процесс играет важную роль в организации внутреннего строения клетки.

16.2.1. Содержащий γ -тубулин белковый комплекс обеспечивает нуклеацию микротрубочек

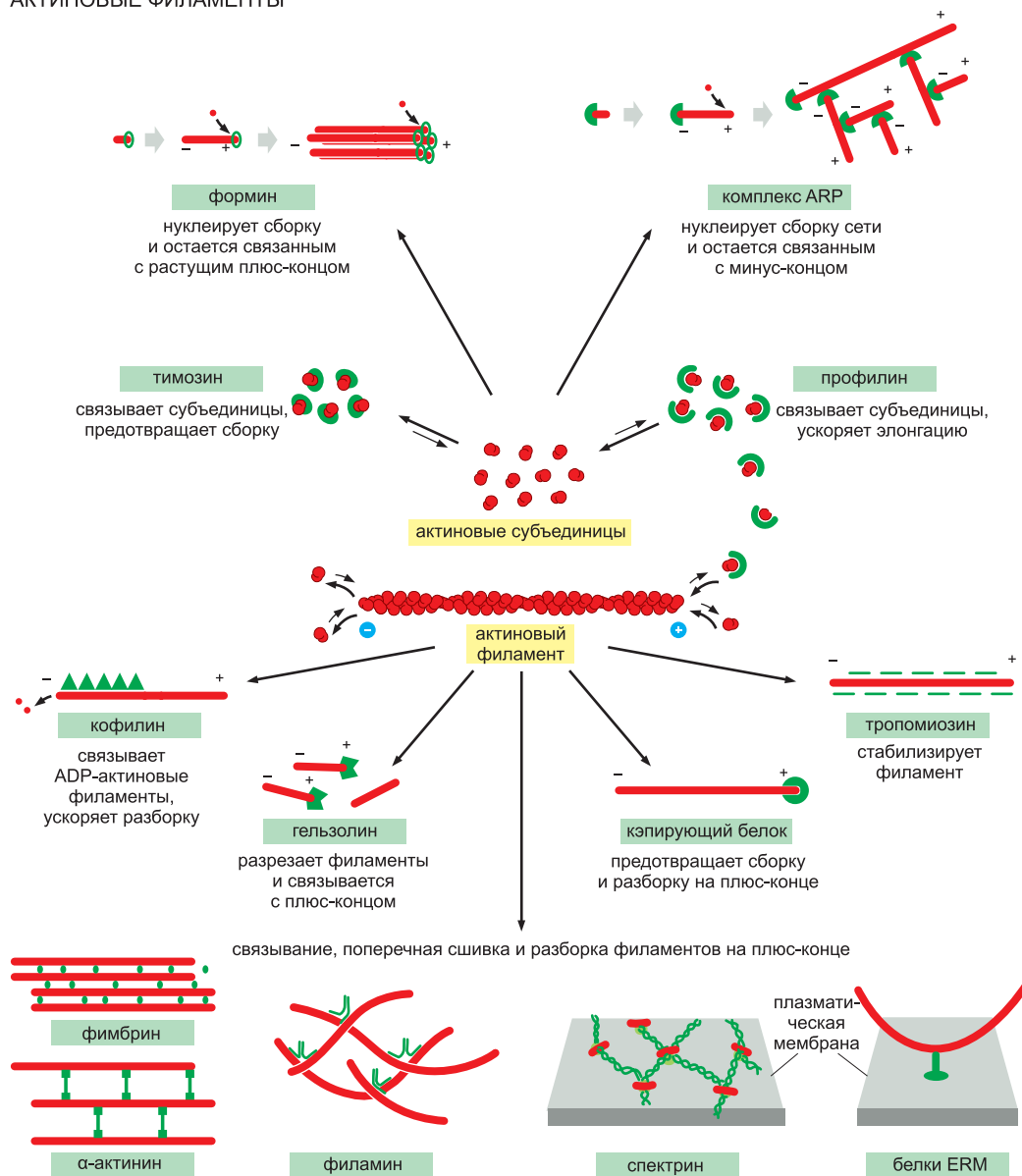
α - и β -тубулины — это обычные строительные блоки микротрубочек, но другой тип тубулина, γ -тубулин, выполняет более специфичную функцию. Присутствуя в клетках разнообразных организмов, от дрожжей до человека, в значительно меньшей концентрации, чем α - и β -тубулины, этот белок участвует в нуклеации роста микротрубочек. Обычно зарождение микротрубочек происходит в специфическом месте клетки, известном как **центр организации микротрубочек (МТОС)**. Антитела против γ -тубулина окрашивают МТОС практически во всех исследованных клетках.

Нуклеация микротрубочек происходит с минус-конца, и плюс-конец растет от МТОС с образованием различных структур. **Кольцевой комплекс γ -тубулина** (*γ -Tubulin Ring Complex, γ -TuRC*), способный к нуклеации роста микротрубочек в пробирке, выделили из клеток насекомых и позвоночных. Два белка, мало отличающихся у организмов от дрожжей до человека, напрямую связывают γ -тубулин, а также несколько других белков, способствующих образованию кольца γ -тубулиновых молекул. Это кольцо можно наблюдать на минус-конце нуклеированных γ -TuRC микротрубочек, и, таким образом, оно служит шаблоном для создания микротрубочки с 13 микрофиламентами в поперечнике ([рис. 16.29](#)).

16.2.2. В животных клетках микротрубочки отходят от centrosомы

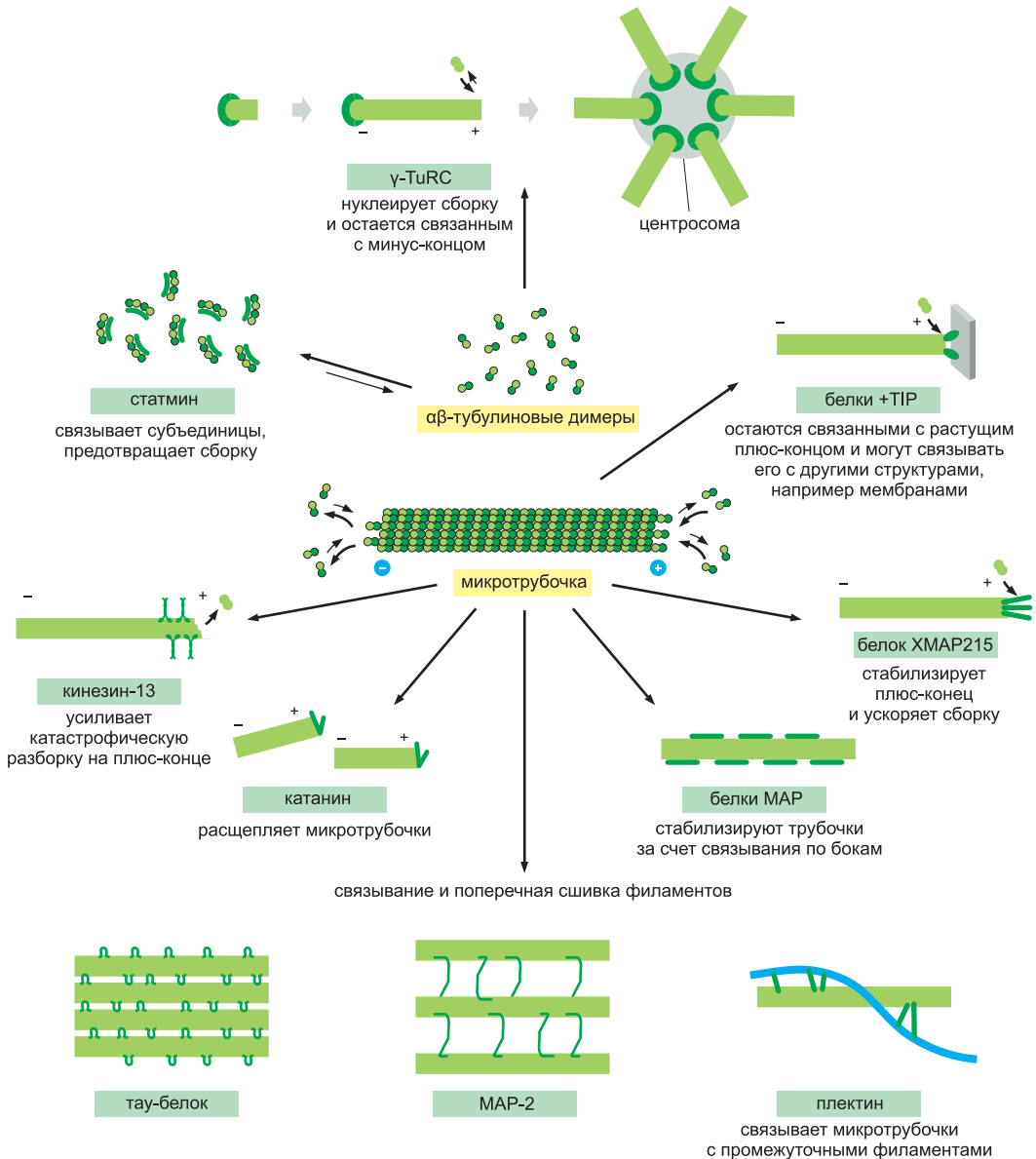
Большинство животных клеток несет единственный ярко выраженный МТОС, носящий название **центросомы** и располагающийся рядом с ядром. Цитоплазматические микротрубочки выходят из этого узла, как лучи звезды. В центросоме происходит нуклеация минус-концов микротрубочек, и поэтому плюс-концы направлены

АКТИНОВЫЕ ФИЛАМЕНТЫ



Некоторые важнейшие дополнительные белки актинового цитоскелета. За исключением двигательных белков миозинов, рассматриваемых в другом разделе, представлены примеры каждого основного типа белков. Все они обсуждаются в тексте. Однако большинство клеток содержит более ста различных актин-связывающих белков, и существует вероятность, что некоторые важные типы ассоциированных с актином белков до сих пор не идентифицированы.

МИКРОТРУБОЧКИ



Некоторые наиболее важные дополнительные белки микротрубочкового цитоскелета. За исключением двух классов двигательных белков, обсуждаемых в другом разделе, представлены примеры каждого типа белков. Все они рассмотрены в тексте. Однако большинство клеток содержит более сотни различных связывающих микротрубочки белков, и, как и в случае ассоциированных с актином белков, вероятно, некоторые важные типы ассоциированных с микротрубочками белков до сих пор не идентифицированы.

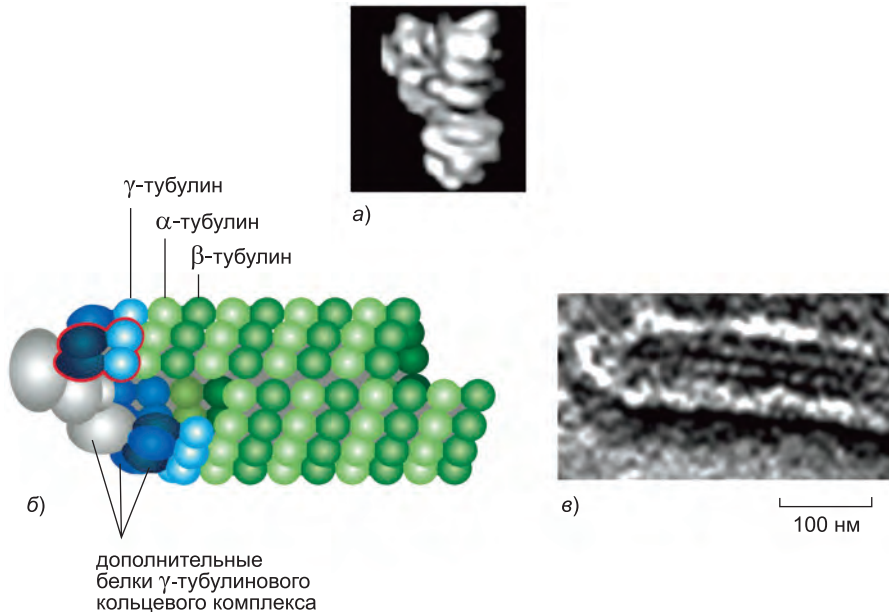


Рис. 16.29. Полимеризация тубулина, нуклеированного γ -тубулиновыми кольцевыми комплексами. (а) Структура кольцевого комплекса γ -тубулина, построенная посредством усреднения электронных микрофотографий отдельных очищенных комплексов. (б) Модель нуклеации роста микротрубочки белком γ -TuRC. Красным обведена пара белков, связанных с двумя молекулами γ -тубулина; эту группу можно изолировать как отдельный подкомплекс более крупного кольца. Обратите внимание на продольную неоднородность двух протофиламентов. Микротрубочки обычно несут один такой «шов», нарушающий однородную спиральную упаковку протофиламентов. (в) Электронная микрофотография нуклеации отдельной микротрубочки очищенным γ -тубулиновым кольцевым комплексом. (а и в, из M. Moritz et al., *Nat. Cell Biol.* 2: 365–370, 2000. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

наружу и растут к периферии клетки. Микротрубочки непрерывно растут и укорачиваются за счет динамической неустойчивости, зондируя трехмерный объем клетки. Центросома состоит из волокнистого *центросомного матрикса*, несущего более пятидесяти копий γ -TuRC. Большинство образующих матрикс белков до сих пор не идентифицировано, и неизвестно, как они рекрутируют и активируют γ -TuRC.

В центросоме находится пара довольно загадочных цилиндрических структур, расположенных под прямым углом друг к другу в Г-подобной конфигурации (**рис. 16.30**). Это **центриоли**, становящиеся базальными тельцами ресничек и жгутиков подвижных клеток (см. ниже). Центриоли структурируют матрикс центросом (также называемый перичентриолярным веществом), обеспечивая его дупликацию при собственном удвоении в каждом клеточном цикле (**рис. 16.31**). Как описано в главе 17, центросомы в интерфазе удваиваются и расщепляются на две равные части, каждая из которых несет дублированную пару центриолей. В начале митоза дочерние центросомы перемещаются в противоположные концы ядра и образуют два полюса веретена деления (см. приложение 17.1, **стр. 1072–1073**). Центриоль состоит из короткого цилиндра модифицированных микротрубочек и большого числа дополнительных белков. Молекулярные основы ее дупликации до сих пор малопонятны.

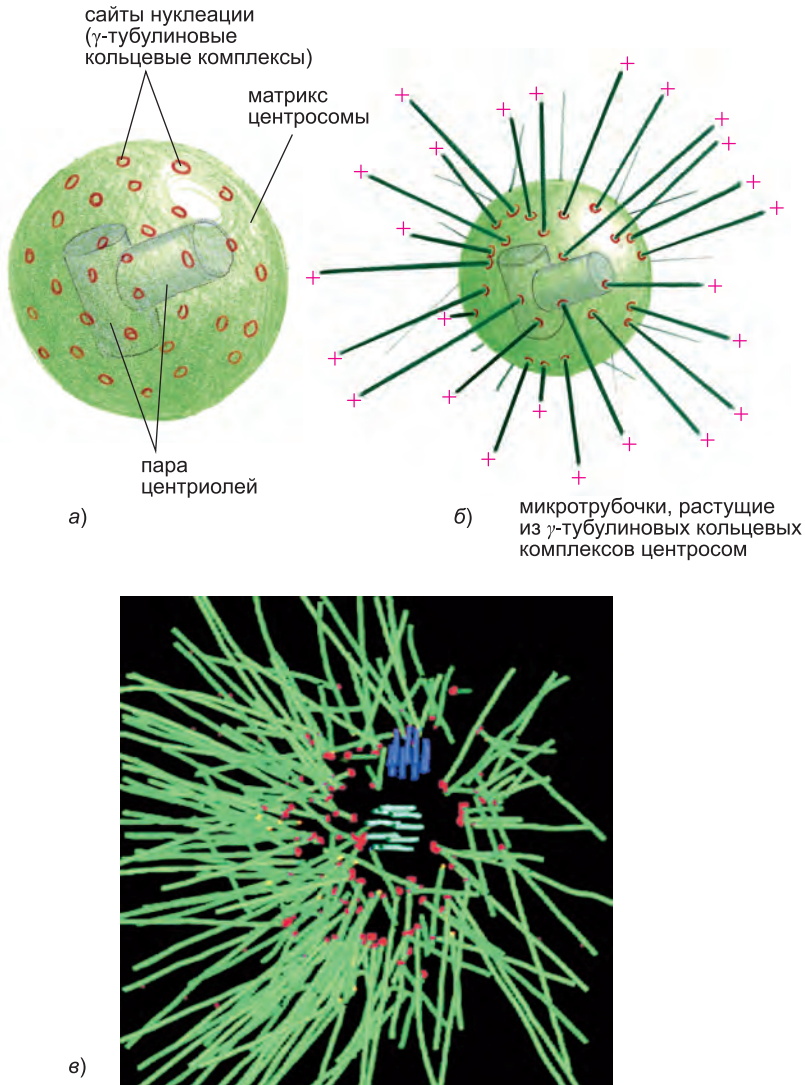


Рис. 16.30. Центросома. (а) Центросома — это основной центр организации микротрубочек МТОС животных клеток. Она расположена в цитоплазме вблизи ядра и состоит из волокнистого аморфного белкового матрикса, к которому прикрепляются γ -тубулиновые кольцевые комплексы, инициирующие рост микротрубочек. Матрикс структурируется парой центриолей (см. текст). (б) Центросома с прикрепленными к ней микротрубочками. Минус-концы микротрубочек, выросшие из γ -тубулинового кольцевого комплекса, встроены в центросому, а плюс-концы свободно располагаются в цитоплазме. (в) На восстановленном изображении МТОС клетки *C. elegans* виден выходящий из центросомы плотный пучок микротрубочек. (в, из Е. Т. О’Тооле et al., *J. Cell Biol.* 163: 451–456, 2003. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

В грибах и диатомовых водорослях микротрубочки зарождаются в МТОС, встроенном в ядерную оболочку в виде небольшой бляшки, носящей название *полярного тельца веретена деления*. В клетках высших растений нуклеация микротрубочек,

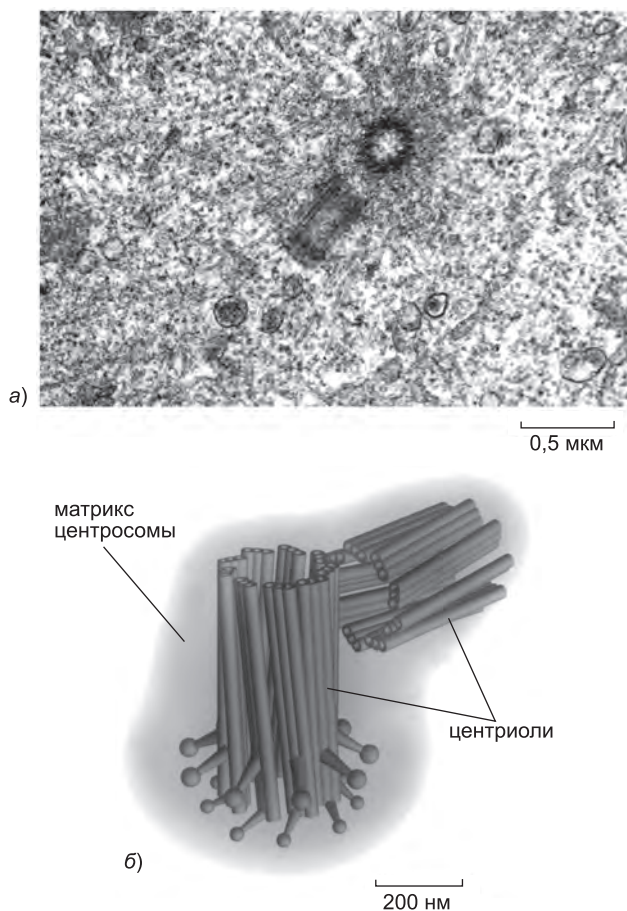


Рис. 16.31. Центриоль в центросоме. (а) Электронная микрофотография тонкого среза центросомы. Представлен вид сверху материнской центриоли и продольный срез дочерней центриоли. Рядом видны многочисленные микротрубочки. (б) Структура пары центриолей. (а, из G. J. Mack, Y. Ou and J. B. Rattner, *Microsc. Res. Tech.* 49: 409–419, 2000. С любезного разрешения издательства John Wiley & Sons. б, адаптировано по D. Chrétien et al., *J. Struct. Biol.* 120: 117–133, 1997. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

по-видимому, происходит в сайтах, распределенных по всей ядерной оболочке. Ни у грибов, ни у большинства растений нет центриолей. Несмотря на эти различия, все эти клетки несут γ -тубулин и используют его для нуклеации микротрубочек.

В животных клетках астральная (похожая на звезду) конфигурация микротрубочек очень постоянна: динамические плюс-концы направлены в сторону периферии клетки и устойчивые минус-концы собраны вблизи ядра. Система микротрубочек, исходящая из центросомы, служит для обследования внешних областей клетки и позиционирования центросомы в центре клетки, причем это происходит даже в искусственных условиях (**рис. 16.32**). Даже в изолированном фрагменте клетки, лишенном центросомы, динамические микротрубочки, взаимодействующие с мембранными органеллами, организуются в астральную структуру, в центре которой располагаются минус-концы. Правда, в этом процессе могут участвовать более слож-

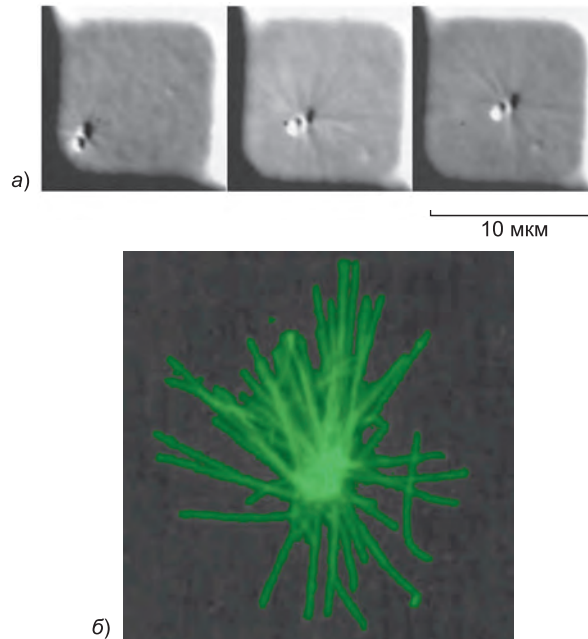


Рис. 16.32. Поиск центра centrosомой. (а) Небольшие квадратные лунки поместили в пластиковый субстрат. В одну из лунок поместили единственную centrosому и раствор тубулиновых субъединиц. По мере полимеризации микротрубочки, зарождающиеся в centrosоме, давят на стенки лунки. Требование одинакового нажима во всех направлениях для стабилизации локализации заставляет centrosому передвинуться в центр лунки. Фотографии сделаны с промежутками в три минуты. (б) Расположенная в центре фиксированная и окрашенная centrosома. Видно распределение микротрубочек, равномерно давящих на стенки лунки. (Из Т. Е. Holy et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 6228–6231, 1997. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

ные механизмы, чем используемый изолированными centrosомами толкательный механизм (рис. 16.33). Способность микротрубочкового цитоскелета находить центр клетки позволяет создать общую систему координат, которая затем используется для распределения многих органелл по клетке. Высокодифференцированным клеткам со сложной морфологией, например нервным, мышечным и эпителиальным, требуются дополнительные измерительные методы для создания более сложной внутренней координатной системы. Таким образом, например когда эпителиальные клетки образуют межклеточные контакты и становятся полярными, минус-концы микротрубочек перемещаются в область вблизи апикальной плазматической мембраны. Из этого асимметричного сайта вдоль длинной оси клетки исходит пучок практически параллельных микротрубочек, чьи плюс-концы достигают базальной поверхности (см. рис. 16.5).

16.2.3. Нуклеация актиновых филаментов часто происходит в плазматической мембране

В отличие от нуклеации микротрубочек, протекающей в основном глубоко в цитоплазме вблизи клеточного ядра, нуклеация актиновых филаментов чаще всего

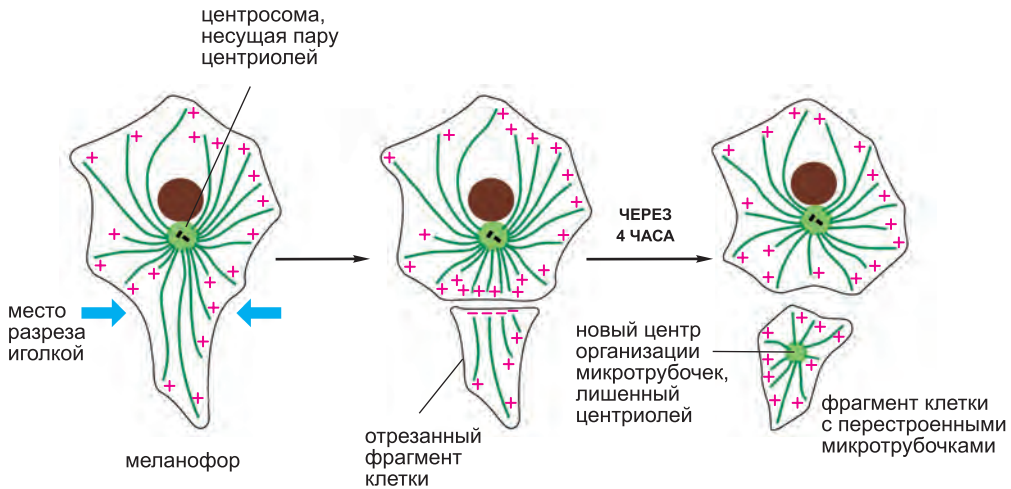


Рис. 16.33. Микротрубочки способны найти центр клетки. После отрезания иглой отростка пигментной клетки рыбы микротрубочки в отделенном фрагменте клетки перестраиваются таким образом, что их минус-концы оказываются в центре фрагмента в новом центре организации микротрубочек.

происходит в плазматической мембране или вблизи нее. В результате плотность актиновых филаментов максимальна на периферии клеток. Слой под плазматической мембраной называется **клеточным кортексом**, и содержащиеся в нем актиновые филаменты определяют форму и движение клеточной поверхности. Например, в зависимости от прикрепления друг к другу и к плазматической мембране актиновые структуры могут образовывать удивительно разнообразные выросты клеточной поверхности. К ним относятся заостренные пучки, например *микроворсинки* и *филоподии*, плоские выступающие вперед *ламеллоподии*, помогающие клетке передвигаться по твердым субстратам, и фагоцитарные чаши макрофагов.

Нуклеация актиновых филаментов в плазматической мембране часто регулируется внешними сигналами, что позволяет клетке быстро изменять форму и жесткость в ответ на изменение внешней среды. Нуклеация может катализироваться двумя различными типами факторов: комплексом ARP и форминами (см. ниже). Первый из них представляет собой комплекс белков, в состав которого входят два *актиноподобных белка* (*Actin-Related Proteins, ARP*), примерно на 45% идентичных актину. Функция **комплекса ARP** (также известного как *комплекс Arp 2/3*) аналогична функции γ -TuRC и состоит в нуклеации роста актиновых филаментов с минус-конца, что приводит к быстрому удлинению с плюс-конца (**рис. 16.34, а и б**). Комплекс также способен сбоку прикрепляться к актиновому филаменту, оставаясь связанным с минус-концом другого филамента. Таким образом, комплекс связывает отдельные филаменты в древоподобную сеть (**рис. 16.34, в и г**).

У животных комплекс ARP связан со структурами, расположенными на ведущем конце мигрирующих клеток. Комплекс расположен в областях быстрого роста актиновых филаментов, например в ламеллоподиях. Его нуклеарная активность регулируется внутриклеточными сигнальными молекулами и компонентами цитоплазматической поверхности плазматической мембраны. Этот высококонсервативный комплекс также участвует в нуклеации актиновых филаментов вблизи плазма-

тической мембраны в дрожжах, где он необходим для образования кортикальных актиновых заплат (см. рис. 16.6), и в растительных клетках, где он направляет формирование на поверхности актиновых пучков, необходимых для роста клеток сложной формы в различных тканях (рис. 16.35).

γ -тубулин и ARP эволюционно очень древние и мало отличаются у разнообразных видов эукариот. По-видимому, их гены возникли в результате ранней дупликации гена субъединицы микротрубочки или актинового филамента соответственно и последующих дивергенции и специализации копий гена. Это привело к формированию генов, кодирующих белки, специализирующиеся на нуклеации. Таким образом, сходная стратегия эволюционировала для двух различных цитоскелетных систем. Это подтверждает центральное значение нуклеации как общего принципа организации клеток.

16.2.4. Механизм нуклеации влияет на крупномасштабную организацию филаментов

Поскольку комплекс ARP наиболее эффективно инициирует рост нового актинового филамента, когда он связан со старым актиновым филаментом, регулируемая активация комплекса ARP в животных клетках обычно приводит к сборке гелеобразных разветвленных актиновых сетей. Однако многие крупные актиновые структуры состоят из параллельных пучков неразветвленных филаментов, включая борозду дробления делящихся клеток (см. рис. 16.2) и актиновые волокна, направленные в сторону роста почки дрожжей (см. рис. 16.6). Образование многих из таких актиновых пучков инициируется другим набором белков нуклеации, *форминами*, которые способны нуклеировать рост прямых неразветвленных филаментов, сшитых друг с другом другими белками с образованием параллельных пучков.

Формины — это крупное семейство димерных белков (геном мыши кодирует около 15 различных формин). Каждая субъединица формина несет сайт связывания мономерного актина, и, по-видимому, нуклеация полимеризации актина происходит путем захвата двух мономеров. По мере роста филамента димер формина остается связанным с быстро растущим плюс-концом, при этом не препятствуя присоединению новых субъединиц для удлинения филамента (рис. 16.36). Это сильно отличается от поведения комплекса ARP или γ -TuRC, которые остаются связанными с минус-концом актинового филамента или микротрубочки и препятствуют как связыванию новых субъединиц с этим концом, так и их потере.

16.2.5. Белки, связывающие свободные субъединицы, влияют на удлинение филаментов

После нуклеации цитоскелетные филаменты обычно удлиняются за счет присоединения растворенных субъединиц. В большинстве клеток позвоночных, за исключением мышечных, примерно 50% актина содержится в филаментах и 50% — в растворе, но это соотношение может быстро изменяться в ответ на внешние сигналы. Концентрация растворимых мономеров обычно составляет 50–200 мкМ (2–8 мг/мл); это довольно много, поскольку критическая концентрация для чистого актина в пробирке меньше 1 мкМ. Почему так много актина остается в растворенной форме, а не полимеризуется в филаменты? Ответ на этот вопрос состоит в том, что пул субъединиц содержит специальные белки, связывающие актиновые мономеры и делающие полимеризацию менее выгодной (их действие

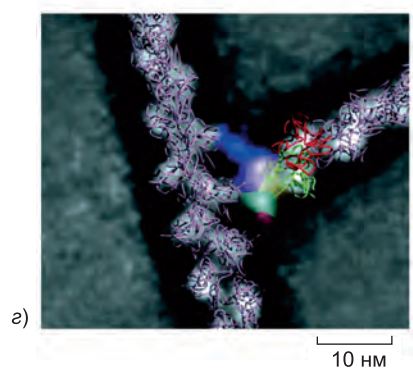
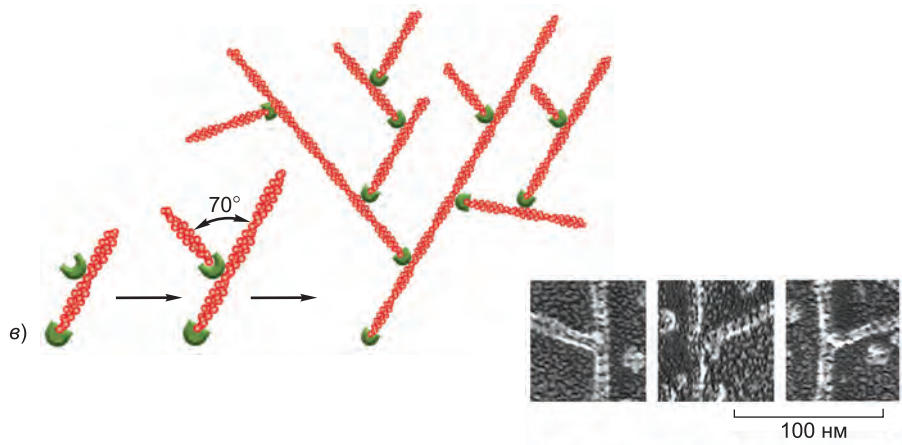
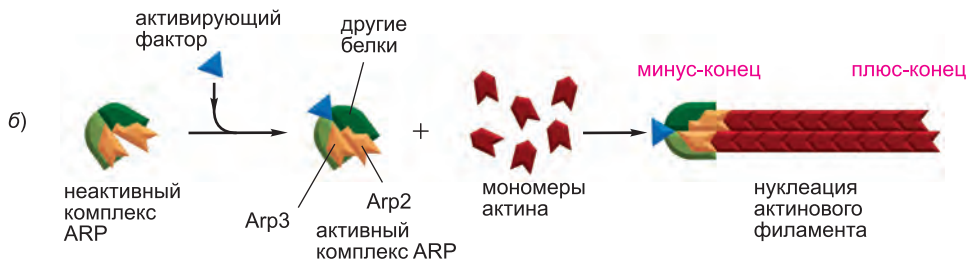
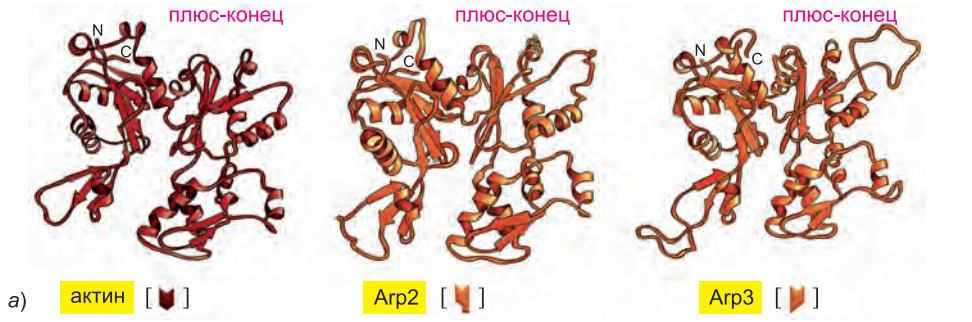


Рис. 16.34(слева). Нуклеация и формирование актиновой сети комплексом ARP. (а) Сравнение структур Arp2, Arp3 и актина. Несмотря на то что поверхность молекул Arp2 и Arp3, соответствующая плюс-концу (*вверху*), очень похожа на плюс-конец актина, различия по бокам и на минус-конце (*внизу*) не дают этим актиноподобным белкам образовывать собственные филаменты или включаться в актиновые. (б) Модель нуклеации актинового филамента комплексом ARP. В отсутствие активирующего фактора Arp2 и Arp3 удерживаются дополнительными белками в ориентации, не позволяющей им начать нуклеацию нового актинового филамента. Когда с комплексом связывается активирующий фактор (*голубой треугольник*), Arp2 и Arp3 сближаются в новой конфигурации, напоминающей плюс-конец актинового филамента. В результате субъединицы актина могут присоединиться к этой структуре, обходя лимитирующую стадию нуклеации филамента (см. рис. 16.10). (в) Комплекс ARP наиболее эффективно нуклеирует филаменты, когда он связан с уже существующим актиновым филаментом. Образуется ответвление, растущее под углом 70° относительно исходного филамента. Повторяющиеся этапы нуклеации приводят к формированию древоподобной сети актиновых филаментов. (г) *Вверху*, электронная микрофотография разветвленных актиновых филаментов, образованных в результате смешения очищенных актиновых субъединиц и очищенных комплексов ARP. *Внизу*, восстановленное изображение разветвления, куда были согласно электронной плотности встроены трехмерные структуры актина и комплекса ARP. Материнский филамент направлен сверху вниз, а дочерний филамент ответвляется справа, где комплекс ARP связался с тремя актиновыми субъединицами материнского филамента. (г, из R. D. Mullins et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 6181–6186, 1998. С любезного разрешения Национальной академии наук США, и из N. Volkmann et al., *Science* 293: 2456–2459, 2001. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

похоже на действие токсина латрункулина). Небольшой белок *тимозин* является наиболее распространенным белком такого типа. Связанные с тимозином актиновые мономеры находятся в «запертом» состоянии и не способны присоединяться ни к плюс-, ни к минус-концам актинового филамента, а также гидролизовать или обменивать свой связанный нуклеотид.

Как клетки рекрутируют актиновые мономеры из этого забуференного пула и используют их для полимеризации? Может показаться, что тимозин регулирует-

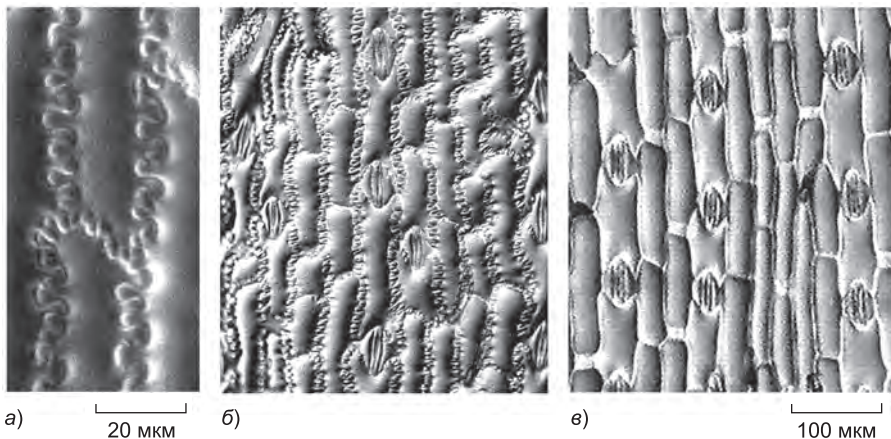


Рис. 16.35. Функция комплекса ARP в растительных клетках. (а) Клетки эпидермиса листьев кукурузы образуют маленькие обогащенные актином выросты, скрепляющие соседние клетки друг с другом, как детали пазла. (б) На поверхности листа можно наблюдать регулярную структуру, образованную сцепленными клетками. (в) Эпидермальные клетки мутантного растения, лишённого комплекса ARP, не образуют выростов. Прямоугольные клетки имеют нормальный размер и располагаются на нормальном расстоянии друг от друга, но невооруженным глазом лист кажется слишком блестящим. (Из M. J. Frank, H. N. Cartwright and L. G. Smith, *Development* 130: 753–762, 2003. С любезного разрешения Company of Biologists.)

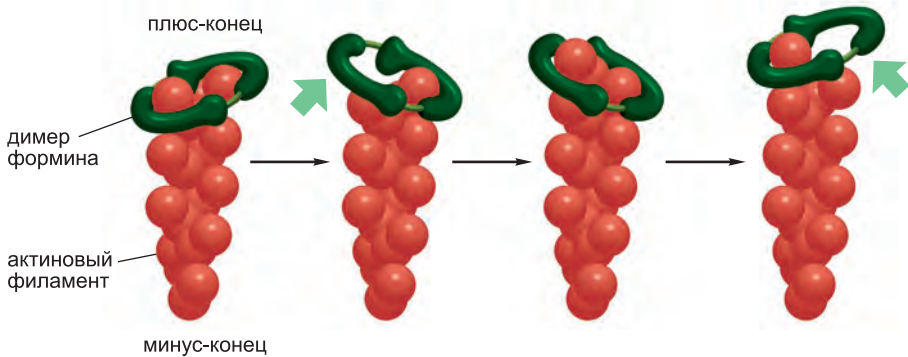
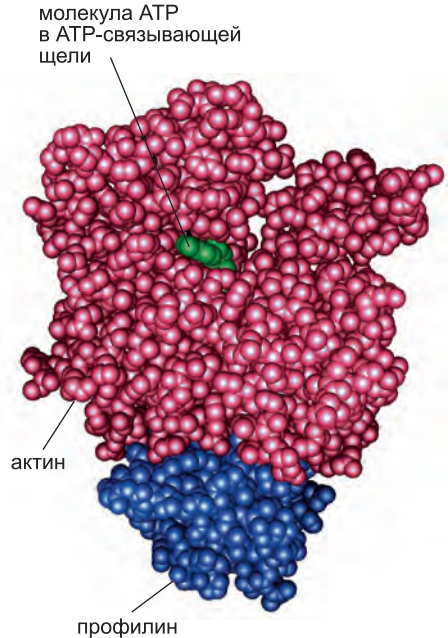


Рис. 16.36. Опосредованное форминами удлинение актина. Белки формины (зеленые) образуют димерный комплекс, опосредующий нуклеацию сборки нового актинового филамента (красный), и остаются связанными с быстрорастущим плюсом-концом. Формин поддерживает связь с одной из двух актиновых субъединиц на плюсом-конце, не мешая присоединению новых субъединиц. Здесь показана только часть крупной молекулы формина. Другие его участки регулируют активность и связываются с различными структурами клетки. Многие формины косвенно связаны с плазматической мембраной клетки и способствуют инсерционной (путем вставок) полимеризации актиновых филаментов прямо под поверхностью мембраны.

ся сигнальными путями (см. главу 15), но это не так. Вместо этого, рекрутизация зависит от другого связывающего мономеры белка — *профилина*. Профилин связывается с актиновым мономером с противоположной от АТФ-связывающей щели стороны, блокируя поверхность, которая в норме связывалась бы с минус-концом филамента, но оставляя открытым сайт, связывающийся с плюсом-концом (рис. 16.37). Комплекс профилин-актин может легко присоединиться к свободному плюсом-концу. Это приводит к конформационной перестройке актина, снижающей его родство к профилину, и профилин отваливается от удлинившегося на одну субъединицу филамента. Поскольку профилин конкурирует с тимозином за связывание с актиновыми мономерами, локальная активация молекул профилина приводит к переходу актиновых субъединиц из тимозин-связанного пула на плюсом-концы филаментов. Рост актиновых филаментов, чьи плюсом-концы связаны с определенными форминами (семейством белков нуклеации актина, описанным ранее), еще сильнее зависит от активации профилина. В этих случаях для удлинения актиновых филаментов необходимо, чтобы мономерный актин был связан с профилином (рис. 16.38).

Активность профилина регулируется несколькими внутриклеточными механизмами, включая фосфорилирование профилина и его связывание с инозитолфосфолипидами. Эти механизмы определяют сайты, где действует профилин. Например, способность профилина перемещать актиновые субъединицы из пула на растущие концы филаментов играет критическую роль в сборке филаментов в плазматической мембране. Профилин располагается на цитоплазматической поверхности мембраны, поскольку он связывается с ее кислыми фосфолипидами. Здесь внеклеточные сигналы способны активировать профилин и инициировать стремительную локальную полимеризацию актина и рост обогащенных актином подвижных структур, например филоподий и ламеллоподий (см. ниже). Помимо связывания с актином и фосфолипидами, профилин также связывается с различными внутриклеточными белками, несущими обогащенные профином домены; эти белки также способствуют

Рис. 16.37. Профилин, связанный с актиновым мономером. Молекула белка профилина показана *синим*, а актин — *красным*. АТР показан *зеленым*. Профилин связывается с актином с противоположной от АТР-связывающей щели стороны. Такой гетеродимер профилин-актин способен связывать и удлинять плюс-конец актинового филамента, но стерически не способен присоединяться к минус-концу. (С любезного разрешения Michael Rozycki и Clarence E. Schutt.)



локализации профилина в местах, где необходима быстрая сборка актина.

Как и в случае актиновых мономеров, клетка удерживает неполимеризованные тубулиновые субъединицы в пуле, где их концентрация значительно превышает критическую. Одна молекула небольшого белка *статмина* связывает два гетеродимера тубулина и не дает им присоединиться к концам микротрубочек. Таким образом, статмин снижает эффективную концентрацию доступных для полимеризации субъединиц тубулина (действие похоже на действие токсина колхицина). Более того, статмин увеличивает вероятность того, что микротрубочка претерпит катастрофический переход к укорочению. Фосфорилирование статмина ингибирует его связывание тубулином, и сигналы, вызывающие фосфорилирование, способны увеличить скорость удлинения микротрубочек и подавить динамическую неустойчивость. В раковых клетках часто наблюдается повышенная экспрессия статмина, и считается, что вызываемая этим повышенная скорость круговорота микротрубочек вносит вклад в характерное изменение формы клеток, связанное со злокачественной трансформацией.

16.2.6. Расщепляющие белки регулируют длину и кинетику актиновых филаментов и микротрубочек

В некоторых случаях клетка может расщепить существующий длинный филамент на множество более мелких. В результате образуется большое число новых филаментных концов: длинный филамент с одним плюс-концом и одним минус-концом может быть разбит на десятки коротких, каждый из которых также будет иметь по одному плюс- и минус-концу. В определенных внутриклеточных условиях такие новообразованные концы будут служить зародышами для удлинения филаментов, и в этом случае расщепление ускоряет сборку новых филаментных структур. В других условиях расщепление способствует деполимеризации старых филаментов, ускоряя этот процесс в десять и более раз. Более того, расщепление изменяет физические и механические свойства цитоплазмы: при разрушении филаментов плотные крупные пучки и гели становятся более текучими.

Для расщепления микротрубочки должно быть разрушено тринадцать продольных связей, по одной для каждого протофиламента. Белок *катанин*, названный в честь японского слова «меч», служит для выполнения этой задачи (**рис. 16.39**). Катанин состоит из двух субъединиц: более маленькой, гидролизующей АТР и про-

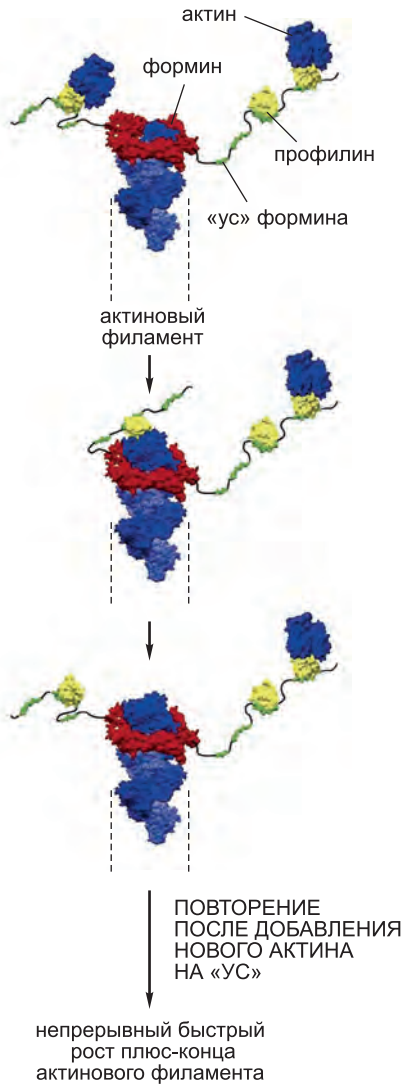


Рис. 16.38. Профилин и формины. Некоторые представители белкового семейства форминных содержат неструктурированные домены или «усы», несущие несколько сайтов связывания профилина или комплекса профилин-актин. Эти гибкие домены служат плацдармом для присоединения актина к растущему плюс-концу актинового филамента. В некоторых условиях это может увеличить скорость удлинения актиновых филаментов таким образом, что рост происходит быстрее, чем в случае диффузионно-контролируемой реакции, и быстрее в присутствии формина и профилина, чем в случае чистого актина (см. также рис. 3.80, в).

изводящей расщепление, и более крупной, направляющей катанин в центросому. Катанин высвобождает микротрубочки из центра организации микротрубочек, что, по-видимому, играет важную роль в быстрой их деполимеризации, наблюдаемой на полюсах веретена деления во время митоза и мейоза. Возможно, катанин также участвует в высвобождении и деполимеризации микротрубочек в пролиферирующих клетках в интерфазе и в постмитотических клетках, например нейронах.

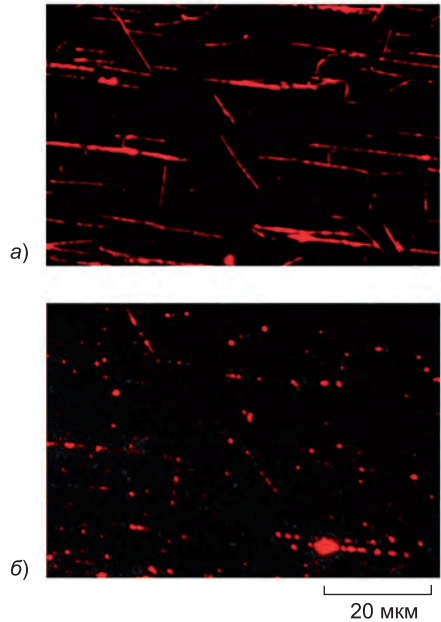
В отличие от расщепления микротрубочек катанином, требующего АТФ, расщепление актиновых филаментов происходит без дополнительных источников энергии. Большинство актин-расщепляющих белков принадлежит *суперсемейству гельзолина*, представители которого активируются высокой концентрацией цитоплазматического Ca^{2+} . Гельзолин несет субдомены, связывающие два различных сайта на субъединице актина, один из которых располагается на поверхности филамента, а другой обычно скрыт в продольной связи между

субъединицами протофиламента. Согласно одной из моделей гельзолинового расщепления гельзолин связывается с актиновым филаментом и ждет, пока тепловые флуктуации не создадут небольшую щель между соседними субъединицами протофиламента, после чего белок встраивает свой субдомен в щель, расщепляя филамент.

16.2.7. Белки, связывающиеся вдоль филаментов, могут их либо стабилизировать, либо дестабилизировать

После образования филамента путем нуклеации и удлинения за счет присоединения субъединиц, набор белков, связывающихся вдоль филамента, может изменить его стабильность и механические свойства. Различные ассоциированные с филаментами белки используют энергию связывания для увеличения или уменьшения свободной

Рис. 16.39. Расщепление микротрубочек катанином. Стабилизированные таксолем и окрашенные родамином микротрубочки абсорбировали на поверхности стеклянной подложки, после чего к ним добавили очищенный катанин и АТФ. (а) Через 30 секунд после добавления катанина можно видеть несколько разрывов в микротрубочках. (б) То же поле зрения через 3 минуты после добавления катанина. Филаменты были расщеплены по множеству сайтов, и теперь на месте длинных микротрубочек остались только короткие фрагменты. (Из J.J. Hartman et al., *Cell* 93: 277–287, 1998. С любезного разрешения издательства Elsevier.)



энергии полимера и, следовательно, дестабилизируют или стабилизируют полимер.

Белки, связывающиеся вдоль микротрубочек, носят общее название **ассоциированных с микротрубочками белков** (*Microtubule-associated Proteins, MAP*). Как и токсин таксол, MAP могут стабилизировать микротрубочки и препятствовать их разборке. Некоторые MAP также способны опосредовать взаимодействие микротрубочек с другими компонентами клетки. Таких белков много в нейронах, где стабилизированные пучки микротрубочек образуют выходящую из тела клетки сердцевину аксонов и дендритов (**рис. 16.40**). Эти MAP несут по крайней мере один домен, связывающий поверхность микротрубочек, и один домен, выступающий наружу. Исследования генетически модифицированных клеток, синтезирующих избыток MAP, показали, что длина выступающего домена определяет, насколько плотно упаковываются покрытые MAP микротрубочки. При сверхэкспрессии белка *MAP2*, несущего длинный выступающий домен, образуются пучки стабильных микротрубочек, расположенных на относительно большом расстоянии друг друга. С другой стороны, при сверхэкспрессии *tau*-белка, белка MAP с более коротким выступающим доменом, образуются пучки близкорасположенных микротрубочек (**рис. 16.41**). Связывающийся с микро-

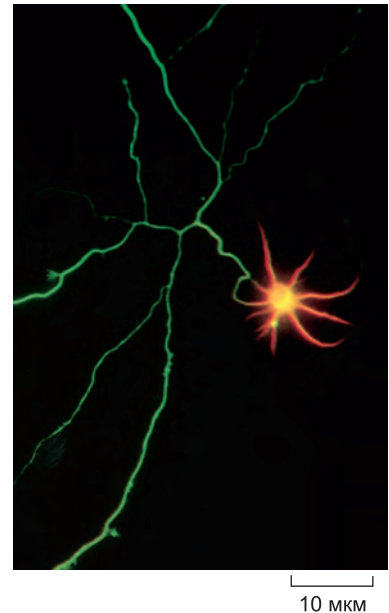


Рис. 16.40. Локализация MAP в аксонах и дендритах нейрона. На данной иммунофлуоресцентной микрофотографии показано распределение *tau*-белка (зеленый) и MAP2 (оранжевый) в гиппокампальном нейроне в культуре. Если окрашивание *tau*-белка обнаружено только в аксоне (у данного нейрона длинном и разветвленном), то окрашивание MAP2 найдено только в теле клетки и в дендритах. Использованное здесь для обнаружения *tau*-белка антитело связывает только нефосфорилированный *tau*; фосфорилированный *tau*-белок также присутствует в дендритах. (С любезного разрешения James W. Mandell и Gary A. Banker.)

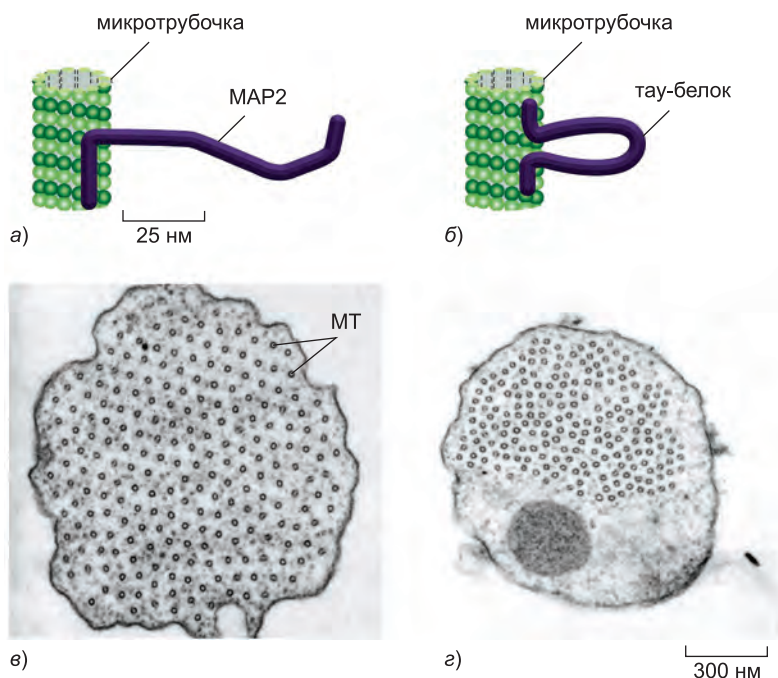


Рис. 16.41. Влияние MAP на пучки микротрубочек. (а) MAP2 одним концом связывается вдоль решетки микротрубочки. На другом конце MAP2 расположен второй связывающий микротрубочки домен, отделенный от первого длинным «плечом». (б) Тау-белок связывает микротрубочки одновременно своими N- и C-концами, образуя короткую выступающую петлю. (в) Электронная микрофотография поперечного среза пучка микротрубочек в клетке, сверхэкспрессирующей MAP2. Регулярная упаковка микротрубочек (MT) является результатом постоянной длины выступающих «плечей» белка MAP2. (г) Сходный поперечный срез пучка микротрубочек в клетке, сверхэкспрессирующей тау-белок. Здесь микротрубочки расположены ближе друг к другу, чем на (в), поскольку у тау-белка выступающий участок относительно невелик. (в и г, из V. Chen et al., *Nature* 360: 674–647, 1992. С любезного разрешения Macmillan Publishers Ltd.)

трубочками тау-белок также способен регулировать зависимый от молекулярных моторов транспорт мембранных органелл (мы обсудим этот вопрос позже).

MAP служат мишенями для нескольких протеинкиназ, и их фосфорилирование играет ключевую роль в регуляции их активности и внутриклеточной локализации. Одними из наиболее важных протеинкиназ, регулирующих MAP, являются киназы, включающиеся и выключающиеся по мере прохождения клеткой клеточного цикла (см. главу 17). В частности, активность MAP регулирует изменение динамики микротрубочек, происходящее во время перестройки микротрубочкового цитоскелета клетки при образовании митотического веретена деления перед расхождением хромосом (см. рис. 16.2).

Помимо связывания по длине микротрубочек, при достаточно высокой концентрации тау-белок образует собственные спиральные филаменты. Цитоплазма нервных клеток мозга людей с болезнью Альцгеймера содержит крупные агрегаты тау-филаментов, носящие название нейрофибриллярных клубков. Неясно, являются ли эти скопления тау-белка причиной или следствием связанной с заболеванием нейродегенерации.

Актиновые филаменты также регулируются связыванием дополнительных белков. В большинстве клеток определенные актиновые филаменты стабилизируются за счет связывания *тропомиозина*, длинного белка, скрепляющего семь соседних актиновых субъединиц протофиламента. Связывание тропомиозина вдоль актинового филамента способно предотвратить его взаимодействие с другими белками; по этой причине регуляция связывания тропомиозина является важным этапом сокращения мышцы (см. рис. 16.78).

Другим важным белком, связывающим актиновые филаменты и присутствующим во всех эукариотических клетках, является *кофилин*. Кофилин, также называемый *фактором деполимеризации актина*, дестабилизирует филаменты и связывается с актином как в филаменте, так и в свободной форме. Связывание кофилина с филаментом приводит к более плотному закручиванию филамента (рис. 16.42). Возникающее механическое напряжение ослабляет контакты между актиновыми субъединицами и делает филамент более хрупким, в результате чего он легче разрушается под действием теплового движения. Более того, связывание кофилина облегчает диссоциацию ADP-актиновой субъединицы с минус-конца филамента, что также ускоряет разборку актиновых филаментов. В результате большинство актиновых филаментов в живых клетках имеют меньшее время жизни, чем филаменты, образованные из чистого актина в пробирке. Связывание тропомиозина защищает актиновые филаменты от действия кофилина.

Кофилин предпочтительнее связывается с ADP-содержащими филаментами, чем с АТФ-содержащими. Поскольку гидролиз АТФ обычно протекает медленнее, чем сборка филаментов, самые новые филаменты в клетке содержат АТФ и устойчивы к кофилиновой деполимеризации. Таким образом, кофилин эффективно разрушает старые филаменты, обеспечивая быстрый круговорот актина. Как мы обсудим далее, кофилин-опосредованная разборка старых, а не новых актиновых филаментов играет ключевую роль в полярном направленном росте актиновой сети при однонаправленном движении клеток.

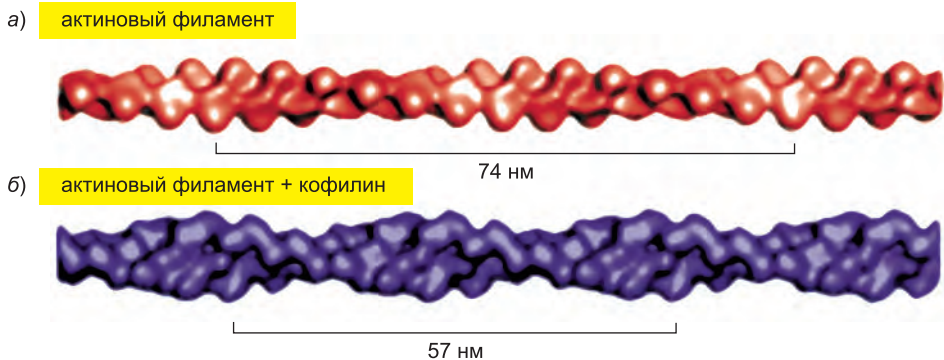


Рис. 16.42. Вызванное кофилином закручивание актиновых филаментов. (а) Трехмерная реконструкция криоэлектронных микрофотографий филаментов, состоящих исключительно из актина. Показана длина двух витков актиновой спирали. (б) Реконструкция покрытого кофилином актинового филамента. Кофилин связывается с актиновыми субъединицами в филаменте в соотношении 1 : 1. По сравнению с актином (43 кДа) кофилин — это маленький белок (14 кДа), поэтому филамент кажется не намного толще. Энергия связывания кофилина используется для деформации решетки актинового филамента и уменьшения длины витков спирали. (Из А. McGough et al., *J. Cell Biol.* 138: 771–781, 1997. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

16.2.8. Белки, взаимодействующие с концами филаментов, способны значительно влиять на их динамику

Как мы только что видели, белки, связывающиеся вдоль филаментов, способны изменять их динамическое поведение. Однако для достижения максимального эффекта зачастую эти белки должны полностью покрывать филамент, т.е. они должны содержаться в довольно высокой стехиометрии (например, около одного тропомиозина на семь актиновых субъединиц, один тау-белок на четыре тубулиновые субъединицы или по одному кофилину на каждую актиновую субъединицу). С другой стороны, белки, связывающие в основном концы филаментов, способны значительно изменять динамику филаментов, присутствуя даже в низких концентрациях. Поскольку добавление и потеря субъединиц происходят преимущественно на концах филаментов, одной молекулы такого белка на актиновый филамент (обычно одна на примерно 200–500 актиновых мономеров) бывает достаточно для изменения архитектуры сети актиновых филаментов.

Как указано выше, актиновые филаменты, рост которых остановился и которые специфически не стабилизированы, могут быстро деполимеризоваться: они могут терять субъединицы как с минус-, так и с плюс-концов, если молекулы актина на конце гидролизуют свой АТФ и перешли в D-форму. Однако самые быстрые изменения происходят на плюс-конце. Связывание с ним *кэпирующего белка* стабилизирует и инактивирует плюс-конец, что значительно снижает скорости роста и деполимеризации филамента (**рис. 16.43**). В самом деле, большинство актиновых филаментов в клетке на плюс-конце несут кэпирующие белки, например *CapZ* (названный так потому, что он содержится в мышечных Z-дисках, смотри ниже; также его называют кэпирующим белком). На минус-конце актиновый филамент может

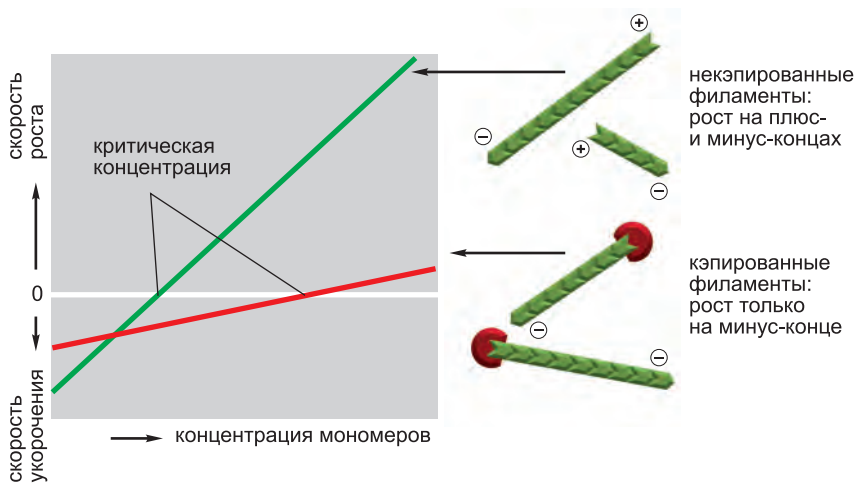


Рис. 16.43. Кэпирование филаментов и его влияние на филаментную динамику. Некэпированные филаменты теряют и присоединяют субъединицы как на минус-, так и на плюс-конце, что приводит к быстрому укорочению или росту, в зависимости от концентрации свободных мономеров (зеленая линия). В присутствии белка, кэпирующего плюс-конец (красная линия), только минус-конец способен присоединять или терять субъединицы; в результате рост филаментов при любой концентрации мономеров, превышающей критическую, будет замедлен; при этом укорочение при любой меньшей, чем критическая, концентрации мономеров также будет протекать медленнее. Более того, критическая концентрация приближается к критической концентрации для минус-конца.

быть экпирован за счет сохранения связи с комплексом ARP, отвечавшим за его нуклеацию. Однако возможно, что в типичных клетках минус-концы филаментов отходят от комплексов ARP и становятся свободными.

В мышечных клетках, где актиновые филаменты особенно долго живут, филаменты экпируются с обоих концов: на плюс-конце — белком CapZ, а на минус-конце — *тропомодулином*. Тропомодулин связывает минус-концы только тех актиновых филаментов, которые уже покрыты тропомиозином и, следовательно, уже в некоторой степени стабилизированы.

16.2.9. Различные типы белков изменяют свойства быстрорастущих концов микротрубочек

Конец микротрубочки с тринадцатью протофиламентами, образующими кольцо (см. рис. 16.11), представляет собой более крупную и сложную структуру, чем конец актинового филамента, и предоставляет больше возможностей для действия дополнительных белков. Мы уже обсудили важный экпирующий белок микротрубочек — кольцевой комплекс γ -тубулина (γ -TuRC), который обеспечивает нуклеацию роста микротрубочек в центре организации и экпирует их минус-концы. Другим истинным экпирующим белком микротрубочек является специальный белковый комплекс, располагающийся на концах микротрубочек в ресничках (см. ниже), где они стабильны и равны по длине.

Некоторые белки, действующие на концы микротрубочек, выполняют функции за пределами простого экпирования. В частности, они могут значительно влиять на динамическую нестабильность микротрубочек (см. рис. 16.16). Они могут изменять скорость перехода микротрубочек от роста к укорочению (частоту катастроф) или от укорочения к росту (частоту спасений). Например, семейство родственных кинезину белков, известных как *катастрофины* (*факторы катастроф*), значительно увеличивают частоту катастроф (эти белки — представители семейства кинезина-13; см. рис. 16.58). Они специфически связываются с концами микротрубочек и, по-видимому, растаскивают протофиламенты. Это приводит к снижению нормального активационного барьера энергии, не позволяющего микротрубочкам отходить друг от друга и образовывать извитые структуры, характерные для укорачивающегося состояния (см. рис. 16.16, в). Им противодействуют белки MAP, например широко распространенный *ХМАР215*, близкие гомологи которого встречаются в разнообразных организмах — от дрожжей до человека (ХМАР — это аббревиатура *Xenopus microtubule-associated protein* — ассоциированного с микротрубочками белка из *Xenopus*, а число соответствует молекулярной массе белка в кДа). ХМАР215 обладает способностью стабилизировать свободные концы микротрубочек и ингибировать их переход из растущего состояния в укорачивающееся. Фосфорилирование ХМАР215 во время митоза ингибирует его активность и смещает равновесие в пользу его белков-конкурентов — катастрофинов (рис. 16.44). В результате динамическая нестабильность микротрубочек при митозе возрастает на порядок, что необходимо для образования веретена деления (см. рис. 17.33).

Во многих клетках минус-концы микротрубочек стабилизированы за счет связывания с центросомой, а в свободном состоянии служат сайтами деполимеризации. Плюс-концы, с другой стороны, эффективно исследуют пространство клетки. Ассоциированные с микротрубочками белки, носящие название *белков плюс-концов микротрубочек* (*Plus-end Tracking Proteins, +TIP*), накапливаются на таких

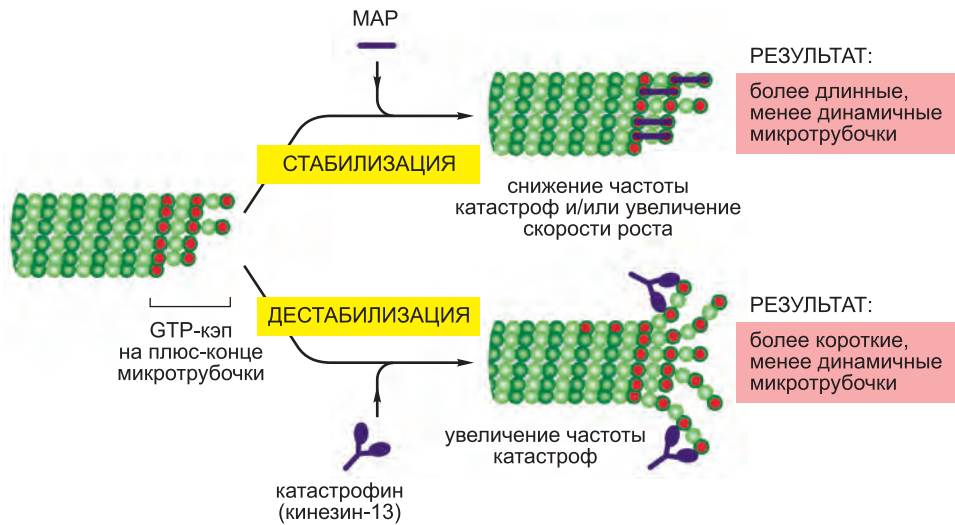


Рис. 16.44. Действие белков, связывающих концы микротрубочек. В клетке переходы между ростом и укорочением микротрубочек осуществляются специальными белками. Например, МАР-белок ХМАР215 стабилизирует конец растущей микротрубочки за счет своего сродства к нему. Противоположное действие оказывают катастрофины, например кинезин-13, представитель суперсемейства двигательных белков кинезинов (см. ниже).

активных концах и путешествуют по клетке на быстрорастущих микротрубочках, диссоциируя от них, когда микротрубочки начинают укорачиваться (**рис. 16.45**).

Некоторые +TIP, например, упомянутые выше родственные кинезину катастрофины и ХМАР215, регулируют рост и укорочение концов связанных с ними микротрубочек. Другие контролируют расположение микротрубочек за счет захвата и стабилизации растущего конца микротрубочки в месте локализации специфических белков-мишеней клеточного кортекса. Например, EB1, белок +TIP, присутствующий как у дрожжей, так и у людей, необходим для правильного расположения дрожжевого митотического веретена деления. Он направляет растущие плюс-концы микротрубочек в определенную область докинга в дрожжевой почке и заякоривает их там.

16.2.10. В клетках филаменты объединяются в структуры более высокого порядка

До сих пор мы описывали, как клетки используют дополнительные белки для регуляции локализации и динамического поведения цитоскелетных филаментов. Эти белки могут нуклеировать сборку филаментов, связываться с концами или вдоль филаментов или взаимодействовать со свободными субъединицами. Но для того чтобы цитоскелетные филаменты формировали внутриклеточный каркас, придающий клетке механическую целостность и форму, отдельные филаменты должны объединяться и прикрепляться друг к другу с образованием структур более высокого порядка. Центросома — это один пример таких цитоскелетных структур; помимо нуклеации роста микротрубочек, она удерживает их в строго определенной геометрии: минус-концы прикреплены к центросоме, а плюс-концы направлены

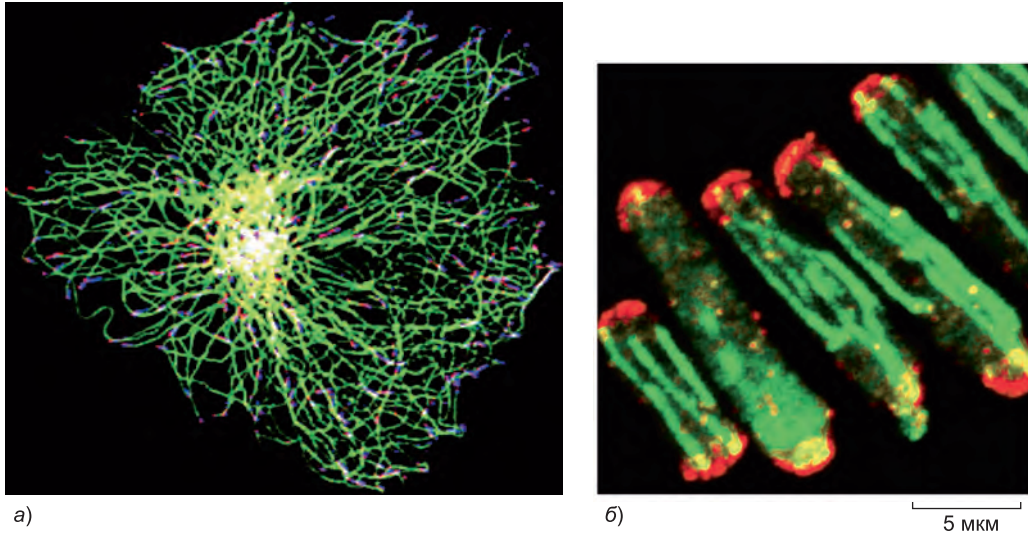


Рис. 16.45. Белки +TIP, обнаруживаемые на плюс-концах микротрубочек. (а) В растущей в культуре ткани эпителиальной клетки у каждой микротрубочки (зеленые) на удлиняющемся плюс-конце располагается +TIP-белок EB1 (красный). (б) В палочковидных делящихся дрожжах *Schizosaccharomyces pombe* плюс-концы микротрубочек (зеленые) связаны с гомологом EB1 (красный) в полюсах клетки. (а, из A. Akhmanova and C. C. Hoogenraad, *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 47–54, 2005. С любезного разрешения издательства Elsevier; б, с любезного разрешения Ken Sawin.)

в цитозоль. Таким образом, centrosома обеспечивает астральную структуру микротрубочек, способную найти центр клетки (см. рис. 16.32).

Другим механизмом объединения филаментов в более крупные структуры является их поперечная сшивка. Как описывалось ранее, некоторые MAP могут связывать микротрубочки в пучки: они несут два домена — один связывается сбоку микротрубочки, а второй направлен наружу и контактирует с другими покрытыми MAP микротрубочками. В актиновом цитоскелете стабилизация и поперечная сшивка выполняются разными белками. Тропомиозин связывается вдоль актиновых филаментов, но у него отсутствует выступающий домен. Как мы вскоре увидим, поперечная сшивка филаментов опосредуется второй группой актин-связывающих белков, выполняющих одну эту функцию. Промежуточные филаменты объединяются за счет латеральной самосборки волокон и поперечных сшивок дополнительными белками.

16.2.11. Для образования прочных структур промежуточные филаменты поперечно сшиваются и формируют пучки

Отдельные промежуточные филаменты образуются как длинный пучок тетрамерных субъединиц (см. рис. 16.19). Многие промежуточные филаменты затем связываются друг с другом; например, нейрофиламентные белки NF-M и NF-H (см. таблицу 16.1, **стр. 985**) несут С-концевой домен, выступающий с поверхности собранного промежуточного филамента и связывающий соседний филамент. Таким образом, группы нейрофиламентов образуют жесткие параллельные структуры, удерживаемые многочисленными латеральными контактами и придающие длинным отросткам нервных клеток прочность и устойчивость (см. рис. 16.22).

Другие типы пучков промежуточных филаментов удерживаются дополнительными белками, например, *филаггрином*, который связывает кератиновые филаменты в дифференцирующихся клетках эпидермиса для придания внешним слоям кожи характерной прочности. Особенно интересен белок поперечных сшивок *плектин*. Помимо связывания промежуточных филаментов в пучки, он присоединяет их к микротрубочкам, пучкам актиновых филаментов и волокнам двигательного белка миозина II (см. ниже), а также способствует прикреплению пучков промежуточных филаментов к адгезионным структурам плазматической мембраны (**рис. 16.46**).

Мутации гена плектина приводят к тяжелому заболеванию человека, объединяющему в себе буллезный эпидермолиз (вызываемый дефектами кератиновых филаментов кожи), мышечную дистрофию (вызываемую нарушением десминовых филаментов) и нейродегенерацию (вызываемую нарушением нейрофиламентов). Мыши, у которых отсутствует функциональный ген плектина, погибают через несколько дней после рождения. У них наблюдается покрытая волдырями кожа и патологическое развитие сердечной и скелетных мышц. Таким образом, несмотря на то что для начального формирования и сборки промежуточных филаментов плектин не нужен, опосредуемая им поперечная сшивка филаментов необходима для придания клеткам жесткости, требующейся для противостояния механическим аспектам позвоночной жизни.

16.2.12. Сшивающие белки с особыми свойствами приводят к различной сборке актиновых филаментов

Актиновые филаменты в животных клетках образуют два типа структур: пучки и гелеподобные сети (**рис. 16.47**). Как описано ранее, эти структуры инициируются различными нуклеирующими белками: длинные прямые филаменты, образуемые форминами, объединяются в пучки, а комплекс ARP создает сети. Белки поперечной сшивки актиновых филаментов, способствующие стабилизации и поддержанию этих структур, делятся на два класса: *белки, образующие пучки*, и *гелеобразующие белки*. Первые поперечно сшивают актиновые филаменты в параллельную структуру, а вторые удерживают два актиновых филамента под углом

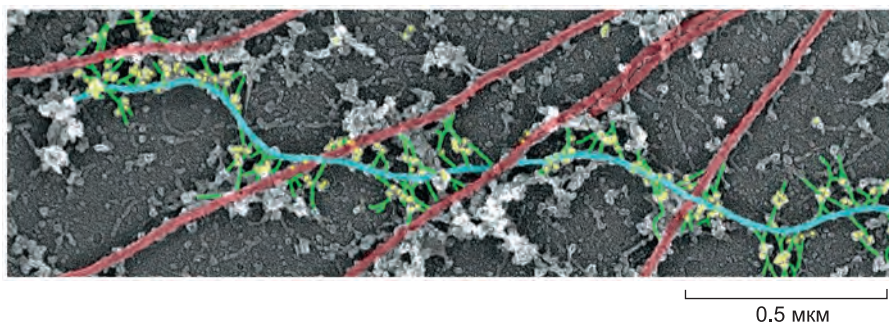


Рис. 16.46. Поперечная сшивка различных цитоскелетных филаментов плектином. Здесь плектин (зеленый) соединяет промежуточные филаменты (голубые) и микротрубочки (красные). На данной электронной микрофотографии точки (желтые) — это золотые частицы, связанные с антителами к плектину. Чтобы эти белки были видны, сеть актиновых филаментов полностью удалили. (Из Т. М. Svitkina and G. G. Borisy, *J. Cell Biol.* 135: 991–1007, 1996. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

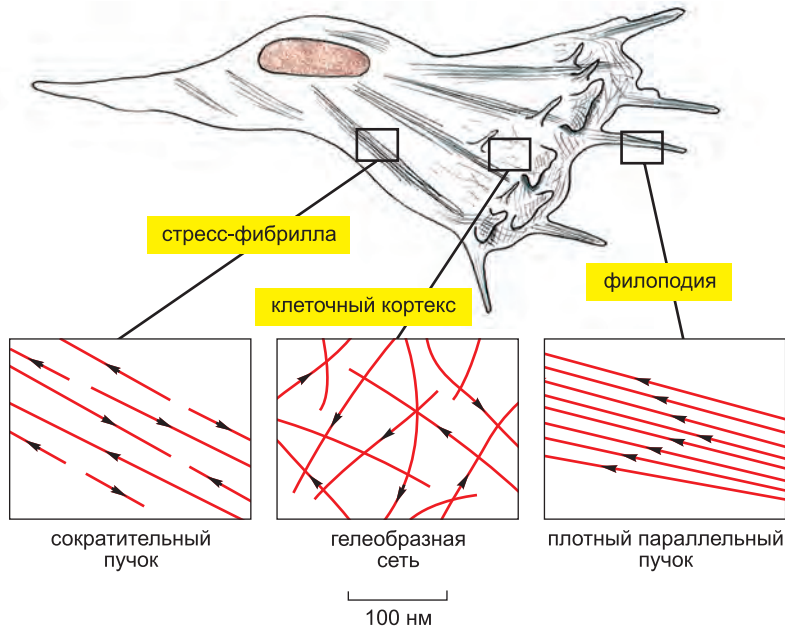


Рис. 16.47. Актиновые структуры клетки. На примере ползущего по чашке Петри фибробласта показаны три области с разной упаковкой актиновых филаментов. Актиновые филаменты показаны *красным*, стрелки указывают в сторону минус-конца. Стресс-фибриллы способны сокращаться и прилагать силу. Филоподии — это заостренные выросты плазматической мембраны, позволяющие клетке исследовать окружающую среду. Кортекс подстилает плазматическую мембрану.

по отношению друг к другу, формируя более свободную сеть. Оба типа сшивающих белков обычно несут два одинаковых сайта связывания актиновых филаментов, которые могут быть частями единой полипептидной цепи или принадлежать разным цепям, удерживаемым вместе в димере (рис. 16.48). Расстояние между этими сайтами и их локализация определяют тип актиновой структуры, образованной данным сшивающим белком.

Различные типы образующих пучки белков также определяют, какие еще молекулы могут взаимодействовать с актиновым филаментом. Миозин II (см. ниже) — это двигательный белок стресс-фибрилл и других сократительных структур, обеспечивающий их сокращение. Очень плотная упаковка актиновых филаментов, опосредуемая небольшим мономерным белком *фимбрином*, по-видимому, исключает миозин, и поэтому образованные им параллельные актиновые пучки не сокращаются; с другой стороны, более свободная упаковка, обеспечиваемая более крупным димерным белком *α -актинином*, позволяет встраиваться молекулам миозина, делая стресс-фибриллы сократительными (рис. 16.49). Благодаря различным расстояниям между актиновыми филаментами, пучки, образованные фимбрином, автоматически исключают взаимодействие α -актинина с филаментами, и наоборот. Таким образом, два типа образующих пучки белков взаимно исключают друг друга.

Виллин также способствует образованию пучков актиновых филаментов и, как и фимбрин, несет в своей полипептидной цепи два близкорасположенных сайта связывания филаментов. Виллин (вместе с фимбрином) способствует поперечной сшивке от 20 до 30 актиновых филаментов микроворсинок — похожих на пальцы

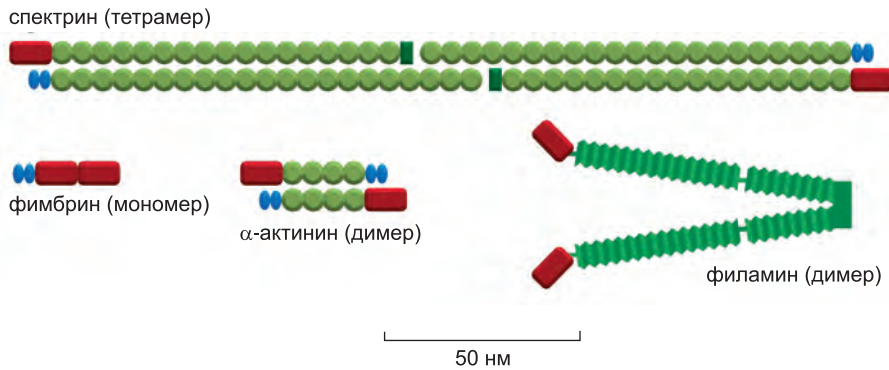


Рис. 16.48. Модульные структуры четырех сшивающих актин белков. Все показанные белки несут по два сходных по последовательности сайта связывания с актиновыми филаментами (красные). Фимбрин несет два напрямую взаимодействующих сайта, поэтому он удерживает одинаково поляризованные актиновые филаменты (см. рис. 16.49, а) очень близко друг к другу (на расстоянии 14 нм). Сайты связывания α -актинина разделены спейсерным участком длиной около 30 нм, поэтому он образует более свободные пучки (см. рис. 16.49, а). Филамин несет два филамент-связывающих сайта, соединенных V-образным спейсером, поэтому он объединяет актиновые филаменты в сети, в которых филаменты располагаются почти под прямым углом друг к другу (см. рис. 16.51). Спектрин — это тетрамер, состоящий из двух α - и двух β -субъединиц и несущий два сайта связывания филаментов на расстоянии около 200 нм друг от друга (см. рис. 10.41).

выростов плазматической мембраны на поверхности многих эпителиальных клеток (рис. 16.50). Например, единственная всасывающая эпителиальная клетка тонкого кишечника человека несет на апикальной поверхности несколько тысяч микроворсинок. Их ширина составляет около 0,08 мкм, а длина — около 1 мкм, что увеличивает площадь всасывающей поверхности клетки примерно в 20 раз. При введении виллина в культуру фибробластов, которые в норме его не содержат и несут лишь несколько небольших микроворсинок, существующие микроворсинки значительно удлиняются и стабилизируются, а также появляются новые. Состоящая из актиновых филаментов сердцевина микроворсинок прикрепляется к плазматической мембране посредством латеральных сшивок, образованных *миозином I* (см. ниже), который на одном конце несет сайт связывания филаментного актина, а на другом — сайт связывания липидов. По-видимому, этих двух типов сшивающих белков, один из которых связывает актиновые филаменты друг с другом, а второй прикрепляет эти филаменты к мембране, достаточно для образования в клетке микроворсинок. У мышей, у которых нарушен ген виллина, формируются морфологически нормальные кишечные микроворсинки, т.е. функция виллина выполняется другими белками. Однако перестройка кишечных микроворсинок в ответ на стресс или голодание у таких мышей нарушена.

16.2.13. Филамин и спектрин образуют сети актиновых филаментов

У описанных выше образующих пучки белков домены связывания актиновых филаментов соединены прямыми, жесткими спейсерными участками, и они объединяют филаменты в параллельные структуры. С другой стороны, сшивающие актин белки, обладающие гибкими или жесткими, но изогнутыми спейсерами между филамент-связывающими доменами, образуют актиновые сети или гели, но не пучки.

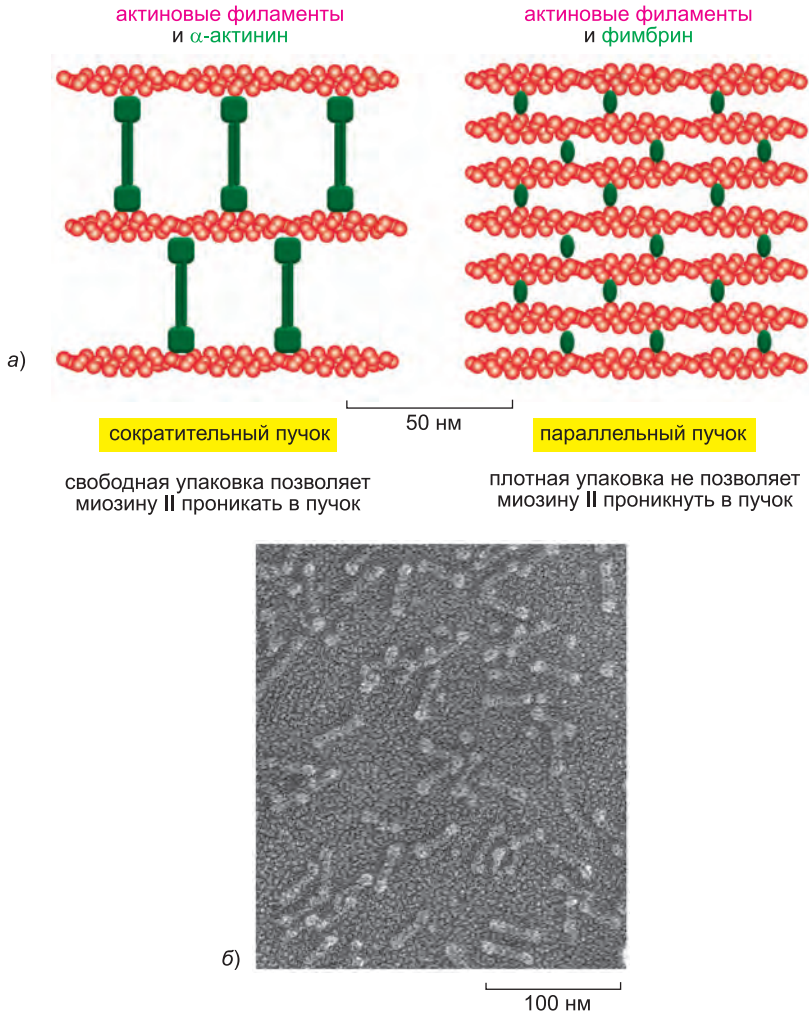


Рис. 16.49. Образование двух типов пучков актиновых филаментов. (а) α -актинин, представляющий собой гомодимер, сшивает актиновые филаменты в свободные пучки, позволяющие двигателю белку миозину II (не показан) участвовать в сборке. Фимбрин объединяет актиновые филаменты в плотные пучки, исключая миозин. За счет различного расстояния между филаментами в пучке фимбрин и α -актинин исключают друг друга. (б) Электронная микрофотография очищенных молекул α -актина. (б, с любезного разрешения John Heuser.)

Любой сшивающий белок, у которого актин-связывающие домены соединены длинным изогнутым мостиком, способен образовывать трехмерные актиновые гели. *Филамин* (см. рис. 16.48) способствует образованию свободных и очень вязких гелей, соединяя актиновые филаменты почти под прямым углом (**рис. 16.51**). Актиновые гели необходимы клеткам для образования тонких и плоских мембранных выростов — *ламеллоподий*, которые позволяют им ползать по твердым поверхностям. В некоторых раковых клетках, особенно в злокачественных меланомах (раках пигментных клеток), филамин отсутствует. Эти клетки не способны нормально

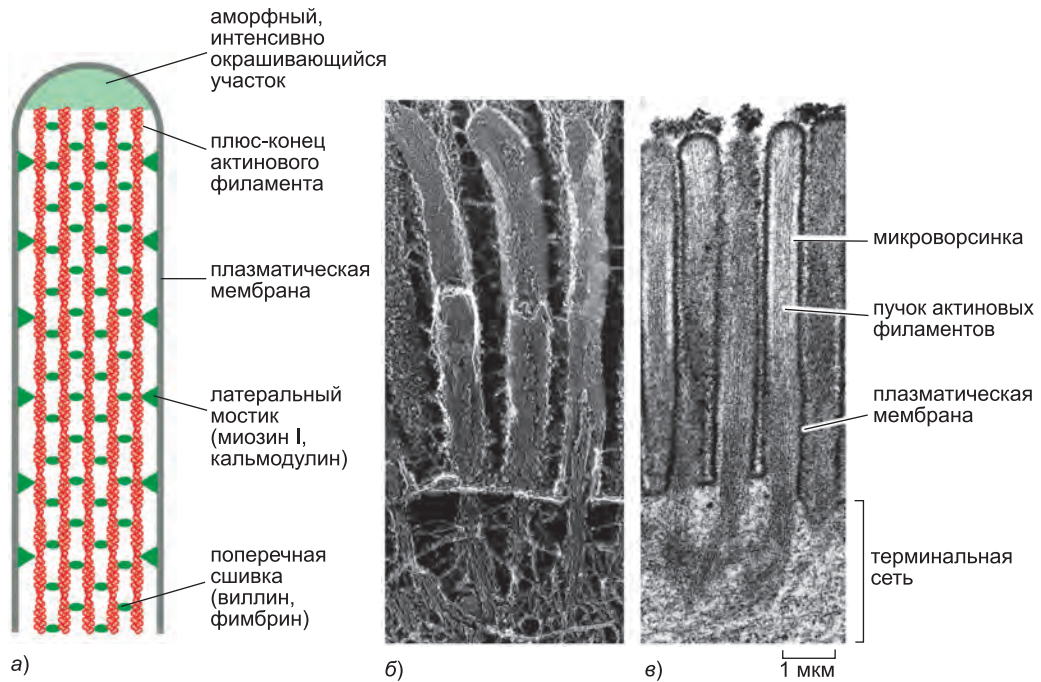


Рис. 16.50. Микроворсинка. (а) Пучок параллельных актиновых филаментов, поперечно сшитых белками виллином и фимбрином, образует сердцевину микроворсинки. Латеральные мостики (состоящие из миозина I и Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина) соединяют боковую поверхность актиновых филаментов с окружающей пучок плазматической мембраной. Плюс-концы филаментов расположены в кончике микроворсинки, где они погружены в аморфное, интенсивно окрашивающееся вещество неизвестного состава. (б) Полученная методом замораживания-скальвания электронная микрофотография апикальной поверхности эпителиальных клеток кишечника и микроворсинок. Актиновые пучки микроворсинки продолжают в клетку, где они встроены в терминальную сеть и связаны друг с другом посредством нескольких белков, включая спектрин и миозин II. Под терминальной сетью лежит слой промежуточных филаментов. (в) Электронная микрофотография тонкого среза микроворсинок. (б, с любезного разрешения John Heuser; в, из P. T. Matsudaira and D. R. Burgess, *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 46: 845–854, 1985. С любезного разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press.)

передвигаться, и поэтому они образуют неупорядоченные мембранные пузырьки (рис. 16.52). Потеря филамина — это плохо для клеток меланомы, но хорошо для пациента; благодаря неспособности клеток ползать, неэкспрессирующие филамин клетки меланомы менее инвазивны, чем те же клетки, сохранившие синтез филамина, что в результате снижает вероятность метастазирования.

Другим хорошо изученным гелеобразующим белком является *спектрин*, который впервые обнаружен в эритроцитах. Спектрин — это длинный, гибкий белок, состоящий из четырех удлиненных полипептидных цепей (двух α -субъединиц и двух β -субъединиц), расположенных таким образом, что сайты связывания актиновых филаментов разнесены на расстояние около 200 нм (для фимбрина это расстояние составляет 14 нм, для α -актинина — около 30 нм, см. рис. 16.48). В эритроцитах спектрин концентрируется под плазматической мембраной, где он образует двухмерную сеть, удерживаемую короткими актиновыми филаментами. Спектрин несет

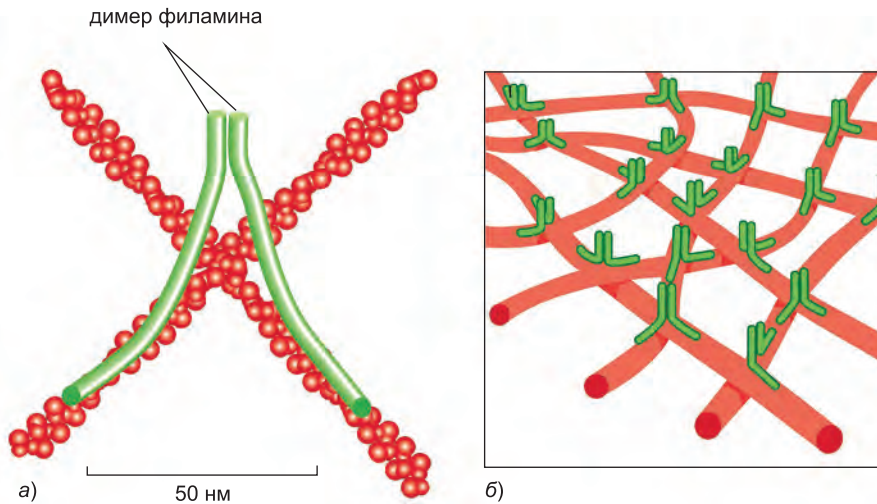


Рис. 16.51. Филамин сшивает актиновые филаменты в трехмерную сеть, обладающую физическими свойствами геля. (а) Длина гомодимера филамина составляет около 160 нм. Гомодимер образует гибкую связь между расположенными почти под прямым углом актиновыми филаментами. (б) Набор актиновых филаментов, сшитых филамином, образует механически прочную сеть или гель.

сайты связывания периферических мембранных белков, располагающихся вблизи плазматической мембраны за счет связи с интегральными белками (см. рис. 10.41), и связывает актиновую сеть с липидным бислоем. Образующаяся структура создает жесткий клеточный кортекс, механически поддерживающий надлежащую плазматическую мембрану. Благодаря этому кортексу эритроциты способны восстанавливать свою исходную форму после прохождения через узкие капилляры. Близкие родственники спектрина содержатся в кортексе почти всех типов эукариотических клеток, где они также придают форму и жесткость поверхностной мембране.

16.2.14. Элементы цитоскелета образуют множество связей с мембраной

Актиновые цитоскелетные структуры изменяют форму плазматической мембраны и делают ее более жесткой. Мы уже рассмотрели два примера: спектрин-актиновую сеть, подстилающую плазматические мембраны, и виллин-актиновые пучки микроворсинок, увеличивающие площадь поверхности всасывания эпителиальных клеток. Чтобы эти структуры были эффективны, необходимы специфические связи между сетью актиновых филаментов и белками или липидами плазматической мембраны.

Связи между кортикальным актиновым цитоскелетом и плазматической мембраной понятны не до конца. Распространенное семейство близкородственных внутриклеточных белков — семейство *ERM* (названное в честь первых трех его представителей — эзрина, радиксина и моезина) — включает в себя белки, необходимые для поддержания полярности клеток и участвующие в экзоцитозе и эндоцитозе. С-концевой домен белка *ERM* напрямую связывается с боковой поверхностью актиновых филаментов. N-концевой домен связывается с цитоплазматической поверхностью одного или нескольких гликопротеинов, например, с CD44, рецептором компонента внеклеточного матрикса гиалуроновой кислоты.

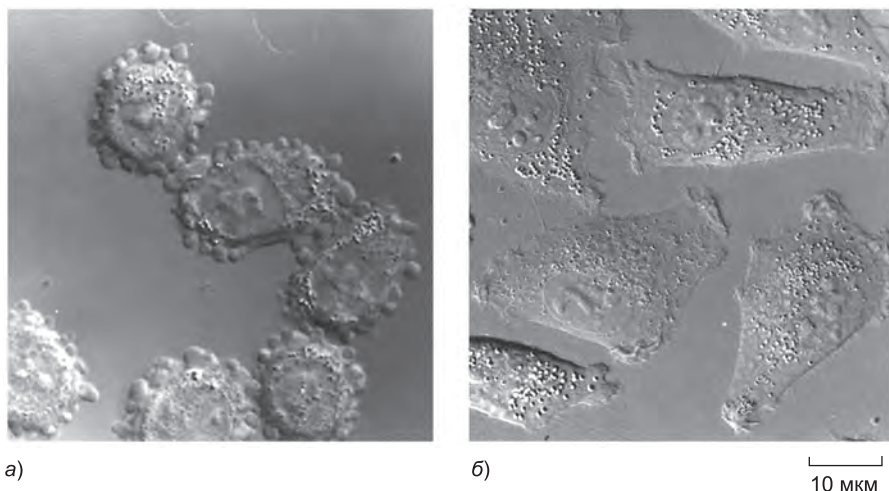


Рис. 16.52. Потеря филамина приводит к неправильной подвижности клеток. (а) Группа клеток меланомы с патологически пониженным содержанием филамина. Эти клетки не способны образовывать нормальные ламеллоподии и покрыты мембранными «пузырьками». В результате они малоподвижны и почти не метастазируют. (б) Те же клетки меланомы, в которых искусственно восстановили экспрессию филамина. Клетки теперь образуют нормальные ламеллоподии и способны метастазировать. Это один из многочисленных примеров того, как присутствие или отсутствие одного структурного белка резко изменяет морфологию и подвижность клеток. (Из C. Cunningham et al., *J. Cell Biol.* 136: 845–857, 1997. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

Опосредуемые белками ERM связи между актином и плазматической мембраной регулируются внутриклеточными и внеклеточными сигналами. Белки ERM могут существовать в двух конформациях: активной расправленной конформации, олигомеризующейся и связывающей актин и трансмембранный белок, и неактивной свернутой конформации, в которой N- и C-концы удерживаются вместе за счет внутримолекулярных взаимодействий. Переключение в активную конформацию может быть инициировано фосфорилированием белка или связыванием с PIP_2 . Оба этих события могут произойти, например, в ответ на внеклеточные сигналы (белки ERM являются мишенями нескольких протеинкиназ). Таким образом, свойства клеточного кортекса становятся зависимыми от разнообразных приходящих в клетку сигналов (**рис. 16.53**).

Потеря одного из представителей семейства ERM, носящего название мерлина, приводит к генетическому заболеванию человека *нейрофиброматозу*, при котором в слуховых нервах и некоторых других частях нервной системы образуются доброкачественные опухоли. Это указывает на существование системы обратных связей, объединяющей структурные элементы клетки и регуляцию клеточного роста (см. главу 17).

Заключение

Разнообразные формы и функции цитоскелетных филаментных структур эукариотических клеток зависят от многочисленных дополнительных белков. Все три основных класса филаментов (микротрубочки, промежуточные

филаменты и актиновые филаменты) обладают своим набором такого рода дополнительных белков.

Регуляция процессов инициации нуклеации новых филаментов определяет локализацию цитоскелетных структур. В большинстве животных клеток микротрубочки зарождаются в центросомах — сложной структуре, расположенной вблизи центра клетки. С другой стороны, большинство актиновых филаментов нуклеируются вблизи плазматической мембраны.

Кинетика сборки и разборки филаментов может быть замедлена или ускорена дополнительными белками, связывающими свободные субъединицы или сами филаменты. Некоторые из этих белков изменяют динамику за счет связывания с концами филаментов или за счет расщепления филаментов на фрагменты. Другой класс дополнительных белков служит для сборки филаментов в более крупные упорядоченные структуры, поперечно сшивая их друг с другом в определенной геометрии. Еще один класс дополнительных белков определяет форму и адгезионные свойства клеток за счет связывания филаментов с плазматической мембраной.

16.3. Молекулярные моторы

Одними из наиболее интересных белков, ассоциирующихся с цитоскелетом, являются молекулярные моторы, носящие название **двигательных**, или **моторных, белков**. Эти удивительные белки связываются с полярными цитоскелетными филаментами и используют энергию циклического гидролиза АТФ для движения по ним. В эукариотических клетках сосуществуют десятки моторных белков. Они различаются по типам филаментов, с которыми связываются (с актином или микротрубочками), по направлению движения вдоль филамента и по переносимому

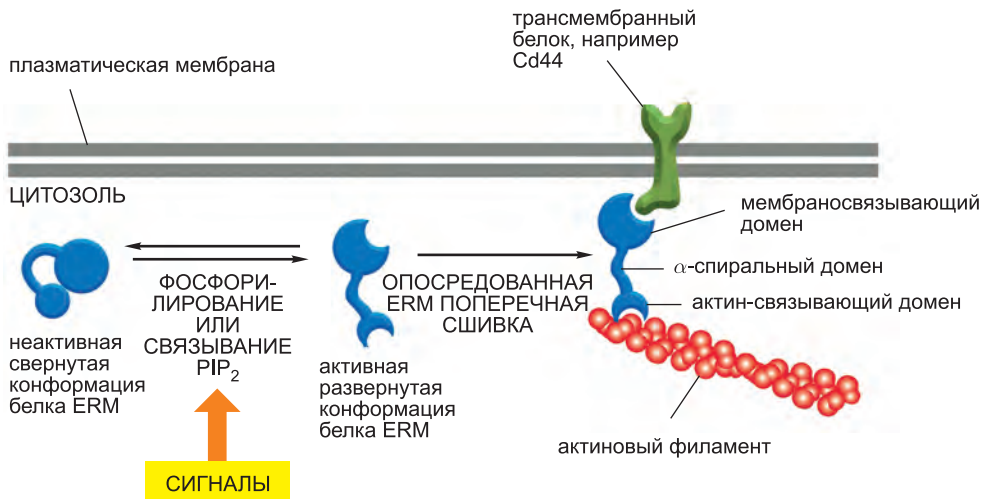


Рис. 16.53. Роль белков семейства ERM в связывании актиновых филаментов с плазматической мембраной. Регулируемое разворачивание белка семейства ERM, запускаемое фосфорилированием или связыванием PIP_2 , приводит к высвобождению двух сайтов связывания, один из которых взаимодействует с актиновым филаментом, а второй — с трансмембранным белком. Таким образом, активация белков семейства ERM способна привести к образованию и стабилизации поверхностных выростов клетки в ответ на внеклеточные сигналы.

«грузу». Многие двигательные белки переносят мембранные органеллы, например митохондрии, стопки Гольджи или секреторные везикулы, в соответствующие места клетки. Другие моторные белки заставляют цитоскелетные филаменты натягиваться или скользить относительно друг друга, создавая силу, лежащую в основе таких явлений, как мышечное сокращение, биение ресничек и клеточное деление.

Цитоскелетные моторные белки, однонаправленно передвигающиеся вдоль ориентированных полимерных «путей», напоминают некоторые другие рассмотренные в данной книге белки и белковые комплексы, например ДНК- и РНК-полимеразы, хеликазы и рибосомы. Все эти белки обладают способностью использовать химическую энергию для движения вдоль линейной молекулы. При этом направление скольжения зависит от структурной полярности этой молекулы. Все эти белки движутся за счет сопряжения гидролиза нуклеозидтрифосфатов с крупномасштабными конформационными перестройками самих белков (см. главу 3, рис. 3.77).

Двигательные белки цитоскелета связываются с филаментами своим «головным» участком, или *моторным доменом*, гидролизующим АТР. За счет циклического гидролиза нуклеотидов, приводящего к конформационным изменениям, белки переключаются между состоянием, в котором они надежно связаны с филаментом, и несвязанным состоянием. За один механохимический цикл связывания филамента, конформационной перестройки, высвобождения филамента, конформационной релаксации и повторного связывания филамента моторный белок и связанный с ним «груз» делают один шаг вдоль филамента (обычно на расстояние в несколько нанометров). Моторный домен (головка) идентифицирует филамент и определяет направление движения вдоль него, тогда как «хвост» моторного белка узнает «груз» (т.е. определяет биологическую функцию отдельного моторного белка).

Мы начнем данный раздел с описания трех групп цитоскелетных моторных белков: миозинов, кинезинов и динеинов. Затем мы рассмотрим, как они транспортируют мембранные органеллы и мРНК или изменяют форму состоящих из цитоскелетных филаментов структур. В последнем разделе этой главы мы опишем, как моторные белки и описанные ранее динамические цитоскелетные филаменты определяют сложное поведение клеток.

16.3.1. Моторные белки актина образуют суперсемейство миозинов

Первым идентифицированным моторным белком был **миозин** скелетных мышц, создающий механическую силу скелетных сокращений. Этот миозин, носящий название *миозина II* (см. ниже), представляет собой удлинённый белок, состоящий из двух тяжелых цепей и двух копий двух легких цепей. Тяжелая цепь миозина несет на N-конце глобулярный домен (головку), содержащий создающий силу аппарат, за которым следует очень длинная аминокислотная последовательность, образующая опосредующую димеризацию тяжелых цепей суперспираль, состоящую из двух скрученных спиралей (рис. 16.54). Две легкие цепи связываются вблизи N-концевого домена, а длинная суперспиральная стержневая часть («хвост») образует пучок с хвостами других молекул миозина. Такие взаимодействия «хвост к хвосту» приводят к образованию биполярных «толстых филаментов», несущих несколько сотен миозиновых головок, ориентированных в противоположные стороны на концах толстого филамента (рис. 16.55).

Головка миозина связывает и гидролизует АТР, используя высвобождаемую энергию для движения к плюс-концу актинового филамента. Благодаря противоположной ориентации головок в толстом филаменте он эффективно заставляет пары

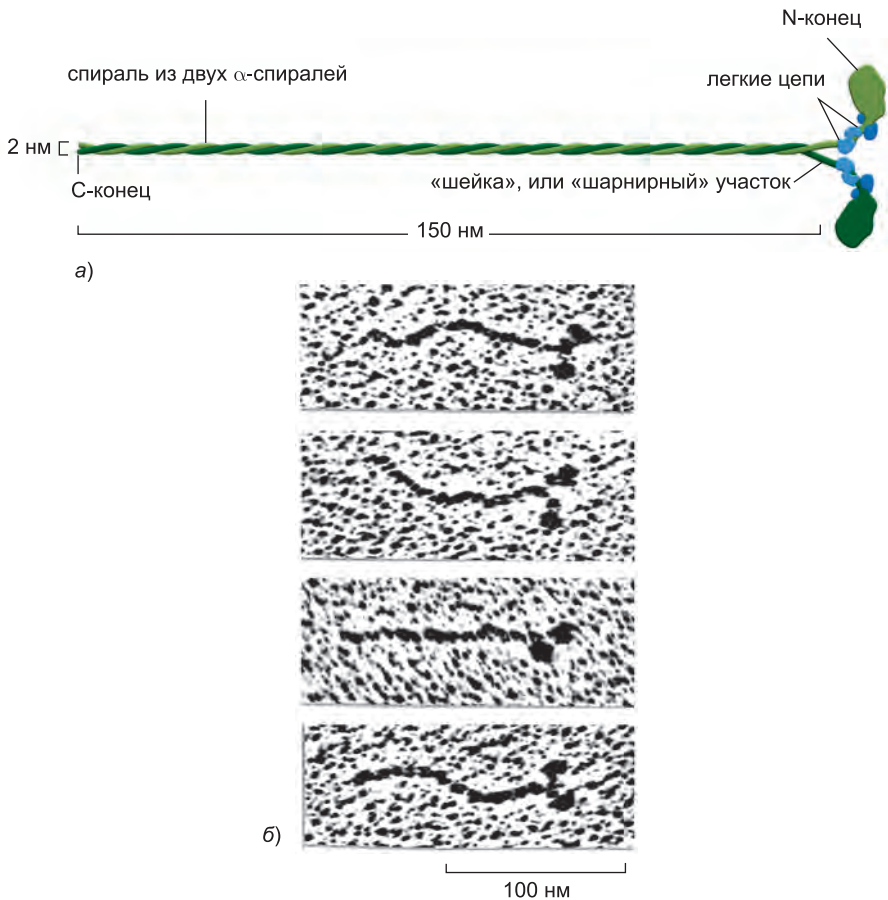


Рис. 16.54. Миозин II. (а) Молекула миозина II состоит из двух тяжелых цепей (длиной примерно 2 000 аминокислот каждая) (зеленые) и четырех легких цепей (голубые). Легкие цепи принадлежат к двум разным типам, и головка миозина несет по одной копии каждого типа. Димеризация происходит, когда две α -спирали тяжелых цепей за счет связывания регулярно расположенных гидрофобных аминокислот оборачиваются вокруг друг друга с образованием суперспирали из двух скрученных спиралей (см. рис. 3.9). В растворе эта спираль имеет линейную форму, и этот участок молекулы называют стержневой частью. (б) Две глобулярные головки и стержневой участок хорошо различимы на электронных микрофотографиях покрытых платиной молекул миозина. (б, с любезного разрешения David Shotton.)

противоположно направленных актиновых филаментов скользить относительно друг друга. В скелетных мышцах, в которых актиновые филаменты упакованы в «тонкие филаменты», окружающие миозиновые толстые филаменты, АТФ-зависимое скольжение актиновых филаментов приводит к мышечному сокращению (см. ниже). Сердечная и скелетные мышцы содержат сходным образом упакованные, но кодируемые другими генами молекулы миозина II.

Когда мышечный миозин расщепляется химотрипсином и папаином, головной домен высвобождается в интактной форме (этот фрагмент называется S1). Фрагмент S1 сам по себе способен приводить к скольжению филаментов *in vitro*. Это доказывает, что моторная активность заключена только к головке (рис. 16.56).

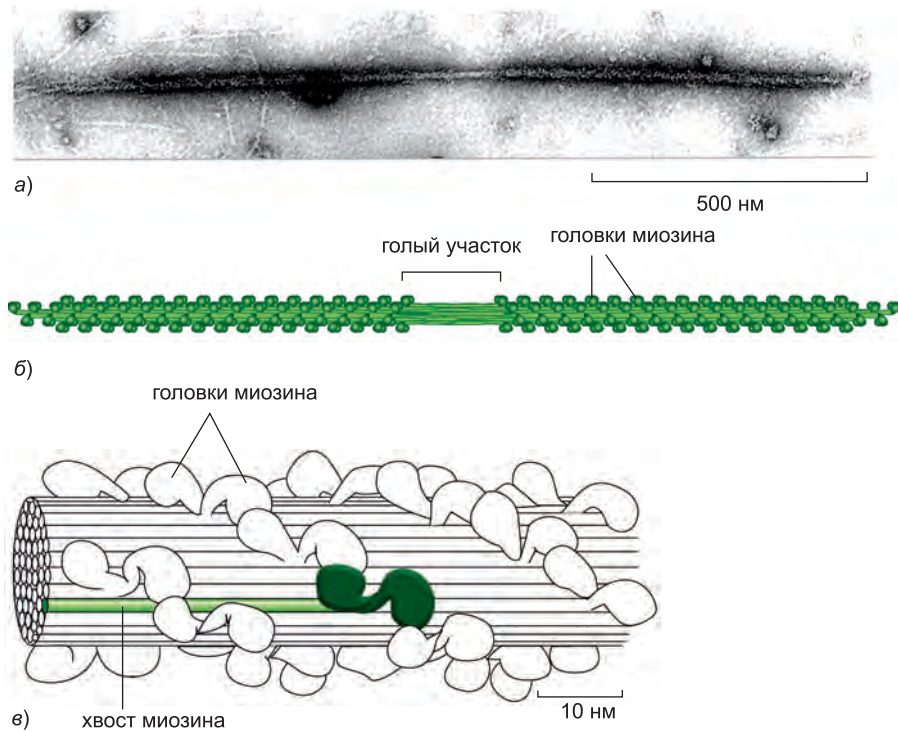


Рис. 16.55. Состоящие из миозина II биполярные толстые филаменты мышц. (а) Электронная микрофотография изолированного из мышц лягушки состоящего из миозина II толстого филамента. Обратите внимание на свободный от головок центральный участок. (б) Схема, не в масштабе. Молекулы миозина II агрегируют стержневыми участками, и их головки расположены на поверхности филамента. Обнаженный участок в центре филамента состоит исключительно из стержневых участков миозина II. (в) Небольшой фрагмент состоящего из миозина II филамента, реконструированный по данным электронной микроскопии. Отдельные молекулы миозина окрашены зеленым. Цитоплазматические состоящие из миозина II филаменты немышечных клеток значительно меньше по размеру, но организованы сходным образом (см. рис. 16.72). (а, с любезного разрешения Murray Stewart; б, согласно R.A.Crowther, R.Padron and R.Craig, *J. Mol. Biol.* 184: 429–439, 1985. С любезного разрешения издательства Academic Press.)

Исходно считали, что миозин содержится только в мышцах, но в 70-х гг. XX века исследователи обнаружили, что сходный, несущий две головки белок также присутствует в немышечных клетках, включая клетки простейших. Примерно в то же время другие исследователи идентифицировали миозин в пресноводной амebe *Acanthamoeba castellanii*. Головной домен этого миозина очень похож на головной домен мышечного миозина, но стержневая часть значительно отличалась. Эта молекула была мономером и поэтому названа *миозином I* (с одной головкой); обычный миозин переименовали в *миозин II* (с двумя головками).

Впоследствии открыли множество других типов миозинов. На N-конце тяжелые цепи обычно начинаются с узнаваемого миозинового моторного домена, но C-концевые домены сильно изменяются (рис. 16.57). Среди идентифицированных миозинов встречаются как содержащие одну головку, так и содержащие две, и они примерно в равной степени родственны миозину I и миозину II, поэтому современная номенклатура отражает примерную последовательность их идентификации (от миозина III

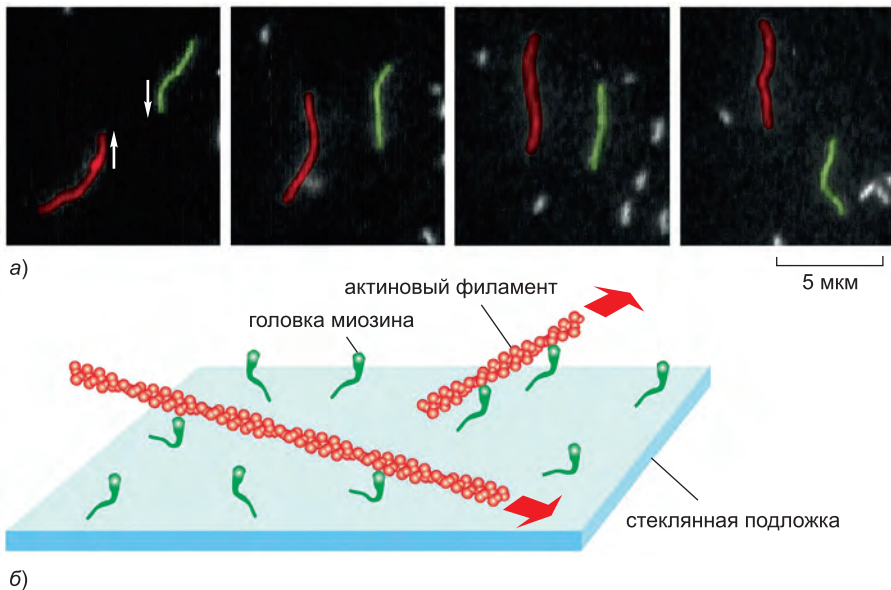


Рис. 16.56. Прямые доказательства моторной активности миозиновой головки. В данном эксперименте очищенные головки S1 миозина прикрепили к стеклянной подложке. К ним добавили окрашенные флуоресцентным фаллоидином актиновые филаменты и дали им связаться с миозином. (а) При добавлении АТФ актиновые филаменты начали скользить по поверхности за счет многочисленных отдельных шажков, совершаемых каждой из десятков связанных с филаментом миозиновых головок. Разница между фотографиями составляет примерно 0,6 секунд; два показанных актиновых филамента (зеленый и красный) двигались со скоростью около 4 мкм/с. (б) Схема эксперимента. Большие красные стрелки указывают направление движения актиновых филаментов. (а, с любезного разрешения James Spudich.)

до по крайней мере миозина XVIII). Сравнение последовательностей миозинов различных эукариот указывают на то, что в суперсемействе содержится по крайней мере 37 различных семейств. По-видимому, стержневые домены миозина (и моторных белков в общем) значительно разнообразились в течение эволюции, позволяя белкам связывать другие субъединицы и взаимодействовать с различными грузами.

Некоторые миозины (например, VIII и XI) найдены только в растениях, а другие (IX) — только у позвоночных. Однако большинство встречается у всех эукариот, что указывает на их раннее появление в течение эволюции. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* содержат пять миозинов: два миозина I, один миозин II и два миозина V. Заманчиво предположить, что эти три типа миозинов являются необходимыми для выживания эукариотической клетки, а все остальные миозины выполняют более специфические функции, особенно в многоклеточных организмах. Нематода *C. elegans*, например, несет по крайней мере 15 генов миозина, входящих в состав не менее семи структурных классов; человеческий геном содержит 40 генов миозина. Девять человеческих миозинов экспрессируются преимущественно или исключительно в волосковых клетках внутреннего уха, и мутации пяти из них вызывают наследственную глухоту. Эти крайне специализированные миозины важны для роста и функционирования сложных и изящных пучков обогащенных актином стереоцилий, располагающихся на апикальной поверхности этих клеток (см. рис. 9.50); в ответ на звук они изгибаются и преобразуют звуковые волны в электрические сигналы (см. главу 23).

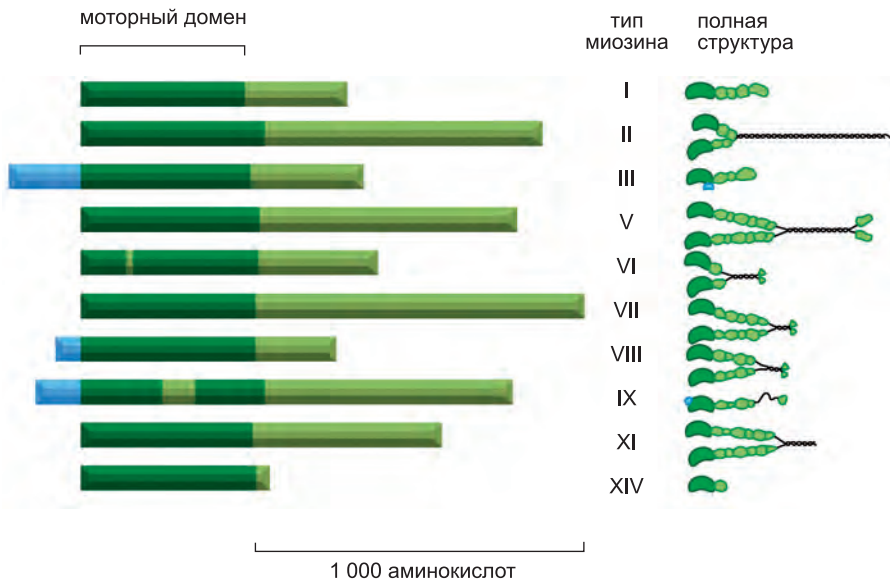


Рис. 16.57. Представители суперсемейства миозинов. Сравнение доменной структуры тяжелых цепей некоторых типов миозинов. Все миозины несут сходные моторные домены (показаны темно-зеленым), но их С-концевые домены (светло-зеленые) и N-концевые дополнения (голубые) значительно отличаются. Справа показаны схематические изображения представителей семейства. Многие миозины образуют димеры с двумя моторными доменами на молекулу, но некоторые (например, I, IX и XIV) функционируют в форме мономеров только с одним моторным доменом. Миозин VI, несмотря на свое структурное сходство с другими представителями семейства, уникален тем, что движется в направлении минус-конца (а не плюс-конца) актинового филамента. По-видимому, за изменение направления ответственна небольшая вставка в его моторном домене, отсутствующая у других миозинов.

Все миозины, за исключением одного, движутся в сторону плюс-конца актинового филамента, но делают это с разной скоростью. Исключением служит миозин VI, движущийся в сторону минус-конца.

Функции большинства миозинов еще предстоит установить. Миозин V участвует в транспорте везикул и органелл. Миозин II связан с сократительной активностью мышечных и немusкечных клеток. Он необходим для цитокинеза (расщепления делящейся клетки на две дочерние), а также для направленной транслокации тела клетки во время клеточной миграции. Миозины I обычно несут на стержневой части второй актин-связывающий сайт или сайт связывания с мембраной и обычно участвуют во внутриклеточной организации, включая выпячивание обогащенных актином структур с поверхности клетки (см. обсуждение строения микроворсинок и рис. 16.50).

16.3.2. Существует два типа моторных белков микротрубочек: кинезины и динеины

Кинезин — это моторный белок, движущийся вдоль микротрубочек. Впервые его идентифицировали в гигантском аксоне кальмара, где он переносит мембранные органеллы из тела клетки к терминали аксона, двигаясь в сторону плюс-конца микротрубочек. Кинезин структурно похож на миозин II: один активный мотор

также состоит из двух тяжелых и двух легких цепей, образующих два глобулярных моторных домена и длинную двуспиральную стержневую часть, отвечающую за димеризацию цепей. Как и миозин, кинезин принадлежит крупному суперсемейству белков, общим элементом которого является моторный домен (**рис. 16.58**). Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* кодируют шесть различных кинезинов, нематода *C. elegans* — 16, человек — около 45.

В суперсемействе кинезинов можно выделить по крайней мере четырнадцать семейств. Большинство из них несут моторный домен на N-конце тяжелой цепи и движутся в сторону плюс-конца микротрубочки. Особенно интересное семейство несет моторный домен на C-конце и передвигается в противоположном направлении — в сторону минус-конца микротрубочки. У некоторых тяжелых цепей кинезина отсутствует двуспиральная последовательность, и они, по-видимому, функционируют как мономеры, аналогично миозину I. Некоторые другие представляют собой гомодимеры, но также существуют и гетеродимеры. Представители семейства кинезина-5 способны связываться с себе подобными с образованием биполярного мотора, сдвигающего противоположно ориентированные микротрубочки относительно друг друга. Это напоминает то, как миозин II воздействует на актиновые филаменты. Большинство кинезинов на хвостовом участке несет сайт связывания для мембранных органелл или других микротрубочек. Многие представители суперсемейства кинезинов выполняют специфические функции при образовании митотических и мейотических веретен деления и расхождении хромосом.

Динеины — это неродственное кинезинам семейство моторов, движущихся в сторону минус-конца микротрубочек. Они состоят из двух или трех тяжелых цепей (включающих в себя моторный домен) и большого и изменяющегося числа связанных промежуточных и легких цепей (**рис. 16.59**). Самая древняя ветвь семейства состоит из *цитоплазматических динеинов*, которые обычно представляют собой гомодимеры тяжелых цепей, в качестве головок которых выступают два крупных моторных домена. Цитоплазматические динеины, по-видимому, встречаются во всех эукариотических клетках. Они играют важную роль в транспорте везикул, а также локализации аппарата Гольджи вблизи центра клетки. *Аксонемные динеины* — другая большая ветвь — представляют собой гетеродимеры и гетеротримеры, несущие два или три моторных домена соответственно. Это высокоспециализированные белки, основной функцией которых является быстрое и эффективное скольжение микротрубочек при биении ресничек и жгутиков (см. ниже). Третья, менее распространенная ветвь семейства по аминокислотной последовательности больше похожа на цитоплазматические, чем на аксонемные динеины, но участвует в биении ресничек.

Динеины являются самыми крупными молекулярными моторами из известных, а также одними из самых быстрых: аксонемные динеины в пробирке способны перемещать микротрубочки с удивительной скоростью — 14 мкм/с. Для сравнения, самые быстрые кинезины перемещают свои микротрубочки со скоростью примерно 2–3 мкм/с. Дальше мы обсудим, как они работают.

16.3.3. Структурное сходство между миозином и кинезином указывает на их общее эволюционное происхождение

Моторный домен миозинов больше, чем моторный домен кинезинов: около 850 аминокислот против примерно 350. Два класса моторных белков передвигаются вдоль разных филаментов и обладают различными кинетическими свойствами,

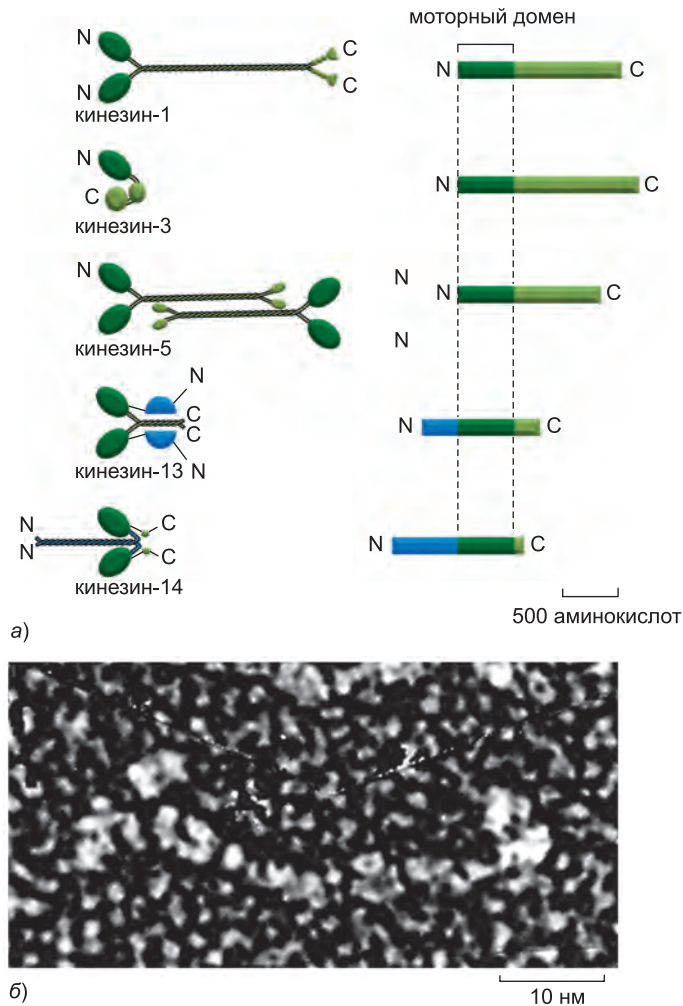
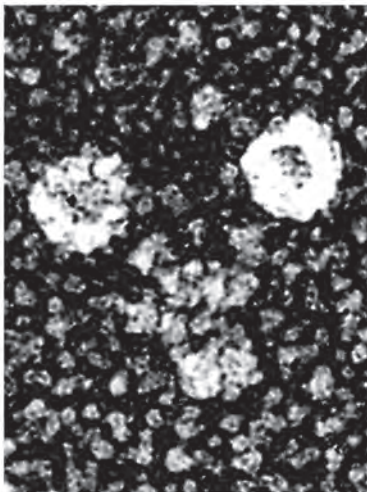


Рис. 16.58. Кинезин и родственные белки. (а) Структуры пяти представителей суперсемейства кинезинов. Как и в случае суперсемейства миозинов, консервативны только моторные домены. Кинезин-1 несет моторный домен на N-конце тяжелой цепи. Средний домен образует длинную двойную спираль, опосредующую димеризацию. С-концевой домен образует хвост, присоединяющий груз, например мембранную органеллу. Кинезин-3 — пример необычного класса кинезинов, которые функционируют в мономерной форме и переносят мембранные органеллы вдоль микротрубочек. Кинезин-5 образует тетрамеры, в которых два димера связываются хвостами. Биполярный тетрамер кинезина-5 способен сдвигать две микротрубочки относительно друг друга аналогично тому, как действуют биполярные толстые филаменты миозина II. У кинезина-13 моторный домен расположен в центре тяжелой цепи. Он является представителем семейства кинезинов, потерявших моторную активность и вместо этого связывают концы микротрубочек для увеличения их динамической нестабильности; поэтому их называют катастрофинами (см. [стр. 1003](#)). Кинезин-14 — это С-концевые кинезины, включающие в себя белок Ncd *Drosophila* и дрожжевой белок Kar3. Эти кинезины обычно движутся в противоположном направлении, чем большинство кинезинов, т. е. в сторону минус-конца микротрубочек. (б) Полученная методом замораживания электронная микрофотография молекулы кинезина. Головные домены расположены справа. (б, с любезного разрешения John Heuser.)

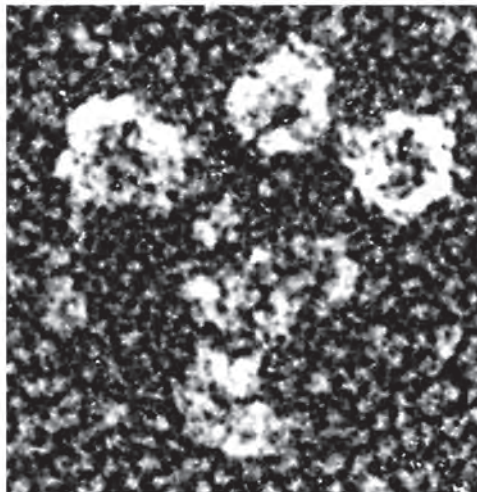
и между их аминокислотными последовательностями не обнаружено сходства. Однако расшифровка трехмерной структуры моторных доменов миозина и кинезина показала, что они строятся вокруг практически идентичных сердцевинных структур (**рис. 16.60**). Центральный, создающий механическую силу элемент, общий для обоих типов моторных белков, включает в себя сайт связывания АТР и аппарат, необходимый для преобразования энергии гидролиза АТР в аллостерическую конформационную перестройку. Крупные петли, отходящие от сердцевины, определяют различия в размере доменов и отвечают за выбор филамента. В состав этих петель входят сайты связывания актина и микротрубочек миозина и кинезина соответственно. Считают, что кинезины и миозины произошли от общего моторного белка-предшественника, и их специализированные функции — результат удвоения и модификации при эволюции отходящих от сердцевины петель.

Важным указанием на то, как сердцевина моторных белков участвует в создании механической силы, является тот факт, что она также обладает структурным сходством с сайтами связывания нуклеотидов малых GTPаз суперсемейства Ras. Как обсуждалось в главе 3 (см. рис. 3.72), эти белки обладают различными конформациями в GTP-связанной (активной) и GDP-связанной (неактивной) формах: подвижные петли в сайте связывания нуклеотида в GTP-связанном состоянии расположены вблизи γ -фосфата (терминального фосфата), но при высвобождении гидролизованного γ -фосфата они отодвигаются. Несмотря на то что некоторые аспекты движения у этих двух моторных белков отличаются, и гидролизуются АТР, а не GTP, относительно небольшое структурное изменение активного сайта — присутствие или отсутствие терминального фосфата — точно так же усиливается и вызывает вращение другой части белка.

цитоплазматический динеин



аксонемный динеин



25 нм

Рис. 16.59. Динеины. Полученная методом замораживания электронная микрофотография молекул цитоплазматического и аксонемного (из реснички) динеинов. Аналогично миозину II и кинезину, цитоплазматический динеин несет две головки. Показан динеин ресничек простейшего, несущий три головки; аксонемные динеины животных обладают двумя головками. Обратите внимание, что головки динеинов значительно больше, чем головки миозина и кинезина. (С любезного разрешения John Heuser.)

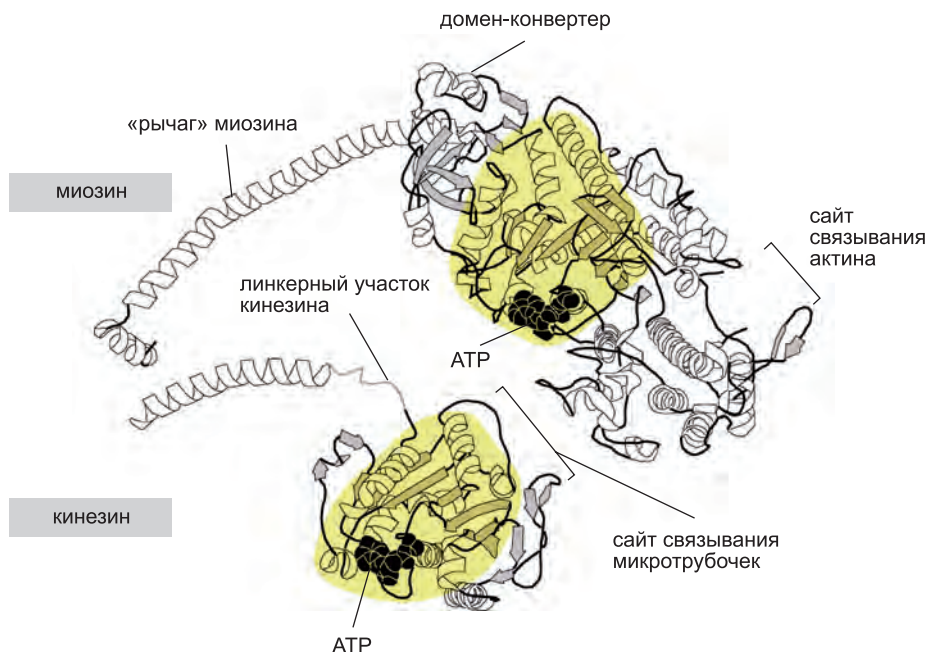


Рис. 16.60. Рентгеновские кристаллические структуры головок миозина и кинезина. Центральные нуклеотид-связывающие домены миозина и кинезина (желтые) структурно очень похожи. Различные размеры и функции моторных белков объясняются значительными различиями в их сайтах связывания полимера и передающей силу части моторного домена. (Адаптировано из L. A. Amos and R. A. Cross, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 239–246, 1997. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

В кинезине и миозине подвижные петли взаимодействуют с областями белков, участвующими в связывании микротрубочек и актина соответственно, что позволяет вызванным циклом гидролиза АТФ структурным переходам передаваться на поверхность связывания полимера. Передача структурных перестроек между сайтом связывания полимера и сайтом гидролиза нуклеотида, по-видимому, работает в обоих направлениях, поскольку АТФ-разная активность моторных белков активируется связыванием с филаментом.

16.3.4. Моторные белки создают механическую силу за счет сопряжения гидролиза АТФ с конформационными перестройками

Несмотря на то что и цитоскелетные моторные белки, и ГТФ-связывающие белки используют структурные изменения сайтов связывания нуклеозидтрифосфатов для циклических взаимодействий со своими белками-партнерами, у моторных белков есть дополнительное требование: каждый цикл связывания и высвобождения должен приводить к их однонаправленному движению вдоль филамента к следующему сайту связывания филамента. Для такого движения моторный белок должен использовать энергию связывания и гидролиза АТФ для крупномасштабного перемещения части белковой молекулы. В случае миозина каждый «шаг» вдоль актина производится за счет поворота α-спирали длиной 8,5 нм, или «рычага», структурно стабилизированного связыванием легких цепей. В основании рычага рядом с головкой располагается работающая по принципу поршня спираль, сопрягающая

АТФ-связывающий карман головки с небольшими вращениями так называемого домена-конвертера (см. рис. 16.60). Небольшие изменения в этом участке способны повернуть спираль, как длинный рычаг, переместив дальний конец спирали примерно на 5,0 нм.

Изменения конформации миозина сопряжены с изменением его средства к актину, что позволяет миозиновой головке высвобождать и снова связывать актиновый филамент. Полный механохимический цикл связывания нуклеотида, гидролиза нуклеотида и высвобождения фосфата (вызывающего «рабочий ход») заставляет миозин сделать один шаг (рис. 16.61).

В кинезине небольшие движения петель сайта связывания нуклеотида, а не раскачивающийся рычаг, регулируют связывание моторного домена с длинным линкерным участком, соединяющим головку с двуспиральным доменом димеризации (см. рис. 16.60). Когда передняя (ведущая) головка кинезина связана с микротрубочкой до рабочего хода, ее линкерный участок относительно неструктурирован. При связывании с моторным доменом АТФ линкерный участок связывается с головкой; в результате вторая головка перебрасывается вперед в положение, где она сможет связаться с новым сайтом на протофиламенте, расположенным на 8 нм ближе к плюс-концу микротрубочки, чем сайт связывания первой головки. Циклы гидролиза АТФ на головках строго скоординированы, поэтому стыковка и отстыковка линкера позволяет мотору передвигаться таким пошаговым образом (рис. 16.62), перемещаясь за один шаг на 8 нм.

Двуспиральный домен, по-видимому, координирует механохимические циклы обеих головок (моторных доменов) димера кинезина и определяет направление движения. Если большинство представителей суперсемейства кинезинов с моторными доменами на N-конце движутся в направлении плюс-конца микротрубочки, то некоторые члены суперсемейства с моторными доменами на С-конце перемещаются в направлении минус-конца. Поскольку головки этих двух

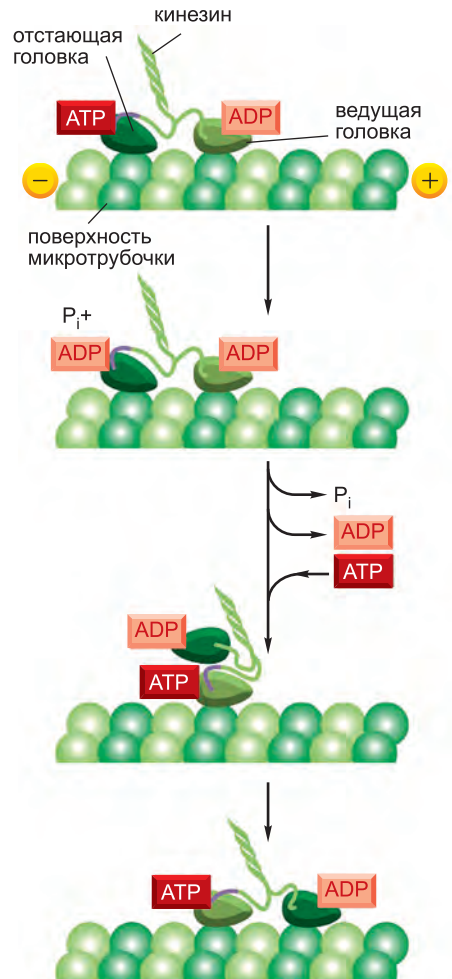
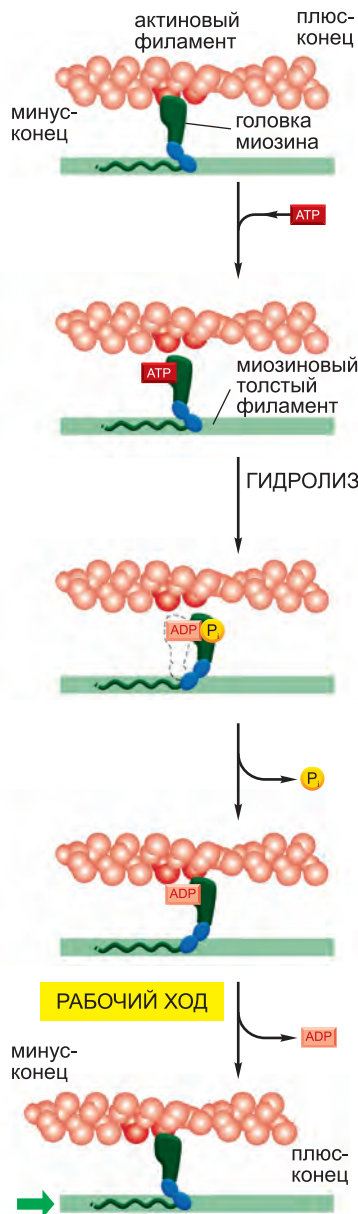


Рис. 16.62. Механохимический цикл кинезина. Кинезин-1 — это димер, состоящий из двух связывающих нуклеотиды моторных доменов (головок), соединенных длинным двуспиральным хвостом (см. рис. 16.58). Два моторных домена кинезина работают скоординированно; во время «шага» кинезина задняя головка отсоединяется от сайта связывания тубулина, проходит мимо второго моторного домена и снова связывается со следующим доступным сайтом тубулина. В результате димер кинезина способен перемещаться на большие расстояния, не теряя связи с микротрубочкой.



СВЯЗАННОЕ СОСТОЯНИЕ

В начале цикла головка миозина без связанного нуклеотида крепко связана с актиновым филаментом в ригорной конфигурации (названной таким образом потому, что она ответственна за *rigor mortis* — трупное окоченение). В активно сокращающейся мышце это состояние короткоживущее и быстро терминируется связыванием АТФ.

РАССЛАБЛЕННОЕ СОСТОЯНИЕ

Молекула АТФ связывается с щелью на «задней» поверхности головки (то есть на поверхности, наиболее удаленной от актинового филамента) и вызывает небольшое изменение конформации доменов, составляющих сайт связывания актина. Это снижает сродство головки к актину и позволяет белку двигаться вдоль филамента. (Изображенное здесь пространство между головкой и актином подчеркивает это изменение, хотя в реальности головка, скорее всего, остается вблизи актина.)

АКТИВИРОВАННОЕ СОСТОЯНИЕ

Щель захлопывается вокруг молекулы АТФ, запуская крупную конформационную перестройку и вызывая перемещение головки вдоль филамента на расстояние около 5 нм. Происходит гидролиз АТФ, но образованные АДФ и P_i остаются связанными с белком.

ГЕНЕРИРУЮЩЕЕ СИЛУ СОСТОЯНИЕ

Слабое связывание миозиновой головки с новым сайтом на актиновом филаменте приводит к высвобождению неорганического фосфата, образованного в результате гидролиза АТФ, и последующему сильному связыванию головки с актином. Это высвобождение запускает рабочий ход — создающее силу изменение формы, во время которого головка принимает исходную конформацию. Во время рабочего хода головка теряет связанный АДФ, возвращаясь к началу нового цикла.

СВЯЗАННОЕ СОСТОЯНИЕ

В конце цикла головка миозина снова оказывается крепко связанной с актиновым филаментом в ригорной конфигурации. Обратите внимание, что головка сдвинулась относительно филамента.

Рис. 16.61. Цикл структурных изменений, приводящий к движению миозина II вдоль актиновых филаментов. В цикле миозина II головки остаются связанными с актиновыми филаментами только 5 % времени цикла, позволяя нескольким миозинам одновременно перемещать один филамент. (Основано на I. Rayment et al., *Science* 261: 50–58, 1993. С любезного разрешения издательства AAAS.)

типов кинезинов структурно практически одинаковы, как они могут двигаться в противоположных направлениях? По-видимому, ответ заключается в том, как соединены головки. Полученные с высоким разрешением изображения связанных с микротрубочками движущихся в прямом и обратном направлении представителей

суперсемейства кинезинов показали, что присоединенные к филаментам головки у обоих типов практически неразличимы, тогда как вторые, несвязанные головки ориентированы по-разному. Это различие в изгибе, по-видимому, влияет на сайт связывания второй головки и, таким образом, определяет направление движения мотора (**рис. 16.63**).

Динеиновый мотор структурно не похож на миозины и кинезины, но следует все тому же общему принципу сопряжения гидролиза нуклеотидов со связыванием микротрубочек и создающей силу конформационной перестройкой. Огромная тяжелая цепь массой более 500 кДа формирует основную создающую движение структуру. Ее N-концевая часть образует хвост, связывающий набор легких цепей и другие тяжелые цепи молекулы динеина, тогда как основная часть тяжелой цепи образует сложную кольцевую головку. Головка состоит из плоского кольца, образованного семью доменами: шестью доменами AAA и С-концевым доменом тяжелой цепи; таким образом, это более сложный родственник рассмотренной в главе 6 гексамерной

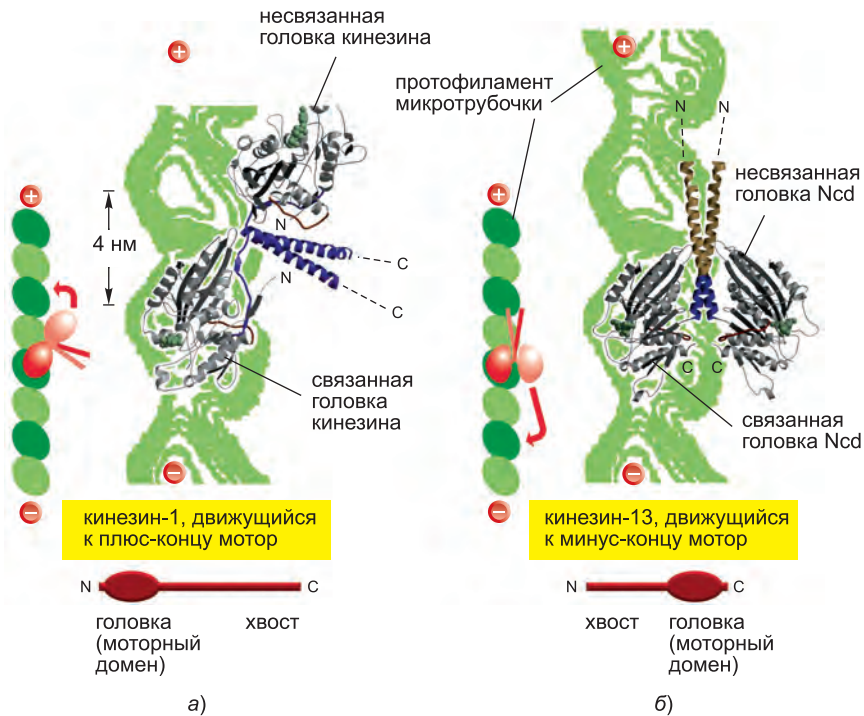


Рис. 16.63. Ориентация и движение в прямом и обратном направлении связанного с микротрубочками суперсемейства кинезинов. Эти изображения созданы путем объединения структур свободных димеров моторных белков (расшифрованных методом рентгеновской кристаллографии) и изображений низкого разрешения димеров, присоединенных к микротрубочкам (полученным методом криоэлектронной микроскопии). (а) Кинезин-1 (традиционный кинезин) несет моторный домен на N-конце и движется в сторону плюс-конца микротрубочки. Когда после рабочего хода одна головка димера связана с микротрубочкой (с АТФ в сайте связывания нуклеотида), вторая, несвязанная головка указывает в сторону плюс-конца и находится в положении для следующего шага. (б) Кинезин-13 (у *Drosophila* носящий название Ncd), движущийся в сторону минус-конца мотор, несущий моторный домен на С-конце, образует димеры с противоположной ориентацией. (Из E. Sablin et al., *Nature* 395: 813–816, 1998. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

АТРаза (см. рис. 6.91). Похожий на крючок линкерный участок соединяет хвост тяжелой цепи с наиболее активным как АТРаза доменом AAA. Между четвертым и пятым доменами AAA расположен домен тяжелой цепи, образующий длинную антипараллельную двуспиральную «ножку». Эта ножка выступает с вершины кольца и несет на конце регулируемый гидролизом АТР сайт связывания микротрубочек. «Рабочий ход» динеина запускается высвобождением ADP и неорганического фосфата и приводит к вращению кольца относительно хвоста (рис. 16.64).

Несмотря на то что кинезин, миозин и динеин претерпевают аналогичные механохимические циклы, природа сопряжения механических и химических циклов для этих трех белков различна. Например, миозин без нуклеотида связан с актином в так называемом «ригорном», или сцепленном, состоянии, и он отсоединяется от филамента при связывании АТР. С другой стороны, кинезин образует похожую на ригорное состояние связь с микротрубочкой, когда он несет АТР, и гидролиз АТР приводит к высвобождению мотора от филамента. Механохимический цикл динеина больше похож на цикл миозина, чем кинезина, то есть свободный от нуклеотида динеин крепко связан с микротрубочкой и отсоединяется от нее при связывании АТР. Однако в случае динеина ADP и неорганический фосфат высвобождаются одновременно, вызывая конформационную перестройку и последующий рабочий ход, тогда как в случае миозина сначала высвобождается фосфат и рабочий ход не совершается до тех пор, пока ADP не диссоциирует от моторной головки.

Таким образом, механизм работы цитоскелетных моторных белков очень похож на механизм работы GTP-связывающих белков, за исключением того, что в моторных белках сопряженные с гидролизом нуклеотида небольшие конформационные перестройки (в несколько десятых нанометра) усиливаются специальными белковыми доменами — рычагом в случае миозина, линкером в случае кинезина и кольцом и ножкой в случае динеина — и становятся крупномасштабными (в несколько нанометров) конформационными изменениями, пошагово продвигающими моторные белки вдоль филаментов. Аналогия между GTPазами и цитоскелетными моторными белками недавно была расширена: было показано, что один из GTP-связывающих белков — бактериальный фактор элонгации G, преобразует химическую энергию гидролиза GTP в направленное движение молекулы мРНК в рибосоме.

В начале каждого шага одна из головок кинезина — задняя, или отстающая, головка (*темно-зеленая*) — крепко связана с микротрубочкой и АТР, тогда как передняя ведущая головка свободно связана с микротрубочкой и несет ADP. Последующее перемещение заднего моторного домена происходит за счет обмена ADP на АТР на ведущем моторном домене (между этапами 2 и 3 на рисунке). Связывание АТР с этим моторным доменом приводит к переходу небольшого пептида, носящего название «линкер шейки», из указывающего назад состояния в указывающее вперед состояние (на рисунке линкер представляет собой линию, соединяющую головку с двойной спиралью). Этот переход тянет отсоединенный от микротрубочки и связанный с ADP задний моторный домен вперед (для отсоединения от микротрубочки необходим гидролиз АТР и высвобождение фосфата (P_i)). Молекула кинезина теперь находится в положении для следующего шага, который в точности повторяет изображенный здесь процесс.

16.3.5. Кинетика моторных белков адаптирована к функциям клетки

Моторные белки суперсемейств миозина и кинезина обладают удивительно разнообразными свойствами подвижности, выходящими далеко за пределы выбора соответствующего полимера. Наиболее удивительным свойством такого рода

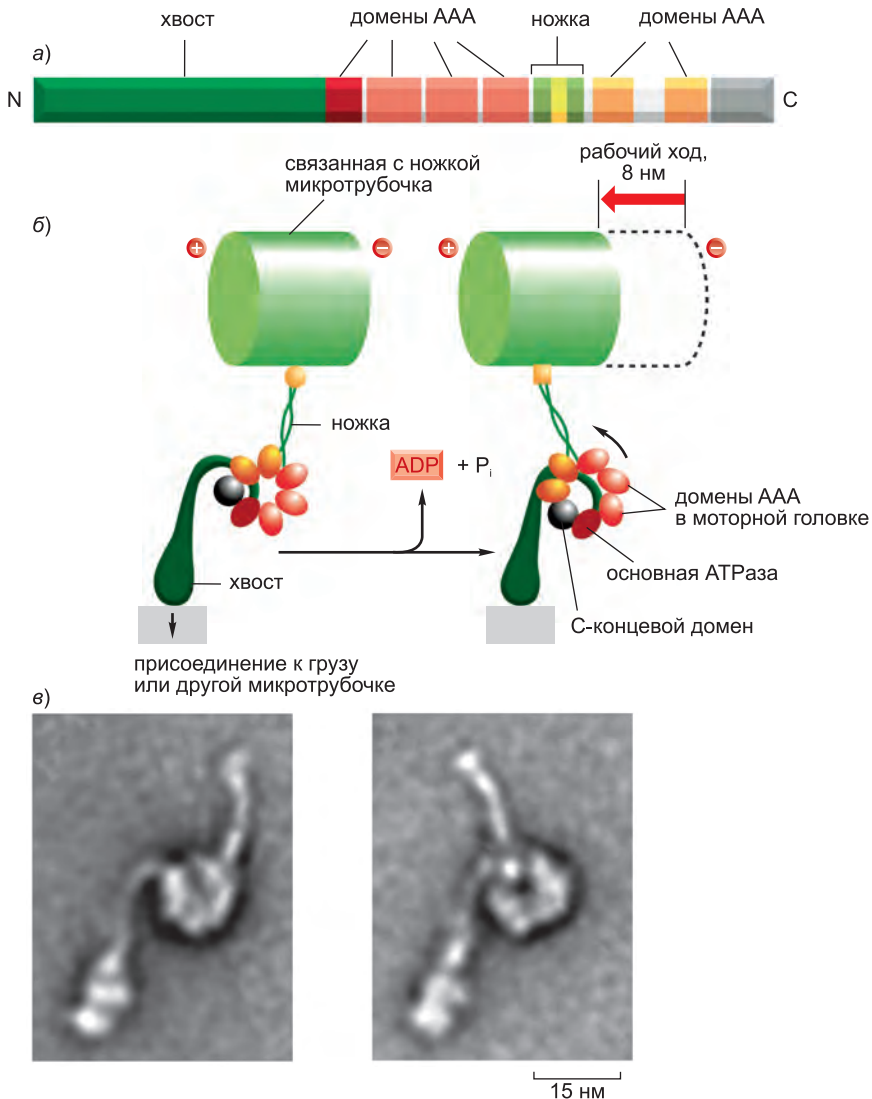


Рис. 16.64. Рабочий ход динеина. (а) Строение доменов тяжелой цепи динеина. Это очень большая молекула, состоящая примерно из 5000 аминокислот. Число тяжелых цепей в динеине равно числу моторных головок. (б) Динеин с — это мономерный динеин жгутиков одноклеточной зеленой водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Крупная моторная головка динеина представляет собой плоское кольцо, состоящее из С-концевого домена (серый) и шести доменов AAA, четыре из которых несут АТФ-связывающие последовательности, но только один обладает АТФазной активностью. От головки отходит длинная двуспиральная ножка, несущая на конце сайт связывания микротрубочек, и хвост, содержащий сайт связывания груза. В связанном с АТФ состоянии ножка не соединена с микротрубочкой, но гидролиз АТФ приводит к связыванию ножки с филаментом. Последующее высвобождение ADP и P_i приводит к конформационному рабочему ходу, заключающемуся во вращении головки и ножки относительно хвоста. В результате одного цикла молекула перемещается вдоль микротрубочки в направлении минус-конца на 8 нм. (в) Электронная микрофотография очищенных динеинов в двух различных конформациях, соответствующих различным этапам механохимического цикла. (б, из S. A. Burgess et al., *Nature* 421: 715–718, 2003. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

является *процессивность* кинезина-1, т.е. его способность претерпевать сотни АТРазных циклов, не прекращая движения вдоль микротрубочки и не диссоциируя. Миозин II скелетных мышц, наоборот, не обладает процессивностью и совершает только один или два шага вдоль актинового филамента, после чего отсоединяется. Эти различия определяют различные биологические функции моторов. Небольшого числа молекул кинезина-1 должно быть достаточно для транспорта органеллы от тела клетки до аксональной терминали, и, следовательно, кинезин-1 должен обладать высокой процессивностью. С другой стороны, миозин скелетных мышц никогда не функционирует как отдельная молекула — он всегда является частью большого набора белков толстого филамента. Здесь процессивность ингибировала бы биологическую функцию, поскольку для эффективного сокращения мышцы каждая молекула миозина должна совершить рабочий ход и быстро уйти, чтобы не мешать другим головкам того же актинового филамента.

Высокая процессивность кинезина-1 объясняется двумя причинами. Во-первых, механохимические циклы двух моторных головок димера кинезина-1 работают скоординированно: первая головка не отсоединится от филамента до тех пор, пока вторая не будет готова к связыванию. Благодаря этому переносимая моторным белком органелла никогда не диффундирует от микротрубочки. С другой стороны, в димере миозина II координация между головками отсутствует. Вторая причина высокой процессивности движения кинезина-1 заключается в том, что большую часть своего АТРазного цикла мотор проводит в связанном с микротрубочкой состоянии. Конформационные перестройки, приводящие к генерирующему силу рабочему ходу кинезина-1 и миозина II, должны происходить, когда моторный белок крепко связан с полимером, а восстановление при подготовке к следующему шагу должно происходить в свободном состоянии. Но миозин II проводит в связанном состоянии только 5% своего АТРазного цикла, и остальное время он отсоединен.

То, чего миозину не хватает в процессивности, он восполняет скоростью; в структуре, где множество моторных головок взаимодействуют с одним актиновым филаментом, набор связанных миозинов за время одного цикла способен переместить свой филамент на расстояние, равное 20 шагам, тогда как кинезины — только на два. Таким образом, миозин II значительно быстрее движет филамент, чем кинезин-1, несмотря на то что белки гидролизуют АТР с практически одинаковой скоростью и совершают молекулярные шаги сходной длины. Это свойство особенно важно для быстрого сокращения скелетных мышц.

В пределах классов моторных белков скорость движения значительно изменяется: 0,2–60 мкм/с для миозинов и 0,02–2 мкм/с для кинезинов. Причиной этих различий является точная настройка механохимического цикла. Количество шагов, которые может сделать молекула за данный промежуток времени и, следовательно, ее скорость могут быть уменьшены за счет снижения АТРазной активности белка или увеличения времени, которое белок проводит в связанном с филаментом состоянии. Например, миозин V (служащий процессивным мотором везикул) проводит 90% своего нуклеотидного цикла в связанном с актиновым филаментом состоянии, тогда как миозин II — только 5%. Более того, моторные белки могут эволюционировать и изменить длину шага, поменяв длину рычага (например, рычаг миозина V в три раза длиннее, чем рычаг миозина II) или угол поворота спирали (**рис. 16.65**). Все эти параметры у разных представителей семейств миозинов и кинезинов немного различаются, что отражается в небольших различиях в аминокислотных последовательностях и структурах белков.

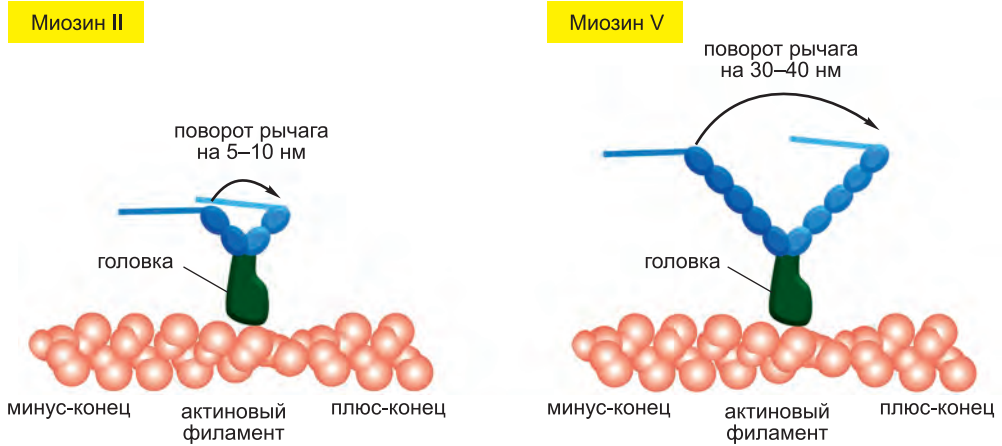


Рис. 16.65. Влияние длины рычага на длину шага моторного белка. Рычаг миозина II значительно короче рычага миозина V. Рабочий ход головки поворачивает рычаги на один угол, поэтому миозин V способен сделать больший шаг, чем миозин II.

Предположительно, эволюция точно настроила характеристики каждого моторного белка, чьи функции определяются прикрепленным к его хвостовому домену грузом, для достижения наибольшей скорости и процессивности в соответствии со специфическими нуждами клетки в связи с функцией конкретного представителя семейства. Если в типичной эукариотической клетке содержится множество различных миозинов и кинезинов, то цитоплазматический динеин обычно один. На данный момент непонятно, как механические свойства цитоплазматического динеина могут быть модифицированы в соответствии с нуждами клетки, и возможно ли это.

16.3.6. Моторные белки опосредуют внутриклеточный транспорт мембранных органелл

Основная функция молекулярных моторов во время интерфазы — транспорт и локализация мембранных органелл. Кинезин изначально идентифицирован как белок, ответственный за быстрый аксональный транспорт — быстрое движение митохондрий, предшественников секреторных пузырьков и различных компонентов синапсов по микротрубочкам аксона к нервным окончаниям. Несмотря на то что в большинстве клеток органеллам нет необходимости перемещаться на такие большие расстояния, их полярный транспорт в равной мере важен. Обычно в интерфазной клетке минус-концы микротрубочек расположены вблизи центра клетки в centrosome, а плюс-концы — на периферии. Таким образом, центроостремительное движение органелл или везикул в направлении клеточного центра требует наличия таких направленных к минус-концу моторных белков, как цитоплазматический динеин, а центробежное движение к периферии клетки требует таких направленных к плюс-концу моторов, как кинезины.

Наиболее наглядным примером влияния микротрубочек и связанных с ними моторов на поведение внутриклеточных мембран служит их роль в организации эндоплазматического ретикулума (ЭР) и аппарата Гольджи. Сеть мембран ЭР расположена вблизи микротрубочек и распространяется почти до самых границ

клетки, тогда как аппарат Гольджи локализован вблизи centrosомы. При обработке клеток веществом, дестабилизирующим микротрубочки, например колхицином или нокадазолом, ЭР коллапсирует к центру клетки, а аппарат Гольджи фрагментируется и расходуется по всей цитоплазме (рис. 16.66). *In vitro* кинезины способны присоединять мембраны ЭР к существующим микротрубочкам и двигаться в направлении плюс-концов, растягивая мембраны ЭР с образованием полых трубчатых структур. Образованная таким образом сеть очень похожа на ЭР живых клеток. Точно так же в живых клетках движение ЭР к периферии клеток связано с ростом микротрубочек. Динеины, наоборот, отвечают за локализацию аппарата Гольджи вблизи центра клетки, перенося везикулы Гольджи в направлении минус-концов микротрубочек к centrosоме.

Различные хвосты и связанные с ними легкие цепи специфических моторных белков позволяют моторам присоединять соответствующие органеллы. Мембранные моторные рецепторы, хранящиеся в специализированных мембранных компартментах, напрямую или косвенно взаимодействуют с хвостами соответствующих представителей семейства кинезинов. Одним из таких белков, по-видимому, является предшественник амилоида, APP, напрямую связывающий легкую цепь хвоста кинезина-1. APP, предположительно, служит трансмембранным моторным рецептором аксонов нервных клеток. Нарушение процессинга этого белка приводит к развитию болезни Альцгеймера за счет образования крупных, устойчивых белковых агрегатов в нервных клетках мозга (см. рис. 6.95). Также обнаружены рецепторы различных кинезинов в эндоплазматическом ретикулуме и других связанных с мембраной органеллах, для локализации которых необходим транспорт по микротрубочкам. Белки JIP (JNK-interacting proteins — взаимодействующие с JNK белки) — это каркасные белки, связанные с клеточной сигнализацией. Возможно, они позволяют найти связь между транспортом и клеточной сигнализацией.

В случае динеина присоединение к мембранам часто опосредуется сборкой крупного макромолекулярного комплекса. Цитоплазматический динеин, который сам по себе является большим белком, для эффективной транслокации органелл

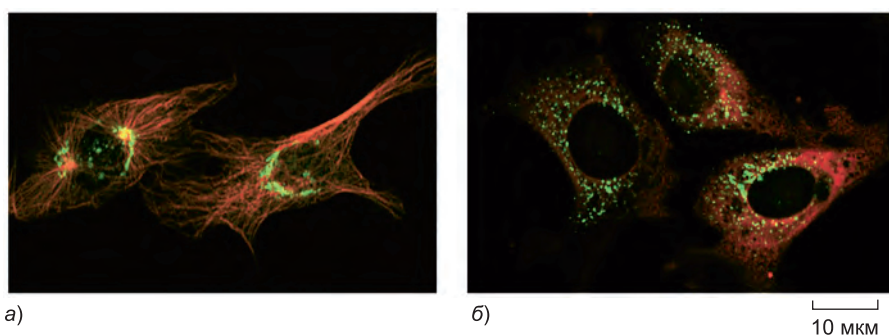
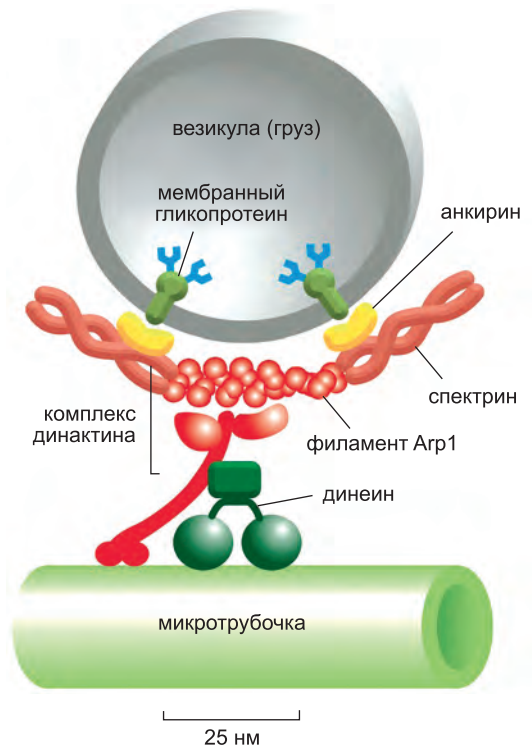


Рис. 16.66. Влияние дестабилизации микротрубочек на аппарат Гольджи. (а) В данной эндотелиальной клетке микротрубочки окрашены красным, а аппарат Гольджи — зеленым (при помощи антитела против белка Гольджи). До тех пор пока система микротрубочек не нарушена, аппарат локализован вблизи centrosомы, рядом с ядром в центре клетки. Клетка справа находится в интерфазе и несет одну centrosому. Клетка слева — в профазе, и удвоенные centrosомы расположены с противоположных сторон ядра. (б) После обработки нокадазолом, вызывающим дестабилизацию микротрубочек (см. таблицу 16.2), аппарат Гольджи фрагментируется и распространяется по всей цитоплазме. (С любезного разрешения David Shima.)

связывается с белковым комплексом *динактином*. В динактиновый комплекс входит короткий актиноподобный филамент, образующийся из родственного актину белка Atp1 (отличного от Atp2 и Atp3, компонентов комплекса ARP, участвующего в нуклеации традиционных актиновых филаментов). Мембраны аппарата Гольджи покрыты белками анкирином и спектрином, которые, по предположению, связываются с филаментом Atp1 в динактиновом комплексе с образованием плоской цитоскелетной структуры, похожей на цитоскелет мембраны эритроцитов (см. рис. 10.41). Спектриновая сеть, по-видимому, придает структурную стабильность мембране Гольджи и при помощи филамента Atp1 опосредует регулируемое связывание органеллы с динеином (рис. 16.67). В других случаях цитоплазматические динеиновые моторы способны напрямую взаимодействовать со своим грузом. Цитоплазматический хвост родопсина, светочувствительного белка глаза, напрямую связывается с одной из легких цепей динеина, что необходимо для направленного транспорта родопсина в палочках сетчатки.

Моторные белки также играют важную роль в транспорте органелл вдоль актиновых филаментов. Первым миозином, для которого доказана такая активность, был миозин V — миозин с двумя головками и большим шагом (см. рис. 16.65). В мышцах и людях мембранные пигментные гранулы *меланосомы* синтезируются под поверхностью кожи в клетках, носящих название *меланоциты*. Меланосомы движутся к концам ветвистых отростков меланоцитов, откуда они доставляются в лежащие выше образующие кожу (и шерсть мышей) кератиноциты. Миозин V связан с поверхностью меланосом (рис. 16.68) и в пробирке способен опосредовать их движение по актину. Мутации гена миозина V у мышей приводят к «размытому» фенотипу, при котором цвет шерсти кажется приглушенным за счет того, что меланоциты не достаточно эффективно доставляются в кератиноциты. Другие миозины, включая миозин I, опосредуют транспорт эндосом и других органелл.

Рис. 16.67. Модель прикрепления динеина к мембранной органелле. Чтобы связаться с мембранной органеллой, динеину необходимо большое количество дополнительных белков. Динактин — это крупный комплекс (красный), включающий в себя компоненты, слабо связывающиеся с микротрубочками, компоненты, связывающиеся с динеином, и компоненты, образующие небольшие актиноподобные филаменты, состоящие из родственного актину белка Atp1. Считают, что филамент Atp1 опосредует прикрепление этого крупного комплекса к мембранной органелле через сеть спектрина и анкирина, аналогично мембраносвязанному цитоскелету эритроцитов (см. рис. 10.41).



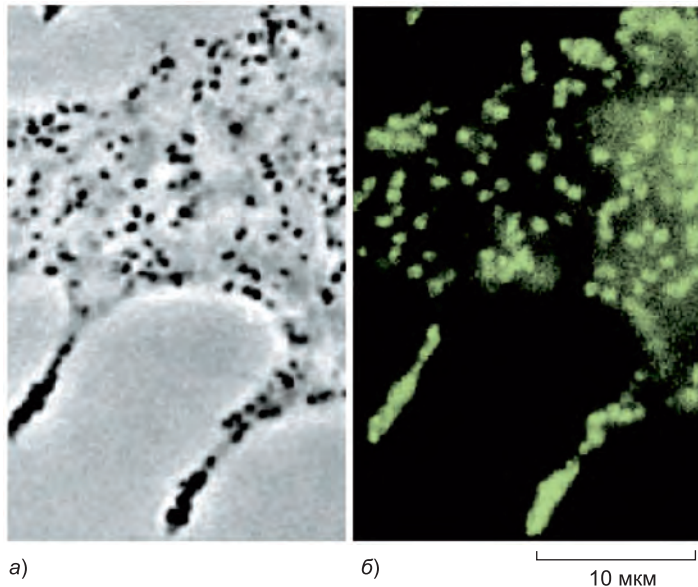


Рис. 16.68. Миозин V на меланосомах. (а) Фазово-контрастное изображение участка изолированного из мыши меланоцита. Черные пятна — это меланосомы, замкнутые мембранные органеллы, заполненные кожным пигментом меланином. (б) Та же клетка, окрашенная флуоресцентным антителом против миозина V. С каждой меланосомой связано множество копий этого моторного белка. (Из X. Wu et al., J. Cell Sci. 110: 847–859, 1997. С любезного разрешения The Company of Biologists.)

16.3.7. Цитоскелет локализует специфические молекулы РНК

Чтобы сконцентрировать белки там, где они должны выполнять свои функции, клетки часто ограничивают синтез определенного белка путем локализации молекул его мРНК. Этот процесс определяет асимметрию клеток и особенно важен при делении родительской клетки на две дочерние с разными путями развития. Другим примером служат некоторые мРНК участвующих в работе синапсов белков. Эти мРНК расположены вблизи синапсов многих нейронов, и опыты показывают, что контроль их локализации и трансляции играет важную роль в регуляции долговременной памяти и синаптической гибкости. Неудивительно, что в таких случаях цитоскелет и цитоскелетные моторные белки транспортируют и локализуют мРНК.

В гигантском ооците *Drosophila* большое число кодируемых матерью мРНК локализовано в специфических участках клетки, где они ожидают быстрых процессов спецификации, протекающих на ранних стадиях эмбриогенеза (см. главу 22). Группа мРНК, кодирующих необходимые для правильного развития задней области зародыша белки, включая клетки зародышевой линии, расположена в задней части ооцита. Аналогично другая группа мРНК, кодирующих белки передней части зародыша, расположена в передней части ооцита.

Ооцит использует поляризованную систему микротрубочкового цитоскелета, в которой большая часть минус-концов располагается в передней части, а плюс-концов — в задней, для организации такого распределения мРНК. Например, мРНК, кодирующая Bicoid, фактор транскрипции, необходимый для развития головной части зародыша, несет в 3'-нетранслируемой области структуру, связывающую белок

Swallow, который, в свою очередь, связывает легкую цепь цитоплазматического динеина. По-видимому, это приводит к транспорту мРНК к минус-концу микротрубочки в передней части клетки. Транспорт мРНК, кодирующей *Oskar*, белок, необходимый для развития клеток зародышевой линии в задней части зародыша, происходит в сторону плюс-концов микротрубочек. Заякоривание мРНК в сайтах их локализации после доставки по микротрубочкам, по-видимому, осуществляется при участии кортикального актинового цитоскелета. мРНК, кодирующая *Oskar*, например, напрямую связывается с актин-связывающим белком моззином, входящим в семейство ERM.

В некоторых клетках транспорт и заякоривание мРНК зависят от актина. Материнская и дочерняя клетки дрожжей во многом не похожи друг на друга, на что указывают значительные различия при последующем переключении типа спаривания (см. главу 7) и выбор ими следующего сайта почкования. Многие из этих различий обусловлены белком-регулятором генов *Ash1*. мРНК *Ash1* и сам белок локализованы исключительно в растущей почке и, следовательно, остаются в дочерней клетке. Один из двух миозинов типа V дрожжевых клеток — *Myo4*, играет ключевую роль в асимметричном распределении мРНК *Ash1*. Генетический скрининг мутаций, снимающих различия между материнской и дочерней клетками, показал, что для нормальной полярности требуется еще по крайней мере шесть связанных с цитоскелетом генных продуктов, включая формины, тропомиозин, профилин и актин, а также комплекс двух белков, образующих связь между специфической последовательностью мРНК *Ash1* и миозином V (рис. 16.69).

16.3.8. Клетки регулируют функционирование моторных белков

Клетки способны регулировать активность моторных белков и, следовательно, менять положение мембранных органелл или контролировать движение клетки как целого. Одним из наиболее ярких примеров являются меланоциты рыб. Эти огромные клетки, отвечающие за быстрое изменение окраски нескольких видов рыб, содержат крупные пигментные гранулы, способные изменять свое положение при нервной или гормональной стимуляции (рис. 16.70). Пигментные гранулы агрегируют или распадаются за счет движения по сети микротрубочек. Эти микротрубочки отходят от centrosомы, и их минус-концы располагаются в центре клетки, а плюс-концы — на периферии.

Наблюдение за отдельными пигментными гранулами (рис. 16.71) показало, что движение к центру происходит быстро и плавно, тогда как движение к периферии резкое, с многочисленными шагами в обратном направлении. С пигментными гранулами связаны моторы микротрубочек динеин и кинезин, а также актиновый мотор миозин V. Резкое движение к периферии, по-видимому, является следствием конкуренции между микротрубочковыми моторными белками, в которой побеждает более сильный кинезин. Фосфорилирование легких цепей кинезина при гормональной стимуляции является сигналом к изменению цвета кожи. Кинезин инактивируется, и динеин быстро переносит пигментные гранулы к центру клетки, изменяя окраску рыбы. Точно так же движение покрытых определенными моторными белками органелл регулируется сложным равновесием между конкурирующими сигналами, контролирующими прикрепление и активность моторных белков.

Клетка также использует фосфорилирование для регуляции активности миозина. В немышечных клетках миозин II может фосфорилироваться по нескольким сайтам на тяжелых и легких цепях, что влияет на его активность и сборку толстых филаментов. В таких клетках миозин II существует в двух конформационных

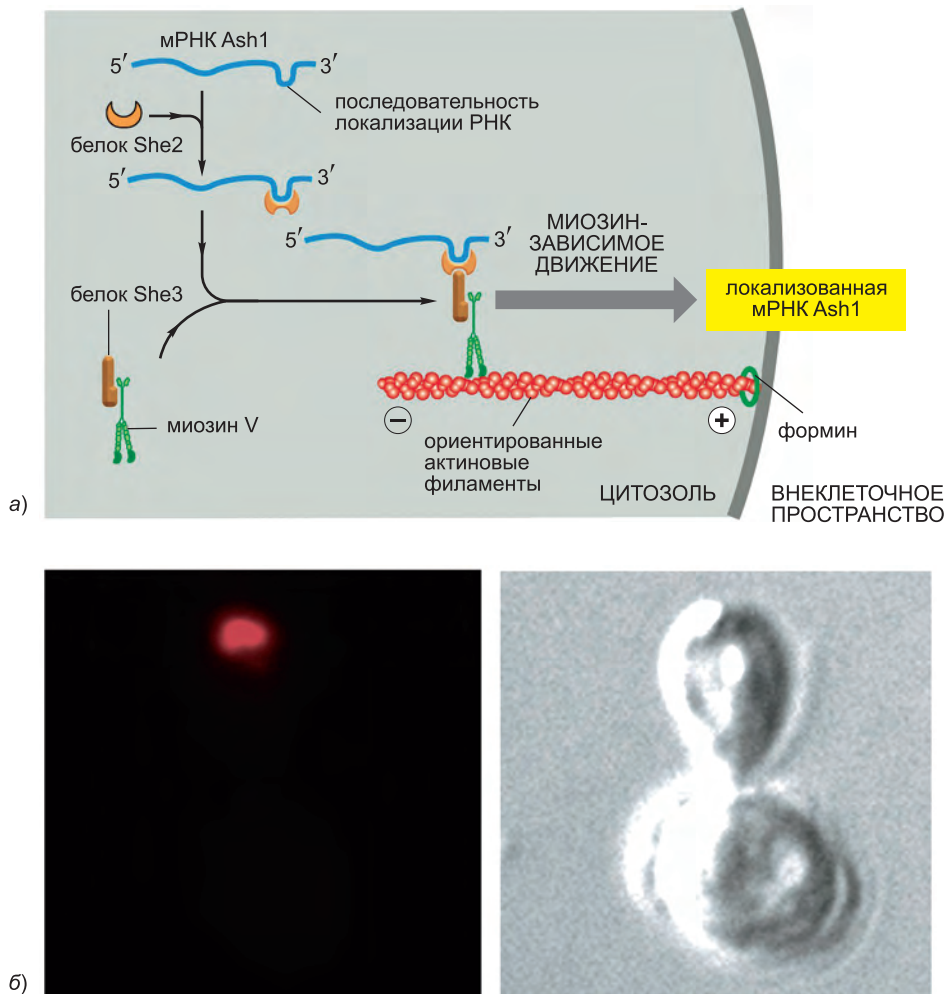


Рис. 16.69. Полярная локализация мРНК в кончике дрожжевой почки. (а) Молекулярный механизм локализации мРНК Ash1, расшифрованный генетическими и биохимическими методами. (б) Для локализации мРНК Ash1 (красная) в делящейся дрожжевой клетке использовали флуоресцентную гибридизацию *in situ* (FISH). мРНК располагается в верхушке дочерней клетки (здесь все еще крупная почка). Белок Ash1, транскрибируемый с этой мРНК, также располагается в дочерней клетке. (б, с любезного разрешения Peter Takizawa и Ron Vale.)

состояниях: расправленном, образующем биполярные филаменты, и свернутом, в котором хвостовой домен, по-видимому, взаимодействует с моторной головкой. Фосфорилирование регуляторной легкой цепи кальций-зависимой киназой *легких цепей миозина* (*Myosin Light-Chain Kinase, MLCK*) заставляет миозин принимать развернутую конформацию, способствующую сборке биполярных филаментов и сокращению клеток (рис. 16.72). MLCK также активируется во время митоза, приводя к встраиванию миозина II в актиновое сократительное кольцо, разделяющее клетку надвое. Как мы обсудим ниже, фосфорилирование миозина также играет важную роль в регуляции сокращения гладкомышечных клеток. Регуляция других

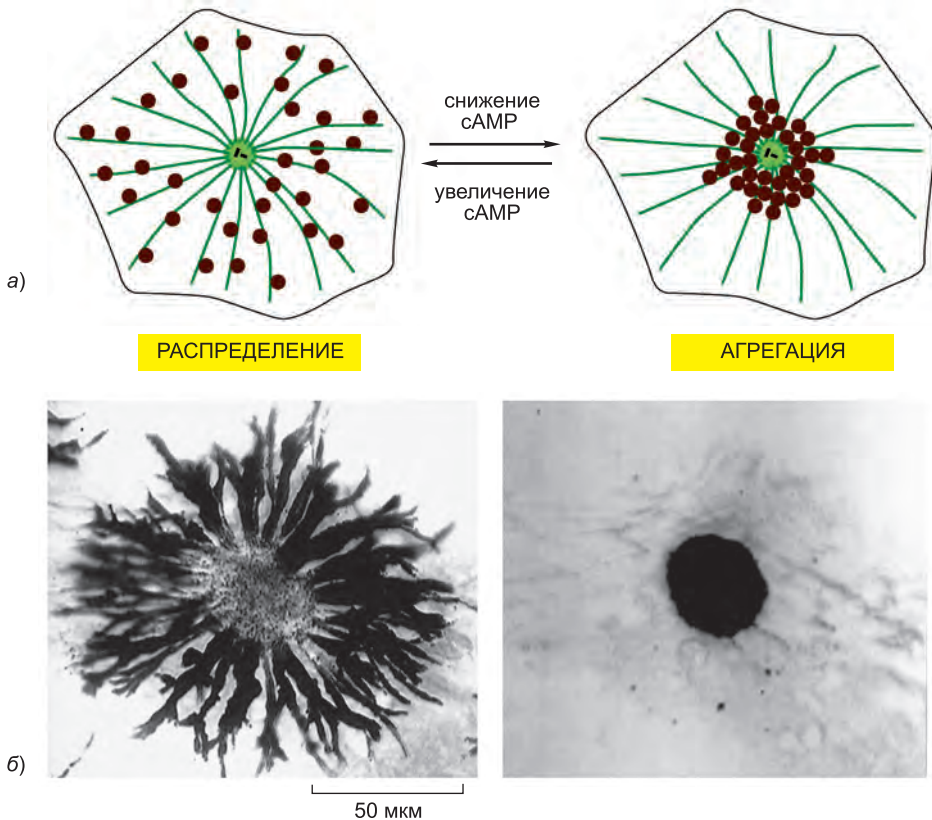


Рис. 16.70. Контролируемое движение меланосом в пигментных клетках рыб. Эти гигантские клетки, отвечающие за изменение окраски кожи нескольких видов рыб, содержат крупные пигментные гранулы, или меланосомы (коричневые). Меланосомы могут изменять положение в клетке в ответ на гормональный или нервный стимул. (а) Схема пигментной клетки, показывающая рассредоточение и агрегацию меланосом в ответ на снижение или увеличение внутриклеточного циклического АМР (сАМР) соответственно. Меланосомы движутся по микротрубочкам. (б) Светлопольное изображение отдельной клетки чешуйки африканской цихлиды. Слева меланосомы равномерно распределены по клетке, справа они агрегированы в центре. (б, любезного разрешения Leah Haimo.)

представителей суперсемейства миозина менее изучена, но, по-видимому, также осуществляется посредством сайт-специфического фосфорилирования.

Заключение

Моторные белки используют энергию гидролиза АТФ для движения вдоль микротрубочек и актиновых филаментов. Они опосредуют скольжение филаментов относительно друг друга и транспорт груза вдоль полимеров. Все известные белки, движущиеся по актиновым филаментам, принадлежат суперсемейству миозинов. Моторные белки, движущиеся по микротрубочкам, принадлежат либо суперсемейству кинезинов, либо семейству динеинов. Суперсемейства кинезинов и миозинов разнообразны; у человека примерно 40 генов кодируют

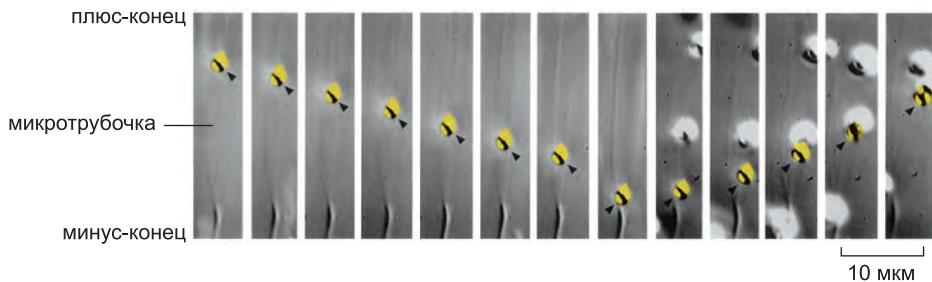


Рис. 16.71. Двухнаправленное движение меланосомы по микротрубочке. Изолированная меланосома (желтая) движется вдоль микротрубочки, помещенной на стеклянную подложку, от плюс-конца к минус-концу. В середине видеозаписи она резко меняет направление и начинает двигаться от минус-конца к плюс-концу. (Из S. L. Rogers et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 3720–3725, 1997. С любезного разрешения Национальной академии наук США.)

каждый тип белков. Представители суперсемейства несут сходные «головные» домены. Эти головки шиты с разнообразными «хвостами», присоединяющими различные типы грузов и позволяющими представителям семейства выполнять в клетке разные функции, включая транспорт и локализацию определенных белков, мембранных органелл и мРНК.

Несмотря на то что миозин и кинезин движутся по разным полимерам и используют различные механизмы для генерации силы и движения за счет гидролиза АТФ, они обладают одинаковой структурной сердцевиной, что указывает на их общего предка. Моторный белок динеин эволюционировал независимо и обладает индивидуальной структурой и механизмом работы.

16.4. Цитоскелет и функционирование клетки

Во всех областях клеточной биологии основной задачей является понимание того, как функции отдельных молекулярных компонентов объединяются для формирования сложного поведения клетки. Свойства клетки, которые мы опишем в данном разделе, основаны на использовании компонентов и процессов, рассмотренных нами в первых трех разделах главы: на динамической сборке и разборке цитоскелетных полимеров, регуляции и модификации их структуры ассоциированными с полимерами белками и функционировании движущихся вдоль полимеров моторных белков. Как клетка координирует все эти активности для изменения своей формы, ползания или точного деления надвое при митозе? Эти вопросы цитоскелетной координации еще много лет будут занимать ученых.

Чтобы дать представление о современных знаниях, сначала мы обсудим примеры, в которых специализированные клетки выстраивают устойчивые структуры и используют высокоорганизованные моторные белки для смещения филаментов относительно друг друга при крупномасштабных движениях мышц, ресничек и эукариотических жгутиков. Затем мы рассмотрим два важных примера, когда динамика филаментов и активность моторных белков вместе приводят к возникновению сложных самоорганизующихся динамических структур: микротрубочкового веретена деления и актиновых структур, участвующих в ползании клеток. В конце мы рассмотрим удивительную организацию и поведение нервного цитоскелета.

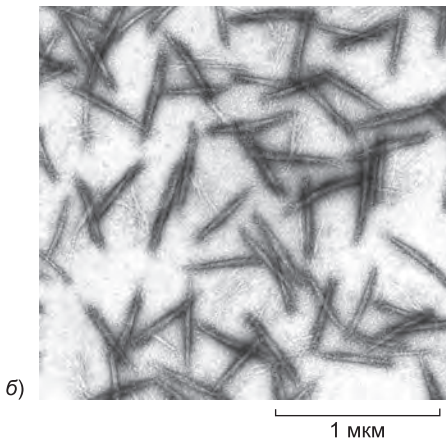
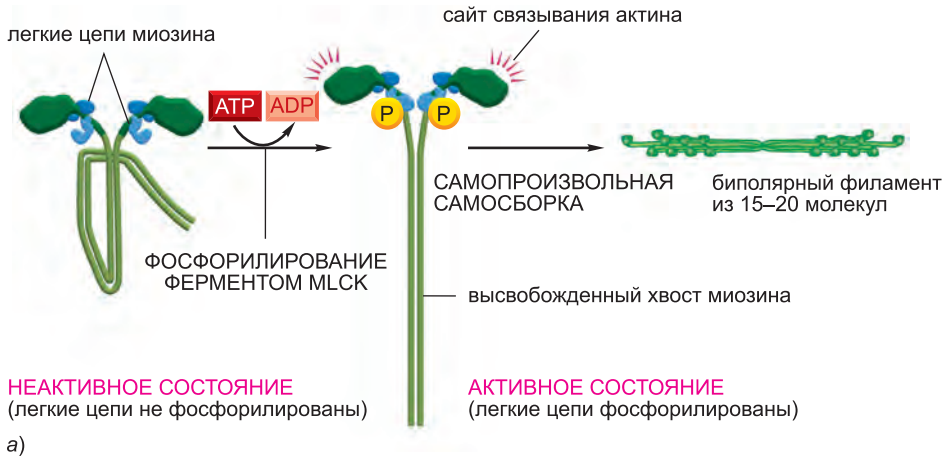


Рис. 16.72. Фосфорилирование легких цепей и регуляция сборки миозина II в толстые филаменты. (а) Регулируемое фосфорилирование ферментом киназой легких цепей миозина (MLCK) одной из легких цепей (так называемой регуляторной цепи, показанной голубым) немышечного миозина II в пробирке приводит по крайней мере к двум эффектам: оно вызывает изменение конформации головки миозина, открывая сайт связывания актина, и высвобождает хвост белка из связи с головкой, позволяя молекулам белка собираться в короткие биполярные толстые филаменты. (б) Электронная микрофотография негативно окрашенных толстых филаментов миозина II, сборку которых в пробирке инициировали фосфорилированием их легких цепей. Эти филаменты миозина II значительно меньше, чем филаменты клеток скелетных мышц (см. рис. 16.55). (б, с любезного разрешения John Kendrick-Jones.)

16.4.1. Скольжение миозина II и актиновых филаментов приводит к сокращению мышц

Сокращение мышц — наиболее изученная и понятная форма движения животных. У позвоночных бег, ходьба, плавание и полет зависят от быстрого сокращения скелетных мышц на поддерживающих их костях, а непроизвольные движения, например биение сердца или перистальтика кишечника, зависят от сокращения сердечной и гладких мышц соответственно. Все эти формы мышечного сокращения основаны на АТФ-зависимом скольжении высокоорганизованных актиновых филаментов относительно филаментов, состоящих из миозина II.

Скелетные мышцы являются относительно поздним эволюционным изобретением, и мышечные клетки обладают высокой специализированностью, направленной на быстрое и эффективное сокращение. Длинные тонкие мышечные волокна скелетных мышц представляют собой отдельные клетки, формирующиеся в развитии путем слияния отдельных клеток (см. главу 22). Крупные мышечные клетки сохраняют многочисленные ядра, располагающиеся вблизи плазматической мембраны (рис. 16.73). Существенная часть цитоплазмы состоит из миофибрилл — основных сократительных элементов мышечной клетки. **Миофибрилла** — это цилиндрическая структура диаметром 1–2 мкм; ее длина часто равна длине самой гигантской мышечной клетки. Она состоит из длинной регулярной цепи сократительных единиц — *саркомеров* длиной около 2,2 мкм. Саркомеры придают миофибриллам позвоночных характерную полосатость (рис. 16.74).

Саркомер представляет собой высокоорганизованную структуру, образованную параллельными, частично перекрывающимися тонкими и толстыми филаментами. *Тонкие филаменты* состоят из актина и ассоциированных с ним белков, и плюс-концом они соединяются с *Z-диск*ом на конце саркомера. Кэпированные минус-концы актиновых филаментов располагаются в центре саркомера, где они перекрываются с *толстыми филаментами*, биполярными структурами, образованными специфическими мышечными изоформами миозина II (см. рис. 16.55). На электронных микрофотографиях поперечных срезов участка перекрывания видно, что миозиновые филаменты образуют шестиугольную решетку, а актиновые

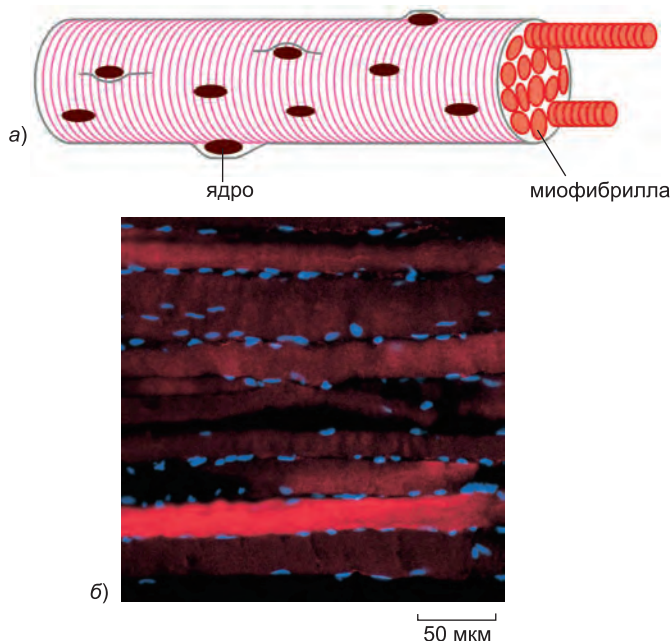


Рис. 16.73. Клетки скелетных мышц (мышечные волокна). (а) Эти огромные многоядерные клетки образуются в результате слияния множества клеток-предшественников, носящих название миобласты. У взрослого человека диаметр мышечной клетки обычно составляет 50 мкм, а длина может достигать нескольких сантиметров. (б) Флуоресцентная микрофотография мышцы крысы. Ядра (синие) в этой гигантской клетке располагаются на периферии. Миофибриллы окрашены красным; см. также рис. 23.46, б. (б, с любезного разрешения Nancy L. Kedersha.)

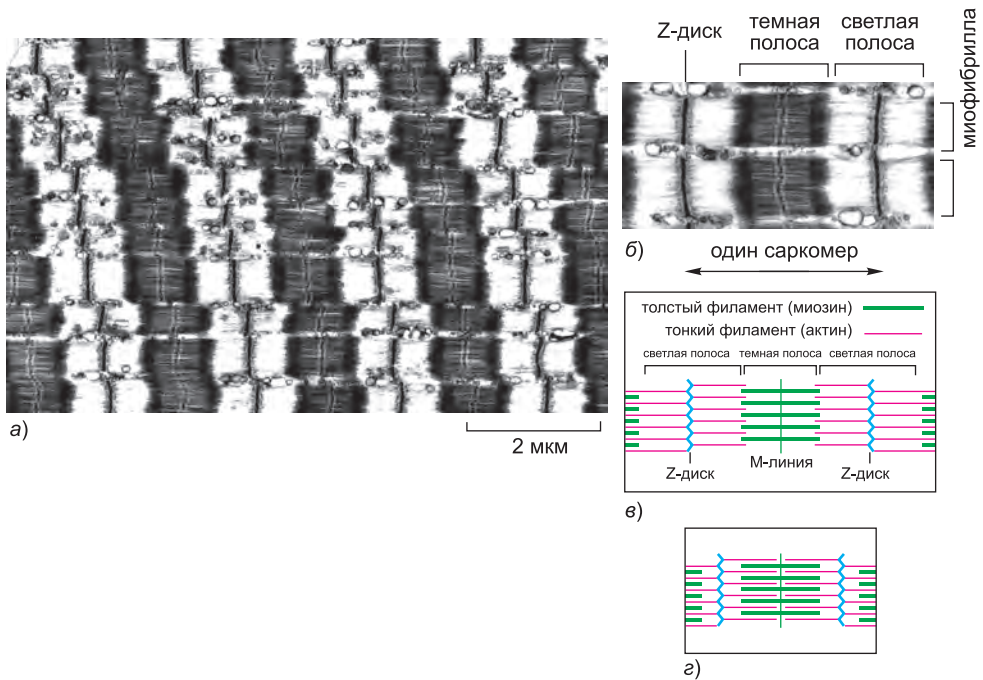


Рис. 16.74. Миофибриллы скелетных мышц. (а) На электронной микрофотографии малого увеличения продольного среза клетки скелетной мышцы кролика видна регулярная поперечная исчерченность. Клетка содержит множество миофибрилл, уложенных параллельно (см. рис. 16.73, а). (б) Область показанной на (а) скелетной мышцы. Видны участки двух прилегающих миофибрилл и целый саркомер (черная стрелка). (в) Схема отдельного саркомера, показывающая, откуда берутся темные и светлые полосы на электронных микрофотографиях. Z-диски на концах саркомера служат сайтами прикрепления плюс-концов актиновых филаментов (тонких филаментов); в М-линии, или мезофрагме, расположены белки, связывающие соседние филаменты миозина II (толстые филаменты) друг с другом. Темные полосы, соответствующие толстым филаментам, иногда называют А-дисками, поскольку в поляризованном свете они кажутся анизотропными (то есть их коэффициент отражения меняется в зависимости от плоскости поляризации). Светлые полосы, содержащие только тонкие филаменты и поэтому несущие меньше белка, относительно изотропны, и иногда их называют I-дисками. (г) При сокращении саркомера актиновые и миозиновые филаменты скользят относительно друг друга без изменения своей длины. (а и б, с любезного разрешения Roger Craig.)

филаменты равномерно распределены между ними (рис. 16.75). Сердечная и гладкие мышцы также содержат саркомеры, но там они уложены не так регулярно, как в скелетных мышцах.

Укорочение саркомера вызывается скольжением миозиновых филаментов относительно актиновых тонких филаментов без изменения длины и тех, и других (рис. 16.74, в и г). Биполярные толстые филаменты движутся в противоположных направлениях в сторону плюс-концов двух групп тонких филаментов за счет работы десятков независимых миозиновых головок, взаимодействующих с тонкими филаментами. Поскольку движения миозиновых головок не скоординированы, очень важно, чтобы они работали с низкой процессивностью, оставаясь в связанном с актиновым филаментом состоянии только небольшую часть АТРазного цикла и не мешая друг другу. Толстый филамент миозина несет около 300 голо-

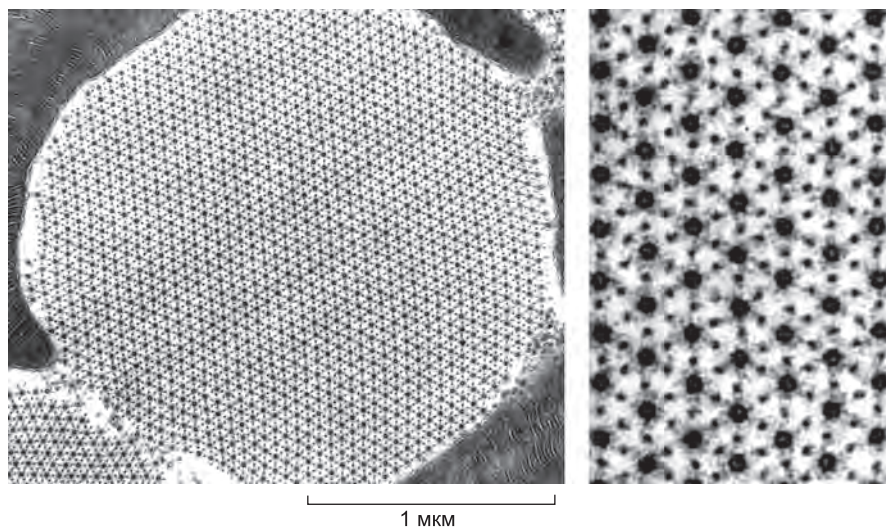


Рис. 16.75. Электронные микрофотографии поперечного среза полетной мышцы насекомого. Миозиновые и актиновые филаменты упакованы практически как кристалл. В отличие от аналогов позвоночных, эти миозиновые филаменты внутри полые, как видно на увеличенном изображении справа. В мышцах позвоночных геометрия шестиугольной решетки несколько отличается. (Из J. Auber et al., *J. de Microsc.* 8: 197–232, 1969. С любезного разрешения Soci t  fran aise de microscopie  lectronique.)

вок (в мышце лягушки — 294), и каждая головка претерпевает АТФ-зависимый цикл примерно пять раз в секунду во время быстрого сокращения, смещая миозиновые и актиновые филаменты относительно друг друга со скоростью до 15 мкм/с и позволяя саркомеру укорачиваться на 10% своей длины менее чем за 1/50 секунды. Быстрое синхронное укорочение тысяч последовательно уложенных в миофибриллу саркомеров позволяет скелетным мышцам сокращаться достаточно быстро для бега, полета или игры на пианино.

Дополнительные белки определяют удивительное единообразие организации, длины и расположения филаментов в саркомере (**рис. 16.76**). Плюс-концы актиновых филаментов заякорены в Z-диске, состоящем из CapZ и α -актинина; Z-диск кэпирует филаменты (препятствуя деполимеризации) и удерживает их в упорядоченном пучке. Длина тонкого филамента определяется огромным белком-шаблоном *небулином*, который практически полностью состоит из повторяющегося, состоящего из 35 аминокислот актин-связывающего мотива. Небулин отходит от Z-диска и оканчивается на минус-конце актинового филамента, представляя собой «молекулярную линейку», задающую длину филамента. Минус-концы тонких филаментов кэпированы и стабилизированы тропоподулином. Несмотря на то что на обоих концах мышечных тонких филаментов происходит медленный обмен актиновых субъединиц с полупериодом оборота компонентов примерно в несколько дней, актиновые филаменты в саркомере удивительно устойчивы по сравнению с динамичными филаментами других типов клеток с полупериодом оборота около нескольких минут и менее.

Противоположные пары более длинного шаблонного белка, *титина*, служат для локализации толстых филаментов между Z-дисками. Титин представляет собой молекулярную «пружину»: он несет множество иммуноглобулин-подобных доме-

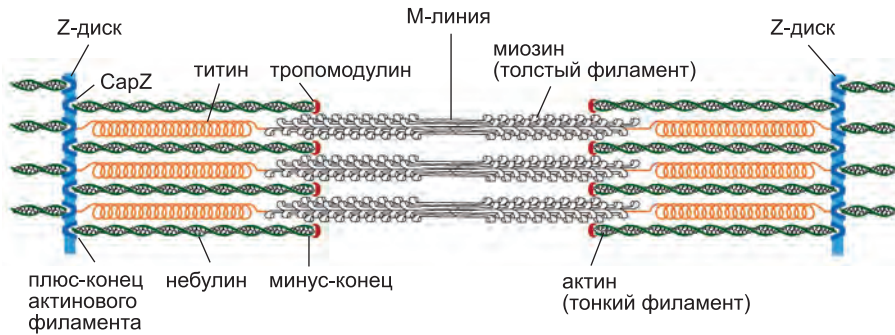


Рис. 16.76. Организация дополнительных белков саркомера. Гигантская молекула титина начинается в Z-диске и заканчивается в M-линии, имея длину более 1 мкм. Часть молекулы титина связана с миозиновым толстым филаментом (меняющим полярность в M-линии); остальная часть молекулы титина эластична и изменяет длину при сокращении и расслаблении саркомера. Длина молекулы небулина точно совпадает с длиной тонкого филамента. Актиновые филаменты также покрыты тропомиозином и тропонином (не показано; см. рис. 16.78) и кэпированы на обоих концах. Тропомодулин кэпирует минус-конец актиновых филаментов, а CapZ закоривает плюс-конец в Z-диске, содержащем также α -актинин.

нов, способных разворачиваться при приложении к белку силы. Разворачивание и повторное сворачивание этих доменов удерживают толстые филаменты в центре саркомера и позволяют мышечным волокнам восстанавливаться после растяжения. У *C. elegans*, чьи саркомеры длиннее, чем у людей, титин также длиннее, что указывает на его функцию молекулярной линейки, определяющей в данном случае длину всего саркомера (см. рис. 3.33).

16.4.2. Мышечное сокращение инициируется внезапным увеличением концентрации цитоплазматического Ca^{2+}

Создающее силу молекулярное взаимодействие между миозиновыми толстыми филаментами и актиновыми тонкими филаментами происходит, только когда скелетная мышца получает сигнал от своего двигательного (моторного) нейрона. После получения сигнала все саркомеры должны очень быстро одновременно укоротиться, т.е. должно произойти сокращение мышечной клетки. Это обеспечивается двумя основными свойствами мышечных клеток. Во-первых, как обсуждалось ранее, отдельные моторные головки миозина в толстом филаменте только небольшую часть своего АТР-цикла проводят в связанном с филаментом состоянии и генерируют силу. В результате на актиновый филамент могут последовательно воздействовать многочисленные миозиновые головки, не мешая друг другу. Во-вторых, специализированная мембранная система быстро распространяет входящий сигнал по всей клетке. Сигнал нерва запускает потенциал действия в плазматической мембране мышечной клетки (см. главу 11), и это электрическое возбуждение быстро распространяется в мембранные складки — поперечные трубочки, или *T-трубочки* (от англ. *transverse* — поперечный), отходящие от плазматической мембраны вокруг миофибриллы. Затем сигнал передается через небольшое пространство в *саркоплазматический ретикулум* — прилегающую сеть модифицированного эндоплазматического ретикулума, окружающего миофибриллу как сетчатый чулок (рис. 16.77, а и б).

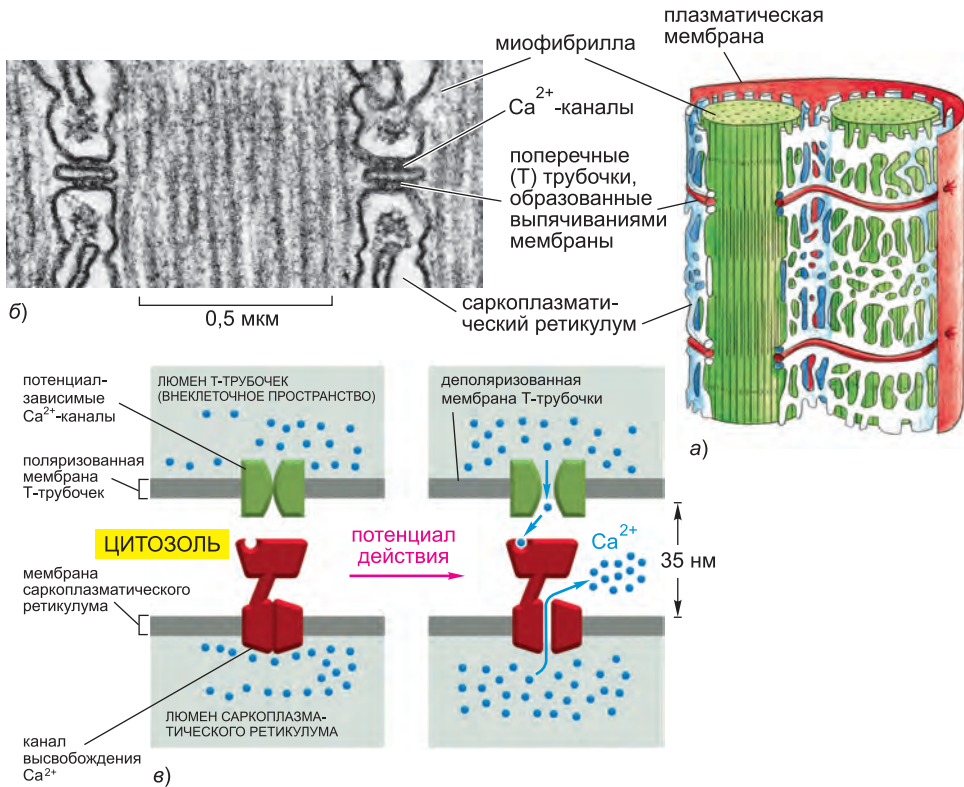


Рис. 16.77. Т-трубочки и саркоплазматический ретикулум. (а) Две мембранные системы, передающие сигнал к сокращению от плазматической мембраны мышечной клетки во все миофибриллы клетки. (б) Электронная микрофотография двух Т-трубочек. Обратите внимание на расположение крупных Ca^{2+} -каналов в мембране саркоплазматического ретикулума; они выглядят, как квадратные «ноги», соединяющие мембраны соседних Т-трубочек. (в) Предположительная схема открывания Ca^{2+} -каналов мембраны саркоплазматического ретикулума в результате активации потенциал-зависимого Ca^{2+} -канала. (б, с любезного разрешения Clara Franzini-Armstrong.)

Когда входящий потенциал действия активирует Ca^{2+} -каналы мембраны Т-трубочек, вход Ca^{2+} инициирует открывание Ca^{2+} -каналов саркоплазматического ретикулума и высвобождение Ca^{2+} (рис. 16.77, в). Приток Ca^{2+} в цитозоль запускает сокращение миофибрилл. Поскольку сигнал от плазматической мембраны мышечной клетки передается в течение миллисекунд (по Т-трубочкам и саркоплазматическому ретикулуму) во все саркомы клетки, все миофибриллы сокращаются одновременно. Увеличение концентрации Ca^{2+} происходит только временно, поскольку Ca^{2+} быстро закачивается обратно в саркоплазматический ретикулум расположенными в его мембране многочисленными АТФ-зависимыми Ca^{2+} -насосами (также называемыми Ca^{2+} -АТРазами) (см. рис. 11.13). Обычно концентрация цитоплазматического Ca^{2+} восстанавливается до уровня покоя через 30 мс, позволяя миофибриллам расслабиться. Таким образом, мышечное сокращение зависит от двух процессов, затрачивающих огромное количество АТФ: скольжения филаментов, зависящего от АТРазы моторного домена миозина, и накачки Ca^{2+} , зависящей от Ca^{2+} -насоса.

Зависимость сокращения скелетных мышц позвоночных от Ca^{2+} и, следовательно, зависимость от двигательных команд, передаваемых нервом, обеспечивается исключительно связанными с актиновыми тонкими филаментами специализированными дополнительными белками. Один из таких белков — мышечная форма *тропомиозина*, удлинённой молекулы, связывающейся вдоль бороздки актиновой спирали, другой — *тропонин*, комплекс трех полипептидов — тропонинов Т (tropomyosin-binding — связывающий тропомиозин), I (inhibitory — ингибиторный) и С (Ca^{2+} -binding — связывающий Ca^{2+}). Тропонин I связывается с актином и тропонином Т. В расслабленной мышце комплекс тропонинов I и Т перемещает тропомиозин из его нормального сайта связывания с актиновым филаментом в положение, где он мешает связыванию головок миозина, препятствуя таким образом генерирующему силу взаимодействию. При повышении уровня Ca^{2+} тропонин С, связывающий до четырех молекул Ca^{2+} , заставляет тропонин I отсоединиться от актина. В результате молекулы тропомиозина возвращаются в свое нормальное положение, и миозиновые головки могут двигаться вдоль актиновых филаментов (рис. 16.78). Тропонин С является близким родственником широко распространенного Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина (см. рис. 15.44); его можно рассматривать как специализированную форму кальмодулина, сформировавшую сайты связывания для тропонина I и тропонина Т и позволившую миофибриллам очень быстро реагировать на увеличение концентрации Ca^{2+} .

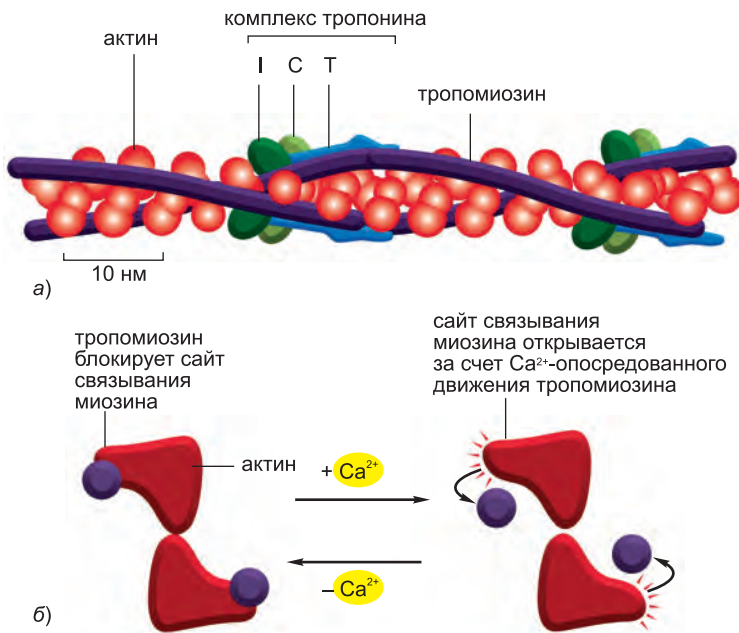


Рис. 16.78. Регуляция сокращения скелетных мышц тропонином. (а) Тонкий филамент клетки скелетной мышцы со связанными тропомиозином и тропонином. Молекула тропомиозина несет семь расположенных на равном расстоянии друг от друга одинаковых аминокислотных последовательностей, связывающихся с актиновыми субъединицами филамента. (б) Вид с торца на актиновый филамент, показывающий, как, предположительно, Ca^{2+} (связывающийся с тропонином) снимает тропомиозиновую блокировку взаимодействия между актином и головкой миозина. (а, адаптировано из G. N. Phillips, J. P. Fillers and C. Cohen, *J. Mol. Biol.* 192: 111–131, 1986. С любезного разрешения издательства Academic Press.)

В гладкомышечных клетках, носящих такое название потому, что они не обладают регулярной исчерченностью скелетных мышц, сокращение также запускается входом ионов кальция, но регуляторный механизм отличается. Гладкие мышцы образуют сокращающиеся части желудка, кишечника и матки, стенки артерий и многие другие структуры, от которых требуется продолжительное медленное сокращение. Гладкие мышцы состоят из слоев удлинённых веретенообразных клеток, каждая из которых несёт по одному ядру. В гладких мышцах тропонины не экспрессируются. Вместо этого, вход Ca^{2+} в клетку регулирует сокращение по двум механизмам, зависящим от кальций-связывающего белка кальмодулина.

Сначала Ca^{2+} -связанный кальмодулин связывает актин-связывающий белок кальдесмон, блокирующий сайты на актине, к которым в норме присоединяются моторные головки миозина. В результате кальдесмон отваливается от актиновых филаментов, подготавливая их к сокращению. Затем гладкомышечный миозин фосфорилируется по одной из двух легких цепей киназой легких цепей миозина (MLCK), как описывалось ранее для случая регуляции немышечного миозина II (см. рис. 16.72). Когда легкая цепь фосфорилирована, головки миозина способны взаимодействовать с актиновыми филаментами и вызывать сокращение; когда она дефосфорилирована, миозиновые головки диссоциируют от актина и становятся неактивными (в отличие от случая немышечного миозина II, дефосфорилирование легкой цепи не вызывает разборку толстых филаментов в гладкомышечных клетках). Для полной активности MLCK требуются Ca^{2+} и кальмодулин.

Внеклеточные сигнальные молекулы, например адреналин (эпинефрин), также способны регулировать сократительную активность гладких мышц. Связывание адреналина с сопряженным с G-белком поверхностным рецептором вызывает увеличение внутриклеточной концентрации циклического АМР, что, в свою очередь, активирует сАМР-зависимую протеинкиназу (РКА) (см. рис. 15.35). РКА фосфорилирует и инактивирует MLCK, вызывая расслабление гладких мышц.

Фосфорилирование, регулирующее сокращение гладкомышечных клеток, происходит относительно медленно. Для максимального сокращения часто требуется почти секунда (тогда как для сокращения клетки скелетных мышц требуется несколько миллисекунд). Но быстрая активация сокращения для гладких мышц не важна: их миозин II гидролизует АТР примерно в 10 раз медленнее, чем миозин скелетных мышц, и его медленный цикл конформационных перестроек приводит к медленному сокращению.

16.4.3. Сердечная мышца — это точно сконструированная машина

Сердце — это самая активно работающая мышца тела, сокращающаяся около 3 миллиардов (3×10^9) раз за человеческую жизнь. Это примерно столько же, сколько оборотов в среднем делает двигатель внутреннего сгорания автомобиля за время его эксплуатации. Клетки сердца экспрессируют несколько специфических изоформ миозина и актина сердечной мышцы. Малейшие изменения этих экспрессируемых в сердце белков, которые в других тканях не привели бы к заметным последствиям, могут вызвать серьезные сердечные заболевания (рис. 16.79).

Нормальный сократительный аппарат сердца представляет собой точно настроенную машину. Самые незначительные, на первый взгляд, нарушения где-либо в работе сердца способны износить его за годы повторяющихся движений. Семейная гипертрофическая кардиомиопатия является частой причиной внезапной смерти молодых атлетов. Это доминантное наследственное заболевание встречается при-

Рис. 16.79. Влияние мутации сердечного миозина на сердце. Слева, нормальное сердце шестидневного мышонка. Справа, сердце мышонка с точечной мутацией в обоих копиях гена сердечного миозина, приводящая к замене Arg 403 на Gln. Стрелки указывают на предсердия. В сердце мышонка с мутацией сердечного миозина оба предсердия увеличены (гипертрофированы), и такие мыши умирают через несколько недель после рождения. (Из D. Fatkin et al., *J. Clin. Invest.* 103: 147, 1999. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)



мерно у двух из тысячи человек. Оно связано с увеличением сердца, патологически узкими коронарными сосудами и нарушениями сердечного ритма (сердечными аритмиями). Причиной этого заболевания является или одна из более 40 небольших мутаций генов, кодирующих тяжелую цепь сердечного миозина β (почти все они располагаются вблизи моторного домена или непосредственно в нем), или же одна из примерно двенадцати мутаций других генов, кодирующих сократительные белки, включая легкие цепи миозина, сердечный тропонин и тропомиозин. Незначительные бессмысленные мутации гена сердечного актина вызывают другое заболевание, носящее название *дилатационная кардиомиопатия*, которая также является частой причиной ранней остановки сердца.

16.4.4. Реснички и жгутики — это подвижные структуры, состоящие из микротрубочек и динеинов

Точно так же как миофибриллы — это высокоспециализированные и эффективные подвижные машины, сконструированные из актиновых и миозиновых филаментов, реснички и жгутики — это высокоспециализированные подвижные структуры, состоящие из микротрубочек и динеина. Реснички и жгутики — это похожие на волоски выросты клетки, несущие в центре пучок микротрубочек. **Жгутики** встречаются у многих простейших и у сперматозоидов. Благодаря своему волнообразному движению они позволяют клеткам плавать в жидкой среде (рис. 16.80, а). **Реснички** обычно короче жгутиков, но организованы сходным образом. Их биение напоминает взмахи кнутом или плавание брассом (рис. 16.80, б). Циклы расположенных рядом ресничек почти, но не совсем синхронны, что создает волнообразное движение, которое можно наблюдать в микроскоп при биении множества ресничек. Биение ресничек может лежать в основе движения отдельной клетки (как при плавании простейшего *Paramecium*) либо обеспечивать омывание жидкостью поверхности группы клеток в ткани. В человеческом теле огромное число ресничек ($10^9/\text{см}^2$ или больше) выстилает дыхательный тракт, перемещая слой слизи, попавшие в организм со вдохом частицы пыли и бактерии вверх к ротовой полости, где они проглатываются и в конце концов уничтожаются. Точно так же, жгутики фаллопиевых труб способствуют движению яйцеклетки в матку.

Движение реснички или жгутика основано на сгибании его сердцевины, носящей название аксонема. Аксонема состоит из микротрубочек и ассоциированных с ними белков, уложенных в определенную регулярную структуру. Девять особых двойных микротрубочек (состоящих из одной целой и одной неполной микротрубочек, слитых вместе таким образом, что они делят единую стенку) образуют кольцо вокруг пары

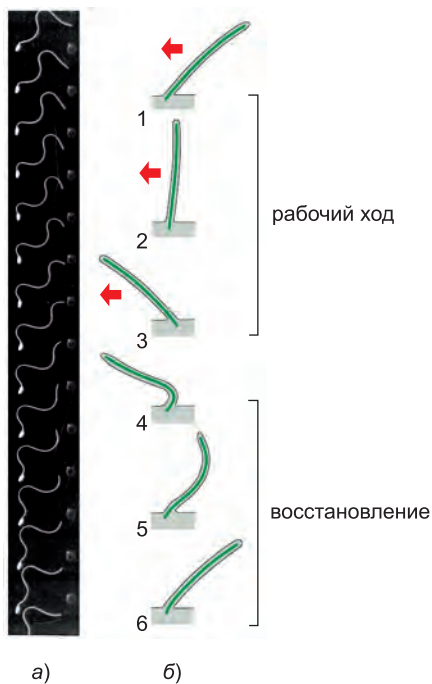


Рис. 16.80. Различия между движением жгутиков и ресничек. (а) Волнообразное движение жгутика сперматозоида трески. Клетку фотографировали при стробоскопическом освещении с 400 вспышками в секунду. Обратите внимание, что от основания до кончика жгутика непрерывно идут волны постоянной амплитуды. (б) Биеение реснички, напоминающее плавание брассом. Быстрый рабочий ход (красные стрелки), при котором жидкость проходит по поверхности клетки, сменяется медленным восстановлением. Цикл обычно занимает 0,1–0,2 с и генерирует силу, перпендикулярную оси аксонемы (сердцевины реснички). (а, с любезного разрешения С. J. Brokaw.)

отдельных микротрубочек (рис. 16.81). Почти все формы эукариотических жгутиков и ресничек (встречающихся от простейших до человека) обладают этой характерной структурой. Микротрубочки непрерывно расположены по длине аксонемы, которая может составлять 10–200 мкм. На равных расстояниях вдоль микротрубочек располагаются дополнительные белки, сшивающие микротрубочки вместе.

Молекулы *ресничного (аксонемного) динеина*

образуют мостики между соседними двойными микротрубочками на периферии аксонемы (рис. 16.82). Когда моторный домен динеина активируется, динеиновые молекулы, прикрепленные к одной паре микротрубочек (см. рис. 16.64), стремятся начать двигаться вдоль соседней пары и вызывать скольжение соседних пар относительно друг друга аналогично скольжению актиновых тонких филаментов во время мышечного сокращения. Однако присутствие других связей между парами микротрубочек препятствует этому, и налагаемая динеином сила преобразуется в гибательное движение (рис. 16.83).

Длина жгутиков точно регулируется. Если удалить один из двух жгутиков клетки *Chlamydomonas*, оставшийся временно укоротится. Когда второй жгутик вновь достигнет длины первого, они начнут удлиняться вместе до тех пор, пока не достигнут нормального размера, характерного для нетронутой клетки. Новые компоненты, включая тубулин и динеин, встраиваются в растущий жгутик на его верхушке. Таким образом, даже в случае таких высокоупорядоченных и стабильных подвижных филаментных структур клетка использует присущие цитоскелету гибкость и адаптивность для быстрого и динамичного ответа на изменения условий.

У человека наследственные дефекты ресничного динеина приводят к синдрому Картагенера. Это заболевание характеризуется мужским бесплодием, вызванным неподвижностью сперматозоидов, высокой восприимчивостью к легочным инфекциям, основанной на параличе ресничек дыхательного тракта и их неспособности к удалению отходов и бактерий, и нарушениями формирования право-левой оси тела во время раннего эмбрионального развития (см. главу 22).

Бактерии также плавают при помощи поверхностных структур, носящих название жгутиков, но эти жгутики не содержат микротрубочек или динеина. Их

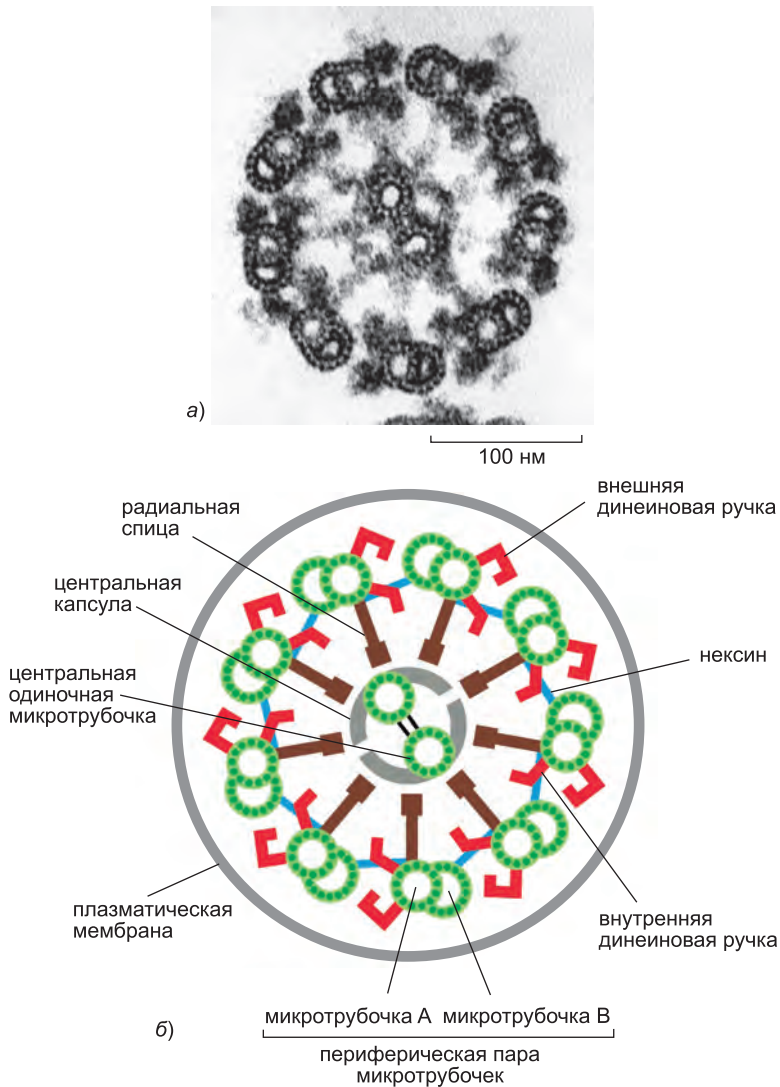


Рис. 16.81. Упаковка микротрубочек в жгутиках и ресничках. (а) Электронная микрофотография поперечного среза жгутика клетки зеленой водоросли (*Chlamydomonas*), показывающая характерную упаковку микротрубочек по принципу «9 + 2». (б) Схема частей жгутика или реснички. Разнообразные выступы микротрубочек связывают их вместе на равных расстояниях по всей длине аксонемы. (а, с любезного разрешения Lewis Tilney.)

движение основано не на биении или волнообразном изгибании. *Бактериальные жгутики* представляют собой длинные, жесткие спиральные филаменты, состоящие из повторяющихся субъединиц белка флагеллина. Жгутики вращаются, как гребной винт, за счет специального вращательного мотора, встроенного в бактериальную клеточную стенку (см. рис. 15.71). Использование одинаковых названий для обозначения принципиально разных эукариотических и прокариотических типов двигательного аппарата — историческая случайность.

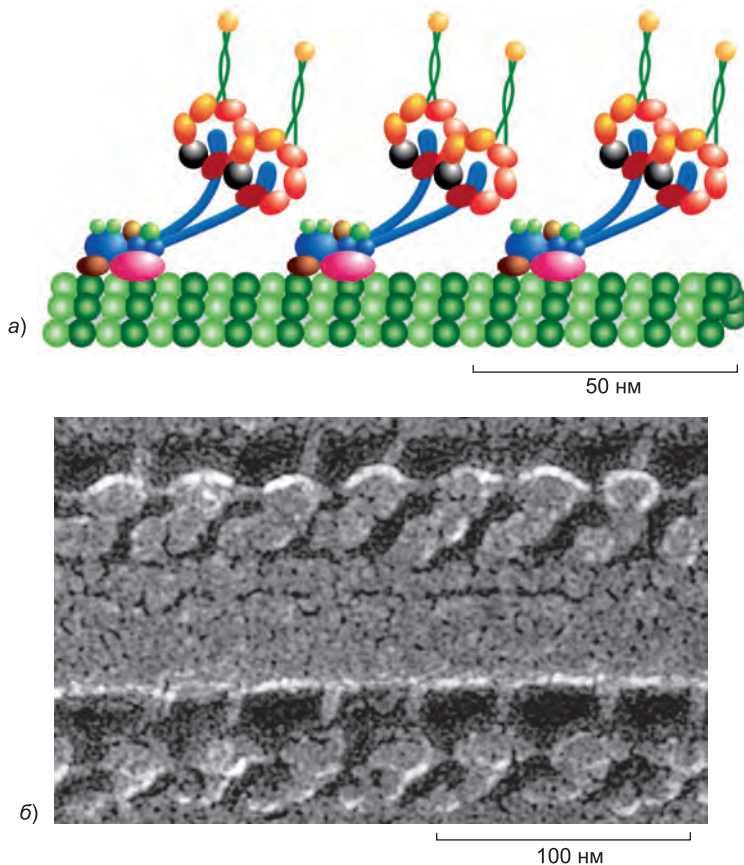


Рис. 16.82. Ресничный динеин. Ресничный (аксонемный) динеин — это крупный белковый комплекс (массой почти 2 000 кДа), состоящий из 9–12 полипептидных цепей, самая большая из которых (тяжелая цепь) имеет массу, превышающую 500 кДа. (а) Тяжелые цепи образуют основную часть глобулярной головки и хвостового домена, а меньшие цепи выстраиваются вокруг основания хвоста. У многоклеточных внешний динеин несет две головки, а у простейших — три, каждая из которых образована своей тяжелой цепью (см. рис. 16.59, б). Хвост молекулы независимо от АТФ связывается с микротрубочкой А, а крупные глобулярные домены несут АТФ-зависимый сайт связывания микротрубочки В (см. рис. 16.81). Когда головки гидролизуют свой АТФ, они движутся в сторону минус-конца микротрубочки В, создавая силу скольжения между соседними парами микротрубочек в ресничке или жгутике. Подробности смотри на рис. 16.64. (б) Полученная методом замораживания электронная микрофотография реснички. Видны расположенные на двойных микротрубочках равноудаленные друг от друга хвосты динеина.

Структуры, носящие название *базальных тельц*, удерживают реснички и жгутики на поверхности клеток. Форма базальных тельц совпадает с формой центриолей, встроенных в середину centrosом животных: и те, и другие представляют собой девять слитых друг с другом тройных микротрубочек, уложенных в форме колеса (**рис. 16.84**). В самом деле, в некоторых организмах базальные тельца и центриоли функционально взаимозаменяемы: во время митоза в одноклеточной водоросли *Chlamydomonas*, например, жгутики поглощаются, и базальные тельца мигрируют внутрь клетки и становятся частью полюсов веретена деления. Новые центриоли и базальные тельца формируются в результате интересного процесса репликации,

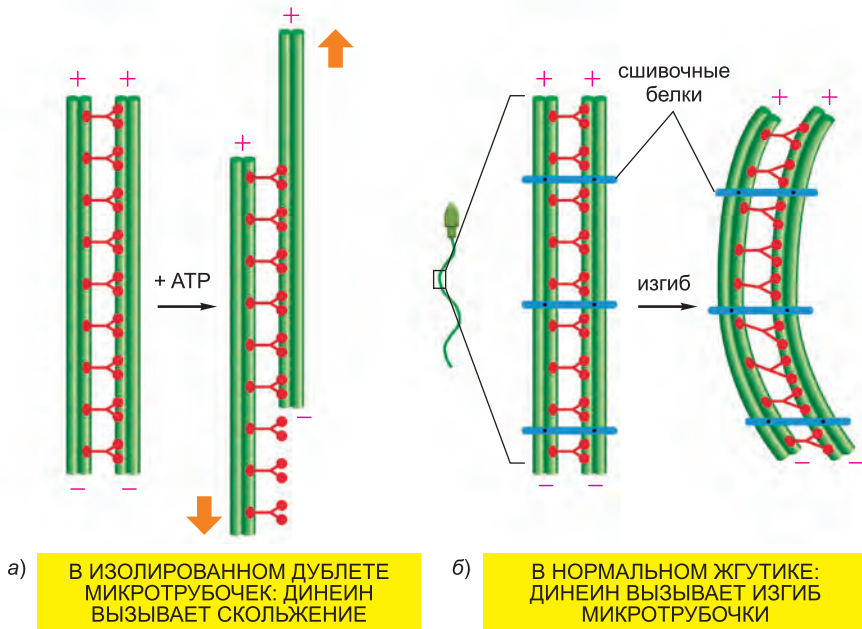


Рис. 16.83. Сгибание аксономы. (а) При обработке аксономы протеолитическим ферментом трипсином связи, удерживающие микротрубочки вместе, разрываются. В данном случае добавление АТФ позволяет головкам динеина смещать пары микротрубочек относительно друг друга. (б) В интактной аксономе (например, в сперматозоиде) гибкие белковые мостики не позволяют парам скользить относительно друг друга. В результате работа динеина приводит к изгибу и волнообразному движению или биению (см. рис. 16.80).

при котором меньшая дочерняя структура образуется перпендикулярно к исходной. Механизм этого процесса до сих пор остается загадкой (см. рис. 17.31).

Даже в животных клетках, в которых отсутствуют развитые реснички или жгутики, центриоли часто инициируют рост неподвижных, обогащенных микротрубочками поверхностных выростов, носящих название *первичных ресничек*. Длина первичных ресничек обычно не превышает нескольких микрометров, и в них отсутствует динеин. Они обнаруживаются на поверхности различных типов клеток, включая фибробласты, эпителиальные клетки, нейроны, костные клетки и хондроциты (клетки хряща). В первичных ресничках концентрируется множество сигнальных белков, включая белки, участвующие в сигнальном пути Hedgehog (см. **стр. 950**), и рецепторы нейромедиаторов в нейронах центральной нервной системы. В эпителиальных клетках почек первичные реснички служат сенсорами тока жидкости через почечные каналы. Когда ток жидкости изгибает первичные реснички, открываются механочувствительные кальциевые каналы, регулирующие рост и пролиферацию клеток почек. Потеря кальциевых каналов или других структурных компонентов первичных ресничек почечных клеток приводит к поликистозной болезни почек — распространенному генетическому нарушению, вызывающему избыточную пролиферацию эпителиальных клеток органа. Это приводит к образованию в почках крупных заполненных жидкостью кист, которые в конце концов вызывают почечную недостаточность. Другой специализированный тип

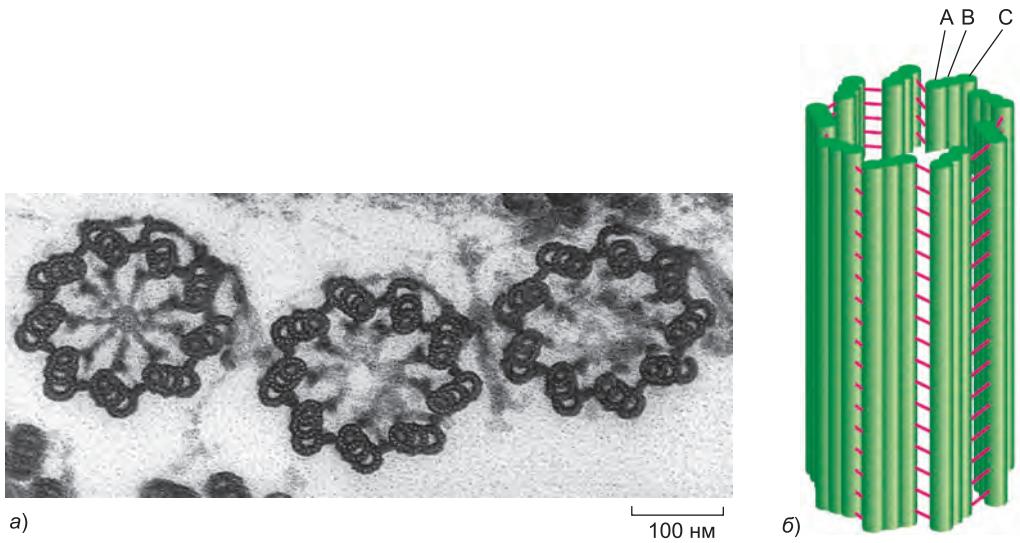


Рис. 16.84. Базальные тельца. (а) Электронная микрофотография поперечного среза через три базальных тельца кортекса простейшего. (б) Вид сбоку на базальное тельце. Базальное тельце образует нижнюю часть аксономы реснички и состоит из девяти тройных микротрубочек, одной полной (А) и двух неполных (В и С). Другие белки (показанные красным на б) образуют мостики, стабилизирующие цилиндрическую структуру микротрубочек. В центриоли микротрубочки упакованы практически так же (см. рис. 16.31). (а, с любезного разрешения D. T. Woodrow и R. W. Linck.)

первичных ресничек, способный к биению, отвечает за формирование право-левой симметрии во время развития зародыша (см. рис. 22.87).

16.4.5. Образование митотического веретена деления требует динамичности микротрубочек и взаимодействия множества моторных белков

Миофибриллы и реснички — относительно постоянные структуры, специализирующиеся на проведении повторяющихся движений. Но большинство видов движения клеток зависит от лабильных структур, возникающих на определенных этапах клеточного цикла или в ответ на внешние сигналы и исчезающих после выполнения своей задачи. Наиболее изученными структурами такого рода являются веретено деления и сократительное кольцо, образующиеся во время деления. В главе 17 мы подробно опишем процесс митоза и систему регуляции клеточного цикла, определяющую последовательность событий клеточного деления. Здесь мы кратко обсудим несколько цитоскелетных механизмов, вносящих вклад в формирование и механическое функционирование веретена деления.

Образование митотического веретена деления — исключительно важный и интересный пример степени самоорганизации групп моторных белков, взаимодействующих с динамичными цитоскелетными филаментами. В этом процессе также активно участвуют хромосомы. Во время быстро сменяющих друг друга событий, протекающих в животной клетке менее чем за час, интерфазная упаковка микротрубочек полностью разбирается и перестраивается с образованием биполярного веретена деления, отвечающего за расхождение с безукоризненной точностью

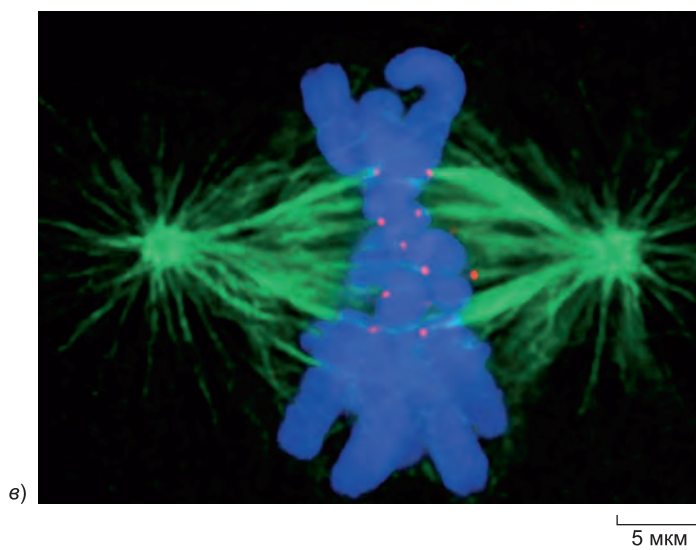
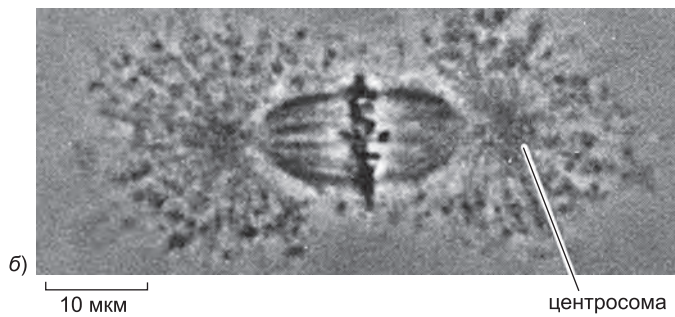
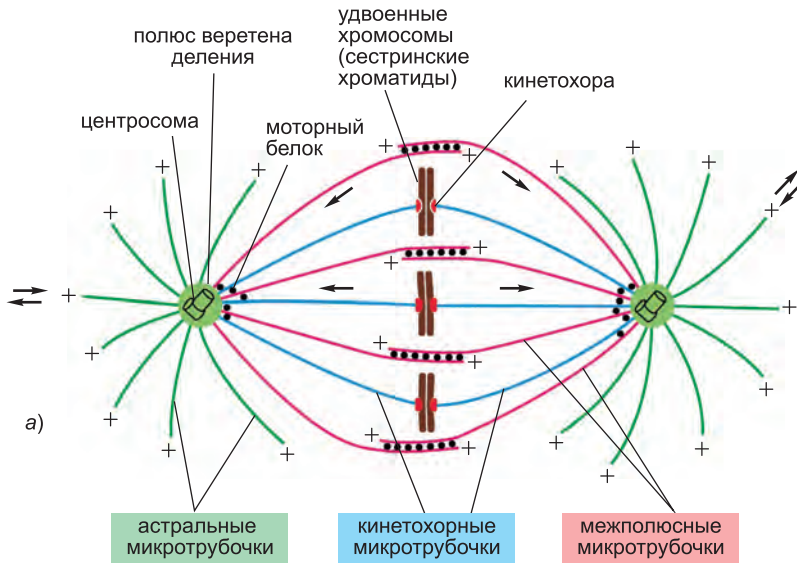
удвоенных хромосом по дочерним клеткам. Поскольку центральная задача — это надежность передачи генетического материала, в образовании и функционировании веретена деления наблюдается удивительная избыточность, благодаря которой в случае нарушения какого-либо механизма ему на смену приходит запасной, обеспечивающий правильное расхождение хромосом.

На ранних стадиях митоза происходят значительные изменения динамического поведения и средней длины микротрубочек. В интерфазе микротрубочки обычно длинные и редко претерпевают катастрофы, но во время митоза они укорачиваются и становятся динамичнее. В областях вокруг конденсированных хромосом усиливаются нуклеация и сборка микротрубочек. По мере сборки направленных в разные стороны микротрубочек на конденсированном хроматине скоординированная работа нескольких моторных белков приводит к образованию из неорганизованной массы микротрубочек упорядоченного биполярного веретена деления. Сначала биполярный кинезин-5 (см. рис. 16.58) образует параллельные пучки микротрубочек и отводит друг от друга противоположно направленные филаменты. Затем связанный с плечами хромосом кинезин-4 движется в сторону плюс-конца ассоциированных с хромосомами микротрубочек и отталкивает их минус-концы от хромосомной массы. Наконец, направленные к минус-концам моторы цитоплазматический динеин и кинезин-14 образуют олигомерные комплексы с каркасными белками, собирающими вместе минус-концы микротрубочек с образованием полюсов веретена деления. В большинстве животных клеток эти процессы направляются парой centrosом, способствующих нуклеации и организации минус-концов микротрубочек. В результате получается изящно сбалансированное биполярное веретено деления (рис. 16.85).

После сборки биполярного веретена деления оно может долгое время казаться стабильным и неподвижным. У многих млекопитающих неоплодотворенная яйцеклетка останавливает клеточный цикл в мейотической метафазе, и веретено деления сохраняется днями и месяцами до тех пор, пока оплодотворение не инициирует дальнейший ход клеточного цикла (см. главу 21). Однако такая неподвижность обманчива, поскольку веретено деления представляет собой крайне динамичную структуру, напряженную в ожидании действия, которое начнется, когда хромосомы начнут расходиться в анафазе. Например, многим микротрубочкам веретена деления свойственно поведение, носящее название *полюсного тока*, при котором на плюс-конце суммарно происходит присоединение тубулиновых субъединиц, а на минус-конце вблизи полюса веретена — их потеря. Полюсный ток зависит от работы направленных к минус-концу моторных белков в полюсе, непрерывно собирающих микротрубочки вместе, и биполярного, направленного к плюс-концу кинезина-5 на межполюсных микротрубочках, постоянно отталкивающего их друг от друга (см. рис. 16.85). Как будет рассмотрено в главе 17, тонкое равновесие между этими двумя типами моторных белков в веретене деления также определяет его длину. В целом, веретено деления представляет собой результат коллективной работы, объединяющей динамические свойства микротрубочек с индивидуальным действием десятков молекулярных моторов и других компонентов.

16.4.6. Многие клетки способны ползать по твердому субстрату

Процесс ползания клеток служит еще одним примером кооперации между динамической сборкой цитоскелетных филаментов, филаментными регуляторами и моторными белками. Многие клетки перемещаются в пространстве посредством



ползания по поверхности, а не плавания при помощи жгутиков или ресничек. Хищные амёбы непрерывно ползают в поисках пищи: в капле прудовой воды можно легко наблюдать, как они атакуют и поглощают меньших по размеру жгутиковых и инфузорий. Почти все клетки животных передвигаются посредством ползания, за исключением плавающих сперматозоидов. Во время эмбриогенеза структура организма создается за счет миграции отдельных клеток в определенные положения и за счет скоординированных движений слоев эпителия (см. главу 23). У позвоночных *клетки нервного гребня* выделяются своей способностью мигрировать на большие расстояния из нервной трубки, где они зарождаются, в различные участки зародыша. Ползание лежит в основе построения всей нервной системы: с его помощью обогащенные актином конусы роста на концах развивающихся аксонов путешествуют к своим синаптическим мишеням, направляемые сочетанием растворимых сигналов и сигналов, связанных с поверхностью клеток и внеклеточным матриксом.

Взрослые животные также несут множество ползающих клеток. Макрофаги и нейтрофилы ползут к очагам инфекции и поглощают чужеродные объекты, обеспечивая важную часть врожденного иммунного ответа. В непрерывном процессе костного обновления и перестройки остеокласты прокладывают каналы в костях, заполняемые следующими за ними остеобластами. Точно так же фибробласты способны мигрировать по соединительным тканям, по необходимости перестраивая их и способствуя восстановлению поврежденных структур в местах травм. Клетки эпителиального слоя кишечника упорядоченно ползут по бокам кишечных ворсинок, замещая потерянные ворсинкой всасывающие клетки. К сожалению, ползание клеток также играет важную роль при развитии многих видов рака, когда клетки первичной опухоли вторгаются в соседние ткани и проникают в кровяные или лимфатические сосуды, распространяясь по всему организму в форме метастазов.

Ползание клеток — это очень сложный скоординированный процесс, зависящий от лежащего под плазматической мембраной обогащенного актином кортекса. В процессе участвуют три механизма: *вытягивание*, при котором из переднего края клетки выходит обогащенная актином структура; *прикрепление*, при котором актиновый цитоскелет через плазматическую мембрану связывается с субстратом; и *подтягивание*, при котором основная часть цитоплазмы перемещается вперед (**рис. 16.86**). В некоторых ползающих клетках, например кератоцитах эпидермиса рыб, эти механизмы точно скоординированы, и кажется, что клетки гладко скользят

Рис. 16.85. Веретено деления в животных клетках. (а) В веретене деления во время метафазы содержится три класса динамических микротрубочек: кинетохорные микротрубочки (*голубые*), прикрепляющие хромосомы к полюсу веретена; межполюсные микротрубочки (*красные*), удерживающие вместе половинки веретена; и астральные микротрубочки (*зеленые*), способные взаимодействовать с кортексом клетки. Минус-концы всех микротрубочек направлены к полюсам веретена деления, где находятся centrosомы. Стрелки указывают на динамическую нестабильность астральных микротрубочек, которые растут и укорачиваются на плюс-конце, тогда как кинетохорные и межполюсные микротрубочки претерпевают непрерывный ток в направлении полюсов веретена. (б) Фазово-контрастная микрофотография изолированного веретена деления в метафазе. Хромосомы выстроены вдоль экватора веретена. (в) На данной флуоресцентной микрофотографии микротрубочки окрашены *зеленым*, а хромосомы — *синим*. Красные точки отмечают положение кинетохор — специализированных структур, присоединяющих микротрубочки к хромосомам. (б, из E. D. Salmon and R. R. Segall, *J. Cell Biol.* 86: 355–365, 1980. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press; в, из A. Desai, *Curr. Biol.* 10: R508, 2000. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

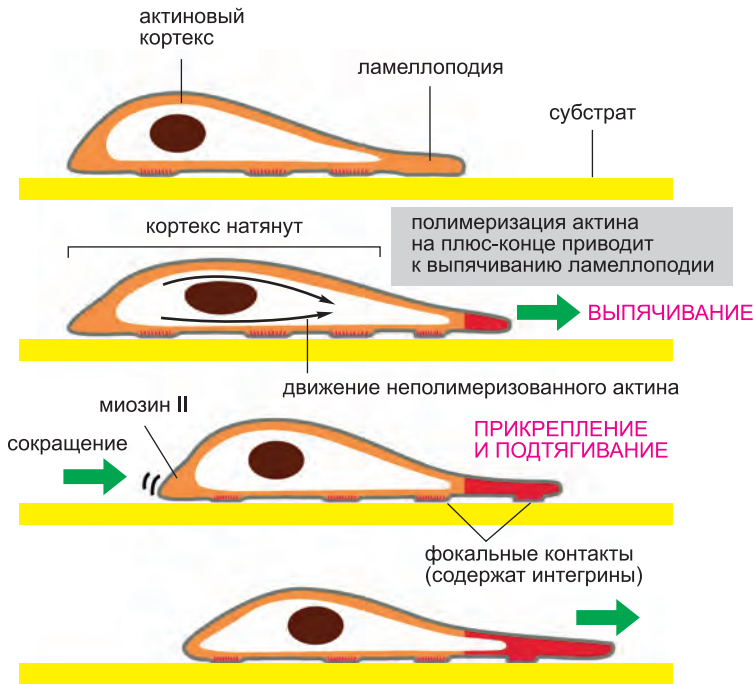


Рис. 16.86. Модель того, как создаваемые актиновым кортексом силы перемещают клетку вперед. Зависящее от полимеризации актина выпячивание и прикрепление ламеллоподии на ведущем конце клетки перемещают край вперед (зеленые стрелки спереди) и растягивают актиновый кортекс. Сокращение заднего конца клетки заставляет тело клетки двигаться вперед (зеленая стрелка сзади) для снятия части натяжения. По мере движения клетки спереди образуются новые фокальные контакты, а старые в заднем конце клетки разбираются. Цикл может повторяться, пошагово перемещая клетку вперед. С другой стороны, все этапы могут быть точно скоординированы, плавно продвигая клетку. Заново полимеризованный кортикальный актин показан красным.

вперед без изменения формы. В других клетках, например фибробластах, механизмы более независимы, и движение кажется резким и беспорядочным.

16.4.7. Полимеризация актина приводит к выпячиванию плазматической мембраны

Первый этап локомоции — выпячивание ведущего конца, по-видимому, преимущественно основан на силах, создаваемых проталкивающей плазматическую мембрану вперед полимеризацией актина. Различные типы клеток образуют разные типы выростов, включая филоподии (также называемые микрошипиками), ламеллоподии и псевдоподии (ложноножки). Все они заполнены плотным филаментным актином, вытесняющим мембранные органеллы. Выросты отличаются в основном, по организации актина — одномерной, двумерной или трехмерной соответственно. Выше мы уже рассмотрели, как актиновые структуры зависят от присутствия различных ассоциированных с актином белков.

Филоподии, свойственные мигрирующим конусам роста и некоторым фибробластам, по сути одномерны. В их сердцевине располагаются длинные пучки актиновых

филаментов, напоминающие филаменты микроворсинок, но более длинные и тонкие, а также более динамичные. **Ламеллоподии**, образуемые эпителиальными клетками, фибробластами и некоторыми нейронами, представляют собой двумерные плоские структуры. Они содержат перпендикулярно сшитую сеть актиновых филаментов, большая часть которых лежит в параллельной твердому субстрату плоскости. **Псевдоподии**, формируемые амебами и нейтрофилами, представляют собой короткие трехмерные выросты, заполненные гелем, актиновых филаментов. Возможно, благодаря тому что двумерную геометрию проще исследовать в световой микроскоп, мы больше знаем о динамической структуре и механизме выпячивания ламеллоподий, чем о тех же аспектах функционирования филоподий и псевдоподий.

Ламеллоподии несут весь необходимый для клеточной подвижности аппарат. Особенно хорошо изучены ламеллоподии эпителиальных клеток эпидермиса рыб и лягушек, известных как *кератоциты* (поскольку они обогащены кератиновыми филаментами). Эти клетки в норме покрывают животное, образуя эпителиальный слой, и специализируются на очень быстром смыкании краев ран. Их скорость может достигать 30 мкм/мин. При культивировании отдельных клеток кератоциты принимают характерную форму, образуя одну очень большую ламеллоподию, крепящуюся к маленькому, не связанному с субстратом телу клетки (**рис. 16.87**). При помощи микропипетки можно отрезать часть ламеллоподии. Несмотря на то что в полученных таким образом фрагментах обычно отсутствуют микротрубочки и мембранные органеллы, они продолжают нормально ползать, сохраняя внешний вид кератоцитов.

Динамическое поведение актиновых филаментов в кератоцитарных ламеллоподиях можно исследовать посредством мечения небольшого участка актина и наблюдения за его судьбой. Такие эксперименты показали, что, когда ламеллоподии ползут вперед, актиновые филаменты остаются неподвижными относительно субстрата. Актиновые филаменты в сети большей частью ориентированы таким образом, что их плюс-конец направлен вперед. Минус-концы часто прикрепляются вдоль других актиновых филаментов через комплексы ARP (см. рис. 16.34), образуя двумерную сеть (**рис. 16.88**). Сеть в целом, по-видимому, претерпевает тредмиллинг, собираясь спереди и разбираясь сзади, почти так же, как происходит описанный ранее тредмиллинг отдельных актиновых филаментов и микротрубочек (см. рис. 16.14). Тредмиллинг формируемой комплексом ARP разветвленной сети — лишь один из способов использования клеткой динамических свойств актиновых филаментов для выпячивания ведущего конца. Некоторые медленно передвигающиеся клетки, включая фибробласты, используют механизм, который не зависит от комплекса ARP, но все равно требует скоординированных сборки и разборки актиновых филаментов. В данном случае, динамическое поведение актина, по-видимому, координируется форминами.

Поддержание ламеллоподиями однонаправленного движения, предположительно, требует объединения и механической интеграции нескольких факторов. Нуклеация филаментов протекает в ведущем конце, т. е. рост новых актиновых филаментов и проталкивание плазматической мембраны вперед происходят преимущественно там. Деполимеризация филаментов происходит в основном в сайтах, расположенных далеко позади ведущего конца. Поскольку *кофилин* (см. рис. 16.42) кооперативно и преимущественно связывается с актиновыми филаментами, несущими ADP-актин (D-форму), образующиеся на ведущем конце новые филаменты в T-форме должны быть устойчивы к деполимеризации кофилином (**рис. 16.89**). По мере старения

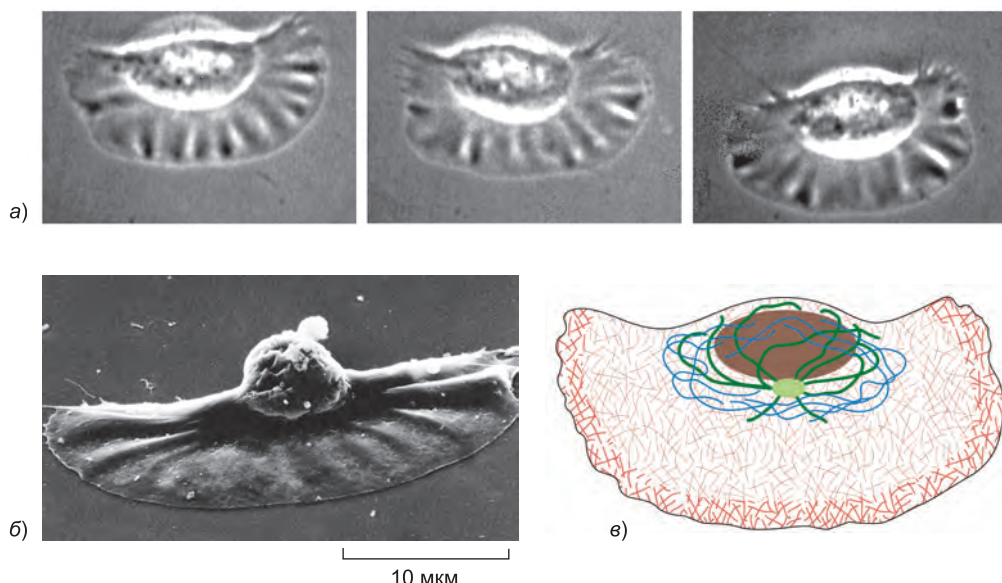


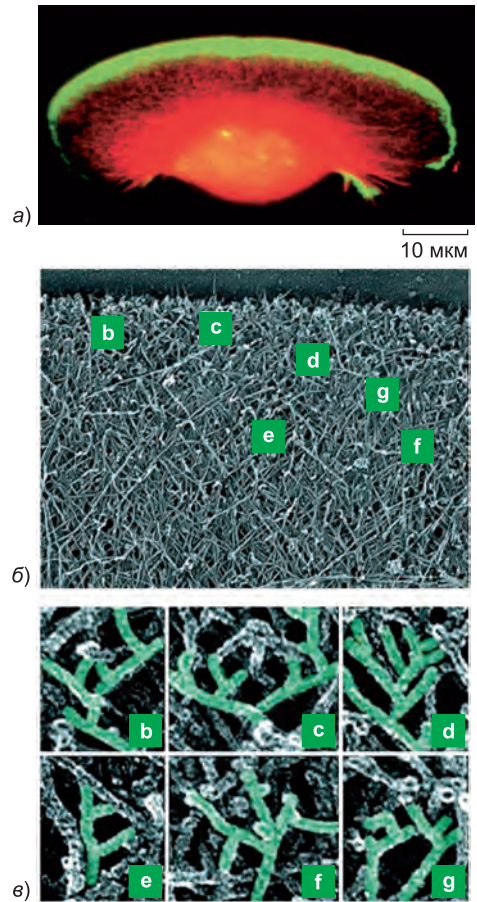
Рис. 16.87. Мигрирующие кератициты эпидермиса рыб. (а) Световые микрофотографии кератицита в культуре, полученные с временными промежутками в 15 с. Эта клетка перемещается со скоростью примерно 15 мкм/с. (б) Изображение кератицита, полученное при помощи сканирующей электронной микроскопии. Видна его широкая, плоская ламеллоподия и маленькое тело, несущее ядро. Обратите внимание, что тело клетки с субстратом не контактирует. (в) Распределение цитоскелетных филаментов в клетке. Актиновые филаменты (красные) заполняют крупную ламеллоподию и отвечают за быстрое движение клетки. Микротрубочки (зеленые) и промежуточные филаменты (голубые) расположены только в области вокруг ядра. (а и б, с любезного разрешения Juliet Lee.)

филаментов, и гидролиза АТФ, кофилин становится способен эффективно разбирать старые филаменты. Таким образом, запаздывающий гидролиз АТФ филаментным актином, по-видимому, лежит в основе механизма, поддерживающего в ламеллоподии эффективный однонаправленный процесс тредмиллинга (рис. 16.90). Наконец, биполярные филаменты миозина II связываются с актиновыми филаментами сети и изменяют их ориентацию с перпендикулярной по отношению к ведущему концу к параллельной ему. Такое сокращение препятствует выпячиванию и сжимает стороны движущейся ламеллоподии, способствуя подтягиванию клетки по мере ее движения вперед (рис. 16.91).

Толкающая сила, создаваемая полимеризацией разветвленной сети актиновых филаментов, играет важную роль во многих клеточных процессах. Полимеризация на плюс-конце способна проталкивать вперед плазматическую мембрану, как в описанном только что примере (см. рис. 16.90), либо перемещать мембранные везикулы или частицы по клеточной цитоплазме, как в описанном в главе 24 примере бактерии *Listeria monocytogenes* (см. рис. 24.37). Более того, при более сложном заякоривании филаментов в мембране та же сила приводит к инвагинациям, как например, при процессах эндоцитоза и фагоцитоза (см. главу 13).

Интересно сравнить организацию обогащенной актином ламеллоподии с организацией обогащенного микротрубочками веретена деления. В обоих случаях клетка использует и усиливает свойственное цитоскелетным филаментам динами-

Рис. 16.88. Нуклеация и образование сети актиновых филаментов комплексом ARP в ламеллоподии. (а) Кератоцит. Актиновые филаменты окрашены красным флуоресцентным фаллоидином, комплекс ARP окрашен зеленым антителом против одного из составляющих его белков. Места перекрывания филаментов и комплекса ARP выглядят желтыми. Комплекса ARP очень много на ведущем конце ламеллоподии, где нуклеация актина протекает особенно активно. (б) Электронная микрофотография покрытой платиной реплики ведущего конца кератоцита. Видна плотная сеть актиновых филаментов. Буквами отмечены области, увеличенные на в. (в) Увеличенные изображения областей актиновой сети ведущего конца, показанной на б. Видны многочисленные разветвленные филаменты с характерным углом 70° , образующимся, когда комплекс ARP нуклеирует сборку нового филамента на уже существующем филаменте (см. рис. 16.34). (Из Т. Svitkina and G. Borisy, *J. Cell Biol.* 145: 1009–1026, 1999. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)



ческое поведение для образования крупных структур, определяющих поведение клетки как целого. Обе структуры претерпевают быстрый круговорот составляющих их филаментов, несмотря на то что сами по себе они на протяжении продолжительных промежутков времени могут казаться неподвижными. Ведущий край плазматической мембраны в ламеллоподиях выполняет организаторскую роль, аналогичную роли конденсированных хромосом в организации и стимулировании динамики веретена деления. В обоих случаях белковые молекулярные моторы способствуют усилению тока цитоскелетных филаментов и круговороту более крупномасштабных структур.

16.4.8. Адгезия и натяжение клеток позволяют им продвигаться вперед

Ламеллоподии всех типов клеток разделяют базовую, простую динамическую организацию: сборка актиновых филаментов происходит преимущественно на ведущем конце, а разборка — в отстающей части. Однако взаимодействия между клеткой и ее нормальным физическим окружением обычно делают ситуацию более сложной, чем в случае ползания кератоцитов по культуральной чашке. Особенно важным аспектом локомоции являются тонкие взаимодействия между цитоскелетом и адгезионным аппаратом клетки. Несмотря на то что некоторая степень адгезии к субстрату необходима для любого вида клеточного ползания, прикрепление и скорость локомоции обычно обратно пропорциональны друг другу, т. е. высокоадгезивные клетки движутся медленнее, чем клетки, слабее прикрепляющиеся к субстрату. Кератоциты так слабо прикрепляются к субстрату, что сила полимеризации актина способна проталкивать ведущий конец вперед очень быстро. С другой стороны, ней-

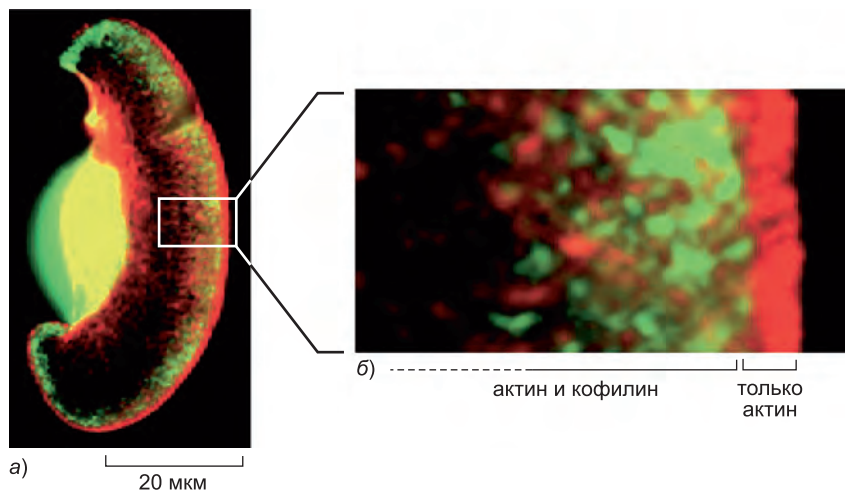


Рис. 16.89. Кофилин в ламеллоподиях. (а) Кератоцит, в котором актиновые филаменты окрашены красным флуоресцентным фаллоидином, а кофилин — зеленым флуоресцентным антителом. Места перекрывания филаментов и кофилина выглядят желтыми. Несмотря на то что плотная актиновая сеть занимает всю ламеллоподию, кофилин на ведущем конце отсутствует. (б) Увеличенное изображение участка в белом прямоугольнике на (а). Расположенные ближе всего к ведущему концу актиновые филаменты решетки, которые также образовались недавно и, вероятнее всего, несут ATP-актин (а не ADP-актин), обычно не связаны с кофилином. (Из Т. Svitkina and G. Borisy, *J. Cell Biol.* 145: 1009–1026, 1999. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

роны морского моллюска *Aplysia*, культивируемые на твердом субстрате, образуют большие ламеллоподии, прикрепляющиеся к чашке и не способные продвигаться вперед. В таких ламеллоподиях продолжает работать цикл локальной нуклеации актиновых филаментов, деполимеризации старых филаментов и миозин-зависимого сокращения. Но поскольку ведущий конец физически не способен продвигаться вперед, вся актиновая сеть утягивается миозинами назад в сторону тела клетки (рис. 16.92). Адгезия большинства клеток лежит где-то посередине между этими двумя крайностями, и в большинстве ламеллоподий одновременно происходит выпячивание актиновых филаментов вперед (как в кератоцитах) и обратный ток актина (как в нейронах *Aplysia*).

Когда ламеллоподия, филоподия или псевдоподия выпячивается вперед, она способна образовать на переднем конце новые связи с субстратом, остающиеся неподвижными по мере того, как клетка проходит через них. Когда отдельная ламеллоподия оказывается не способной прикрепиться к субстрату, она обычно поднимается вверх и быстро переносится назад в форме раффла (волны) (рис. 16.93).

Сайты прикрепления ведущего конца служат точками закоривания, позволяющими клетке создавать на субстрате силы натяжения и проталкивать свое тело вперед. По-видимому, натяжение создается моторными белками миозинами, особенно миозином II. Во многих подвижных клетках миозин II концентрируется в задней части клетки, где он может способствовать проталкиванию тела клетки вперед, напоминая выдавливание зубной пасты из тюбика (рис. 16.94; смотри также рис. 16.91). Амебы *Dictyostelium*, лишенные миозина II, с нормальной скоростью выпячивают псевдоподии, но перемещение тела клетки у них протекает

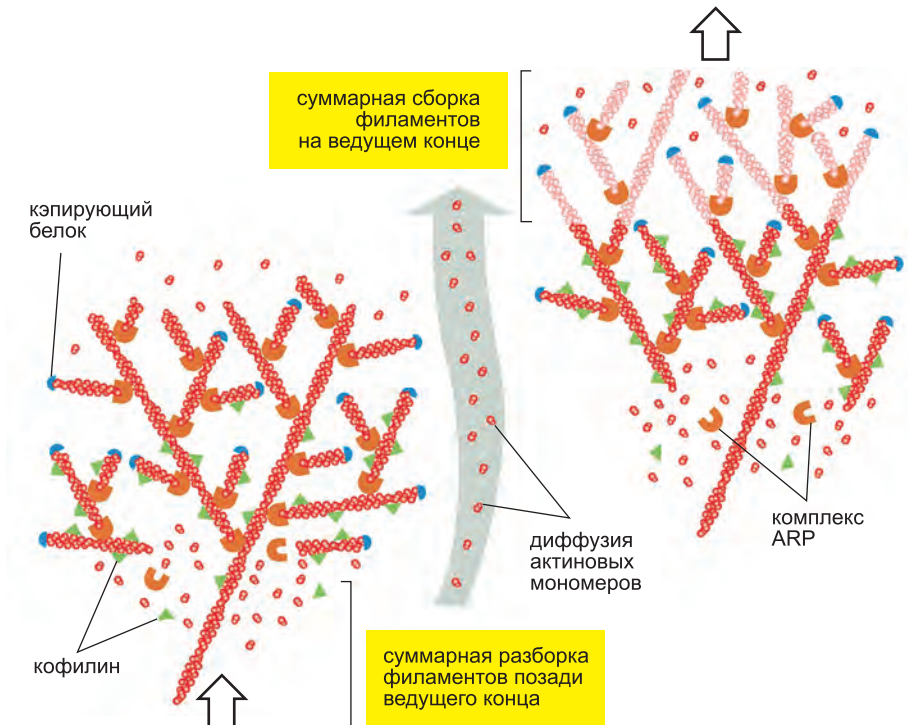


Рис. 16.90. Модель выпячивания актиновой сети на ведущем конце. Показаны два момента времени при продвижении ламеллоподии. Новообразованные структуры во второй момент времени показаны более светлым цветом. Нуклеация опосредуется впереди комплексом ARP. Образующиеся актиновые филаменты зарождаются на уже существующих и находятся к ним под углом в 70° . Поскольку филаменты заякорены в уже существующей структуре, при своем удлинении они толкают плазматическую мембрану вперед. Плюс-концы актиновых филаментов кэпируются с постоянной скоростью. После того как ново-синтезированные филаменты в решетке гидролизуют связанный АТФ, они становятся чувствительными к деполимеризации кофилином. Такой цикл приводит к пространственному разделению суммарной полимеризации филаментов спереди и их суммарной деполимеризации сзади, что позволяет актиновой сети как целому продвигаться вперед, несмотря на то что отдельные филаменты по отношению к субстрату остаются неподвижными.

значительно медленнее, чем у амёб дикого типа, что указывает на важную роль сокращения миозина II в цикле локомоции клетки. Помимо проталкивания тела клетки вперед, сокращение обогащенного актином кортекса на заднем конце клетки может селективно ослаблять более старые адгезионные взаимодействия, удерживающие клетку на месте. Миозин II также, вероятно, транспортирует вперед компоненты тела клетки через полярные структуры актиновых филаментов.

Силы натяжения, создаваемые движущимися клетками, довольно сильно воздействуют на субстрат (рис. 16.95). В животных большинство ползающих клеток движется по состоящему из внеклеточного матрикса полужесткому субстрату, который может в результате деформироваться и перестраиваться. В культуре движение фибробластов в геле, образованном коллагеновыми фибриллами, приводит к структурированию коллагена и формированию организованного внеклеточного матрикса, который, в свою очередь, начинает влиять на форму и направление локомоции

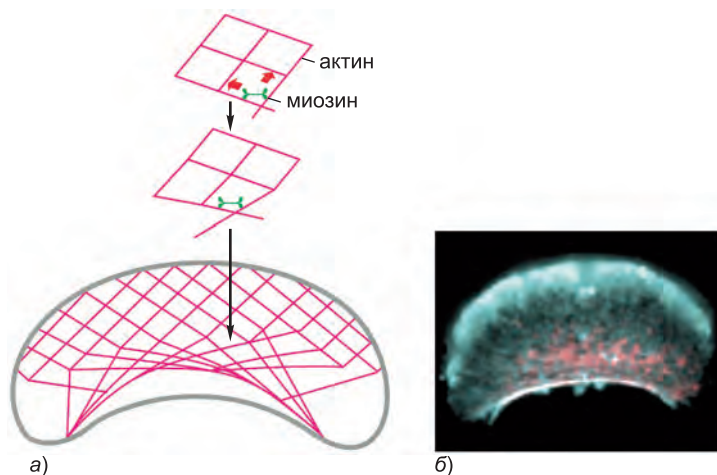


Рис. 16.91. Вклад миозина II в поляризованную подвижность клеток. (а) Биполярные филаменты миозина II связывают актиновые филаменты в разветвленной сети ламеллоподий и вызывают ее сокращение. Зависимая от миозина переориентация актиновых филаментов в сети приводит к образованию актинового пучка, рекрутирующего еще больше миозина II и вносящего вклад в создание сократительных сил, необходимых для подтягивания отстающего конца клетки. (б) От основного тела клетки посредством микропипетки или обработки определенным соединением можно отделить фрагмент ламеллоподии. Многие такие фрагменты продолжают быстро передвигаться, сохраняя свойственную intactным кератоцитам организацию цитоскелета. Актин (голубой) образует сеть на переднем конце фрагмента. Миозин II (розовый) образует полосу в заднем конце. (Из A. Verkovsky et al., *Curr. Biol.* 9: 11–20, 1999. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

фибробластов (рис. 16.96). Аналогично внешнее механическое напряжение или растяжение, приложенное к клетке, приведет к сборке в ней стрессовых фибрилл и фокальных контактов, в результате чего клетка станет активнее сокращаться. Несмотря на то что такие двусторонние взаимодействия между клетками и их физическим окружением малопонятны, предполагают, что они играют основную роль в организации тканей позвоночных.

16.4.9. Представители семейства белков Rho вызывают значительные перестройки актинового цитоскелета

Миграция клеток требует дальнodelствующий взаимодействий и координации между противоположными концами клетки. При направленной миграции важно, чтобы передний конец оставался структурно и функционально отличным от заднего. Помимо участия в таких локальных механических процессах, как выпячивание спереди и сокращение сзади, цитоскелет отвечает за регуляцию формы, организации и механических свойств на протяжении всей клетки, т. е. на расстоянии, составляющем для типичной животной клетки десятки микрометров. В большинстве случаев, включая клеточную миграцию, крупномасштабная координация цитоскелета представляет собой формирование полярности клетки, при которой клетка строит различные структуры из различных молекулярных компонентов спереди и сзади или сверху и снизу. Для локомоции в определенном направлении необходима исходная полярность клетки. Точно регулируемые процессы поляризации клетки также не-

обходимы для ориентированного клеточного деления в тканях и для образования связной, организованной многоклеточной структуры. Наше понимание молекулярных механизмов клеточной полярности основано на генетических исследованиях дрожжей, мушек и червей. Процессы, приводящие к установлению полярности клеток у позвоночных, только сейчас начали изучаться. Однако во всех известных случаях цитоскелет играет центральную роль, и многие молекулярные компоненты процесса мало изменились в течение эволюции.

Глобальная перестройка актинового цитоскелета в ответ на внеклеточные сигналы инициируется различными поверхностными рецепторами. Но внутри клетки

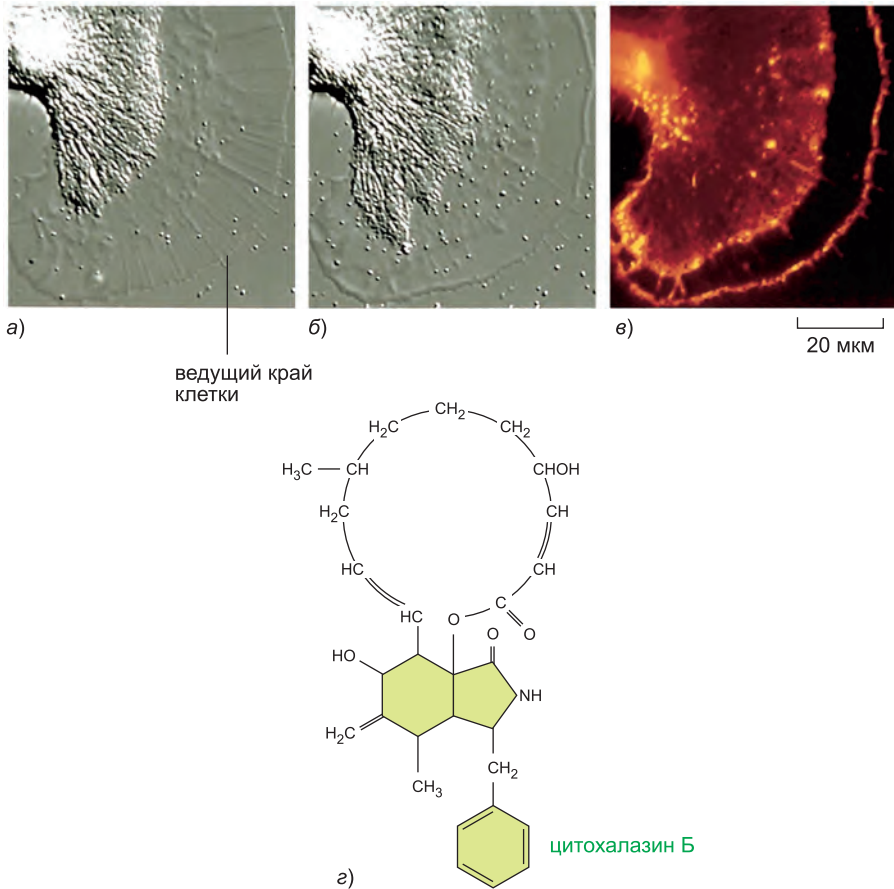


Рис. 16.92. Движение актиновой сети назад в ламеллоподии конуса роста. (а) Изображения дифференциальной интерференционной контрастной микроскопии конуса роста нейрона морского моллюска *Aplysia*, выращенного на высокоадгезивном субстрате. Микротрубочки и мембранные органеллы располагаются в яркой задней части конуса роста (*слева*), а сеть актиновых филаментов заполняет ламеллоподию (*справа*). (б) После краткой обработки веществом цитохалазином, кэпирующим плюс-концы актиновых филаментов (см. таблицу 16.2, **стр. 988**), актиновая сеть оторвалась от переднего конца и отошла назад. (в) В момент времени, показанный на (б), клетки фиксировали и окрасили флуоресцентным фаллоидином для того, чтобы исследовать распределение актиновых филаментов. Часть филаментов осталась в ведущем конце, но область за ним полностью лишена филаментов. Обратите внимание на четкую границу движущейся назад актиновой сети. (г) Сложная циклическая структура цитохалазина Б. (а–в, с любезного разрешения Paul Forscher.)

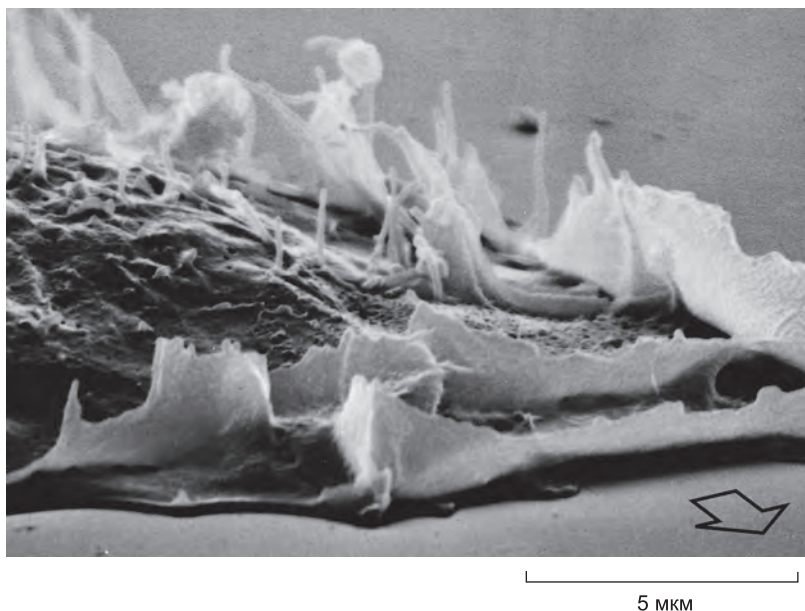


Рис. 16.93. Ламеллоподии и раффы на ведущем конце мигрирующего в культуре фибробласта человека. Стрелка на полученной сканирующей микроскопией микрофотографии указывает направление движения. По мере движения клетки вперед не прикрепившиеся к субстрату ламеллоподии поднимаются вверх, образуя раффы, и уходят на верхнюю сторону клетки. (С любезного разрешения Julian Heath.)

все эти сигналы сходятся на группе близкородственных мономерных ГТРАЗ **белкового семейства Rho**: *Cdc42*, *Rac* и *Rho*. Эти же белки участвуют в формировании различных типов клеточной полярности.

Аналогично другим представителям суперсемейства Ras, белки Rho служат молекулярными переключателями, переходя из активного, связанного с GTP состояния в неактивное состояние, связанное с GDP (см. рис. 3.71). Активация *Cdc42* на плазматической мембране приводит к полимеризации актина и формированию им пучков с образованием филоподий или более коротких выпячиваний клетки — микрошипииков.

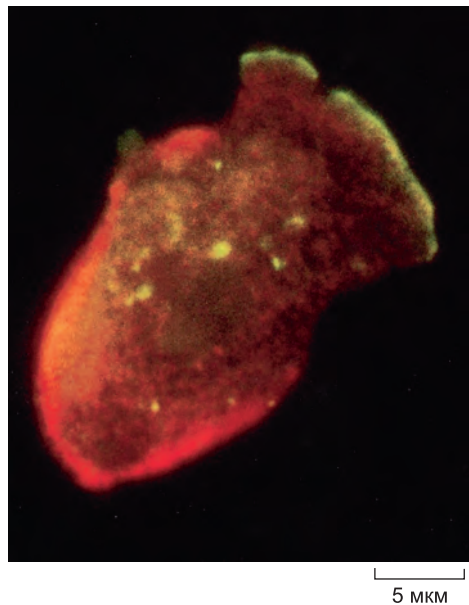


Рис. 16.94. Расположение миозинов I и II в нормальной ползающей амебе *Dictyostelium*. Данная клетка ползла в направлении правого верхнего угла, когда ее фиксировали и поместили антителами, специфичными к двум изоформам миозина. Миозин I (зеленый) в основном располагается на ведущем конце псевдоподии. Миозина II (красный) больше всего в заднем, обогащенном актином кортексе. Сокращение этого кортекса миозином II способствует проталкиванию тела клетки вперед. (С любезного разрешения Yoshio Fukui.)



Рис. 16.95. Адгезивные клетки налагают на субстрат силы натяжения. Данные фибробласты культивировались в очень тонком слое силиконового каучука. Прикрепление клеток и последующее сокращение их цитоскелета привели к образованию складок на субстрате. (Из А. К. Harris, P. Wild and D. Stopak, *Science* 208: 177–179, 1980. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Активация Ras способствует полимеризации актина на периферии клетки, что приводит к формированию плоских ламеллоподий и мембранных раффлов, обогащенных актином выступов на верхней поверхности клетки (см. рис. 16.93). Активация белка Rho инициирует объединение актиновых филаментов и филаментов миозина II в стрессовые фибриллы и кластеризацию интегринов и дополнительных белков с образованием фокальных контактов (рис. 16.97). Такие резкие и сложные структурные изменения происходят благодаря тому, что каждый из этих трех молекулярных переключателей обладает множеством белков-мишеней, влияющих на организацию и динамику актина.

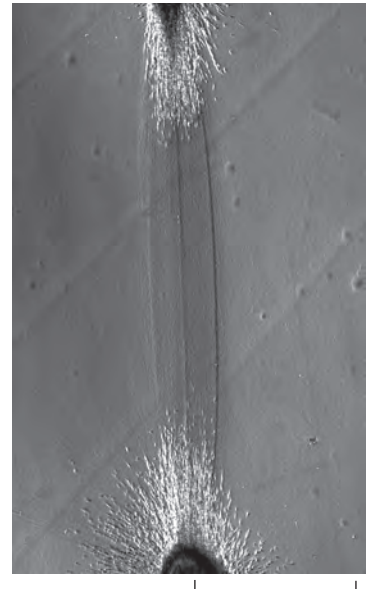


Рис. 16.96. Структурирование внеклеточного матрикса за счет растягивания. На данной микрофотографии показана область между двумя кусочками сердца зародыша цыпленка (тканевыми эксплантатами, обогащенными фибробластами и сердечными мышечными клетками), выращиваемыми в культуре на коллагеновом геле в течение 4 дней. Между эксплантатами за счет налагаемых фибробластами сил натяжения образовалась плотная полоса структурированного коллагена. (Из D. Stopak and A. K. Harris, *Dev. Biol.* 90: 383–398, 1982. С любезного разрешения издательства Academic Press.)

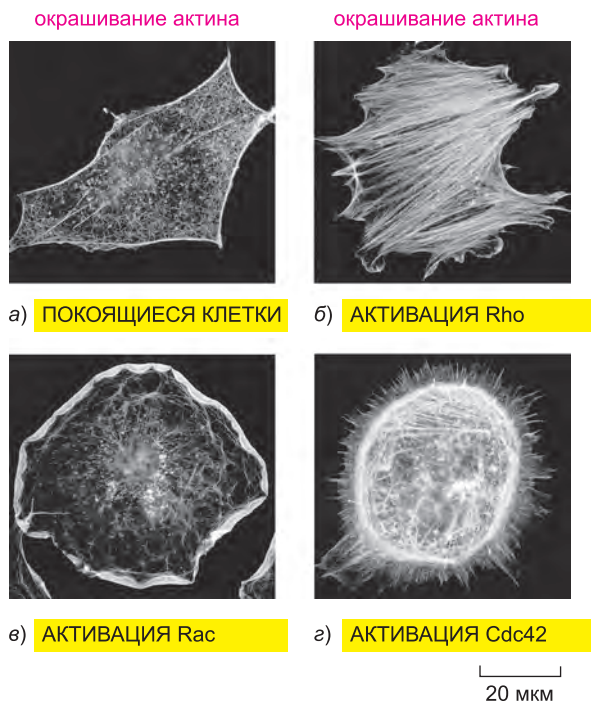


Рис. 16.97. Влияние Rac, Rho и Cdc42 на организацию актина в фибробластах. На всех изображениях актин окрашен флуоресцентным фаллоидином. (а) В безсывороточной среде фибробласты несут актин, в основном — в кортексе, и практически лишены стрессовых фибрилл. (б) Микроинъекция активированной формы Rho приводит к быстрой сборке множества стрессовых фибрилл. (в) Микроинъекция активированной формы Rac, родственной Rho мономерной GTPазы, приводит к образованию огромной ламеллоподии, отходящей от всей периферии клетки. (г) Микроинъекция активированной формы Cdc42, еще одного представителя семейства Rho, приводит к выпячиванию с периферии клетки множества длинных филоподий. Действие этих трех GTPаз на глобальную организацию актинового цитоскелета опосредуется десятками других белков, регулируемых GTPазами. Среди этих белков-мишеней встречаются некоторые рассмотренные в данной главе ассоциированные с актином белки. (Из А. Hall, *Science* 279: 509–514, 1998. С любезного разрешения издательства AAAS.)

Некоторые ключевые мишени активированного Cdc42 относятся к белковому семейству WASp. Люди, у которых отсутствуют WASp, страдают от синдрома Вискотта—Олдрича, тяжелой формы иммунодефицита, характеризующейся патологической актиновой подвижностью клеток иммунной системы и нарушением образования тромбоцитов. Несмотря на то что сами WASp экспрессируются только в клетках крови и иммунной системе, другие представители семейства синтезируются во всех клетках, что позволяет активированному Cdc42 усиливать полимеризацию актина. **Белки WASp** могут существовать в неактивной свернутой и активной развернутой конформациях. Cdc42-GTP стабилизирует открытую форму белка WASp, позволяющую ему связывать комплекс ARP и усиливать его способность к нуклеации актиновых филаментов (см. рис. 16.34). Таким образом, активация Cdc42 приводит к усилению нуклеации актина.

Rac-GTP также активирует белки семейства WASp. Помимо этого, он активирует образование поперечных сшивок формирующим гель белком филамином

и ингибирует сократительную активность моторного белка миозина II, стабилизируя ламеллоподии и ингибируя образование сократительных стрессовых фибрилл (рис. 16.98, а).

Rho-GTP обладает отличным набором мишеней. Вместо активации комплекса ARP для сборки актиновых сетей, Rho-GTP действует на формины и способствует образованию параллельных актиновых пучков. Одновременно Rho-GTP активи-

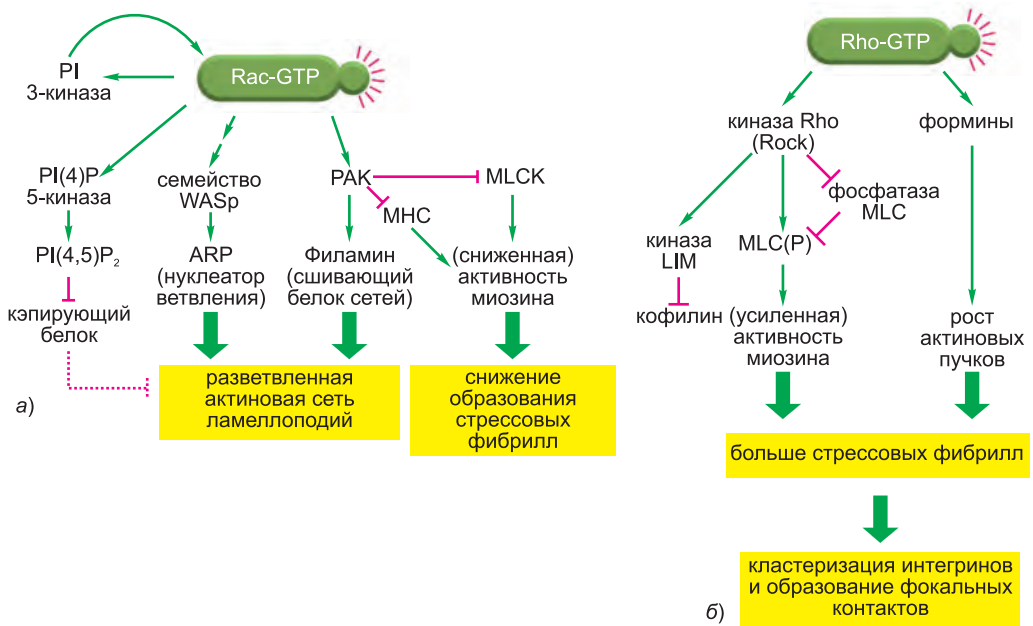


Рис. 16.98. Влияние активации Rac и Rho на организацию актина. (а) Активация небольшой GTPазы Rac приводит к нуклеации актина комплексом ARP и другим изменениям дополнительных белков актина, способствующим образованию актиновых сетей, например, в ламеллоподиях. В эти процессы вносят вклад несколько независимых путей. Rac-GTP активирует белки семейства WASp, которые, в свою очередь, активируют и нуклеацию актина, и ветвление сетей комплексом ARP. В параллельном пути Rac-GTP активирует протеинкиназу PAK, воздействующую на несколько мишеней, включая образующий поперечные сшивки филамин, активируемый фосфорилированием, и киназу легких цепей миозина (MLCK), ингибируемую фосфорилированием. В результате снижение фосфорилирования регуляторных легких цепей миозина приводит к разборке филаментов миозина II и снижению сократительной активности. В некоторых клетках PAK также напрямую ингибирует активность миозина II за счет фосфорилирования его тяжелой цепи (MHC). Другой набор путей, следующих за активацией Rac, опосредуется сигналами фосфоинозитидных липидов. Локальное образование $PI_2[PI(4,5)P_2]$ может способствовать снижению активности экранирующего белка и усилению полимеризации актина. Активация PI3-киназы, катализирующей превращение PIP_3 в PIP_2 , стимулирует активацию Rac в петле положительной обратной связи. (б) Активация родственной GTPазы Rho приводит к нуклеации актиновых филаментов формином и усиливает сокращение миозина II, способствуя образованию таких сократительных актиновых пучков, как стрессовые фибриллы. Для активации миозина II белком Rho необходима Rho-зависимая киназа Rock. Эта киназа ингибирует фосфатазу, удаляющую активирующие фосфатные группы легких цепей миозина II (MLC); в некоторых типах клеток она также может напрямую фосфорилировать миозиновые легкие цепи. Rock также активирует некоторые другие протеинкиназы, например, киназу LIM, которая затем вносит вклад в образование стабильных сократительных актиновых пучков за счет ингибирования деполимеризующего фактора кофилина. Сходный сигнальный путь играет важную роль в формировании необходимого для цитокинеза сократительного кольца (см. рис. 17.52).

рует протеинкиназу, косвенно ингибирующую активность кофилина, что приводит к стабилизации актиновых филаментов. Та же самая протеинкиназа ингибирует фосфатазу, взаимодействующую с легкими цепями миозина (см. рис. 16.72). Последующее суммарное усиление фосфорилирования легких цепей миозина увеличивает сократительную активность моторного белка, что усиливает формирование зависящих от напряжения структур, например стрессовых фибрилл (рис. 16.98, б).

В некоторых типах клеток Rac-GTP активирует Rho, причем кинетика этого процесса медленнее, чем активация комплекса ARP белком Rac. Это позволяет клетке использовать путь Rac для сборки новой актиновой структуры с последующей активацией пути Rho, создающего напряжение в этой структуре. Так происходит, например, во время формирования и созревания межклеточных контактов. Ниже мы более подробно обсудим, как взаимодействие между путями Rho и Rac способствует поддержанию крупномасштабных различий между противоположными концами клетки во время клеточной миграции.

16.4.10. Внеклеточные сигналы могут активировать трех представителей белкового семейства Rho

Активация мономерных GTPаз Rho, Rac и Cdc42 происходит посредством обмена GTP на связанную молекулу GDP, катализируемого факторами обмена гуаниновых нуклеотидов GEF. Из 85 идентифицированных в человеческом геноме GEF некоторые специфичны по отношению к определенным GTPазам семейства Rho, тогда как другие взаимодействуют со всеми тремя представителями. Число GEF превышает число регулируемых ими GTPаз Rho, потому что различные GEF характерны для различных тканей и субклеточных участков и чувствительны к различным типам регуляторных сигналов. GEF активируются поверхностными рецепторами. Одним из них является рецепторная тирозинкиназа Eph, участвующая в направлении аксонального конуса роста (см. главу 15). Несколько GEF семейства Rho связываются с +TIP растущих концов микротрубочек, что способствует взаимодействию динамики микротрубочечного цитоскелета и организации актинового цитоскелета и играет важную роль в координации клеточной формы и движения.

GTPазы семейства Rho также играют ключевую роль в полярности дрожжевых клеток, представления об общих механизмах которой были получены при помощи генетического анализа. При голодании дрожжи, как и многие другие одноклеточные организмы, образуют споры. Но споруляция может происходить только в диплоидных клетках почкующихся дрожжей, а они обычно пролифелируют как гаплоидные клетки. Голодающая гаплоидная особь до образования спор должна найти партнера с противоположным фактором спаривания, добиться его расположения и слиться с ним. Дрожжевые клетки не способны плавать и, вместо этого, подходят к своим партнерам посредством полярного роста. Гаплоидная форма почкующихся дрожжей может иметь один из двух типов спаривания — **a** или α — и секретировать соответственно **a**- или α -фактор спаривания. Эти секретлируемые сигнальные молекулы связываются с поверхностными рецепторами суперсемейства сопряженных с G-белками рецепторов (см. главу 15). Одним из последствий связывания α -фактора с рецептором является поляризация клетки, которая принимает грушевидную форму (по-английски — *shmoo*) (рис. 16.99). В градиенте α -фактора узкая часть грушевидной **a**-клетки направлена в сторону наибольшей концентрации сигнальной молекулы, что в естественных условиях приведет ее к расположенной недалеко «влюбленной» α -клетке.



Рис. 16.99. Морфологическая поляризация дрожжевых клеток в ответ на фактор спаривания. (а) Клетки *Saccharomyces cerevisiae* обычно сферические. (б) Они поляризуются при обработке фактором спаривания клеток противоположного типа спаривания и принимают грушевидную форму. (в) Знаменитый персонаж комиксов Эла Каппа Шму (Shmoo), в честь которого в англоязычной научной литературе называют грушевидную форму дрожжей. (а и б, с любезного разрешения Michael Snyder; в, © 1948 Carr Enterprises, Inc. Приводится с разрешения.)

Для полярного роста клеток необходима организация актинового цитоскелета в ответ на сигнал фактора спаривания. Когда сигнал связывается со своим рецептором, рецептор активирует Cdc42, который, в свою очередь, инициирует сборку актиновых филаментов в ближайшем к источнику сигнала участке. Локальная активация Cdc42 усиливается петлей положительной обратной связи, требующей актин-зависимого транспорта Cdc42 и его GEF и других компонентов вдоль новообразованных актиновых структур в направлении сайта сигнала. Затем за счет активации еще одной GTPазы семейства Rho, стимулирующей формин, актиновые тяжи собираются таким образом, что они указывают на сайт аккумуляции Cdc42. Актиновые тяжи служат «рельсами» для направленного транспорта и экзоцитоза веществ клеточной стенки, что приводит к полярному росту кончика грушевидной клетки (**рис. 16.100**).

Гаплоидные клетки почкующихся дрожжей используют аппарат поляризации и во время вегетативного роста. Для формирования почки, которая впоследствии станет дочерней клеткой, дрожжи должны направить вещества новой плазматической мембраны и клеточной стенки в один конкретный участок. Как и в случае формирования грушевидной клетки, для этого необходима полярность цитоскелета: большинство актиновых заплат и пучков в растущей почке должны быть ориентированы вдоль ее продольной оси. В гаплоидных клетках сайт новой почки всегда собирается рядом с сайтом предыдущей. В данном случае пространственные сигналы, определяющие полярность клетки, исходно присущи клетке, поскольку они остались от предыдущих клеточных делений. Cdc42 вновь участвует в передаче сигнала от сайта будущей почки к цитоскелету. Большинство белков, участвующих в этом пути у дрожжей, идентифицировали в генетических экспериментах, после чего их гомологи обнаружили в других организмах, где они также часто участвуют в формировании полярности клетки.

16.4.11. Внешние сигналы могут определять направление миграции клеток

Хемотаксис — это движение клеток в направлении, определяемом градиентом диффундирующего вещества. Это особенно интересный случай того, как внешние

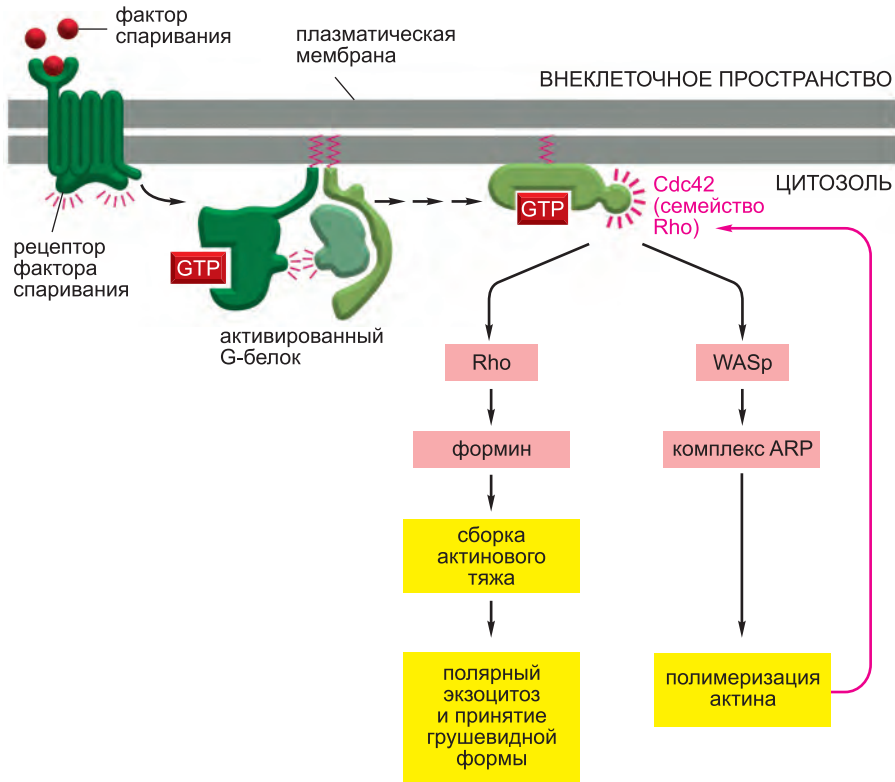
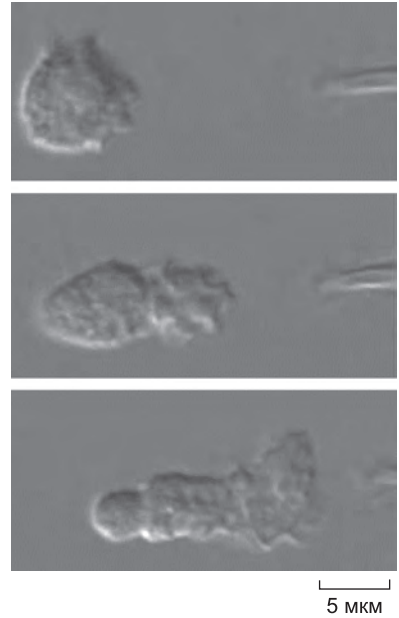


Рис. 16.100. Сигнальный путь в дрожжевом ответе на фактор спаривания. Внеклеточный фактор спаривания связывается с сопряженным с G-белком рецептором плазматической мембраны. Активация рецептора инициирует диссоциацию от гетеротримерного G-белка GTP-связанной субъединицы $G\alpha$ (см. главу 15), что, в свою очередь, активирует GTP-связывающий белок семейства Rho — Cdc42. Как и в клетках млекопитающих, Cdc42 активирует белок семейства WASp, стимулирующий комплекс ARP, что приводит к локальной нуклеации актина в сайте связывания фактора спаривания. Локальная нуклеация актина и рост филаментов создают петлю положительной обратной связи, усиливающую активность Cdc42. Это приводит к сильной активации Rho и формина и образованию актинового тяжа, полярному росту и принятию грушевидной формы. Более того, активация рецепторов запускает через MAP-киназный каскад другие ответы (см. главу 15), подготавливающие гаплоидную клетку к слиянию (не показано).

сигналы активируют белки семейства Rho и формируют клеточную полярность, влияя на организацию описанного выше аппарата клеточной подвижности. Одним из наиболее изученных примеров является хемотаксическое движение одного из классов белых клеток крови, нейтрофилов, в направлении источника бактериальной инфекции. Рецепторные белки на поверхности нейтрофилов позволяют им регистрировать очень низкие концентрации *N*-формилированных пептидов, образующихся из бактериальных белков (только прокариоты начинают синтез белка с *N*-формилметионина). При помощи этих рецепторов нейтрофилы направляются к бактериальным мишеням, улавливая различия в 1 % между концентрацией этих диффундирующих пептидов на противоположных сторонах клетки (**рис. 16.101**).

В данном случае и в очень похожем случае хемотаксиса амёбы *Dictyostelium* в направлении циклического AMP локальная полимеризация актина вблизи ре-

Рис. 16.101. Поляризация и хемотаксис нейтрофилов. Из расположенного справа кончика пипетки вытекает небольшое количество пептида формил-Met-Leu-Phe. Только бактериальные белки несут формилированные остатки метионина, поэтому человеческие нейтрофилы узнают такой пептид как продукт чужеродного организма (см. главу 24). Нейтрофил быстро выпячивает в направлении источника пептидного хемоаттрактанта новую ламеллоподию (*вверху*). Затем он увеличивает ламеллоподию и поляризует свой цитоскелет таким образом, что сократительный миозин II располагается в основном в заднем, противоположном от ламеллоподии конце клетки (*в центре*). Наконец, клетка ползет в направлении источника пептида (*внизу*). Если бы источником хемоаттрактанта была настоящая бактерия, а не пипетка ученого, нейтрофил бы проглотил и уничтожил ее (см. также рис. 16.4). (Из O. D. Weiner et al., *Nat. Cell Biol.* 1: 75–81, 1999. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)



цепторов стимулируется связыванием рецептора со своим лигандом. Такой ответ в форме полимеризации актина зависит от описанных выше мономерных GTPаз семейства Rho. Как и в грушевидных дрожжах (см. рис. 16.99), клетка образует выпячивание, направленное в сторону сигнала. В хемотаксических клетках связывание хемоаттрактанта с сопряженным с G-белком рецептором активирует фосфоинозитид-3'-киназы (PI3K), катализирующие образование липидной сигнальной молекулы (PI(3,4,5)P₃), которая, в свою очередь, активирует GTPазу Rac. Затем Rac активирует комплекс ARP и образуется ламеллоподия (см. рис. 16.98). По неизвестному механизму полярная актиновая сеть на ведущем конце приводит к дальнейшему локальному увеличению активности PI3K в петле положительной обратной связи, что усиливает инициацию выпячивания. PI(3,4,5)P₃, активирующий Rac, не способен диффундировать далеко от своего сайта синтеза, поскольку он быстро превращается обратно в PIP₂ конститутивно активной липидфосфатазой. Одновременно связывание хемоаттрактанта с рецептором активирует другой сигнальный путь, направленный на Rho и усиливающий миозин-зависимую сократительную способность. Эти процессы напрямую ингибируют друг друга, и в результате активация Rac начинает преобладать в переднем конце клетки, а активация Rho — в заднем конце (**рис. 16.102**). Это позволяет клетке поддерживать функциональную полярность: спереди располагается ламеллоподия, а сзади происходят сокращения.

Недиффундирующие химические сигналы, связанные с внеклеточным матриксом или поверхностью клеток, также способны влиять на направление клеточной миграции. При активации рецепторов этими сигналами может увеличиться адгезия клеток и усиливается полимеризация актина. Большинство случаев миграции клеток в животных на большие расстояния, включая движение аксонального конуса роста и миграцию клеток нервного гребня, зависит от сочетания диффундирующих и неподвижных сигналов, направляющих клетки или конусы роста в соответствующие части организма (см. рис. 15.62).

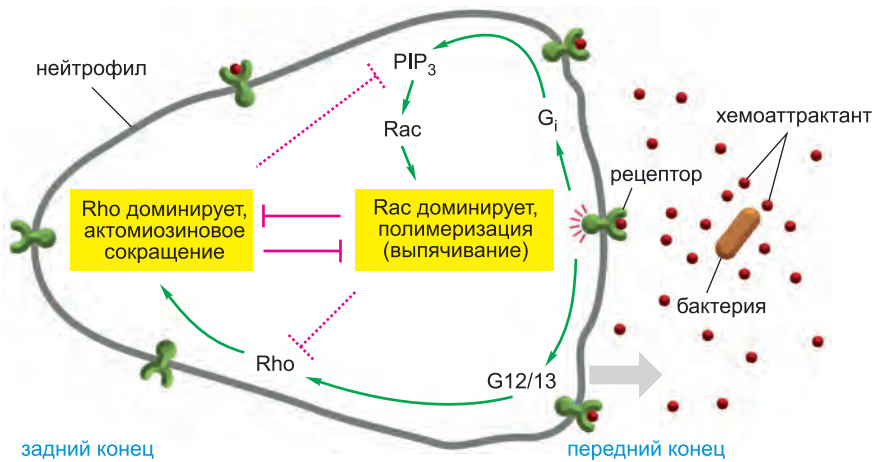


Рис. 16.102. Сигнализация во время поляризации нейтрофилов. Бактерии, проникшие в тело человека, секретируют молекулы, узнаваемые клетками иммунной системы, в том числе нейтрофилами, как чужеродные. Связывание бактериальных молекул с сопряженными с G-белками рецепторами нейтрофилов стимулирует направленную подвижность. Эти рецепторы располагаются на всей поверхности клетки, но, вероятнее всего, свяжутся с бактериальным лигандом спереди. В поляризацию клеток вносят вклад два различных сигнальных пути. В переднем конце клетки вблизи бактериального сигнала стимуляция пути Ras приводит посредством тримерного G-белка G_i к росту актиновой сети. Вторичные посредники в этом пути короткоживущи, поэтому выпячивание ограничивается областью, наиболее близкой к источнику стимула. Тот же самый рецептор также стимулирует второй сигнальный путь посредством тримерных G-белков G12 и G13 (обозначаемых G12/13), запускающих активацию Rho. Эти два пути взаимно исключают друг друга. Поскольку Ras-зависимое выпячивание активно на переднем конце клетки, Rho активируется только на заднем конце, стимулируя сокращение клетки и способствуя направленному движению. Живой пример эффективности данной сигнальной системы приведен на рис. 16.4.

16.4.12. Взаимодействие между микротрубочковым и актиновым цитоскелетами координирует поляризацию и локомоцию целой клетки

Чтобы организовать постоянное движение в определенном направлении клетки, помимо актиновых филаментов, также используют микротрубочки. Во многих движущихся клетках полимеризация актина в ведущем конце приводит к смещению centrosомы на переднюю сторону ядра. Механизм переориентации centrosомы малопонятен, но показано, что в нем участвует белок семейства Rho Cdc42. Предполагают, что активация рецепторов на одном конце клетки не только стимулирует полимеризацию актина в этом месте (и, следовательно, локальное выпячивание), но и локально активирует динеин-подобные моторные белки, смещающие centrosому за счет взаимодействия с ее микротрубочками. Несколько эффекторных белков в путях Rho и Ras напрямую влияют на динамику микротрубочек. Например, активируемая Ras протеинкиназа может фосфорилировать (и, следовательно, ингибировать) связывающий тубулин белок статмин (см. приложение 16.3, стр. 994–995), дестабилизируя микротрубочки. Активация Rho, по-видимому, наоборот, стабилизирует микротрубочки.

В свою очередь, динамика микротрубочек влияет на перестройку актина. Centrosома нуклеирует большое число динамических микротрубочек, и ее пере-

мещение означает, что плюс-концы многих микротрубочек оказываются в выпячивании клетки. Динамические плюс-концы могут косвенно изменять локальную адгезию и активировать GTPазу Rac, еще сильнее стимулируя полимеризацию актина в ведущем конце путем доставки Rac-GEF, связывающих +TIP растущих концов микротрубочек. Таким образом, увеличение концентрации микротрубочек будет способствовать выпячиванию, создавая петлю положительной обратной связи, позволяющую клетке продолжительное время двигаться в одном направлении. Вне зависимости от точного механизма ориентация centrosомы увеличивает количество информации о полярности, получаемой актиновым цитоскелетом от внешнего мира. Это обеспечивает чувствительный ответ на слабые сигналы.

Сходная кооперативная петля обратной связи действует во многих других случаях поляризации. Особенно интересным примером является убийство определенных клеток-мишеней Т-лимфоцитами. Эти клетки служат важнейшим компонентом адаптивного иммунного ответа позвоночных на инфицирование вирусами. Т-клетки, как и нейтрофилы, используют актин-зависимую подвижность для ползания по тканям организма и нахождения клеток-мишеней. Когда Т-клетка контактирует с зараженной вирусом клеткой, для ее убийства используется очень сходный механизм. В точке межклеточного контакта активируется Rac, и в этом сайте начинается полимеризация актина, создающая специализированную область кортекса. Этот специализированный сайт вызывает переориентацию centrosомы, которая вместе со своими микротрубочками перемещается в область контакта Т-клетки и клетки-мишени (рис. 16.103). Микротрубочки, в свою очередь, располагают аппарат Гольджи прямо под зоной контакта, направляя аппарат убийства на клетку-мишень. Механизм убийства рассмотрен в главе 25 (см. рис. 25.47).

16.4.13. Сложная морфологическая специализация нейронов зависит от цитоскелета

Последним примером того, как природные свойства эукариотического цитоскелета направляют специфическое и невероятно сложное крупномасштабное поведение клеток, будет нейрон. Нейроны в зародыше представляют собой ничем не выделяющиеся клетки, использующие актин-зависимую подвижность для миграции в определенные области. Однако как только они попадают в соответствующее окружение, от них начинают отходить длинные специализированные выросты, которые будут либо получать электрические сигналы (*дендриты*), либо передавать их на клетки-мишени (*аксоны*). Изящная и продуманная ветвистая морфология аксонов и дендритов позволяет нейронам образовывать крайне сложные сигнальные сети, одновременно взаимодействующие со множеством клеток и определяющие порой непредсказуемое поведение высших животных. Аксоны и дендриты (носящие общее название *невритов*) заполнены пучками микротрубочек, играющими ключевую роль в их структуре и функциях.

В аксонах все микротрубочки ориентированы в одном направлении: их минус-концы направлены в сторону тела клетки, а плюс-концы — в сторону терминалей (рис. 16.104). Микротрубочки не обладают достаточной длиной, чтобы продолжаться от тела клетки до терминали аксона; обычно их длина составляет всего несколько микрометров, но они образуют перекрывающиеся цепочки. Такой набор упорядоченных микротрубочек служит для быстрого транспорта многих специфических белков, содержащих белки везикул и мРНК, в аксональные терминали, где создаются

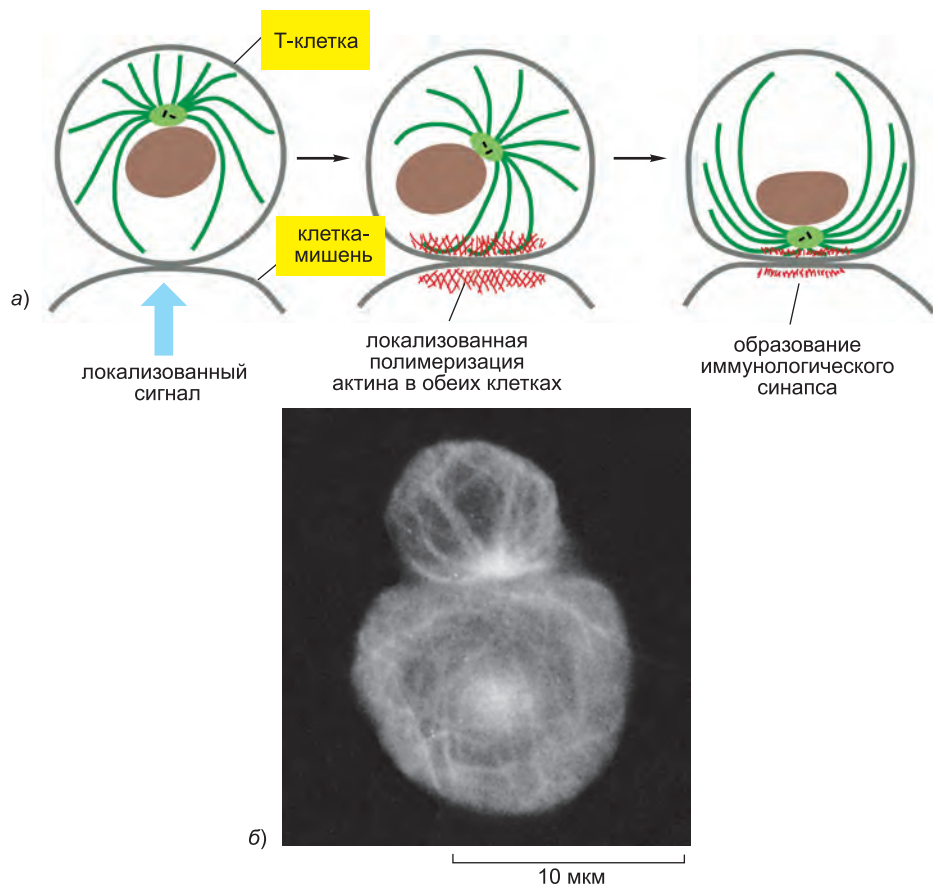


Рис. 16.103. Поляризация цитотоксической Т-клетки после узнавания клетки-мишени. (а) Изменения в цитоскелете цитотоксической Т-клетки после ее контакта с клеткой-мишенью. За начальным узнаванием следуют сигналы, вызывающие полимеризацию актина в обеих клетках. В Т-клетках взаимодействия между обогащенной актином зоной контакта и микротрубочками, исходящими из centrosомы, приводят к переориентации centrosомы, и аппарат Гольджи оказывается прямо напротив клетки-мишени. (б) Иммунофлуоресцентная микрофотография Т-клетки (вверху) и клетки-мишени (внизу), окрашенных антителами к микротрубочкам. Centrosома и исходящая из нее микротрубочковая структура ориентированы в направлении межклеточного контакта. В клетке-мишени, наоборот, микротрубочки не поляризованы. (б, из B. Geiger, D. Rosen and G. Berke, *J. Cell Biol.* 95: 137–143, 1982. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)

и поддерживаются синапсы. Самый длинный аксон человеческого тела начинается в основании спинного мозга и заканчивается в ступне, имея в длину до метра.

Митохондрии, большое число специфических белков и предшественников синаптических везикул путешествуют в прямом (антероградном) направлении. Они переносятся направленными к плюс-концу моторными белками семейства кинезинов, которые способны переместить их на метр за два или три дня. Это значительное улучшение по сравнению с диффузией, которой для перемещения митохондрии на такое расстояние понадобится несколько десятилетий. Многие члены семейства кинезинов участвуют в *антероградном аксональном транспорте*. Большинство

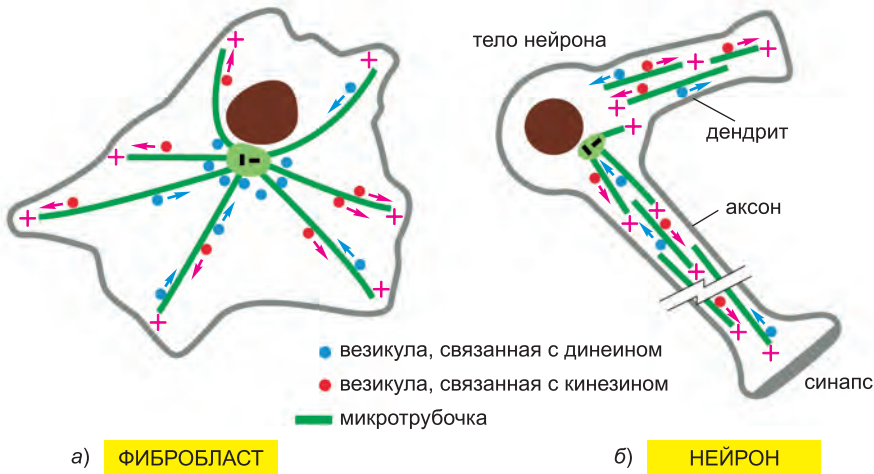


Рис. 16.104. Организация микротрубочек в фибробластах и нейронах. (а) В фибробластах микротрубочки отходят от расположенной в центре клетки centrosомы к периферии. Везикулы, связанные с направленными к плюс-концам кинезинами, движутся к краям клетки, а везикулы, связанные с направленными к минус-концам кинезинами, — к центру. (б) В нейронах микротрубочки организованы сложнее. В аксоне все микротрубочки обладают одинаковой полярностью: их плюс-концы направлены к терминали. Отдельные микротрубочки не продолжают по всей длине аксона, вместо этого, перекрывающиеся сегменты параллельных микротрубочек создают пути для быстрого аксонального транспорта. В дендритах полярность микротрубочек смешана, часть плюс-концов направлена к телу клетки, часть — к терминали дендрита.

из них переносит вдоль микротрубочек определенный набор мембранных органелл. Огромное разнообразие моторных белков кинезинов, использующихся в аксональном транспорте, указывает на то, что они участвуют в направлении своего груза к определенным структурам вблизи терминали или на пути к ней, а также в движении груза. Старые компоненты терминали переносятся обратно в тело клетки для деградации и рециркуляции *ретроградным* (обратным) *аксональным транспортом*. Этот транспорт протекает вдоль тех же ориентированных микротрубочек, но зависит от цитоплазматического динеина, направленного к минус-концам моторного белка. Ретроградный транспорт также играет ключевую роль в сигнализации в ядро о наличии факторов роста и выживания, регистрируемых терминалью аксона, и изменении экспрессии генов.

Одна из форм человеческой периферической нейропатии, болезнь Шарко — Мари — Тута, вызвана точечной мутацией в определенном представителе семейства кинезинов, транспортирующем по аксону предшественников синаптических везикул. Другие типы нейродегенеративных заболеваний, например болезнь Альцгеймера, также могут быть вызваны нарушением нейронного транспорта; как отмечено выше, белок-предшественник амилоидных бляшек APP является частью белкового комплекса, служащего рецептором связывания кинезина-1 с другими аксональными транспортными везикулами.

Структура аксона зависит от аксональных микротрубочек, а также двух других цитоскелетных систем — актиновых филаментов и промежуточных филаментов. Актиновые филаменты выстилают кортекс аксона под плазматической мембраной.

Также в аксонах много актин-зависимых моторных белков, например миозина V, которые, по-видимому, способствуют переносу веществ. Нейрофиламенты, специализированные промежуточные филаменты нервных клеток, обеспечивают основную структурную поддержку аксона. Нарушение нейрофиламентов или сшивающих белков, присоединяющих их к распределенным по аксону микротрубочкам и актиновым филаментам, может привести к дезорганизации аксона и его последующему разрушению.

Создание сложной ветвистой структуры нейрона в процессе эмбрионального развития требует актин-зависимой подвижности. Как упомянуто ранее, кончики растущих аксонов и дендритов удлиняются посредством *конуса роста* — обогащенной актином специализированной подвижной структуры (**рис. 16.105**). Большинство конусов роста образует филоподии, а некоторые еще и ламеллоподии. Выпячивание и стабилизация филоподий очень чувствительны к сигналам окружающей среды. Некоторые клетки секретируют растворимые белки, например нетрин, привлекающие или отталкивающие конусы роста. Они регулируют структуру и подвижность цитоскелета конуса роста, изменяя соотношение между активностями Ras и Rho на ведущем крае (см. рис. 15.62). Более того, вдоль пути также располагаются неподвижные маркеры направления, прикрепленные к внеклеточному матриксу или поверхности клеток. Когда филоподия встречает такой ориентир, она быстро образует адгезионные контакты. Считают, что после этого миозин-зависимое разрушение актиновой сети в нестабилизированной части конуса роста приводит к отклонению развивающегося аксона от ориентира.

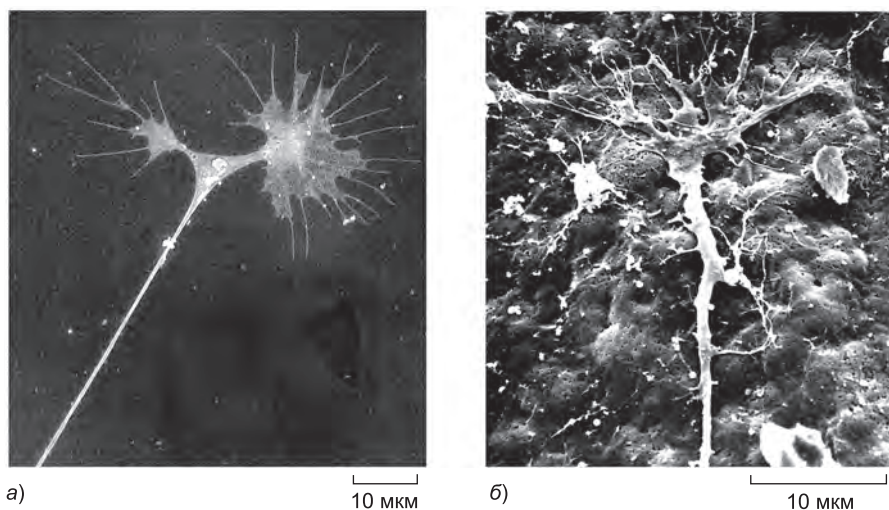


Рис. 16.105. Нейронные конусы роста. (а) Сканирующая электронная микрофотография двух конусов роста на конце нейрита симпатического нерва цыпленка в культуре. Здесь ранее одинарный конус роста расщепился надвое. Обратите внимание на многочисленные филоподии и крупную ламеллоподию. Натянутость нейрита объясняется напряжением, создаваемым движением конусов роста, которые часто являются единственными точками прикрепления аксона к субстрату. (б) Сканирующая электронная микрофотография конуса роста чувствительного нейрона, ползущего по внутренней поверхности эпидермиса головастика *Xenopus*. (а, из D. Bray, в Cell Behaviour [R. Bellairs, A. Curtis and G. Dunn, eds.]. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1982; б, из A. Roberts, *Brain Res.* 118: 526–530, 1976. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Таким образом, сложное сочетание положительных и отрицательных сигналов, как растворимых, так и нерастворимых, точно направляет конус роста к его конечной цели. Затем микротрубочки подкрепляют направительные решения, сделанные обогащенными актином филоподиями и ламеллоподиями. Микротрубочки расположенной позади конуса роста параллельной структуры постоянно растут в конус роста и укорачиваются динамической нестабильностью. Адгезионные сигналы направления каким-то образом передаются на динамические концы микротрубочек, что позволяет растущим в правильном направлении микротрубочкам стабилизироваться против деполимеризации. Таким образом, позади остается обогащенный микротрубочками аксон, отмечающий путь конуса роста.

Дендриты обычно короче, чем аксоны, и они получают синаптические сигналы, а не отправляют их, как аксоны. Микротрубочки в дендритах лежат параллельно друг другу, их полярность перемешана: плюс-концы части микротрубочек указывают в направлении кончика дендрита, тогда как плюс-концы других микротрубочек — в направлении тела клетки. Несмотря на это, дендриты также образуются в результате активности конуса роста. Таким образом, именно конусы роста на концах аксонов и дендритов создают замысловатую, индивидуальную морфологию зрелых нервных клеток (**рис. 16.106**).

Несмотря на то что нейроны центральной нервной системы живут долго, они не статичны. Синапсы постоянно образуются, усиливаются, ослабляются по мере того, как мозг учится, запоминает, забывает. Изображения высокого разрешения структуры нейронов мозга взрослых мышей показали, что морфология нейронов непрерывно претерпевает изменения по мере создания и разрушения синапсов (**рис. 16.107**). По-видимому, эти актин-зависимые перестройки играют ключевую роль в обучении и долговременной памяти. Таким образом, цитоскелет служит двигателем конструирования всей нервной системы и обеспечивает ее части усиливающими, стабилизирующими и поддерживающими структурами.

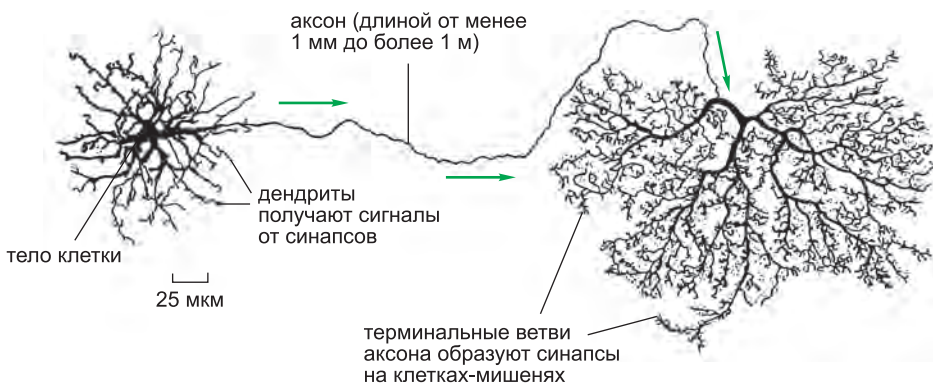


Рис. 16.106. Сложная архитектура нейрона позвоночных. Показан нейрон сетчатки обезьяны. Стрелки указывают на направление движения электрического сигнала вдоль аксона. Самые крупные нейроны человеческого тела достигают 1 м (1 миллиона мкм) в длину, начинаясь в основании спинного мозга и заканчиваясь в большом пальце ноги, и имеют диаметр 15 мкм. (Адаптировано из B. B. Boycott, в *Essays on the Nervous System* [R. Bellairs and E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clanderon Press, 1974.)

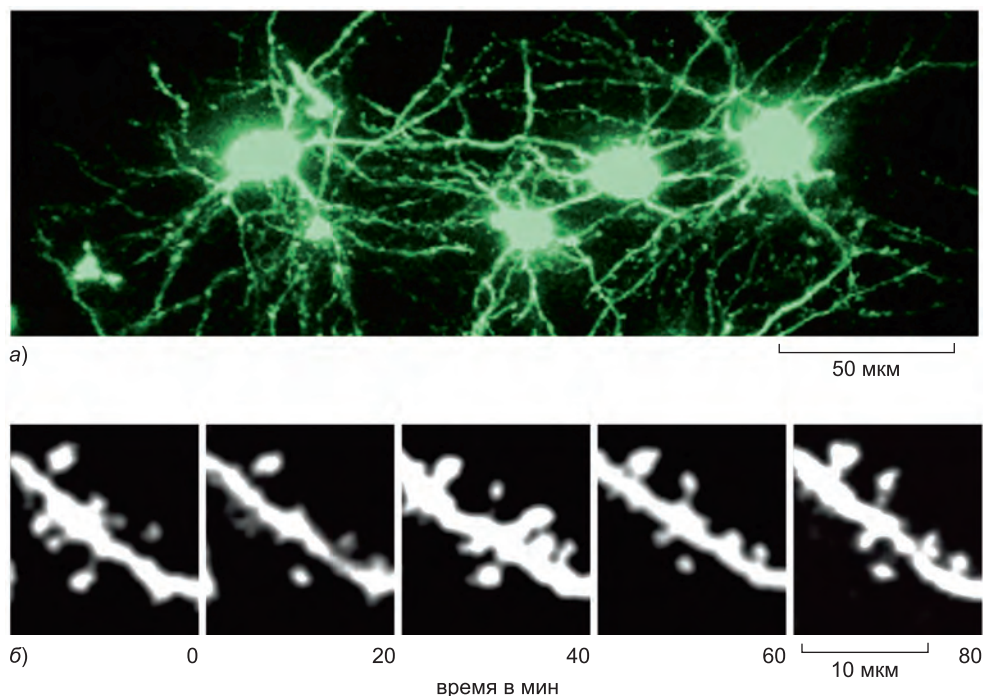


Рис. 16.107. Быстрые изменения структуры дендритов в мозге живой мыши. (а) Изображение нейронов коры трансгенной мыши, экспрессирующей в клетках мозга небольшое количество зеленого флуоресцентного белка. Изменения нейронов такого мозга и их отростков можно месяцами наблюдать при помощи высокочувствительной флуоресцентной микроскопии. Мышь подвергают операции, во время которой ей в череп встраивают маленькую прозрачную пластинку. Каждый раз, когда записывают изображение, мышь анестезируют. (б) Единственный дендрит на протяжении 80 минут. Изображения показывают, что дендриты непрерывно выпускают и втягивают маленькие актин-зависимые выпячивания — дендритные шипики, переносящие большинство возбуждающих синапсов аксонов мозга. Те шипики, которые стабилизируются и сохраняются месяцами, предположительно, играют важную роль в функционировании мозга и могут участвовать в долговременной памяти. (С любезного разрешения Karel Svoboda.)

Заключение

В эукариотических клетках из высокоупорядоченных групп моторных белков, движущихся вдоль филаментов, образуется два типа специализированных структур. Актомиозиновая система саркомеров обеспечивает сокращение различных типов мышц, включая скелетные, гладкие и сердечную мышцы. Система динеин-микротрубочки аксономы обеспечивает биение ресничек и волнообразные колебания жгутиков.

Движение клетки как целого и крупномасштабное придание формы и структурирование клеток требуют скоординированной работы трех основных филаментных систем и большого числа цитоскелетных дополнительных белков, включая моторные белки. Во время деления клеток функционирование микротрубочкового веретена деления требует пространственного и временного взаимодействия динамических цитоскелетных филаментов, активных моторных белков и разнообразных дополнительных факторов. Ползание клеток — рас-

пространенное поведение, играющее важную роль в эмбриональном развитии, заживлении ран, поддержании тканей и функционировании иммунной системы взрослых животных, — служит еще одним ярким примером такой сложной, скоординированной работы цитоскелета. Для ползания клетка должна сформировать и поддерживать структурную полярность, зависящую от внешних сигналов. Более того, чтобы продвигаться вперед, клетка должна координировать отростки на ведущем конце (путем сборки актиновых филаментов), адгезию новообразованных частей клетки к субстрату и силы, создаваемые молекулярными моторами.

Таким сложным клеткам, как нейроны, необходима скоординированная сборка микротрубочек, нейрофиламентов (нейронных промежуточных филаментов) и актиновых филаментов, а также работа десятков специализированных молекулярных моторов, транспортирующих субклеточные компоненты в ответствующие участки клетки.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности? Объясните почему

16.1. Гидролиз АТФ при полимеризации актина выполняет ту же функцию, что гидролиз GTP при полимеризации тубулина: ослабление связей в полимере и, следовательно, усиление деполимеризации.

16.2. В большинстве животных клеток направленные к минус-концам микротрубочковые моторы доставляют свой груз к периферии клетки, а направленные к плюс-концам моторы — к центру клетки.

16.3. Двигательные нейроны инициируют в мембранах мышечных клеток потенциалы действия, открывающие потенциал-зависимые Ca^{2+} -каналы Т-трубочек, в результате чего внеклеточный Ca^{2+} входит в цитозоль, связывает тропонин С и запускает быстрое мышечное сокращение.

Решите следующие задачи

16.4. В растворе чистого тубулина с концентрацией 1,4 мг/мл микротрубочки растут со скоростью примерно 2 $\mu\text{м}/\text{мин}$. При такой скорости роста сколько $\alpha\beta$ -тубулиновых димеров (длиной 8 нм) присоединяется к концам микротрубочек каждую секунду?

16.5. Предположительно, в растворе димеров $\alpha\beta$ -тубулина нуклеация микротрубочек происходит за счет образования линейных протофиламентов длиной около семи димеров, после чего вероятности присоединения следующего димера латерально или на конце протофиламента становятся примерно равными. Ключевым событием образования микротрубочки считается первое латеральное присоединение (рис. Q16.1). Как это событие приводит к последующей быстрой сборке микротрубочки?

16.6. Как центросома «узнает», что она нашла центр клетки?

16.7. Концентрация актина в клетках в 50–100 раз выше, чем критическая концентрация чистого актина в пробирке. Как такое возможно? Что препятствует полимеризации актиновых субъединиц в филаменты? Почему клетке выгодно поддерживать такой большой пул актиновых субъединиц?

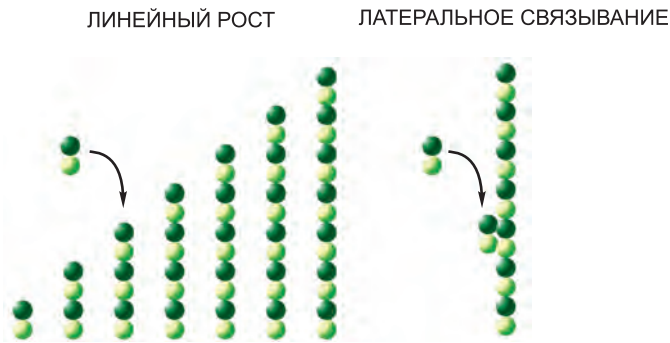


Рис. Q16.1. Модель нуклеации микротрубочек очищенными димерами $\alpha\beta$ -тубулина (задача 16.5).

16.8. Движение отдельной молекулы моторного белка можно анализировать напрямую. При помощи поляризованного лазерного луча можно создавать интерференционную картину, налагающую центрально направленную силу, изменяющуюся от нуля в центре до нескольких пиконьютонов на периферии (на расстоянии около 200 нм от центра). Отдельные молекулы, входящие в интерференционные полосы, быстро выталкиваются в центр, где их можно захватить и перемещать по воле экспериментатора.

При помощи такого «оптического пинцета» отдельные молекулы кинезина можно поместить на расположенную на покровном стекле микротрубочку. Несмотря на то что молекулу кинезина нельзя увидеть в оптический микроскоп, ее можно пометить силиконовой гранулой и косвенно следить за ней, наблюдая гранулу (рис. Q16.2). В отсутствие АТФ молекула кинезина остается в центре интерференционной картины, но при наличии АТФ она движется к плюс-концу

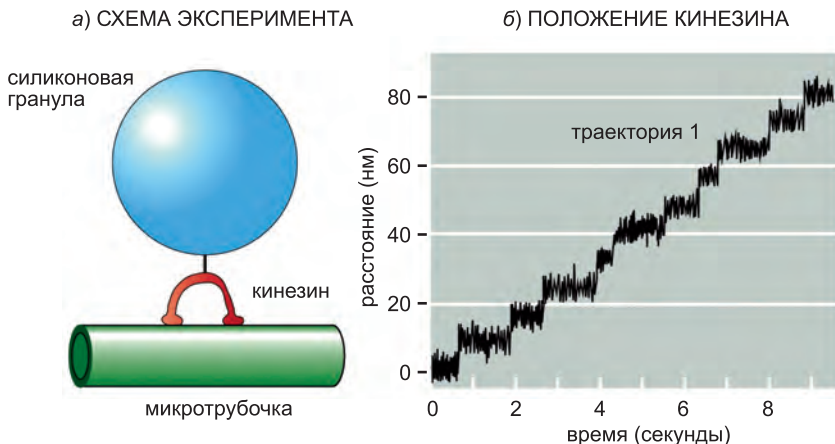


Рис. Q16.2. Движение кинезина вдоль микротрубочки (задача 16.8). (а) Схема эксперимента. Связанный с силиконовой гранулой кинезин движется вдоль микротрубочки. (б) Положение кинезина (определенное по положению силиконовой гранулы) относительно центра интерференционной картины как функция от времени движения вдоль микротрубочки. Неровность траектории объясняется броуновским движением гранулы.

микротрубочки. По мере движения вдоль филамента кинезин испытывает действие интерференционной картины, что моделирует груз, переносимый моторным белком в клетке. Более того, давление против силиконовой гранулы уравнивает броуновское (тепловое) движение, поэтому положение гранулы точнее отражает положение молекулы кинезина на микротрубочке.

Траектории движения молекулы кинезина вдоль микротрубочки показаны на рисунке Q16.2, б.

а. Как показано на рисунке Q16.2, б, кинезин движется исключительно в одном направлении (к плюс-концу микротрубочки). Откуда берется свободная энергия, необходимая для поддержания однонаправленного движения?

б. Какова средняя скорость движения кинезина вдоль микротрубочки?

в. Какова длина шага кинезина вдоль микротрубочки?

г. Другие исследования показали, что кинезин несет два глобулярных домена, способных связывать β -тубулин, и что кинезин движется вдоль единственного протофиламента микротрубочки. В протофилamente субъединица β -тубулина встречается каждые 8 нм. Учитывая длину шага и расстояние между β -тубулиновыми субъединицами, как, по вашему мнению, молекула кинезина движется вдоль микротрубочки?

д. Можно ли по данным рисунка Q16.2, б определить, сколь молекул АТФ гидролизует на каждом шаге?

16.9. Как поддерживается однонаправленное движение ламеллоподии?

16.10. Измерения длины саркомера и напряжения во время изометрического сокращения поперечнополосатых мышц предоставили ранние доказательства модели скользящих филаментов мышечного сокращения. На основании вашего понимания модели скользящих филаментов и строения саркомера предложите молекулярное объяснение зависимости напряжения от длины саркомера в областях **рис. Q16.3**, обозначенных I, II, III и IV. (В данной мышце длина миозинового филамента составляет 1,6 мкм, а длина отходящих от Z-дисков актиновых филаментов — 1,0 мкм.)

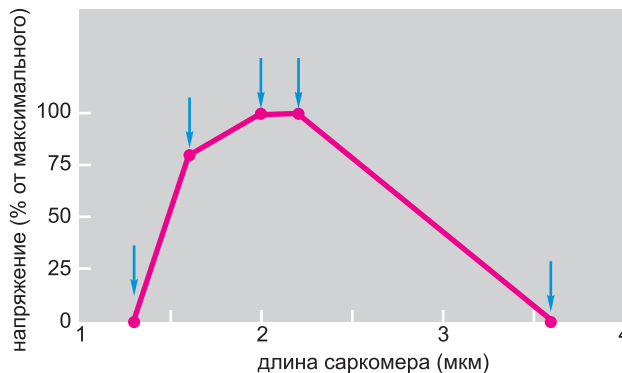


Рис. Q16.3. Зависимость напряжения от длины саркомера при изометрическом сокращении (задача 16.10).

Литература

Общая

Bray D. (2001) *Cell Movements: From Molecules to Motility*, 2nd ed. New York: Garland Science.

Howard J. (2001) *Mechanics of Motor Proteins and the Cytoskeleton*. Sunderland, MA: Sinauer.

Самосборка и динамическая структура филаментов цитоскелета

Dogterom M. & Yurke B. (1997) Measurement of the force-velocity relation for growing microtubules. *Science* 278: 856–860.

Garner E.C., Campbell C.S. & Mullins R.D. (2004) Dynamic instability in a DNA-segregating prokaryotic actin homolog. *Science* 306: 1021–1025.

Helfand B.T., Chang L. & Goldman R.D. (2003) The dynamic and motile properties of intermediate filaments. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19: 445–467.

Hill T.L. & Kirschner M.W. (1982) Bioenergetics and kinetics of microtubule and actin filament assembly-disassembly. *Int. Rev. Cytol.* 78: 1–125.

Hotani H. & Horio T. (1988) Dynamics of microtubules visualized by darkfield microscopy: treadmilling and dynamic instability. *Cell Motil. Cytoskeleton* 10: 229–236.

Jones U., Carballido-Lopez R. & Errington J. (2001) Control of cell shape in bacteria: helical, actin-like filaments in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104: 913–922.

Kerssemakers J.W., Munteanu E.L., Laan L. et al. (2006) Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature* 442: 709–712.

Luby-Phelps K. (2000) Cytoarchitecture and physical properties of cytoplasm: volume, viscosity, diffusion, intracellular surface area. *Int. Rev. Cytol.* 192: 189–221.

Mitchison T. & Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242.

Mitchison T.J. (1995) Evolution of a dynamic cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 349: 299–304.

Mukherjee A. & Lutkenhaus J. (1994) Guanine nucleotide-dependent assembly of FtsZ into filaments. *J. Bacteriol.* 176: 2754–2758.

Oosawa F. & Asakura S. (1975) *Thermodynamics of the polymerization of protein*. New York: Academic Press, pp. 41–55, pp. 90–108.

Pauling L. (1953) Aggregation of Globular Proteins. *Discuss Faraday Soc.* 13: 170–176.

Rodionov V.I. & Borisy G.G. (1997) Microtubule treadmilling in vivo. *Science* 275: 215–218.

Shih Y.L. & Rothfield L. (2006) The bacterial cytoskeleton. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 729–754.

Theriot J.A. (2000) The polymerization motor. *Traffic* 1: 19–28.

Как клетки регулируют свои цитоскелетные филаменты

Aldaz H., Rice L.M., Stearns T. & Agard D.A. (2005) Insights into microtubule nucleation from the crystal structure of human gamma-tubulin. *Nature* 435: 523–527.

Bretscher A., Chambers D., Nguyen R. & Reczek D. (2000) ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16: 113–143.

Doxsey S., McCollum D. & Theurkauf W. (2005) Centrosomes in cellular regulation. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 21: 411–434.

Garcia M.L. & Cleveland D.W. (2001) Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 41–48.

Holy T.E., Dogterom M., Yurke B. & Leibler S. (1997) Assembly and positioning of microtubule asters in microfabricated chambers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 6228–6231.

Mullins R.D., Heuser J.A. & Pollard T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6181–6186.

Robinson R.C., Turbedsky K., Kaiser D.A. et al. (2001) Crystal structure of Arp2/3 complex. *Science* 294: 1679–1684.

Quarmby L. (2000) Cellular Samurai: katanin and the severing of microtubules. *J. Cell Sci.* 113: 2821–2827.

Stearns T. & Kirschner M. (1994) In vitro reconstitution of centrosome assembly and function: the central role of gamma-tubulin. *Cell* 76: 623–637.

Wiese C. & Zheng Y. (2006) Microtubule nucleation: gamma-tubulin and beyond. *J. Cell Sci.* 119: 4143–4153.

Zheng Y., Wong M.L., Alberts B. & Mitchison T. (1995) Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378: 578–583.

Zigmond S.H. (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16: 99–105.

Молекулярные моторы

Burgess S.A., Walker M.L., Sakakibara H. et al. (2003) Dynein structure and power stroke. *Nature* 421: 715–718.

Hirokawa N. (1998) Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science* 279: 519–526.

Howard J., Hudspeth A.J. & Vale R.D. (1989) Movement of microtubules by single kinesin molecules. *Nature* 342: 154–158.

Howard J. (1997) Molecular motors: structural adaptations to cellular functions. *Nature* 389: 561–567.

Rayment I., Rypniewski W.R., Schmidt-Base K. et al. (1993) Three-dimensional structure of myosin subfragment-1: a molecular motor. *Science* 261: 50–58.

Reek-Peterson S.L., Yildiz A., Carter A.P. et al. (2006) Single-molecule analysis of dynein processivity and stepping behavior. *Cell* 126: 335–348.

Rice S., Lin A.W., Safer D. et al. (1999) A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 402: 778–784.

Richards T.A. & Cavalier-Smith T. (2005) Myosin domain evolution and the primary divergence of eukaryotes. *Nature* 436: 1113–1118.

Svoboda K., Schmidt C.F., Schnapp B.J. & Block S.M. (1993) Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 365: 721–727.

Vikstrom K.L. & Leinwand L.A. (1996) Contractile protein mutations and heart disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8: 97–105.

Wells A.L., Lin A.W., Chen L.Q. et al. (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401: 505–508.

Yildiz A., Forkey J.N., McKinney S.A. et al. (2003) Myosin V walks hand-overhand: single fluorophore imaging with 1.5-nm localization. *Science* 300: 2061–2065.

Yildiz A. & Selvin P.R. (2005) Kinesin: walking, crawling or sliding along? *Trends Cell Biol.* 15: 112–120.

Цитоскелет и функционирование клетки

Abercrombie M. (1980) The crawling movement of metazoan cells. *Proc. Roy. Soc. B.* 207: 129–147.

Cooke R. (2004) The sliding filament model: 1972–2004. *J. Gen. Physiol.* 123: 643–656.

Dent E. W. & Gertler F. B. (2003) Cytoskeletal dynamics and transport in growth cone motility and axon guidance. *Neuron* 40: 209–227.

Lauffenburger D. A. & Horwitz A. F. (1996) Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 84: 359–369.

Lo C. M., Wang H. B., Dembo M. & Wang Y. L. (2000) Cell movement is guided by the rigidity of the substrate. *Biophys. J.* 79: 144–152.

Madden K. & Snyder M. (1998) Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 52: 687–744.

Ridley A. J., Schwartz M. A., Burridge K. et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302: 1704–1709.

Rafelski S. M. & Theriot J. A. (2004) Crawling toward a unified model of cell motility: spatial and temporal regulation of actin dynamics. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 209–239.

Parent C. A. & Devreotes P. N. (1999) A cell's sense of direction. *Science* 284: 765–770.

Pollard T. D. & Borisy G. G. (2003) Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112: 453–465.

Purcell E. M. (1977) Life at low Reynolds' number. *Am. J. Phys.* 45: 3–11.

Wittmann T., Hyman A. & Desai A. (2001) The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nature Cell Biol.* 3: E28–E34.

Клеточный цикл

Единственный способ получить новую клетку — удвоить уже существующую. Этот простой факт, впервые установленный в середине XIX века, несет в себе основополагающий вывод о непрерывности жизни. Все живые организмы, от одноклеточных бактерий до многоклеточных млекопитающих, являются результатом повторяющихся циклов роста и деления, начавшихся с момента зарождения жизни на Земле более трех миллиардов лет назад.

Клетка воспроизводит себя через последовательность событий, в процессе которых она удваивает свое содержимое и затем разделяется надвое. Этот цикл удвоения и деления, известный как **клеточный цикл**, является основополагающим механизмом, при помощи которого размножаются все живые существа. У таких одноклеточных видов, как бактерии и дрожжи, каждое клеточное деление приводит к образованию полного нового организма. У многоклеточных видов для возникновения функционирующего организма требуются длинные и сложные последовательности клеточных делений. Даже взрослому организму клеточное деление необходимо для замещения погибших клеток. В самом деле, в каждом из нас каждую секунду образуются миллионы клеток просто для выживания: если клеточное деление остановится, например, за счет воздействия высокой дозы рентгеновского излучения, мы умрем через несколько дней.

Детали клеточного цикла изменяются от организма к организму и в различные этапы жизни. Однако определенные свойства универсальны. Минимальный набор процессов, которые должны произойти в клетке, позволяют ей выполнить наиболее фундаментальную задачу — передать генетическую информацию следующему поколению клеток. Для получения двух генетически идентичных дочерних клеток ДНК каждой хромосомы необходимо точно реплицировать с образованием двух полных копий. Затем реплицированные хромосомы должны быть аккуратно распределены (этот процесс называется *сегрегацией*, или *расхождением*, хромосом) по двум дочерним клеткам таким образом, чтобы каждая из них получила по полному геному (**рис. 17.1**).

В эукариотических клетках эволюционировала сложная сеть регуляторных белков, известных как *система контроля клеточного цикла*, управляющая прохождением через клеточный цикл. Ядром этой системы служит упорядоченный набор биохимических переключателей, инициирующих основные события цикла, включая удвоение и расхождение хромосом. В большинстве клеток дополнительные уровни регуляции усиливают точность клеточного деления и позволяют системе контроля отвечать на различные сигналы, приходящие как изнутри, так и снаружи клетки. Внутри клетки системы контроля следят за прохождением клеточного цикла и задерживают последующие события до тех пор, пока не завершились предшествующие. Например, они препятствуют подготовке к расхождению удвоенных хромосом до окончания репликации ДНК. Система контроля также следит за условиями вне клетки. В многоклеточных животных система высокочувствительна к сигналам

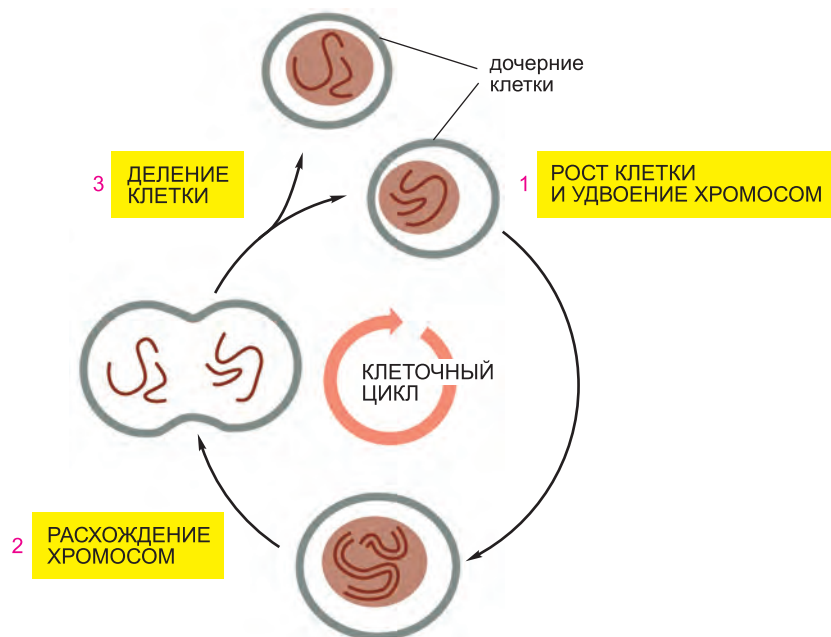


Рис. 17.1. Клеточный цикл. Чтобы показать то, как в каждом цикле образуются две генетически идентичные дочерние клетки, показано деление гипотетической эукариотической клетки с двумя хромосомами. Обычно дочерние клетки продолжают делиться, проходя через дополнительные клеточные циклы.

от других клеток, стимулируя клеточное деление, когда требуется больше клеток, и блокируя его, когда такой необходимости нет. Таким образом, система контроля клеточного цикла играет центральную роль в регуляции численности клеток в тканях организма. Когда система работает неправильно, избыточное клеточное деление может привести к раку.

Помимо удвоения генома, большинство клеток удваивает и другие органеллы и макромолекулы; в противном случае дочерние клетки становились бы с каждым делением все меньше. Для поддержания размера делящиеся клетки должны координировать свой рост (т.е. увеличение своей массы) с делением.

В данной главе описаны различные события клеточного цикла и то, как они контролируются и координируются. Мы начнем с короткого обзора клеточного цикла. Затем мы рассмотрим систему контроля клеточного цикла и объясним, как она запускает различные события цикла. Затем мы подробно опишем основные этапы клеточного цикла, во время которых происходит удвоение и расхождение хромосом по двум дочерним клеткам. Наконец, мы рассмотрим, как внеклеточные сигналы управляют скоростями роста и деления клеток и как эти два процесса координируются.

17.1. Обзор клеточного цикла

Мы начнем данный раздел с краткого описания четырех *фаз* эукариотического клеточного цикла. Затем мы рассмотрим некоторые методы и модельные системы, используемые для изучения клеточного цикла.

17.1.1. Эукариотический клеточный цикл подразделяется на четыре фазы

Основная функция клеточного цикла — аккуратное удвоение большого количества ДНК хромосом и последующее точное распределение копий по двум генетически идентичным дочерним клеткам. Эти процессы определяют две основные фазы клеточного цикла. Удвоение хромосом происходит во время *S-фазы* (*S* соответствует синтезу ДНК — *DNA synthesis*), занимающей 10–12 часов и соответствующей примерно половине времени клеточного цикла типичной клетки млекопитающих. После *S-фазы* в *M-фазе* (*M* соответствует митозу — *mitosis*) происходит расхождение и клеточное деление, для чего необходимо значительно меньше времени (меньше часа в клетке млекопитающих). *M-фаза* включает в себя два основных события: ядерное деление, или митоз, во время которого удвоенные хромосомы распределяются по дочерним ядрам, и деление цитоплазмы, или *цитокинез*, при котором сама клетка разделяется надвое (рис. 17.2).

В конце *S-фазы* молекулы ДНК каждой пары удвоенных хромосом переплетены и удерживаются вместе специализированными белковыми мостиками. В начале митоза на стадии, носящей название *профаза*, две молекулы ДНК постепенно расплетаются и конденсируются в пару жестких и компактных палочек — **сестринских хроматид**, которые остаются связанными за счет их *когезии* (*сцепления*). Когда позднее в митозе разбирается ядерная оболочка, пары сестринских хроматид присоединяются к *веретену деления*, крупной биполярной структуре, состоящей из микротрубочек (см. главу 16). Сестринские хроматиды связаны с противоположными полюсами веретена, и в конце концов все «сестры» выстраиваются по экватору веретена на стадии, носящей название *метафаза*. Разрушение когезии сестринских хроматид в начале *анафазы* разделяет хроматиды, растаскиваемые к противоположным полюсам веретена. Затем веретено разбирается, и разошедшиеся хромосомы упаковываются в отдельные ядра в *телофазе*. Наконец, цитокинез разделяет клетку надвое таким образом, что каждая из дочерних клеток наследует по одному ядру (рис. 17.3).

Большинству клеток необходимо значительно больше времени для роста и удвоения своей массы белков и органелл, чем для дубликации хромосом и деления. Частично для того, чтобы у клетки было время расти, в большинстве клеточных циклов имеются дополнительные *промежуточные фазы* (*G-фазы*, от англ. *gap* — промежуток) — **G₁-фаза** между *M-фазой* и *S-фазой* и **G₂-фаза** между *S-фазой* и митозом. Таким образом, эукариотический клеточный цикл традиционно подразделяется на четыре последовательные фазы: G₁,

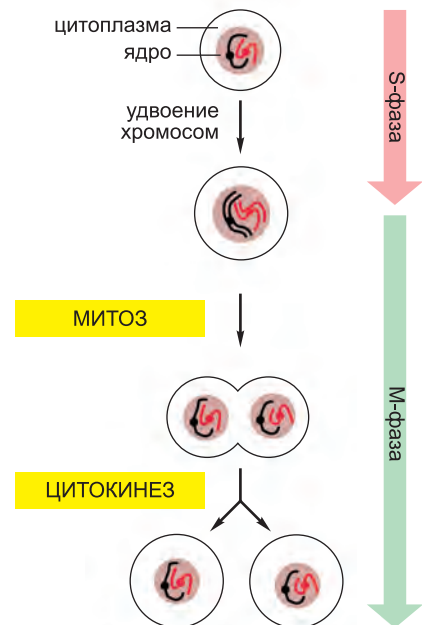


Рис. 17.2. Основные события клеточного цикла. Основные хромосомные события клеточного цикла происходят в *S-фазе*, когда удваиваются хромосомы, и в *M-фазе*, когда удвоенные хромосомы расходятся по парам дочерних ядер (в митозе) и сама клетка разделяется надвое (цитокинез).

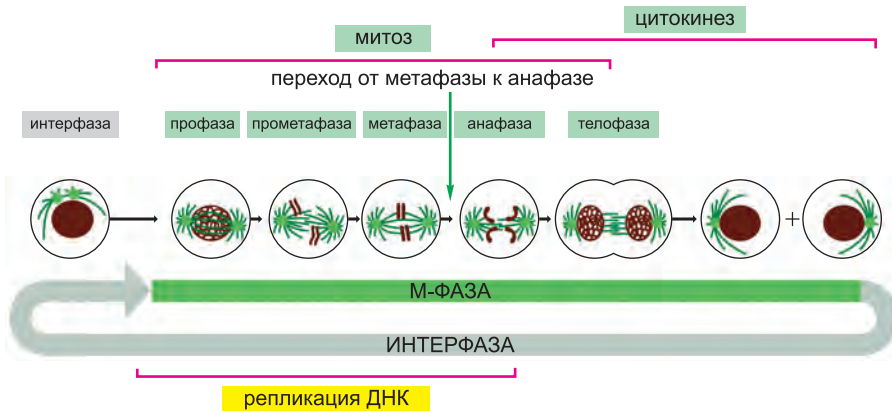


Рис. 17.3. События деления эукариотических клеток, как они видны в микроскоп. Легко видимые процессы ядерного деления (митоза) и клеточного деления (цитокинеза), вместе называемые М-фазой, обычно занимают лишь небольшую часть клеточного цикла. Другая, значительно более продолжительная часть цикла, интерфаза, включает в себя S-фазу и промежуточные фазы (см. текст). Показано пять стадий митоза: резкое изменение биохимического состояния клетки происходит при переходе от метафазы к анафазе. Клетка может остановиться в метафазе до точки перехода, но как только она ее преодолевая, прохождение митоза и цитокинеза до следующей интерфазы неизбежно.

S, G_2 и M. G_1 , S и G_2 вместе носят название **интерфаза** (рис. 17.4, и см. рис. 17.3). В типичной пролиферирующей клетке человека в культуре интерфаза может занимать 23 часа 24-часового клеточного цикла. При этом 1 час занимает М-фаза. Клеточный рост протекает на всем протяжении клеточного цикла, за исключением М-фазы.

Промежуточные фазы — это не просто временные задержки, позволяющие клетке расти. Они также предоставляют клетке время для наблюдения за внутренней и внешней средами, поскольку, прежде чем перейти к значительным перестройкам S-фазы и митоза, клетка должна быть уверена, что все приготовления завершены и условия благоприятны. В этом отношении особенно важна G_1 -фаза. Ее продолжительность может значительно изменяться в зависимости от внешних условий и внеклеточных сигналов от других клеток. Например, если внеклеточные условия неблагоприятны, клетки задерживают прохождение через G_1 и даже могут войти в специальное состояние покоя, известное как G_0 (G-ноль). В этом состоянии клетки могут находиться дни, недели и даже годы до возобновления пролиферации. В самом деле, многие клетки постоянно остаются в G_0 до тех пор, пока они сами или организм не умирают. Если внеклеточные условия благоприятны и присутствуют сигналы роста и деления, клетки в ранней G_1 - или G_0 -фазе проходят критическую точку перехода в конце G_1 , известную как **Старт** (у дрожжей) или **точка рестрикции** (в клетках млекопитающих). Мы будем использовать термин «Старт» как для дрожжей, так и для млекопитающих. После прохождения этой точки клетки должны реплицировать ДНК, даже если внеклеточные сигналы клеточного роста и деления исчезают.

17.1.2. Контроль клеточного цикла примерно одинаков во всех эукариотах

Некоторые свойства клеточного цикла, включая время, необходимое для завершения определенных событий, значительно изменяются от одного типа клетки

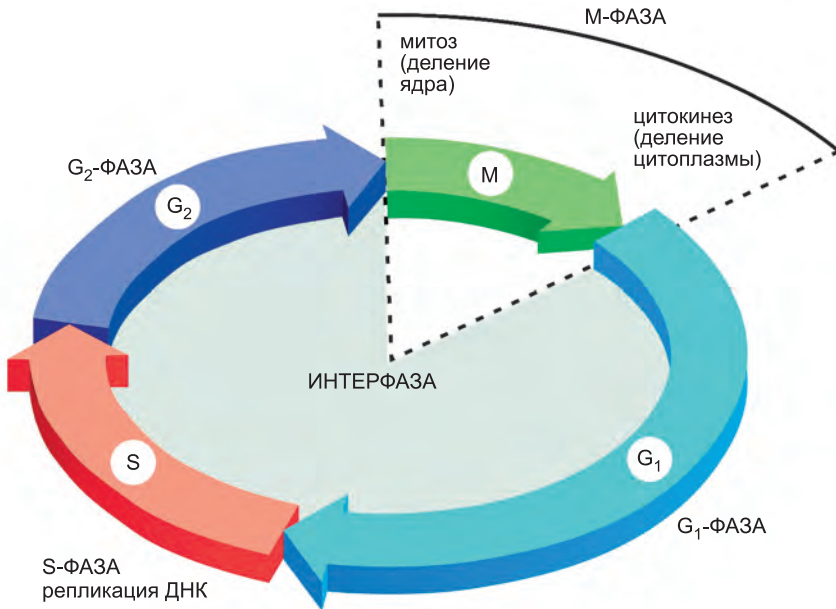


Рис. 17.4. Четыре фазы клеточного цикла. В большинстве клеток промежуточные фазы разделяют основные события S-фазы и M-фазы. G_1 — это промежуток между M-фазой и S-фазой, а G_2 — между S-фазой и M-фазой.

к другому, даже если эти клетки принадлежат одному организму. Однако фундаментальная организация цикла во всех эукариотических клетках одинакова, и, по-видимому, все эукариоты используют сходный аппарат и механизмы контроля для запуска и регуляции событий клеточного цикла. Белки системы контроля клеточного цикла, например, впервые возникли более миллиарда лет назад. Они настолько высококонсервативны, что многие из них отлично работают при переносе из человеческой клетки в дрожжевую. Таким образом, мы можем изучать клеточный цикл и его регуляцию в разнообразных организмах и использовать полученные знания для составления общей картины деления эукариотической клетки. В оставшейся части данного раздела мы кратко рассмотрим три эукариотические системы, наиболее часто используемые для изучения контроля и организации клеточного цикла: дрожжи, зародыши животных и культивируемые клетки млекопитающих.

17.1.3. Контроль клеточного цикла можно генетически препарировать путем анализа дрожжевых мутантов

Дрожжи — это очень маленькие одноклеточные грибы, чья система контроля клеточного цикла удивительно похожа на нашу. Для изучения клеточного цикла обычно используют два вида. **Делящиеся дрожжи** *Schizosaccharomyces pombe* названы в честь африканского пива, для получения которого их используют. Это палочковидные клетки, растущие за счет удлинения на концах. Деление происходит, когда посередине клетки образуется перегородка, или клеточная пластинка (рис. 17.5, а). **Почкующиеся дрожжи** *Saccharomyces cerevisiae* используют пивовары и пекари. Это овальные клетки, делящиеся путем образования почки, которая

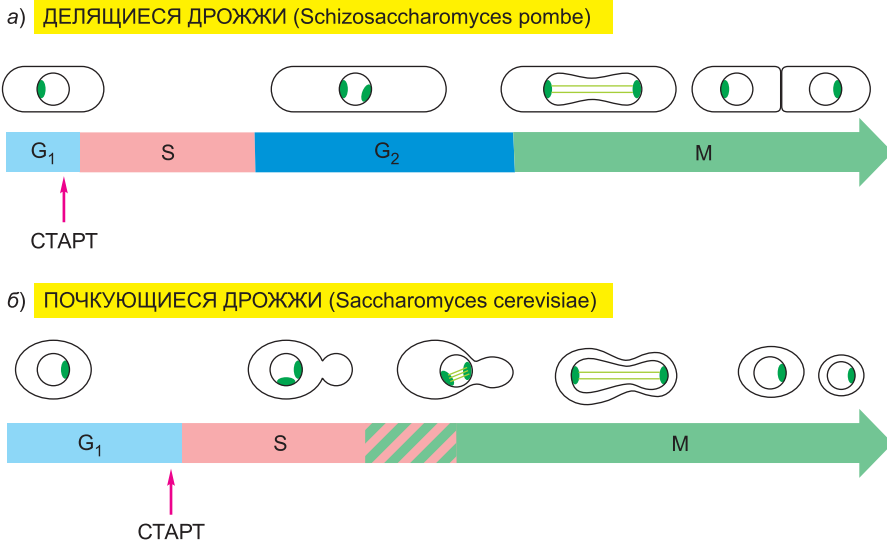


Рис. 17.5. Сравнение клеточных циклов делящихся и почкующихся дрожжей. (а) Делящиеся дрожжи обладают типичным эукариотическим клеточным циклом с фазами G_1 , S, G_2 и M. Во время M-фазы ядерная оболочка дрожжевой клетки, в отличие от оболочки высших эукариотических клеток, не разрушается. Микротрубочки веретена деления (светло-зеленые) образуются внутри ядра и присоединяются к полярным тельцам веретена (темно-зеленые) на его периферии. Клетка делится за счет образования перегородки (известной как клеточная пластинка) и разделения надвое. (б) Почкующиеся дрожжи обладают нормальными фазами G_1 и S, но не имеют нормальной G_2 -фазы. Вместо этого, основанное на микротрубочках веретено начинает образовываться в конце S-фазы; как и в делящихся дрожжах, ядерная оболочка во время митоза не нарушается и веретено формируется внутри ядра. В отличие от делящихся дрожжей, здесь клетка делится за счет почкования.

формируется в G_1 и постепенно растет до тех пор, пока не отделится от материнской клетки во время митоза (рис. 17.5, б).

Несмотря на внешние различия, двум видам дрожжей свойственны общие характеристики, полезные для генетических исследований. Они размножаются почти так же быстро, как бактерии, а размер их генома составляет менее 1% от генома млекопитающих. Они легко поддаются быстрым молекулярно-генетическим манипуляциям, направленным на удаление, замещение или изменение генов. Но наиболее важно то, что они способны пролиферировать в гаплоидном состоянии, т. е. с единственной копией каждого гена в клетке. Когда клетки гаплоидны, легко изолировать и изучать мутации, приводящие к инактивации гена, поскольку это позволяет избежать осложнений, связанных с наличием второй копии гена.

Многие важные открытия о контроле клеточного цикла стали результатом систематического поиска мутаций дрожжей, инактивирующих гены, кодирующие важные компоненты системы контроля клеточного цикла. Гены, подверженные некоторым из этих мутаций, известны как **гены цикла клеточного деления** (*Cell-Division-Cycle Genes*), или **гены Cdc**. Многие из этих мутаций приводят к остановкам клеточного цикла в определенных точках, т. е. продукты этих генов, по-видимому, необходимы для прохождения через эту точку.

Однако мутант, не способный завершить клеточный цикл, не может быть размножен. Таким образом, мутанты по *Cdc* могут отбираться и поддерживаться,

только если они обладают *условным* фенотипом, т.е. если продукт мутантного гена не способен функционировать лишь в определенных условиях. Большинство условных мутаций клеточного цикла представляют собой *температурочувствительные мутации*, при которых мутантный белок не функционирует при высоких температурах, но обеспечивает клеточное деление при низких температурах. Температурочувствительный мутант *Cdc* может быть размножен при низких температурах (в *пермиссивных условиях*) и выращен при повышенной температуре (в *рестриктивных условиях*) для выключения функции мутантного гена. При более высокой температуре клетки продолжают проходить клеточный цикл до тех пор, пока не достигнут точки, в которой функция мутантного гена необходима для протекания дальнейших процессов. В результате в этой точке клетки останавливаются (**рис. 17.6**). В случае почкующихся дрожжей однородную остановку клеточного цикла такого рода можно обнаружить, просто взглянув на клетку: присутствие или отсутствие почки и ее размер указывают на точку клеточного цикла, в которой остановился мутант (**рис. 17.7**).

17.1.4. Контроль клеточного цикла можно биохимически анализировать в зародышах животных

Биохимические свойства клеточного цикла удобно анализировать на гигантских оплодотворенных яйцеклетках животных, несущих большие запасы белков, необходимых для клеточного деления. Яйцеклетка лягушки *Xenopus*, например, превышает в диаметре 1 мм и содержит в 100 тысяч раз больше цитоплазмы, чем средняя клетка человеческого тела (**рис. 17.8**). Оплодотворение яйцеклетки *Xenopus* запускает удивительно быструю последовательность клеточных делений, носящих название *дробление*, при которых единственная гигантская клетка делится без роста с образованием зародыша, состоящего из тысяч более мелких клеток (**рис. 17.9**).

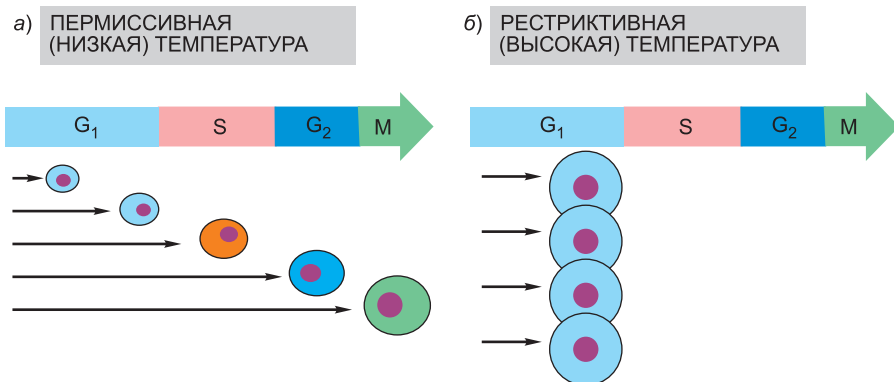


Рис. 17.6. Поведение температурочувствительного мутанта *Cdc*. (а) При пермиссивной (низкой) температуре клетки нормально делятся и проходят все стадии клеточного цикла (фаза клетки обозначена цветом). (б) При повышении температуры до рестриктивного уровня, при котором продукт мутантного гена функционирует неправильно, мутантные клетки продолжают проходить клеточный цикл до тех пор, пока не достигнут определенного этапа, который они уже не способны преодолеть (в данном примере — инициация S-фазы). Поскольку *Cdc*-мутанты продолжают расти, они становятся ненормально большими. С другой стороны, не-*Cdc*-мутанты, у которых нарушен процесс, необходимый для биосинтеза и роста (например, образование АТФ), останавливаются на любом этапе клеточного цикла в зависимости от того, когда исчерпываются их биохимические запасы (не показано).

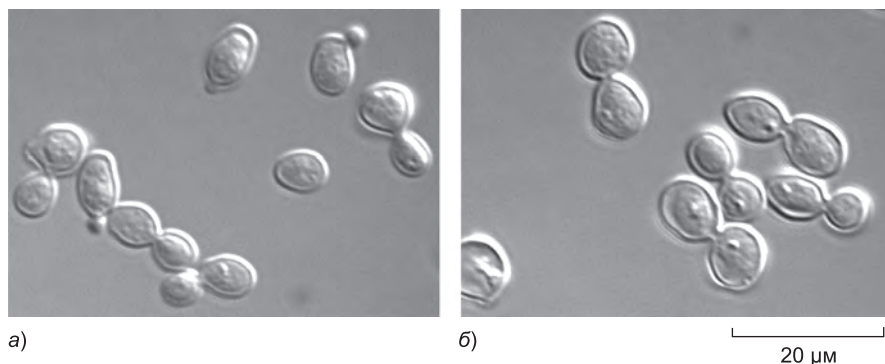


Рис. 17.7. Морфология клеток почкующихся дрожжей, остановленных мутацией *Cdc*. (а) В нормальной популяции пролиферирующих дрожжевых клеток почки изменяются по размеру в соответствии со стадией клеточного цикла. (б) Мутанты *Cdc15*, выращенные при рестриктивной температуре, проходят анафазу, но не способны завершить выход из митоза и цитокинеза. В результате все клетки останавливаются на стадии с крупными почками, характерными для поздней М-фазы. (С любезного разрешения Jeff Ubersax.)

После первого деления, занимающего примерно 90 минут, следующие 11 делений происходят более-менее синхронно с интервалами в 30 минут, в результате чего образуется примерно 4096 (2^{12}) клеток за 7 часов. Каждый цикл подразделяется на фазы S и M продолжительностью около 15 минут без различимых фаз G_1 или G_2 .

Таким образом, ранние эмбриональные клетки *Xenopus*, а также двусторчатого моллюска *Spisula* и фруктовой мушки *Drosophila*, способны к очень быстрому делению в отсутствие ростовых или других механизмов контроля (обсуждаемых позднее), действующих в более сложных клеточных циклах. Такие *клеточные циклы раннего эмбриогенеза* позволяют раскрыть принципы работы изолированной и максимально упрощенной системы контроля клеточного цикла, направленной на решение самой фундаментальной задачи — удвоения генома и разделения двух дочерних клеток. Другим достоинством ранних зародышей для анализа клеточного цикла является их крупный размер. В них относительно просто ввести вещества для определения их влияния на прохождение клеткой клеточного цикла. Также возможно приготовить практически чистую цитоплазму яйцеклетки *Xenopus* и вос-

произвести многие события клеточного цикла в пробирке (**рис. 17.10**). В таких клеточных экстрактах можно наблюдать события клеточного цикла и манипулировать ими в упрощенных и контролируемых условиях.

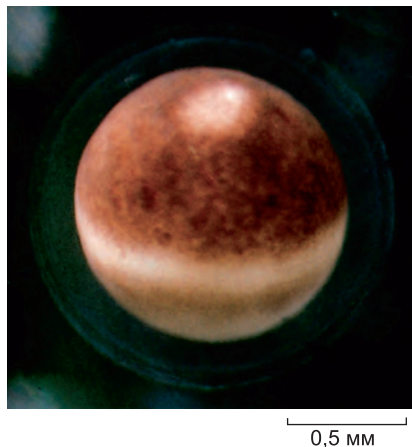


Рис. 17.8. Готовая к оплодотворению зрелая яйцеклетка *Xenopus*. Светлое пятно вблизи вершины указывает на местоположение ядра, выместившего *коричневый* пигмент из поверхностного слоя цитоплазмы яйцеклетки. На рисунке не видно, но в процессе созревания яйцеклетки ядерная оболочка разрушилась. (С любезного разрешения Tony Mills.)

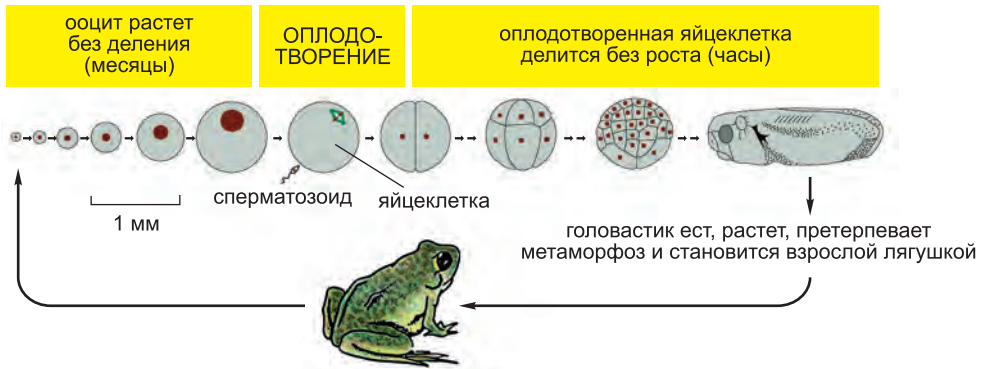


Рис. 17.9. Созревание ооцита и дробление яйцеклетки *Xenopus*. Ооцит в яичнике лягушки много месяцев растет без делений и наконец созревает до яйцеклетки (см. главу 21). После оплодотворения яйцеклетка очень быстро дробится – сначала со скоростью один цикл деления каждые 30 минут – с образованием через день-два многоклеточного головастика. С каждым делением клетки становятся все меньше, а размер зародыша не меняется. Рост начинается только тогда, когда головастик начинает питаться. Рисунки в верхнем ряду (но не лягушка внизу) представлены в одном масштабе.

17.1.5. Контроль клеточного цикла можно изучать на клетках млекопитающих в культуре

Сложно наблюдать отдельные клетки в интактных млекопитающих. В большинстве исследований контроля клеточного цикла млекопитающих используются клетки, изолированные из нормальных тканей или опухолей и выращенные в пла-

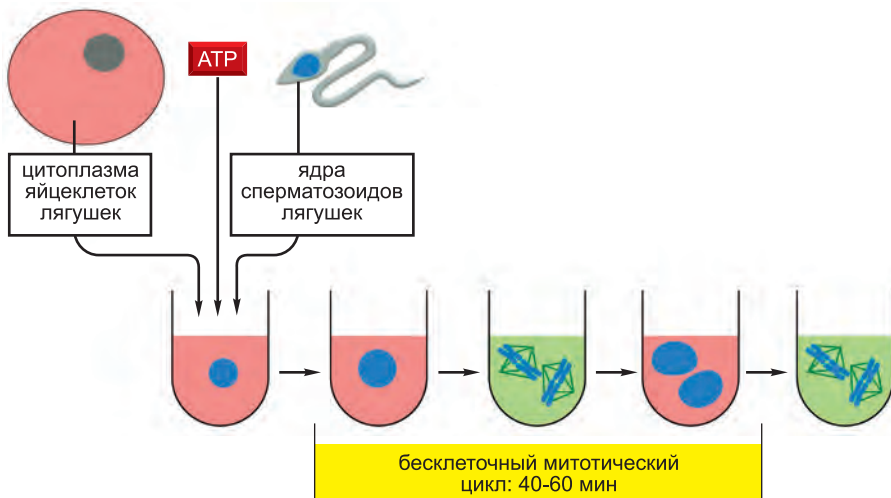


Рис. 17.10. Изучение клеточного цикла в бесклеточной системе. Чтобы разрушить большое число лягушачьих яйцеклеток и отделить цитоплазму от других клеточных компонентов, используют мягкое центрифугирование. Чистую цитоплазму собирают и добавляют к ней ядра сперматозоидов и АТФ. Ядра сперматозоидов деконденсируются и претерпевают повторяющиеся циклы репликации ДНК и митоза. Это указывает на то, что в таком бесклеточном цитоплазматическом экстракте функционирует система контроля клеточного цикла.

стиковых культуральных чашках в присутствии необходимых питательных веществ и других факторов (рис. 17.11). Однако существуют и сложности. Когда клетки нормальных тканей млекопитающих культивируют в стандартных условиях, они часто перестают делиться, пройдя некоторое ограниченное число циклов. Деление человеческих фибробластов, например, навсегда прекращается после 25–40 делений. Этот процесс называется *репликативным старением клеток*, и мы обсудим его позднее.

В клетках млекопитающих иногда происходят мутации, помогающие им бесконечно пролиферировать в культуре в форме «бессмертных» *клеточных линий*. Несмотря на то что это ненормальные клетки, такие клеточные линии широко используются для изучения клеточного цикла (и в клеточной биологии в целом), поскольку они служат неисчерпаемым источником генетически однородных клеток. Более того, эти клетки достаточно велики для подробных цитологических наблюдений событий клеточного цикла, и их удобно использовать для биохимического анализа белков, участвующих в контроле клеточного цикла.

Изучение культивированных клеток млекопитающих оказалось особенно полезным для исследования молекулярных механизмов, управляющих контролем пролиферации клеток в многоклеточных организмах. Такие исследования играют важную роль не только для понимания нормальных механизмов во многих тканях, но и для понимания потери этих механизмов при раке (см. главу 20).

17.1.6. Прохождение по клеточному циклу можно изучать разными способами

Как мы можем определить, какой стадии клеточного цикла достигла животная клетка? Можно просто посмотреть на живые клетки в микроскоп. В культуре пролиферирующих клеток млекопитающих можно увидеть, что часть клеток округлилась и находится в митозе (см. рис. 17.11). Другие претерпевают цитокинез. Дополнительную информацию о клеточном цикле можно получить, окрасив клетки ДНК-связывающими флуоресцентными красителями (которые показывают конденсацию хромосом в митозе), или антителами, узнающими специфические клеточные компоненты, например микротрубочки (что позволяет увидеть веретено деления). Точно так же клетки в S-фазе можно идентифицировать в микроскоп, добавив к ним

визуализируемые молекулы, встраивающиеся в новосинтезированную ДНК, например, искусственный аналог тимидина бромдезоксимуридин (BrdU). Клеточные ядра, в которые встроен BrdU, затем визуализируют путем окрашивания анти-BrdU антителами (рис. 17.12).

Обычно в популяции быстро, но не синхронно пролиферирующих клеток около 30–40 % клеток в любой момент времени будет находиться в S-фазе и окрашиваться кратким добавлением

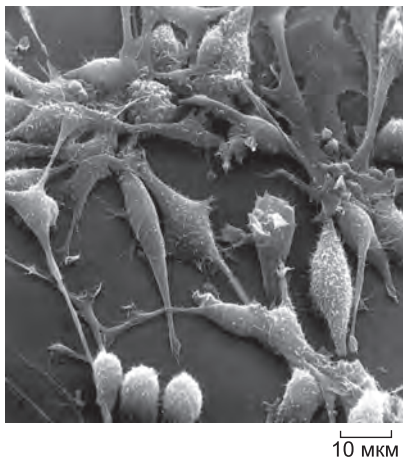
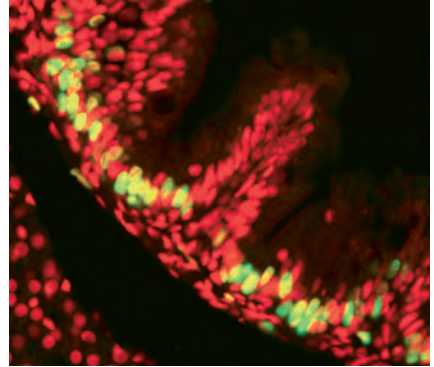


Рис. 17.11. Пролиферирующие в культуре клетки млекопитающих. На данной сканирующей электронной микрофотографии показаны фибробласты крысы. (С любезного разрешения Guenter Albrecht-Buehler.)

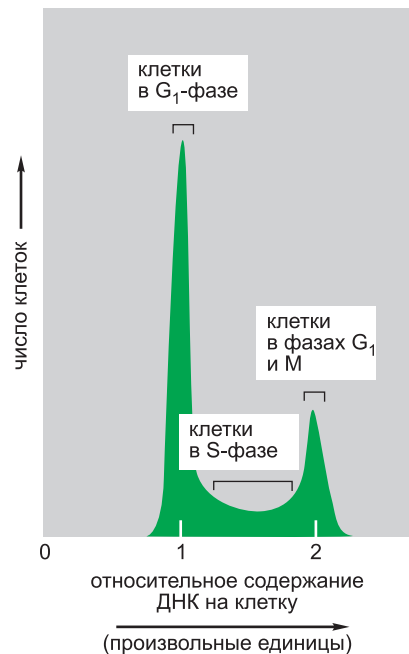
Рис. 17.12. Мечение S-фазных клеток. Иммунофлуоресцентная микрофотография меченных BrdU эпителиальных клеток кишечника рыбы данио. Рыбу подвергли действию BrdU, после чего ткань фиксировали и приготовили для мечения флуоресцентными анти-BrdU антителами (зеленые). Все клетки окрашены красным флуоресцентным красителем.



BrdU. Из доли окрашенных клеток в такой популяции (*индекса мечения*) можно оценить продолжительность S-фазы как части всего клеточного цикла. Точно так же из доли клеток в митозе (*митотического индекса*) можно оценить продолжительность M-фазы. Более того, добавив BrdU и позволив клеткам продолжать клеточный цикл фиксированные промежутки времени, можно определить, сколько времени необходимо клетке в S-фазе для прохождения через G_2 в M-фазу, через M в G_1 и, наконец, через G_1 обратно в S.

Другим методом определения стадии клеточного цикла, которой достигла клетка, является измерение содержания ДНК, увеличивающегося вдвое в S-фазе. Этот подход значительно улучшается за счет использования флуоресцентных ДНК-связывающих красителей и *проточных цитометров*, позволяющих быстро автоматически анализировать большое число клеток (**рис. 17.13**). Проточную цитометрию также можно использовать для определения продолжительности фаз G_1 , S и $G_2 + M$. Для этого во времени наблюдают популяцию ДНК-меченых клеток, предварительно отобранных таким образом, что все они находятся в одной фазе клеточного цикла: измерение содержания ДНК в такой синхронизированной популяции клеток позволяет наблюдать, как клетки проходят через клеточный цикл.

Рис. 17.13. Анализ содержания ДНК при помощи проточного цитометра. На данном графике показаны типичные результаты определения содержания ДНК в отдельных клетках, полученные на пролиферирующей популяции клеток в проточном цитометре. (Проточный цитометр, также называемый клеточным сортиером с возбуждением флуоресценции, или FACS, также может использоваться для сортировки клеток в соответствии с их флуоресценцией — см. рис. 8.2). Проанализированные здесь клетки окрашены красителем, начинающим флуоресцировать после связывания с ДНК, т. е. уровень флуоресценции клетки прямо пропорционален содержанию в ней ДНК. Клетки подразделяются на три категории: клетки, которые несут нереплицированный набор ДНК и, следовательно, находятся в G_1 ; клетки, которые несут полностью реплицированный набор ДНК (в два раза больше от содержания в G_1) и находятся в G_2 или M; и клетки, несущие промежуточное количество ДНК, т. е. находящиеся в S-фазе. Показанное здесь распределение клеток указывает на то, что в G_1 находится больше клеток, чем в $G_2 + M$, т. е. в данной популяции G_1 продолжительнее по времени, чем $G_2 + M$.



Заключение

Деление клеток обычно начинается с удвоения содержимого клетки, за которым следует распределение этого содержимого по дочерним клеткам. Удвоение хромосом происходит в S-фазе клеточного цикла, но остальные компоненты клетки обычно удваиваются на протяжении всего цикла. Во время M-фазы реплицированные хромосомы расходятся по ядрам (митоз), и клетка разделяется надвое (цитокинез). Между S-фазой и M-фазой обычно наблюдаются промежуточные фазы G_1 и G_2 , во время которых различные внутриклеточные и внеклеточные сигналы регулируют прохождение по клеточному циклу. Контроль и организация клеточного цикла высококонсервативны, и исследования разнообразных систем, включая дрожжи, животные зародыши и клетки млекопитающих в культуре, позволили составить унифицированную картину эукариотического контроля клеточного цикла.

17.2. Система контроля клеточного цикла

Многие годы клеточные биологи наблюдали за кукольным спектаклем синтеза ДНК, митоза и цитокинеза, но не имели ни малейшего понятия о том, что находится за занавеской и кто дергает за ниточки. Система контроля клеточного цикла была черным ящиком, запертым внутри клетки. Прорыв совершен в 80-х гг. XX века, когда идентифицировали ключевые белки системы контроля и пришло понимание того, что они отличаются от белков, непосредственно участвующих в процессах репликации ДНК, расхождения хромосом и так далее.

В данном разделе мы сначала рассмотрим основные принципы работы системы контроля клеточного цикла. Затем мы обсудим белковые компоненты этой системы и то, как они работают вместе, обеспечивая пространственную и временную координацию событий клеточного цикла.

17.2.1. Система контроля клеточного цикла запускает основные события клеточного цикла

Система контроля клеточного цикла действует как таймер или осциллятор, запускающий события клеточного цикла в определенной заданной последовательности (рис. 17.14). В своей простейшей форме, как в описанных выше эмбриональных клеточных циклах, система контроля напоминает строго запрограммированный таймер, предоставляющий каждому этапу клеточного цикла фиксированное время. Система контроля в эмбриональных клетках не зависит от событий, которыми она управляет, поэтому ее механизмы временного контроля продолжают работать, даже если эти события не происходят или происходят неправильно. Однако в большинстве клеток система контроля отвечает на информацию, получаемую от управляемых ею событий. Сенсоры, например, определяют завершение синтеза ДНК, и если какое-либо нарушение не позволяет этому процессу успешно завершиться, контрольной системе посылается сигнал отложить переход к M-фазе. Такие задержки предоставляют время для «починки» аппарата и предотвращают катастрофу, которая может произойти, если цикл преждевременно перейдет на следующий этап, например, если произойдет расхождение не полностью реплицированных хромосом.

Система контроля клеточного цикла основана на взаимосвязанных последовательностях биохимических переключателей, каждый из которых инициирует опреде-

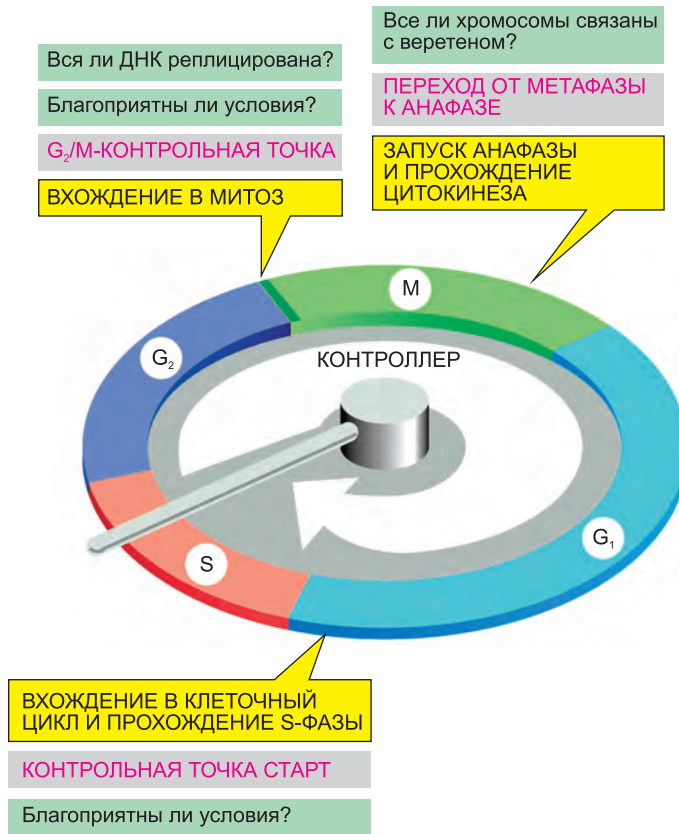


Рис. 17.14. Контроль клеточного цикла. Система контроля клеточного цикла запускает такие основные процессы клеточного цикла, как репликация ДНК, митоз и цитокinesis. Здесь система контроля представлена как рукоятка в центре — контроллер, вращающийся по часовой стрелке и запускающий по достижении определенных контрольных точек на внешнем циферблате процессы цикла. Информация о завершении событий клеточного цикла и сигналы среды могут привести к тому, что система контроля остановит цикл в этих точках. Наиболее важным контрольным точкам соответствуют желтые блоки.

ленное событие клеточного цикла. Эта система переключателей обладает многими инженерными свойствами, увеличивающими точность и надежность прохождения клеточного цикла. Во-первых, переключатели обычно *двоичны* (вкл./выкл.) и необратимо и одновременно запускают события. Очевидно, для клетки было бы очень плохо, если бы такие события, как например, конденсация хромосом или разрушение ядерной оболочки, только частично инициировались или начинались, но не завершались. Во-вторых, система контроля клеточного цикла удивительно жесткая и надежная, частично благодаря резервным механизмам и другим свойствам, позволяющим системе эффективно функционировать в различных условиях и даже при отказе некоторых компонентов. Наконец, система контроля легко адаптируется и может быть модифицирована под нужды определенного типа клеток или в ответ на специфические внутриклеточные или внеклеточные сигналы.

В большинстве эукариотических клеток система контроля запускает прохождение через клеточный цикл в трех основных регуляторных переходах, или

контрольных (сверочных) точках (см. рис. 17.14). Первой точкой является Старт (или точка рестрикции) в поздней G_1 -фазе, где клетка решает войти в клеточный цикл и начинает удваивать хромосомы, как упомянуто ранее. Вторая точка — это **G_2 /М-сверочная точка**, в которой система контроля запускает ранние события митоза, приводящие к выстраиванию хромосом на веретене деления в метафазе. Третья точка — это **переход от метафазы к анафазе**, где система контроля стимулирует разделение сестринских хроматид, что приводит к завершению митоза и цитокинезу. Система контроля блокирует прохождение через эти сверочные точки, если обнаруживает проблемы внутри или снаружи клетки. Если система контроля чувствует недостатки в завершении репликации ДНК, например, она будет удерживать клетку в точке G_2 /М до тех пор, пока эти недостатки не будут устранены. Точно так же, если внеклеточные условия не подходят для пролиферации клетки, система блокирует прохождение через Старт, не давая клетке разделиться до тех пор, пока не наступят благоприятные условия.

17.2.2. Система контроля клеточного цикла зависит от циклично активируемых циклин-зависимых протеинкиназ (Cdk)

Центральные составляющие системы контроля клеточного цикла — члены семейства протеинкиназ, известных как **циклин-зависимые киназы (Cyclin-Dependent Kinases, Cdk)**. Активность этих киназ возрастает и снижается по мере прохождения клеткой клеточного цикла, что приводит к циклическим изменениям фосфорилирования внутриклеточных белков, инициирующих или регулирующих события клеточного цикла. Увеличение активности Cdk в сверочной точке G_2 /М, например, увеличивает фосфорилирование белков, контролирующих конденсацию хромосом, разрушение ядерной оболочки, сборку веретена деления и другие события, происходящие в начале митоза.

Циклические изменения активности Cdk контролируются сложным набором ферментов и других белков. Наиболее важными регуляторами Cdk являются белки **циклины**. Cdk, в соответствии со своим названием, зависят от циклинов: в свободном от циклина состоянии они не обладают протеинкиназной активностью (**рис. 17.15**). Исходно циклины получили свое название потому, что в каждом клеточном цикле они претерпевают цикл синтеза и деградации. Уровень белков Cdk, наоборот, остается постоянным (по крайней мере в самых простых циклах). Циклические изменения уровня белков циклинов приводят к циклической сборке и активации **комплексов циклин-Cdk**; эта активация, в свою очередь, запускает события клеточного цикла.

Существует четыре класса циклинов, соответствующих стадии клеточного цикла, в которой они связывают Cdk и функционируют. Всем эукариотическим клеткам необходимы три из этих 4 классов (**рис. 17.16**):



Рис. 17.15. Два ключевых компонента системы контроля клеточного цикла. Когда циклин образует комплекс с Cdk, протеинкиназа активируется и запускает определенные события клеточного цикла. Без циклина Cdk неактивна.

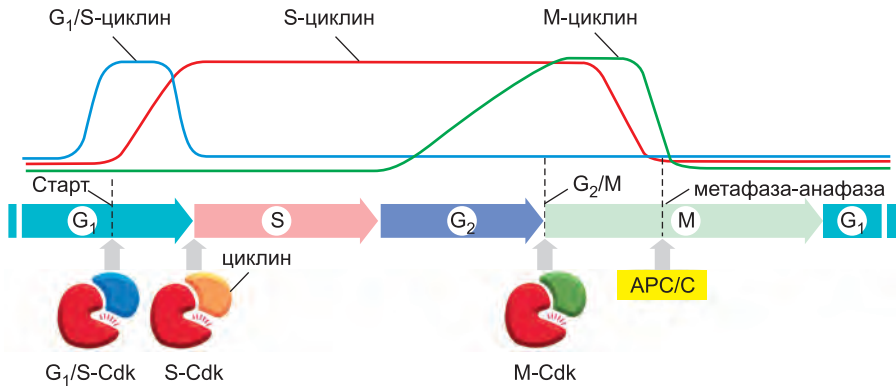


Рис. 17.16. Комплексы циклин-Cdk системы контроля клеточного цикла. Концентрации трех основных типов циклинов колеблются в течение клеточного цикла, тогда как концентрации Cdk (не показано) не изменяются и превышают концентрации циклинов. В поздней G_1 -фазе увеличение концентрации G_1/S -циклина приводит к образованию комплексов G_1/S -Cdk, запускающих прохождение через контрольную точку Старт. Комплексы S-Cdk образуются в начале S-фазы и инициируют репликацию ДНК и некоторые ранние события митоза. Комплексы M-Cdk формируются в G_2 , но удерживаются в неактивном состоянии механизмами, которые мы опишем позднее. Эти комплексы активируются в конце G_2 и запускают ранние события митоза. Другой регуляторный белок APC/C инициирует переход от метафазы к анафазе.

1. **G_1/S -циклины** активируют Cdk в поздней G_1 -фазе и способствуют прохождению через Старт и, следовательно, входу в клеточный цикл. Их уровень падает в S-фазе;

2. **S-циклины** связывают Cdk вскоре после прохождения Старта и способствуют удвоению хромосом. Уровень S-циклинов остается повышенным до митоза, и эти белки также вносят вклад в контроль некоторых ранних митотических событий;

3. **M-циклины** активируют Cdk, стимулирующие вход в митоз в контрольной точке G_2/M . Позднее мы рассмотрим механизмы, разрушающие M-циклины в середине митоза.

В большинстве клеток четвертый класс циклинов, **G_1 -циклины**, управляет активностью G_1/S -циклинов, контролирующей прохождение через Старт в позднюю G_1 -фазу.

В дрожжевых клетках единственный белок Cdk связывает все эти классы циклинов и запускает различные события клеточного цикла за счет замены партнеров на различных стадиях цикла. В клетках позвоночных, с другой стороны, находится четыре Cdk. Две взаимодействуют с G_1 -циклинами, одна — с G_1/S - и S-циклинами и одна — с M-циклинами. В этой главе мы будем называть различные комплексы циклин-Cdk просто **G_1 -Cdk**, **G_1/S -Cdk**, **S-Cdk** и **M-Cdk**. В [таблице 17.1](#) перечислены названия отдельных Cdk и циклинов.

Как разные комплексы циклин-Cdk запускают разные события клеточного цикла? Ответ, по крайней мере частично, заключается в том, что циклины не просто активируют Cdk, но и направляют их к определенным белкам-мишеням. В результате каждый комплекс циклин-Cdk фосфорилирует свой набор субстратных белков. Тот же самый комплекс циклин-Cdk может также вызывать различные эффекты на различных стадиях клеточного цикла, что объясняется, по-видимому, изменением доступности некоторых субстратов Cdk в течение цикла. Определенные

Таблица 17.1. Основные циклины и Cdk позвоночных и почкующихся дрожжей

КОМПЛЕКС ЦИКЛИН-CDK	ПОЗВОНОЧНЫЕ		ПОЧКУЮЩИЕСЯ ДРОЖЖИ	
	ЦИКЛИН	CDK-ПАРТНЕР	ЦИКЛИН	CDK-ПАРТНЕР
G1-Cdk	D*	Cdk4, Cdk6	Cln3	Cdk1**
G1/S-Cdk	E	Cdk2	Cln1, 2	Cdk1
S-Cdk	A	Cdk2, Cdk1**	Clb5, 6	Cdk1
M-Cdk	B	Cdk1	Clb1, 2, 3, 4	Cdk1

*У млекопитающих три циклина D (циклины D1, D2 и D3).

**Изначально Cdk1 у позвоночных и делящихся дрожжей называлась Cdc2, а у почкующихся дрожжей – Cdc28.

функционирующие в митозе белки, например, могут стать доступными для фосфорилирования только в G_2 .

Исследование трехмерных структур Cdk и циклинов показало, что в отсутствие циклинов активный сайт Cdk частично закрыт частью белка, как камнем, закрывающим вход в пещеру (рис. 17.17, а). Связывание циклина приводит к смещению этого участка и открывает активный сайт, что частично активирует фермент Cdk (рис. 17.17, б). Полная активация комплекса циклин-Cdk происходит, когда другая киназа, **Cdk-активирующая киназа (Cdk-Activating Kinase, САК)**, фосфорилирует аминокислоту вблизи активного сайта Cdk. Это приводит к небольшой конформационной перестройке, усиливающей активность Cdk и позволяющей киназе эффективно фосфорилировать белки-мишени и, таким образом, запускать определенные события клеточного цикла (рис. 17.17, в).

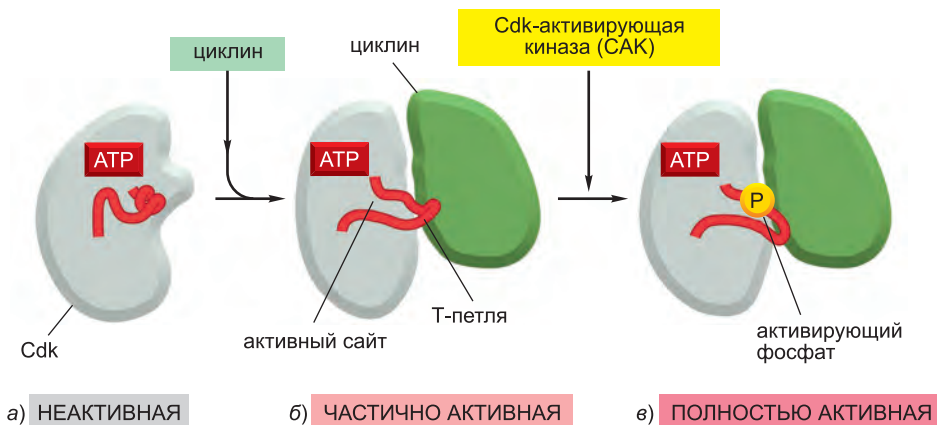


Рис. 17.17. Структурная основа активации Cdk. Эти рисунки основаны на полученных при помощи рентгеновской кристаллографии трехмерных структурах человеческой Cdk2. Показано положение связанного АТР. Фермент показан в трех состояниях. (а) В неактивном состоянии без связанного циклина активный сайт блокирован участком белка, носящим название Т-петля (*красная*). (б) Связывание циклина приводит к смещению Т-петли от активного сайта и частичной активации Cdk2. (в) Фосфорилирование Cdk2 (ферментом САК) по остатку треонина в Т-петле усиливает активацию фермента за счет изменения формы Т-петли, что улучшает способность фермента связывать свои белковые субстраты.

17.2.3. Ингибирующее фосфорилирование и белки-ингибиторы Cdk (CKI) способны подавлять активность Cdk

В первую очередь активность Cdk в течение клеточного цикла определяется повышением и снижением концентрации циклинов. Однако на некоторых этапах цикла несколько дополнительных механизмов способствуют более тонкой регуляции активности Cdk.

Фосфорилирование пары аминокислот на верхней стенке киназного активного сайта ингибирует активность комплекса циклин-Cdk. Фосфорилирование этих сайтов протеинкиназой **Wee1** ингибирует активность Cdk, а дефосфорилирование фосфатазой **Cdc25** увеличивает активность Cdk (рис. 17.18). Позднее мы увидим, что этот регуляторный механизм особенно важен для контроля активности M-Cdk в начале митоза.

Связывание **белков-ингибиторов Cdk (Cdk Inhibitor Proteins, CKI)** также регулирует комплексы циклин-Cdk. Трехмерная структура комплекса циклин-Cdk-CKI показала, что связывание CKI приводит к значительным перестройкам структуры активного сайта Cdk, делаящим его неактивным (рис. 17.19). В основном, клетки используют CKI для управления активностью G_1/S - и S-Cdk в начале клеточного цикла.

17.2.4. Система контроля клеточного цикла зависит от циклического протеолиза

Если активация специфических комплексов циклин-Cdk служит движущей силой прохождения через контрольные точки Старт и G_2/M (см. рис. 17.16), то переход от метафазы к анафазе инициируется не фосфорилированием белков, а их разрушением, ведущим к конечным стадиям клеточного деления.

Ключевым регулятором перехода от метафазы к анафазе является **стимулирующий анафазу комплекс**, или **циклосома (Anaphase-Promoting Complex / Cyclosome)**,

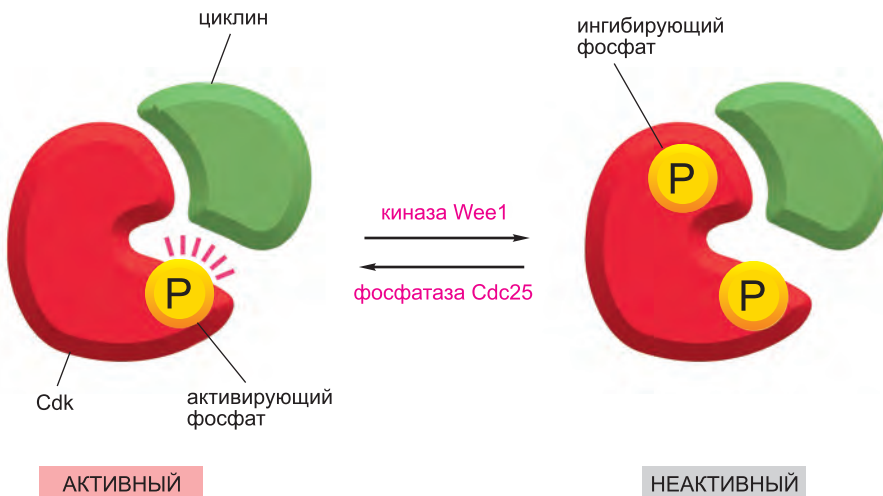


Рис. 17.18. Регуляция активности Cdk ингибирующим фосфорилированием. Активный комплекс циклин-Cdk выключается, когда киназа Wee1 фосфорилирует два близкорасположенных сайта над активным сайтом. Удаление этих фосфатов фосфатазой Cdc25 активирует комплекс циклин-Cdk. Для наглядности показан только один ингибиторный фосфат. САК добавляет активирующий фосфат, как показано на рис. 17.17.

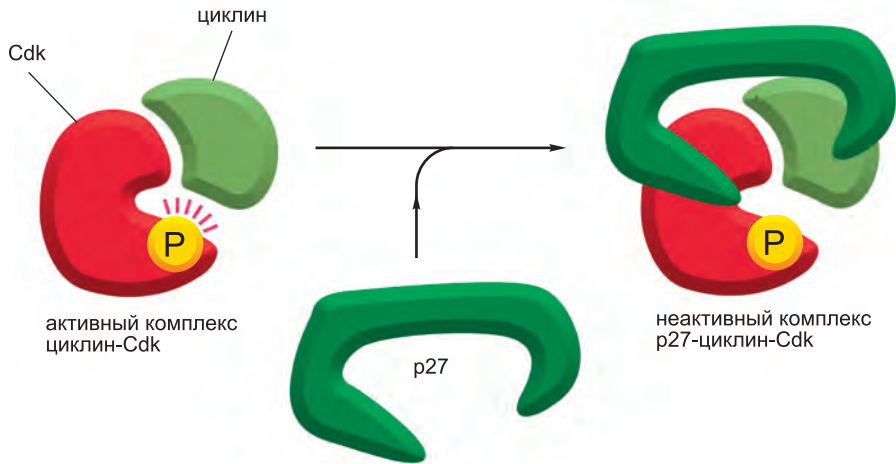


Рис. 17.19. Ингибирование комплекса циклин-Cdk белком SKI. Данный рисунок основан на полученной методом рентгеновской кристаллографии трехмерной структуре человеческого комплекса циклин A-Cdk2, связанного с SKI p27. p27 одновременно связывает в комплексе как циклин, так и Cdk, нарушая активный сайт Cdk. Он также входит в АТР-связывающий сайт, еще сильнее ингибируя ферментативную активность.

APC/C), представитель семейства ферментов убиквитин-лигаз. Как обсуждалось в главе 3, эти ферменты используются в многочисленных клеточных процессах для стимуляции протеолитического разрушения определенных регуляторных белков. Они переносят множественные копии небольшого белка убиквитина на белки-мишени, что приводит к их протеолитическому расщеплению в протеасомах. Другие убиквитин-лигазы маркируют белки для других целей, помимо расщепления.

APC/C катализирует убиквитинирование и разрушение двух белков. Первый — это *секурин*, который в норме защищает белковые мостики, удерживающие вместе сестринские хроматиды в начале митоза. Разрушение секурина при переходе от метафазы к анафазе активирует протеазу, разделяющую сестринские хроматиды и запускающую анафазу. Второй основной мишенью APC/C служат S- и M-циклины. Расщепление этих циклинов инактивирует большинство Cdk клетки (см. рис. 17.16). В результате многочисленные белки, фосфорилированные киназами Cdk начиная с S-фазы и до раннего митоза, дефосфорилируются различными присутствующими в анафазной клетке фосфатазами. Дефосфорилирование мишеней Cdk необходимо для завершения M-фазы, включая конечные этапы митоза и процесс цитокинеза. После активации в середине митоза APC/C остается активным в G₁, обеспечивая период неактивности Cdk. Когда G₁/S-Cdk активируются в поздней G₁-фазе, APC/C выключается, позволяя накоплению циклинов начать новый клеточный цикл.

В системе контроля клеточного цикла также используется другая убиквитин-лигаза, носящая название **SCF** (по названиям ее трех субъединиц). Она убиквитинирует определенные белки SKI в поздней G₁-фазе и способствует активации S-Cdk и репликации ДНК.

APC/C и SCF представляют собой крупные мультисубъединичные комплексы с некоторыми родственными компонентами, но разной регуляцией. Активность

APC/C изменяется в течение клеточного цикла, в основном в результате изменения его связывания с активирующей субъединицей **Cdc20** во время анафазы и **Cdh1** от позднего митоза до ранней G_1 -фазы. Эти субъединицы помогают APC/C узнавать свои белки-мишени (рис. 17.20, а). Активность SCF также зависит от субъединиц, носящих название белков F-box и помогающих комплексу узнавать белки-мишени. Однако, в отличие от активности APC/C, активность SCF в клеточном цикле постоянна. Убиквитинирование комплексом SCF контролируется фосфорилированием белков-мишеней, поскольку субъединицы F-box узнают только специфически фосфорилированные белки (рис. 17.20, б).

17.2.5. Контроль клеточного цикла также зависит от транскрипционной регуляции

В эмбриональном клеточном цикле зародыша лягушки, как обсуждалось ранее, транскрипции генов не происходит. Контроль клеточного цикла зависит исключительно от посттранскрипционных механизмов, т. е. регуляции Cdk и убиквитин-лигаз и их белков-мишеней. Однако в более сложных клеточных циклах большинства типов клеток транскрипционный контроль создает дополнительный уровень регуляции. Изменения транскрипции генов циклинов, например, способствуют контролю уровня циклинов в большинстве клеток.

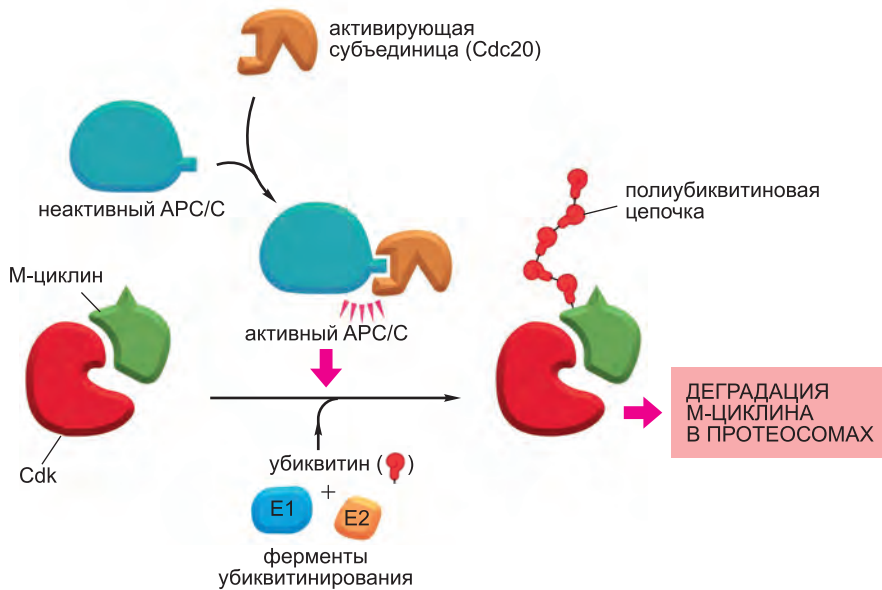
Для анализа изменений экспрессии всех генов генома по мере прохождения клеткой клеточного цикла можно использовать ДНК-чипы (см. главу 8). Результаты таких исследований удивительны. В почкующихся дрожжах, например, около 10% генов кодируют мРНК, чей уровень колеблется в течение клеточного цикла. Некоторые из этих генов кодируют белки с известными функциями в клеточном цикле, но функции многих других до сих пор не установлены.

17.2.6. Система контроля клеточного цикла функционирует как сеть биохимических переключателей

В таблице 17.2 перечислены основные компоненты системы контроля клеточного цикла. Эти белки функционально связаны друг с другом и образуют устойчивую сеть, работающую практически автономно для активации набора биохимических переключателей, каждый из которых запускает определенное событие клеточного цикла.

Когда условия благоприятны для пролиферации клеток, различные внешние и внутренние сигналы стимулируют активацию G_1 -Cdk, которые, в свою очередь, стимулируют экспрессию генов, кодирующих G_1/S - и S-циклины. В результате активация G_1/S -Cdk приводит к прохождению контрольной точки Старт. При помощи механизмов, которые мы обсудим позднее, G_1/S -Cdk запускают волну активности S-Cdk, инициирующую удвоение хромосом в S-фазе и вносящую вклад в некоторые ранние события митоза. Затем активация M-Cdk запускает прохождение через контрольную точку G_2/M и ранние события митоза, приводящие к выстраиванию сестринских хроматид по экватору митотического веретена деления. Наконец, APC/C и его активатор Cdc20 инициируют разрушение секурина и циклинов при переходе от метафазы к анафазе, таким образом приводя к расхождению сестринских хроматид и завершению митоза (рис. 17.21). После окончания митоза запускаются многочисленные механизмы, направленные на подавление активности Cdk, что приводит к стабильному периоду G_1 , как мы обсудим позднее. Теперь мы готовы рассмотреть стадии клеточного цикла более подробно, начав с S-фазы.

а) контроль протеолиза комплексом APC/C



б) контроль протеолиза комплексом SCF

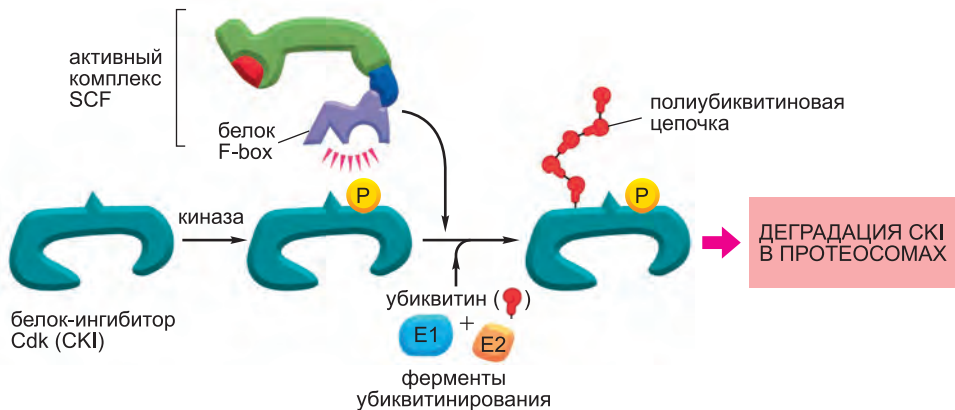


Рис. 17.20. Контроль протеолиза комплексами APC/C и SCF во время клеточного цикла. (а) APC/C активируется в митозе путем связывания с активирующей субъединицей Cdc20, узнающей специфические аминокислотные последовательности на М-циклине и других белках-мишенях. При помощи двух дополнительных белков E1 и E2 APC/C переносит множественные молекулы убиквитина на белок-мишень. Полиубиквитинированная мишень узнается и деградирует в протеасоме. (б) Активность убиквитин-лигазы SCF зависит от субстрат-связывающих субъединиц, носящих название белков F-box. Существует много типов F-box. Фосфорилирование белка-мишени, например показанного CKI, позволяет мишени быть узнаваемой определенной субъединицей F-box.

Заключение

Система контроля клеточного цикла запускает события клеточного цикла и обеспечивает правильный порядок и время этих событий. Она отвечает

Таблица 17.2. Обзор основных регуляторных белков клеточного цикла

ОБЩЕЕ НАЗВАНИЕ	ФУНКЦИИ И КОММЕНТАРИИ
Протеинкиназы и протеинфосфатазы, модифицирующие Cdk	
Cdk-активирующая киназа (CAK)	фосфорилирует активирующий сайт на Cdk
Киназа Wee1	фосфорилирует ингибиторные сайты на Cdk; в основном участвует в подавлении активности Cdk1 до митоза
Фосфатаза Cdc25	удаляет ингибирующие фосфаты с Cdk; у млекопитающих три представителя семейства (Cdc25A, B, C); в основном участвует в контроле активации Cdk1 в начале митоза
Белки-ингибиторы Cdk (CKI)	
Sic1 (у почкующихся дрожжей)	подавляет активность Cdk1 в G1; фосфорилирование киназой Cdk1 в конце G1 запускает его разрушение
p27 (у млекопитающих)	подавляет активности G1/S-Cdk и S-Cdk в G1; способствует уходу клеток из клеточного цикла после терминальной дифференцировки; фосфорилирование киназой Cdk2 запускает его убиквитинирование комплексом SCF
p21 (у млекопитающих)	подавляет активность G1/S-Cdk и S-Cdk после повреждения ДНК
p16 (у млекопитающих)	подавляет активность G1/S-Cdk в G1; часто инактивирован при раке
Убиквитин-лигазы и их активаторы	
APC/C	катализирует убиквитинирование регуляторных белков, участвующих в основном в выходе из митоза, включая секурин и S- и M-циклины; регулируется связыванием с активирующими субъединицами
Cdc20	APC/C-активирующая субъединица во всех клетках; запускает начальную активацию APC/C при переходе от метафазы к анафазе; стимулируется активностью M-Cdk
Cdh1	APC/C-активирующая субъединица, поддерживающая активность APC/C после анафазы и на протяжении всей G1; ингибируется активностью Cdk
SCF	катализирует убиквитинирование регуляторных белков, участвующих в контроле G1, включая некоторые CKI (Sic1 в почкующихся дрожжах, p27 у млекопитающих); для активности обычно требуется фосфорилирование белков-мишеней

на различные внутриклеточные и внеклеточные сигналы и останавливает цикл, когда клетка оказывается неспособной завершить какой-либо процесс или сталкивается с неблагоприятными внешними или внутриклеточными условиями.

Центральными компонентами системы контроля клеточного цикла являются циклин-зависимые протеинкиназы (Cdk), активность которых зависит от циклиновых субъединиц. Колебания активности различных комплексов циклин-Cdk контролируют события клеточного цикла. Таким образом, активация комплексов циклин-Cdk M-фазы (M-Cdk) запускает митоз. Механизмами, контролирующими активность комплексов циклин-Cdk, служат фосфорилирование субъединицы Cdk, связывание Cdk с ингибиторными белками (CKI), протеолиз циклинов и изменение транскрипции генов, кодирующих регуляторы Cdk. Система контроля клеточного цикла также зависит от двух дополнительных ферментных комплексов, убиквитин-лигаз APC/C и SCF, катализирующих убиквитинирование и последующее разрушение определенных регуляторных белков, контролирующих критические события клеточного цикла.

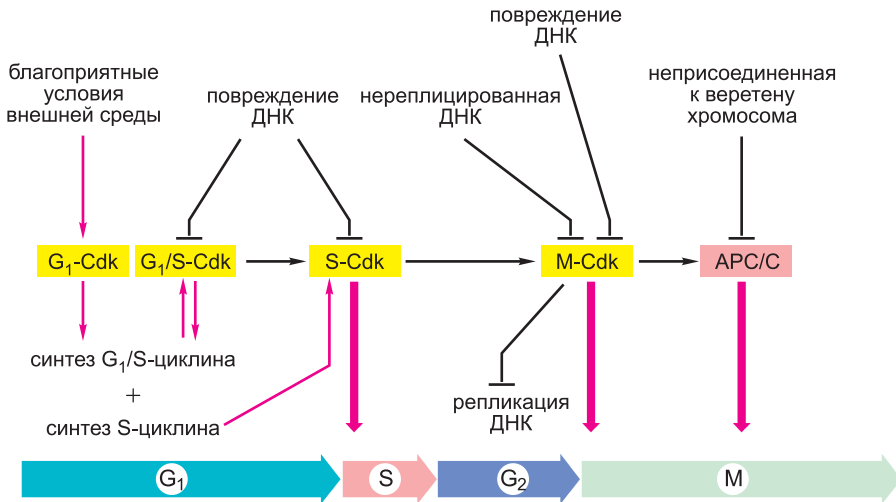


Рис. 17.21. Обзор системы контроля клеточного цикла. Ядром системы контроля клеточного цикла является набор комплексов циклин-Cdk (желтые). Как будет более подробно рассмотрено позднее, на активность каждого комплекса также влияют различные ингибиторные механизмы, передающие информацию о внеклеточном окружении, повреждении клетки и незавершенности событий клеточного цикла (вверху). Эти механизмы присутствуют не во всех типах клеток; многие из них отсутствуют, например, в эмбриональных клеточных циклах.

17.3. S-фаза

Линейные хромосомы эукариотических клеток — это крупные и динамические структуры, состоящие из ДНК и белков. Их удвоение представляет собой сложный процесс, занимающий по времени значительную часть клеточного цикла. Не только длинная молекула ДНК каждой хромосомы должна быть аккуратно редуцирована (что само по себе является большим достижением), но и белковая оболочка, окружающая каждый участок ДНК, также должна быть воспроизведена. Необходимо, чтобы дочерние клетки унаследовали все свойства материнской хромосомной структуры.

Центральным событием удвоения хромосом является репликация ДНК. При инициации и завершении репликации ДНК клетка должна решить две задачи. Во-первых, репликация должна происходить с высокой точностью для минимизации риска мутаций в следующем поколении клеток. Во-вторых, каждый нуклеотид генома должен быть скопирован только один раз, чтобы не допустить повреждающих эффектов амплификации генов. В главе 5 мы обсудили сложный белковый аппарат, обеспечивающий удивительно быструю и точную репликацию ДНК. В данном разделе мы рассмотрим изящные механизмы, благодаря которым система контроля клеточного цикла инициирует процесс репликации и в то же время не позволяет ему происходить чаще, чем раз в цикл.

17.3.1. S-Cdk раз в цикл инициирует репликацию ДНК

Репликация ДНК начинается в *точках начала (ориджинах) репликации*, разбросанных по всей хромосоме. Во время S-фазы в этих точках происходит *инициация* репликации, когда специализированные белковые машины (иногда

называемые *инициаторными белками*) расплетают двойную спираль в ориджине и загружают ферменты репликации ДНК на два одноцепочечных шаблона. Это приводит к стадии *элонгации*, когда аппарат репликации движется от точки начала в двух *репликационных вилках* (см. главу 5).

Чтобы удвоение хромосом происходило только единожды за клеточный цикл, фаза инициации репликации ДНК подразделяется на два этапа, протекающих в различные периоды клеточного цикла. Первый этап происходит в позднем митозе и ранней G_1 -фазе, когда крупный комплекс инициаторных белков, носящий название **пререпликативного комплекса**, или **pre-RC (Prereplicative Complex)**, собирается в точке начала репликации. Этот этап иногда называют *авторизацией (licensing)* ориджинов репликации, поскольку инициация синтеза ДНК разрешается только в тех точках, где присутствует pre-RC. Второй этап протекает в начале S-фазы, когда компоненты pre-RC нуклеируют образование более крупного белкового комплекса, носящего название *преинициаторного комплекса*. Этот комплекс расплетает спираль ДНК и загружает ДНК-полимеразы и другие ферменты репликации на цепочки ДНК, иницируя синтез ДНК (см. главу 5). Как только точка начала репликации активируется таким образом, pre-RC разбирается, и его сборка на ориджине становится невозможной до следующей G_1 -фазы. В результате ориджины могут быть активированы только один раз за клеточный цикл.

Система контроля клеточного цикла управляет сборкой pre-RC и преинициаторного комплекса (**рис. 17.22**). Сборка pre-RC ингибируется активностью Cdk и в большинстве клеток стимулируется APC/C. Таким образом, сборка pre-RC происходит только в позднем митозе и ранней G_1 -фазе, когда активность Cdk низка, а активность APC/C — высока. В начале S-фазы активация S-Cdk запускает образование преинициаторного комплекса, запускающего синтез ДНК. Более того, pre-RC частично разбирается. Поскольку активности S-Cdk и M-Cdk остаются высокими (а активность APC/C остается низкой) до позднего митоза, новые pre-RC не могут быть собраны в точках начала репликации до окончания клеточного цикла.

На **рис. 17.23** показаны некоторые белки, участвующие в инициации репликации ДНК. Основным игроком является крупный мультисубъединичный комплекс, носящий название **комплекса узнавания точки начала репликации (Origin Recognition Complex, ORC)**, связывающий точки начала репликации на всем протяжении клеточного цикла. В позднем митозе и ранней G_1 -фазе белки **Cdc6** и **Cdt1** связываются с ORC в ориджинах и способствуют загрузке трех родственных белков — **белков Msm**. Образующийся крупный комплекс представляет собой pre-RC, и точка начала теперь авторизирована для репликации.

Шесть белков Msm комплекса pre-RC образуют кольцо вокруг ДНК, которое, по-видимому, служит основной ДНК-хеликазой, расплетающей ориджин ДНК в начале синтеза ДНК и по мере движения репликационной вилки от ориджина. Таким образом, основной функцией pre-RC является загрузка хеликазы, которая будет играть центральную роль в последующей репликации ДНК.

После того как pre-RC был собран в G_1 , ориджин репликации готов к работе. Активация S-Cdk в поздней G_1 -фазе запускает сборку в точке начала нескольких дополнительных белковых комплексов, что приводит к образованию гигантского преинициаторного комплекса, расплетающего спираль и начинающего синтез ДНК.

Одновременно с инициацией репликации ДНК S-Cdk запускает разборку в ориджине некоторых компонентов pre-RC. Cdk фосфорилируют ORC и Cdc6,

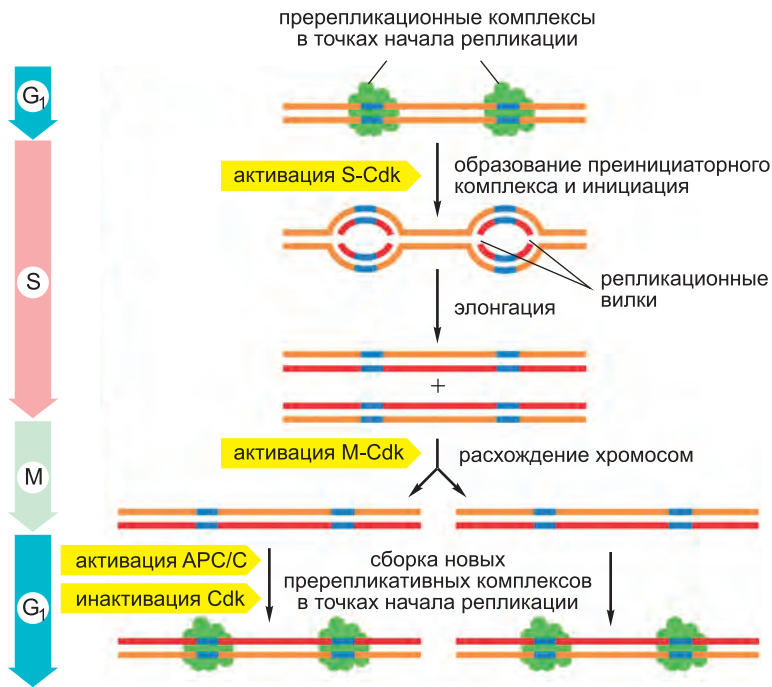


Рис. 17.22. Контроль репликации хромосом. Подготовка к репликации ДНК начинается в G_1 со сборки пререпликативных комплексов (pre-RC) в точках начала репликации. Активация S-Cdk приводит к образованию мультисубъединичных преинициаторных комплексов, расплетающих ДНК в точках начала репликации и начинающих процесс репликации ДНК. Две репликационные вилки движутся от каждой точки начала репликации до тех пор, пока вся хромосома не будет скопирована. Затем удвоенные хромосомы расходятся в М-фазе. Активация точек начала репликации в S-фазе также приводит к разборке пререпликативного комплекса, который не восстанавливается в ординате до следующей G_1 -фазы, благодаря чему каждая точка начала репликации активируется лишь единожды за клеточный цикл.

что приводит к их ингибированию по различным механизмам. Более того, инактивация APC/C в поздней G_1 -фазе также способствует выключению сборки pre-RC. В позднем митозе и ранней G_1 -фазе APC/C запускает разрушение белка **геминина**, связывающего и ингибирующего компонент pre-RC Cdt1. Таким образом, когда в поздней G_1 -фазе APC/C отключается, геминин накапливается и ингибирует Cdt1. В результате этих многочисленных процессов активность S- и M-Cdk и пониженная активность APC/C блокируют образование pre-RC в S-фазе и позднее. Но как тогда система контроля клеточного цикла обнуляется и позволяет репликации произойти в следующем клеточном цикле? Ответ прост. В конце митоза активация APC/C приводит к инактивации Cdk и разрушению геминина. Компоненты pre-RC дефосфорилируются и активируется Cdt1, что позволяет сборке pre-RC подготовить клетку к следующей S-фазе.

17.3.2. Для удвоения хромосом необходима дупликация структуры хроматина

ДНК хромосом упакована в различные белковые компоненты, включая гистоны и многочисленные регуляторные белки, участвующие в контроле экспрессии генов

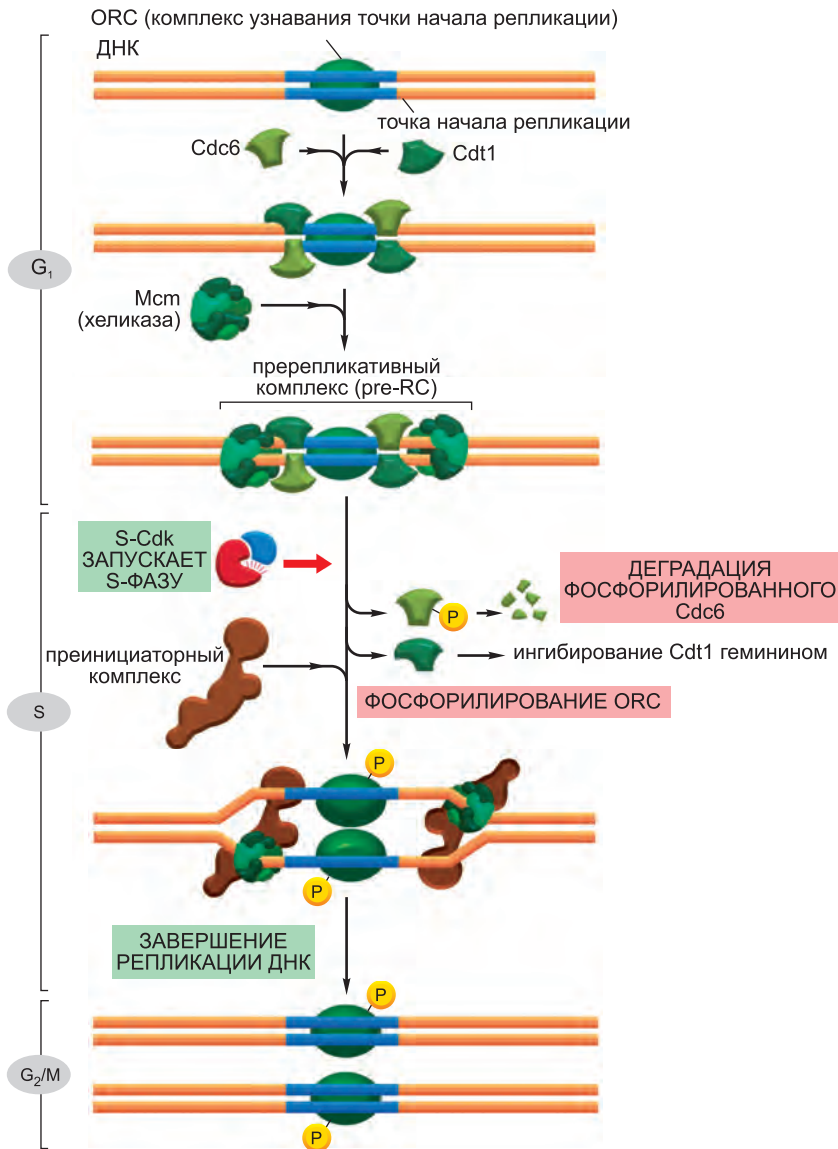


Рис. 17.23. Контроль инициации репликации ДНК. ORC остается связанным с точкой начала репликации на протяжении всего клеточного цикла. В ранней G_1 -фазе Cdc6 и Cdt1 связываются с ORC. Образующийся белковый комплекс затем связывается с кольцевыми комплексами Mcm на прилегающей ДНК, что приводит к формированию пререпликативного комплекса (pre-RC). Затем S-Cdk (и еще одна киназа, не показана) стимулирует сборку нескольких дополнительных белков в точке начала репликации с образованием преинициаторного комплекса. Туда же рекрутируются ДНК-полимераза и другие репликационные ферменты, белковые кольца Mcm активируются как хеликазы, и расплетание ДНК позволяет начаться репликации. S-Cdk также блокирует повторную репликацию, запуская разрушение Cdc6 и инактивацию ORC. Cdt1 инактивируется белком геминином. Геминин — это мишень APC/C, и, следовательно, его концентрация возрастает в S- и M-фазах, когда APC/C неактивен. Таким образом, компоненты pre-RC (Cdc6, Cdt1, Mcm) не могут образовать новый pre-RC в ордициях до тех пор, пока M-Cdk не будет инактивирован, а APC/C активирован в конце митоза (см. текст).

(см. главу 4). Таким образом, удвоение хромосомы — это не просто удвоение ДНК в ее сердцевине, но и воспроизведение всех белков хроматина и их правильная сборка на ДНК.

Синтез белков хроматина усиливается во время S-фазы для обеспечения сырого материала, необходимого для упаковки новосинтезированной ДНК. S-Cdk стимулируют значительное усиление синтеза четырех субъединиц гистонов, образующих гистоновые октамеры в сердцевине каждой нуклеосомы. Эти субъединицы собираются в нуклеосомы на ДНК факторами сборки нуклеосом, которые обычно связываются с репликационной вилкой и распределяют нуклеосомы по обеим цепочкам ДНК по мере их выхода из машинерии синтеза ДНК.

Упаковка хроматина помогает контролировать экспрессию генов. В некоторых частях хромосомы хроматин сильно конденсирован. Такой хроматин называется *гетерохроматином*, тогда как участки с более свободной структурой называются *эухроматином*. Подобные различия в структуре хроматина основываются на различных механизмах, включая модификацию гистоновых хвостов и присутствие негистоновых белков (см. главу 4). Поскольку эти различия играют важную роль в генной регуляции, важно, чтобы структура хроматина, как и содержащаяся в нем ДНК, были точно воспроизведены в S-фазе. Однако механизм дупликации структуры хроматина малоизучен. Во время синтеза ДНК ферменты, модифицирующие гистоны, и различные негистоновые белки, по-видимому, располагаются на двух новых цепях ДНК по мере выхода из репликационной вилки. Считают, что эти белки способствуют воспроизведению локальной структуры хроматина родительской хромосомы.

17.3.3. Когезины удерживают сестринские хроматиды вместе

В конце S-фазы каждая реплицированная хромосома состоит из пары идентичных сестринских хроматид, связанных друг с другом по всей длине. Когезия сестринских хроматид обеспечивает успешный митоз, поскольку она значительно усиливает прикрепление пары двух сестринских хроматид к противоположным полюсам веретена деления. Представьте, как сложно было бы добиться такого биполярного прикрепления, если бы сестринским хроматидам было позволено отойти друг от друга в S-фазе. В самом деле, нарушение когезии хроматид (например, в мутантах дрожжей) приводит к значительным ошибкам в расхождении хромосом.

Когезия сестринских хроматид зависит от крупного белкового комплекса **когезина**, который прикрепляется по всей длине хроматид по мере репликации ДНК в S-фазе. Две субъединицы когезина являются представителями крупного семейства *белков SMC* (Structural Maintenance of Chromosomes — структурное поддержание хромосом). Когезин образует крупные кольцевые структуры. По-видимому, он способен образовывать кольца вокруг двух сестринских хроматид (**рис. 17.24**).

Когезия сестринских хроматид также обеспечивается, по крайней мере частично, *катенацией* (*сцеплением*) ДНК — переплетением сестринских молекул ДНК, происходящим, когда две репликационные вилки встречаются во время синтеза ДНК. Фермент топоизомеразы II постепенно расплетает катенированные сестринские ДНК между S-фазой и ранним митозом путем разрезания одной молекулы ДНК, протягивания второй молекулы через разрыв и сшивания расщепленной ДНК (см. рис. 5.23). После того как катенация снята, когезия сестринских хроматид зависит только от когезиновых комплексов. Потеря когезии при переходе от метафазы к анафазе, таким образом, зависит в основном от нарушения этих комплексов, как мы обсудим позднее.

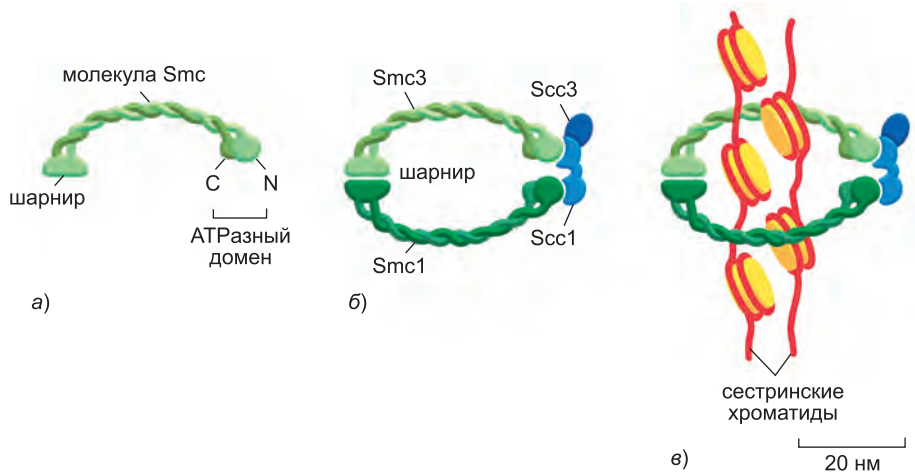


Рис. 17.24. Когезин. Когезин—это белковый комплекс, состоящий из четырех субъединиц. Две субъединицы Smc1 и Smc3 представляют собой суперспирали, образованные двумя скрученными спиралями, несущие на одном конце АТРАЗный домен; вместе они образуют показанную крупную V-образную структуру. Две дополнительные субъединицы Scc1 и Scc3 связывают АТРАЗные головные домены с образованием кольцевой структуры, которая, по-видимому, окружает сестринские хроматиды.

Заключение

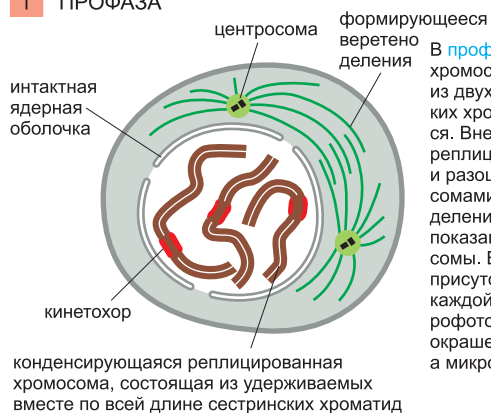
Удвоение хромосом в S-фазе представляет собой точное копирование молекулы ДНК каждой хромосомы и дупликацию связанных с ДНК белков хроматина, управляющих различными аспектами функционирования ДНК. Удвоение ДНК запускается активацией S-Cdk, которые активируют белки, расплетающие ДНК и иницирующие ее репликацию в сайтах, носящих название точек начала (ориджинов) репликации. После активации ориджина в S-фазе S-Cdk также ингибируют белки, необходимые для повторной инициации репликации ДНК в ориджине. Таким образом, каждая точка начала репликации срабатывает в S-фазе только один раз и не может быть повторно использована до следующего клеточного цикла.

17.4. Митоз

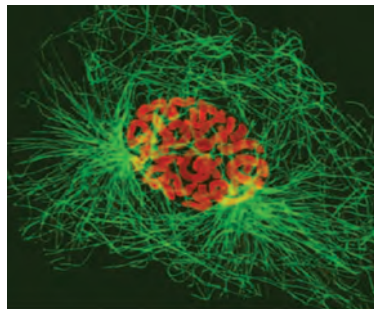
После завершения S-фазы и перехода через G_2 клетка претерпевает значительные изменения в M-фазе. Все начинается с митоза, во время которого сестринские хроматиды разделяются и распределяются (*расходятся*) по двум идентичным дочерним ядрам, каждое из которых несет копию генома. Митоз по наблюдаемому в микроскоп поведению хромосом традиционно подразделяют на пять стадий: *профазу*, *прометафазу*, *метафазу*, *анафазу* и *телофазу*. После завершения митоза второе основное событие M-фазы — цитокинез — разделяет клетку на две половины, несущие идентичные ядра. В [приложении 17.1](#) представлены основные события M-фазы.

С точки зрения регуляции митоз можно подразделить на две основные части, каждая из которых управляется разными компонентами системы контроля клеточного цикла. Сначала резкое увеличение активности M-Cdk в контрольной точке

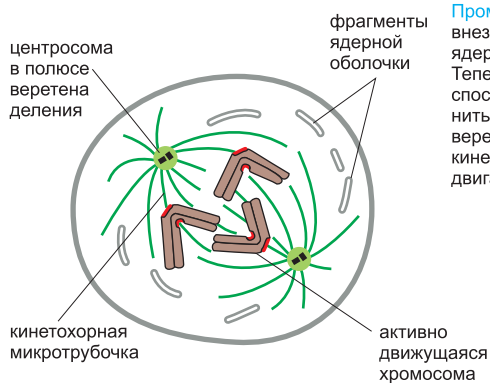
1 ПРОФАЗА



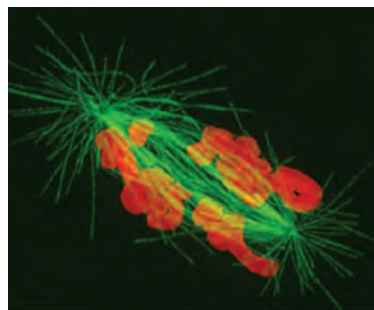
В **профазе** реплицированные хромосомы, состоящие из двух связанных сестринских хроматид, конденсируются. Вне ядра между двумя реплицированными и разошедшимися центросомами собирается веретено деления. Для простоты показаны только три хромосомы. В диплоидных клетках присутствует по две копии каждой хромосомы. На микрофотографии хромосомы окрашены оранжевым, а микротрубочки — зеленым.



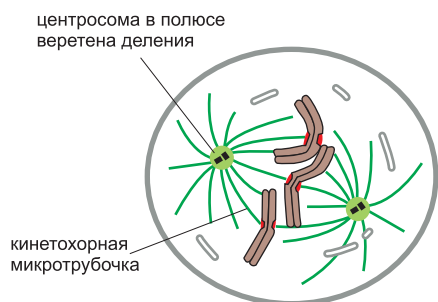
2 ПРОМЕТАФАЗА



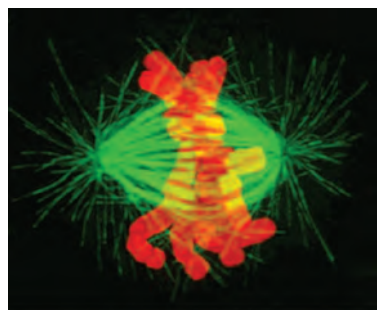
Прометафаза начинается внезапно с разрушения ядерной оболочки. Теперь хромосомы способны присоединиться к микротрубочкам веретена через кинетохоры и активно двигаться.



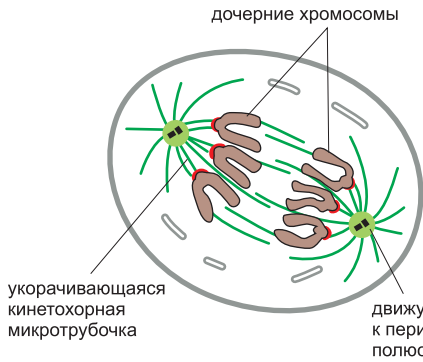
3 МЕТАФАЗА



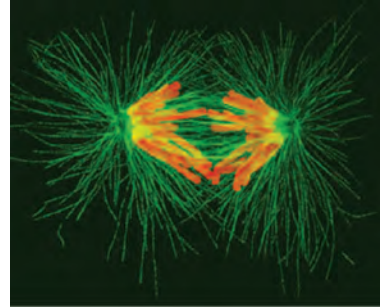
В **метафазе** хромосомы выстраиваются по экватору веретена деления на полпути между полюсами веретена. Кинетохорные микротрубочки соединяют сестринские хроматиды с противоположными полюсами веретена.



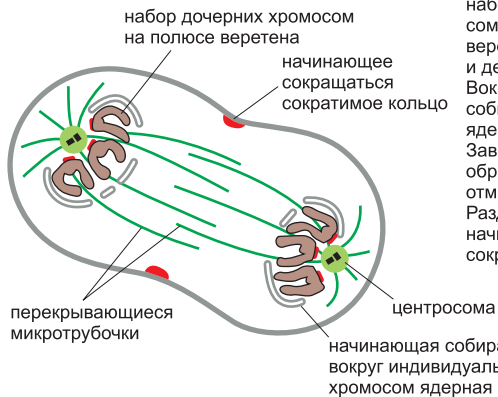
4 АНАФАЗА



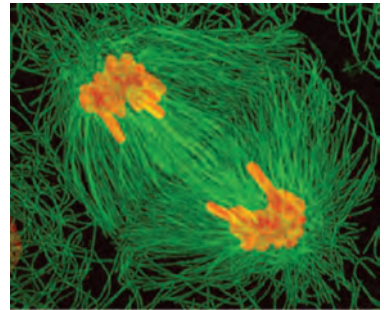
В **анафазе** сестринские хроматиды синхронно расходятся с образованием двух дочерних хромосом, медленно растаскиваемых к противоположным полюсам веретена деления. Кинетохорные микротрубочки укорачиваются, и полюса веретена также удаляются друг от друга; оба процесса вносят вклад в расхождение хромосом.



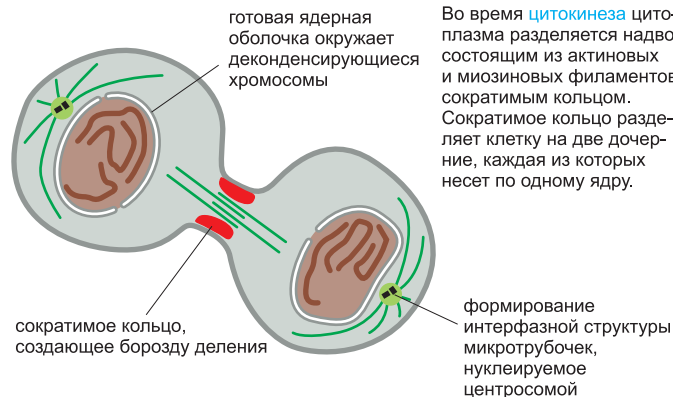
5 ТЕЛОФАЗА



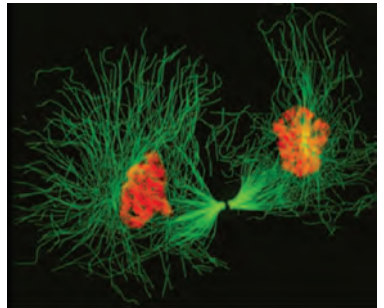
Во время **телофазы** два набора дочерних хромосом достигают полюсов веретена деления и деконденсируются. Вокруг каждого набора собирается новая ядерная оболочка. Завершение образования двух ядер отмечает конец митоза. Разделение цитоплазмы начинается с сокращения сократимого кольца.



6 ЦИТОКИНЕЗ



Во время **цитокинеза** цитоплазма разделяется надвое состоящим из актиновых и миозиновых филаментов сократимым кольцом. Сократимое кольцо разделяет клетку на две дочерние, каждая из которых несет по одному ядру.



(Микрофотографии предоставлены Julie Canman и Ted Salmon.)

G_2/M запускает события раннего митоза (профазу, прометафазу и метафазу). Во время этого периода M-Cdk и несколько других митотических протеинкиназ фосфорилируют разнообразные белки, что приводит к сборке веретена деления и его прикреплению к сестринским хроматидам. Вторая основная стадия митоза начинается с перехода от метафазы к анафазе, когда APC/C запускает разрушение секурина, высвобождающее расщепляющую когезин протеазу и, следовательно, инициирующее расхождение сестринских хроматид. APC/C также запускает разрушение циклинов, приводящее к инактивации Cdk и дефосфорилированию мишеней Cdk, что необходимо для протекания событий поздней M-фазы, включая завершение анафазы, разборку веретена деления и разделения клетки посредством цитокинеза.

В данном разделе мы опишем ключевые механические события митоза и то, как M-Cdk и APC/C управляют ими.

17.4.1. M-Cdk управляет входением в митоз

Одно из наиболее удивительных свойств контроля клеточного цикла — единственная протеинкиназа, M-Cdk — вызывает практически все разнообразные и сложные перестройки клетки, происходящие на ранних стадиях митоза. По меньшей мере M-Cdk должна инициировать сборку веретена деления и обеспечить прикрепление пар сестринских хромосом к противоположным полюсам веретена. Она также запускает *конденсацию хромосом* — крупномасштабную перестройку переплетенных сестринских хроматид с образованием компактных, палочковидных структур. В животных клетках M-Cdk также способствует разрушению ядерной оболочки и перестройке актинового цитоскелета и аппарата Гольджи. Считается, что каждый из этих процессов запускается, когда M-Cdk фосфорилирует определенные белки, участвующие в конкретном процессе, но большинство этих белков еще предстоит идентифицировать.

Не только M-Cdk фосфорилирует ключевые белки, участвующие в раннем митозе. Два дополнительных семейства протеинкиназ, *Polo-подобные киназы* и *Aurora-киназы*, также вносят важный вклад в контроль ранних событий митоза. Polo-подобная киназа Plk, например, необходима для нормальной сборки биополярного веретена деления, поскольку она фосфорилирует белки, участвующие в разделении полюсов веретена в раннем митозе. Aurora-киназа Aurora-A также способствует контролю белков, управляющих сборкой и устойчивостью веретена, как мы обсудим позднее. Активация Polo-подобных киназ и Aurora-киназ зависит от активности M-Cdk, но механизмы активации не до конца понятны.

17.4.2. В начале митоза дефосфорилирование активирует M-Cdk

Активация M-Cdk начинается с накопления M-циклина (или циклина B в клетках позвоночных; см. таблицу 17.1). В эмбриональных клеточных циклах синтез M-циклина постоянен на протяжении всего цикла, и накопление M-циклина является результатом высокой устойчивости белка в интерфазе. Однако в большинстве типов клеток синтез M-циклина возрастает во время G_2 и M, в основном за счет усиления транскрипции гена M-циклина. Повышение концентрации M-циклина приводит к соответствующему накоплению M-Cdk (комплекса Cdk1 и M-циклина) по мере приближения клетки к митозу. Несмотря на то что в этих комплексах Cdk фосфорилирована в активном сайте упоминавшейся ранее Cdk-активирующей киназой

(САК), протеинкиназа Wee1 удерживает ее в неактивном состоянии посредством ингибирующего фосфорилирования по двум соседним сайтам (см. рис. 17.18). Таким образом, к тому моменту, как клетка достигает конца G_2 , она содержит большое количество М-Cdk, готового к работе, но подавленного фосфатами, блокирующими активный сайт киназы.

Что же тогда запускает активацию запасов М-Cdk? Ключевым событием является активация протеинфосфатазы Cdc25, удаляющей ингибиторные фосфаты с М-Cdk (рис. 17.25). В то же время подавляется ингибиторная активность Wee1, что также обеспечивает усиление активности М-Cdk. Механизмы, активирующие Cdc25 (и подавляющие Wee1) в раннем митозе, малопонятны. Одно из предположений заключается в том, что активные в G_2 S-Cdk и ранняя фосфатаза стимулируют Cdc25.

Примечательно, что Cdc25 также может активироваться, по крайней мере частично, своей мишенью М-Cdk. Также М-Cdk может ингибировать ингибиторную киназу Wee1. Способность М-Cdk активировать собственный активатор (Cdc25) и ингибировать ингибитор (Wee1) указывает на то, что в активации М-Cdk в митозе участвуют петли положительных обратных связей (см. рис. 17.25). В соответствии с этой привлекательной моделью частичная активация Cdc25 (возможно, комплексом S-Cdk) приводит к частичной активации субпопуляции комплексов М-Cdk, которые затем фосфорилируют еще больше молекул Cdc25 и Wee1. Это еще сильнее активирует М-Cdk, и цикл повторяется. Такой механизм может быстро привести к полной активации всех комплексов М-Cdk клетки. Как упомянуто ранее, сходные молекулярные переключатели действуют в различных точках клеточного цикла и приводят к резкому и полному переходу от одной фазы клеточного цикла к другой.

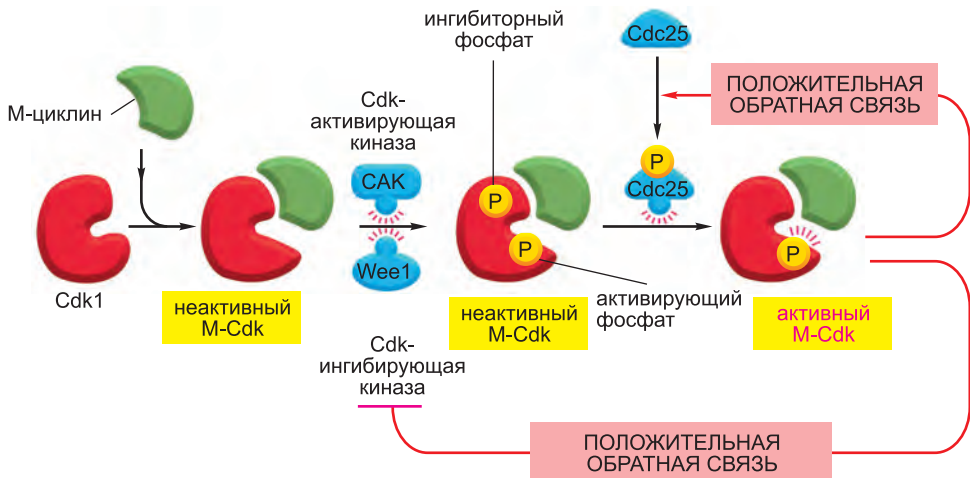
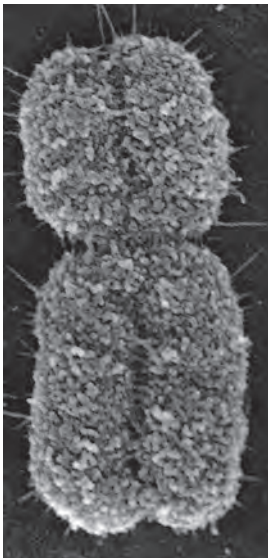


Рис. 17.25. Активация М-Cdk. Cdk1 связывается с М-циклином по мере увеличения его концентрации. Образующийся комплекс М-Cdk фосфорилируется по активному сайту Cdk-активирующей киназой (САК) и по паре ингибиторных сайтов киназой Wee1. Затем такой неактивный комплекс М-Cdk активируется в конце G_2 -фазы фосфатазой Cdc25. Cdc25 стимулируется комплексом М-Cdk, что приводит к формированию положительной обратной связи. Эта связь усиливается благодаря способности М-Cdk ингибировать Wee1.

17.4.3. Конденсин помогает подготовить удвоенные хромосомы к разделению

В конце S-фазы очень длинные молекулы ДНК сестринских хроматид представляют собой смесь переплетенной ДНК и белков. Любая попытка растащить хроматиды в таком состоянии, без сомнения, привела бы к разрывам хромосом. Чтобы избежать этого, клетка тратит значительную энергию в начале митоза для постепенной перестройки сестринских хроматид в относительно короткие структуры, которые можно легко разделить в анафазе. Такие хромосомные изменения включают в себя два процесса: *конденсацию хромосом*, при которой хроматиды значительно компактизуются, и *обособление сестринских хроматид*, когда хроматиды обособляются друг от друга и становятся двумя независимыми, разделяемыми единицами (рис. 17.26). Обособление происходит в результате расплетания сестринских ДНК, сопровождаемого частичным удалением молекул когезина вдоль плеч хромосом. В результате, когда клетка достигает метафазы, сестринские хроматиды в микроскоп выглядят как компактные палочковидные структуры, крепко соединенные в центромерной области и слабо — по плечам.

Конденсация и обособление сестринских хроматид, по крайней мере частично, зависят от пятиясубъединичного белкового комплекса **конденсина**. Структура конденсина родственна структуре когезинового комплекса, удерживающего вместе сестринские хроматиды (см. рис. 17.24). Конденсин содержит две субъединицы SMC, аналогичные субъединицам когезина, и три не-SMC-субъединицы (рис. 17.27). Он может образовывать кольцевую структуру, которая каким-то образом использует энергию гидролиза АТФ для компактизации и обособления сестринских хроматид. Конденсин в пробирке изменяет спирализацию молекул ДНК, и эта его способность, по-видимому, играет важную роль в конденсации хромосом во время митоза. Примечательно, что фосфорилирование субъединиц конденсина киназой M-Cdk стимулирует связанную со спирализацией активность конденсина, что проливает свет на один из механизмов того, как M-Cdk способствует перестройке хромосом в раннем митозе.

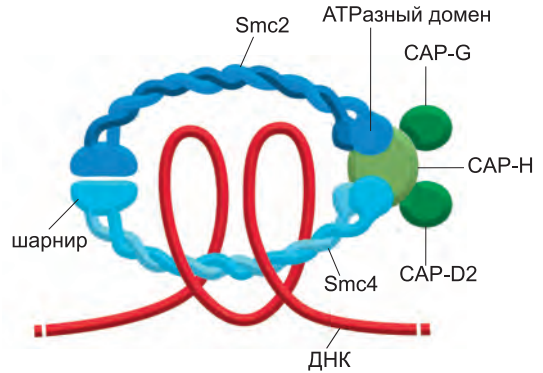


17.4.4. Веретено деления — это состоящая из микротрубочек машина

Центральное событие митоза — расхождение хромосом — во всех эукариотах зависит от сложной и изящной машины, носящей название **веретено деления**. Веретено деления представляет собой биполярную состоящую из микротрубочек структуру, в анафазе растаскивающую сестринские хроматиды к противоположным концам клетки, разделяя, таким образом, два набора хромосом для упаковки в дочерние ядра. M-Cdk в раннем митозе запускает сборку веретена деления параллельно с описанной выше перестройкой хромосом. Прежде чем мы рассмотрим, как веретено

Рис. 17.26. Митотическая хромосома. Сканирующая электронная микрофотография человеческой митотической хромосомы, состоящей из соединенных по длине двух сестринских хроматид. Узкая область — это центромера. (С любезного разрешения Terry D. Allen.)

Рис. 17.27. Конденсин. Конденсин — это пяти-субъединичный белковый комплекс, напоминающий когезин (см. рис. 17.24). Головные домены двух его основных субъединиц, Smc2 и Smc4, удерживаются вместе тремя дополнительными субъединицами. Непонятно, как конденсин катализирует перестройку и компактизацию хромосомной ДНК, но, возможно, он образует кольцо, окружающее петли ДНК (как показано); он может гидролизовать АТР и спирализовать молекулы ДНК в пробирке.



собирается и как его микротрубочки прикрепляются к сестринским хроматидам, кратко обсудим основные свойства структуры веретена.

Как обсуждалось в главе 16, в основе веретена деления лежит биполярная микротрубочковая структура, минус-концы которой располагаются в двух полюсах веретена, а плюс-концы направлены наружу от полюсов (рис. 17.28). Плюс-концы некоторых микротрубочек, носящих название **межполюсных микротрубочек**, взаимодействуют с плюс-концами микротрубочек противоположного полюса, что приводит к антипараллельной укладке филаментов в средней области веретена. Плюс-концы

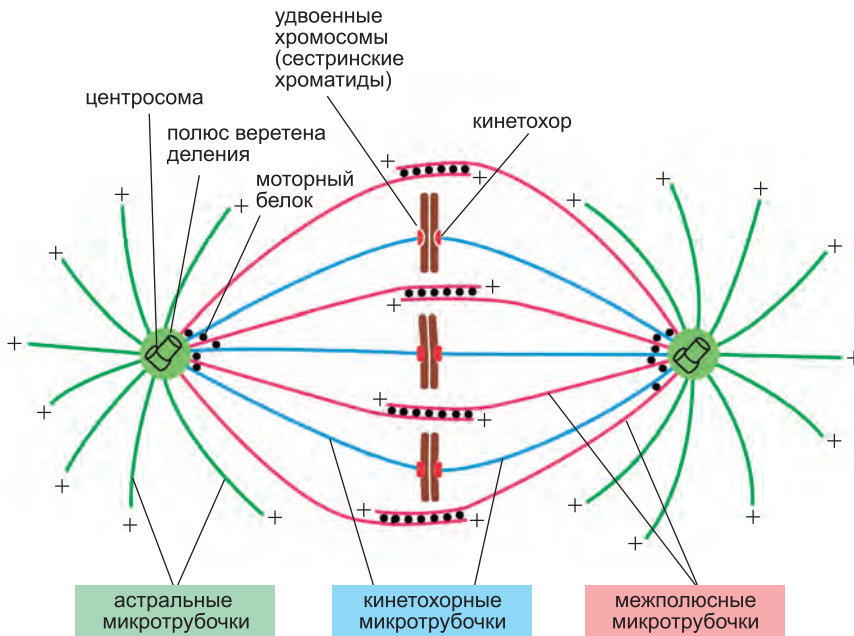


Рис. 17.28. Три класса микротрубочек веретена деления животной клетки. Плюс-концы микротрубочек направлены наружу от центросом, тогда как минус-концы заякорены в полюсах веретена деления, которые в данном примере образованы центросомами. Кинетохорные микротрубочки соединяют полюса веретена с кинетохорами сестринских хроматид, тогда как межполюсные микротрубочки противоположных полюсов переплетаются на экваторе веретена. Астральные микротрубочки исходят из полюсов в цитоплазму и обычно взаимодействуют с клеточным кортексом, способствуя правильному расположению веретена в клетке.

других микротрубочек — **кинетохорных микротрубочек** — прикрепляются к парам сестринских хроматид в крупных белковых структурах — *кинетохорах*, расположенных в *центромерах* хроматид. Наконец, многие веретена деления также содержат **астральные микротрубочки**, исходящие из полюсов и взаимодействующие с клеточным кортексом, способствуя правильному расположению веретена в клетке.

В большинстве соматических животных клеток полюсы веретена деления сосредоточены в белковой органелле, носящей название **центросомы** (см. главу 16). Каждая центросома состоит из облака аморфного вещества (носящего название *перичентриольного матрикса*), окружающего пару *центриолей* (рис. 17.29). Перичентриольный матрикс нуклеирует лучевую структуру микротрубочек, в которой быстрорастущие полюс-концы направлены наружу, а минус-концы связаны с центросомой. Матрикс содержит множество белков, включая микротрубочковые моторные белки, двуспиральные белки, связывающие моторы с центросомой, структурные белки и компоненты системы контроля клеточного цикла. Одним из важнейших компонентов матрикса является *кольцевой комплекс γ -тубулина*, отвечающий в основном за нуклеацию микротрубочек (см. главу 16).

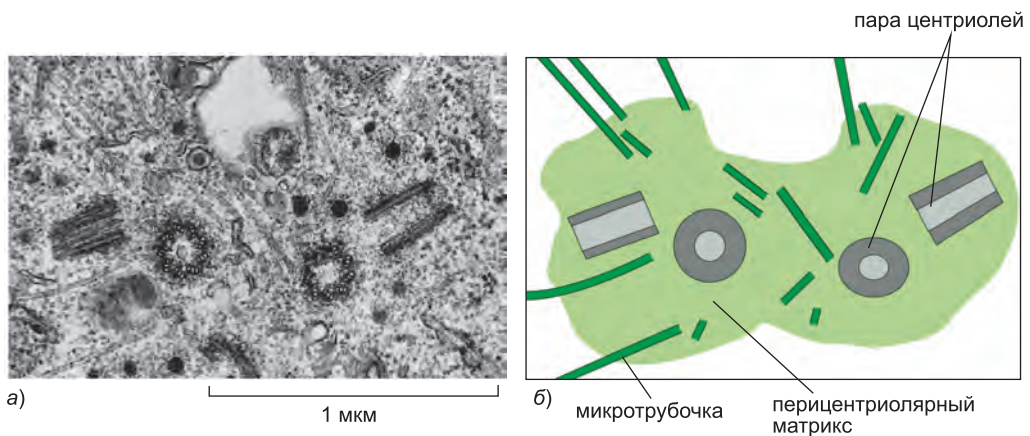


Рис. 17.29. Центросома. (а) На данной электронной микрофотографии клетки млекопитающего в культуре в S-фазе видна удвоенная центросома. Каждая центросома содержит пару центриолей; несмотря на то что центриоли удваиваются, они остаются вместе в едином комплексе, как показано на эскизе фотографии на (б). Одну центриоль каждой пары разрезали вдоль, а вторую — поперек, т. е. две центриоли в паре расположены под прямым углом друг к другу. Две половины реплицированной центросомы, состоящие из окруженной перичентриольным матриксом пары центриолей, в начале М-фазы расходятся и мигрируют к противоположным концам клетки для инициации образования двух полюсов веретена деления. (в) Электронная микрофотография изолированной из клетки пары центриолей. Две центриоли частично разделились вследствие процесса выделения, но остаются связанными тонкими волокнами, удерживающими их вместе до тех пор, пока им не надо будет разойтись. Обе центриоли разрезаны вдоль, и теперь видно, что они по-разному устроены: материнская центриоль более крупная и сложная, чем дочерняя, и только она связана с перичентриольным матриксом, нуклеирующим микротрубочки. Дочерние центриоли созревают в течение следующего клеточного цикла, когда удваиваются с образованием собственных дочерних центриолей. (а, из M. McGill, D. P. Highfield, T. M. Monahan and B. R. Brinkley, *J. Ultrastruct. Res.* 57: 43–53, 1976. С любезного разрешения издательства Academic Press; в, из M. Paintrand et al., *J. Struct. Biol.* 108: 107–128, 1992. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

Некоторые клетки, например клетки высших растений и ооциты многих позвоночных, не обладают центросомами, и микротрубочковые моторные белки и другие белки, связанные с минус-концами микротрубочек, организуются и фокусируются в этих клетках в полюсах веретена деления.

17.4.5. Связанные с микротрубочками моторные белки управляют сборкой и функционированием веретена деления

Сборка и функционирование веретена деления зависит от многочисленных связанных с микротрубочками моторных белков. Как обсуждалось в главе 16, эти белки принадлежат двум семействам — семейству кинезинов, представители которого обычно движутся в направлении плюс-концов микротрубочек, и семейству динеинов, представители которого движутся к минус-концам. В веретене деления эти моторные белки обычно функционируют вблизи концов микротрубочек. Для сборки и работы веретена особенно важны четыре типа моторных белков: *кинезин-5*, *кинезин-14*, *кинезины-4 и -10* и *динеин* (рис. 17.30).

Белки кинезины-5 несут два моторных домена, взаимодействующих с плюс-концами антипараллельных микротрубочек в центральной зоне веретена деления. Поскольку одновременно к плюс-концам движутся два моторных домена, происходит скольжение антипараллельных микротрубочек относительно друг друга в направлении полюсов веретена, что приводит к расхождению полюсов. Белки кинезины-14, с другой стороны, движутся в направлении минус-концов и несут один моторный домен и домены, способные взаимодействовать с различными микротрубочками. Они способны поперечно сшивать антипараллельные межполюсные микротрубочки в центральной области веретена деления и стремятся сблизить полюса. Белки кинезин-4 и кинезин-10, часто называемые *хромокинезинами*, представляют собой движущиеся к плюс-концам моторы, связывающиеся с плечами хромосом и отталкивающие их от полюсов (или полюса от хромосом). Наконец, динеины — это направленные к минус-концам моторы, которые, наряду с дополнительными белками, организуют микротрубочки в различных областях клетки. Например, они связывают плюс-концы астральных микротрубочек с компонентами актинового цитоскелета в клеточном кортексе; за счет движения в направлении минус-концов

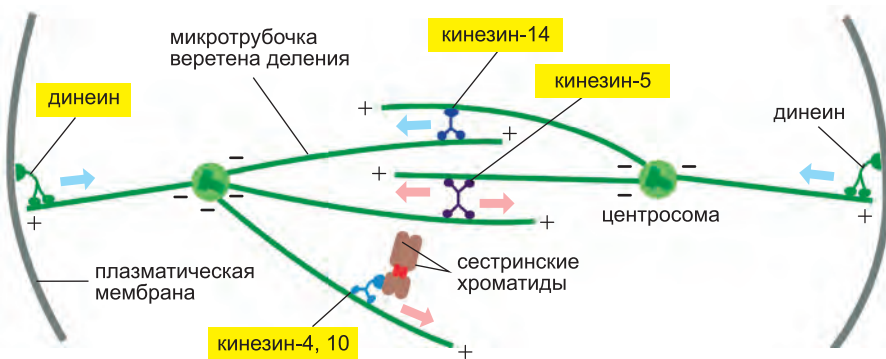


Рис. 17.30. Основные моторные белки веретена деления. В сборку и функционирование веретена деления (см. текст) вносят вклад четыре основных класса связанных с микротрубочками моторных белков (желтые). Цветные стрелки указывают направление движения мотора вдоль микротрубочки: голубые — в сторону минус-конца, красные — в сторону плюс-конца.

микротрубочек динеиновые моторы толкают полюса веретена деления к кортексу и в противоположном друг от друга направлении.

17.4.6. В сборке биполярного веретена деления участвуют два механизма

Для растаскивания двух наборов сестринских хроматид к противоположным концам клетки в анафазе веретено деления должно иметь два полюса. В животных клетках, основном объекте данной главы, биполярность веретена обеспечивается двумя механизмами. Один зависит от способности митотических хромосом нуклеировать и стабилизировать микротрубочки и способности различных моторных белков (см. выше) организовывать микротрубочки в биполярную структуру, в которой минус-концы сосредоточены к двух полюсах веретена, а плюс-концы взаимодействуют друг с другом в центральной области веретена. Второй механизм зависит от способности centrosом помогать образованию полюсов веретена деления. Типичная животная клетка входит в митоз с парой centrosом, каждая из которых нуклеирует астральную микротрубочковую структуру. Centrosомы ускоряют сборку биполярного веретена деления, предоставляя пару заранее существующих полюсов веретена. Однако они не являются необходимыми для сборки веретена деления, поскольку функционирующее веретено образуется в лишенных centrosом клетках и в клетках в культуре, в которых лазером centrosомы разрушены.

Далее мы опишем этапы сборки веретена деления, начиная с зависимой от centrosом сборки в раннем митозе. Затем мы рассмотрим механизм самоорганизации, не требующий centrosом и играющий важную роль после разрушения ядерной оболочки.

17.4.7. Удвоение centrosом происходит рано в клеточном цикле

Большинство животных клеток несет единственную centrosому, нуклеирующую большинство цитоплазматических микротрубочек клетки. Centrosома удваивается, когда клетка входит в клеточный цикл, т.е. к тому моменту, как клетка входит в митоз, она несет две centrosомы. Дупликация centrosом начинается примерно в то же время, когда клетки входят в S-фазу. G_1/S -Cdk (комплекс циклина E и Cdk2 в животных клетках; см. таблицу 17.1), запускающий вход в клеточный цикл, также инициирует удвоение centrosомы. Центриоли centrosомы расходятся, и каждая из них нуклеирует формирование еще одной новой центриоли, что приводит к образованию двух пар центриолей в увеличенном перичентриолярном матриксе (рис. 17.31). Пара centrosом располагается рядом вблизи ядра до тех пор, пока клетка не войдет в митоз.

Между удвоением centrosом и удвоением хромосом существуют интересные параллели. В обоих процессах используется полуконсервативный механизм дупликации, при котором две половины расходятся и каждая из них служит шаблоном для создания новой половины. Centrosомы, как хромосомы, должны реплицироваться только один раз за клеточный цикл, чтобы клетка вошла в митоз только с двумя копиями: неправильное число centrosом может привести к нарушению сборки веретена деления и, следовательно, к ошибкам расхождения хромосом.

Механизмы, обеспечивающие единственное удвоение centrosом за клеточный цикл, малопонятны. Во многих типах клеток искусственное ингибирование синтеза ДНК блокирует удвоение centrosом, что указывает на один из механизмов

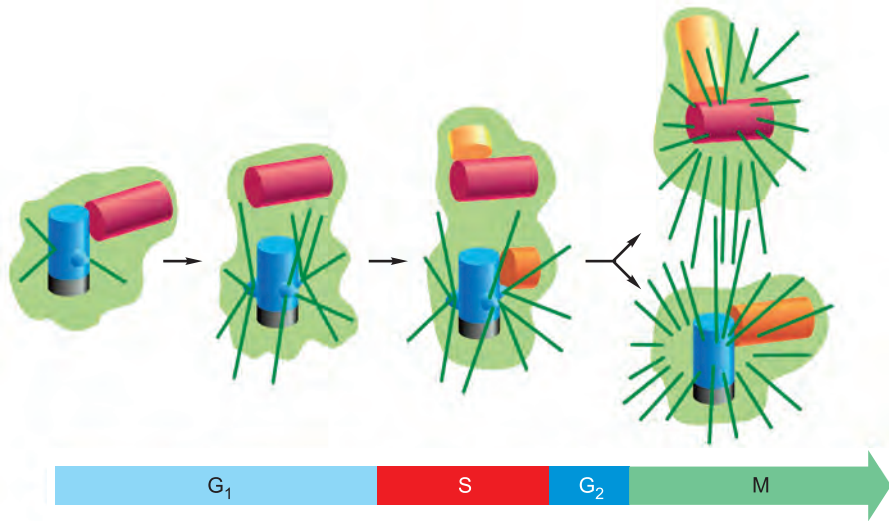


Рис. 17.31. Удвоение центриолей. Центросома состоит из пары центриолей и связанного с ними перичентриольного матрикса (зеленый). В определенный момент в G_1 -фазе центриоли пары отходят друг от друга на несколько микрометров. Во время S-фазы вблизи основания материнской центриоли и под прямым углом по отношению к ней начинает расти дочерняя центриоль. Удлинение дочерней центриоли обычно завершается к началу G_2 -фазы. Две пары центриолей остаются рядом в едином центросомном комплексе до начала М-фазы, после чего комплекс распадается надвое и его половинки начинают расходиться. Центросомы начинают нуклеировать звездообразные микротрубочковые структуры, носящие название «звезды».

управления числом центросом. Однако другие типы клеток, включая клетки ранних эмбрионов мушек, морских ежей и лягушек, не обладают таким механизмом, и в них удвоение центросом продолжается при блокировке дупликации хромосом. Неизвестно, как такие клетки ограничивают удвоение хромосом до одного раза за клеточный цикл.

17.4.8. М-Cdk инициирует сборку веретена деления в профазе

В начале митоза внезапное усиление активности М-Cdk инициирует сборку веретена. В животных клетках две центросомы расходятся, двигаясь вдоль ядерной оболочки, и плюс-концы микротрубочек между ними переплетаются с образованием межполюсных микротрубочек развивающегося веретена деления. Одновременно в центросомах значительно увеличивается содержание кольцевого комплекса γ -тубулина, что усиливает способность центросом нуклеировать новые микротрубочки. Этот процесс называется *созреванием центросом*.

Многочисленные моторные белки обеспечивают разделение центросом в раннем митозе. В профазе основную работу совершают направленные к минус-концам моторные белки динеины, расположенные на плюс-концах микротрубочек. Эти моторы закорены в клеточном кортексе или ядерной оболочке, и их движение в направлении минус-концов микротрубочек приводит к расхождению центросом (см. рис. 17.30). После разрушения ядерной оболочки в конце профазы взаимодействия между центросомными микротрубочками и клеточным кортексом позволяют актин-миозиновым пучкам кортекса растаскивать центросомы дальше. Наконец,

моторы кинезины-5 поперечно сшивают перекрывающиеся антипараллельные концы межполюсных микротрубочек и окончательно разделяют полюса (см. рис. 17.30).

Равновесие между накладываемыми различными типами моторных белков противоположно направленными силами определяет конечную длину веретена деления. Динеин и кинезин-5 обычно способствуют расхождению центросом и увеличивают длину веретена. Белки кинезины-14 способствуют обратному процессу: они представляют собой направленные к минус-концам моторы и взаимодействуют с микротрубочками одного полюса, одновременно двигаясь к минус-концу антипараллельной микротрубочки другого; в результате они стремятся сблизить полюса. Неизвестно, как клетка регулирует равновесие между противоположно направленными силами для создания веретена деления нужной длины (рис. 17.32).

M-Cdk и другие митотические протеинкиназы необходимы для разделения и созревания центросом. M-Cdk и Auroga-A фосфорилируют кинезины-5 и, таким образом, стимулируют расхождение центросом. Auroga-A и Plk также фосфорилируют компоненты центросомы и этим способствуют их созреванию.

17.4.9. Для завершения сборки веретена деления в животных клетках необходимо разрушение ядерной оболочки

Центросомы и микротрубочки животных клеток расположены в цитоплазме и отделены от хромосом двойной мембраной ядерной оболочки (см. главу 12). Очевидно, для прикрепления сестринских хроматид к веретену деления необходимо удаление этого барьера. Более того, многие моторные белки и регуляторы микротрубочек, способствующие сборке веретена, связаны с хромосомами внутри ядра. Разрушение ядерной оболочки позволяет этим белкам выполнять важные функции по сборке веретена деления.

Разрушение ядерной оболочки — это сложный, многоэтапный процесс, начинающийся, по-видимому, с фосфорилирования киназой M-Cdk нескольких субъединиц крупного ядерного порового комплекса в ядерной оболочке. Это запускает разборку поровых комплексов и их диссоциацию из оболочки. M-Cdk также фосфорилирует компоненты ядерной ламины — лежащего под оболочкой структурного каркаса. Фосфорилирование компонентов ламины и нескольких белков внутренней ядерной мембраны приводит к разборке ламины и расщеплению оболочки на небольшие везикулы.

17.4.10. В митозе значительно усиливается нестабильность микротрубочек

В большинстве интерфазных животных клеток цитоплазматические микротрубочки выходят из единственной центросомы. Как обсуждалось в главе 16, микротрубочки в этой интерфазной структуре находятся в состоянии *динамической нестабильности*, при которой отдельные микротрубочки либо удлиняются, либо укорачиваются и случайным образом переключаются между этими состояниями. Переключение от удлинения к укорочению называется *катастрофой*, а переключение от укорочения к удлинению — *спасением* (см. рис. 16.16). Для уравнивания потери полностью исчезающих за счет деполимеризации микротрубочек постоянно создаются новые.

Вход в митоз сигнализирует о резком изменении микротрубочек клетки. Интерфазная структура микротрубочек, представляющая собой небольшое число длинных

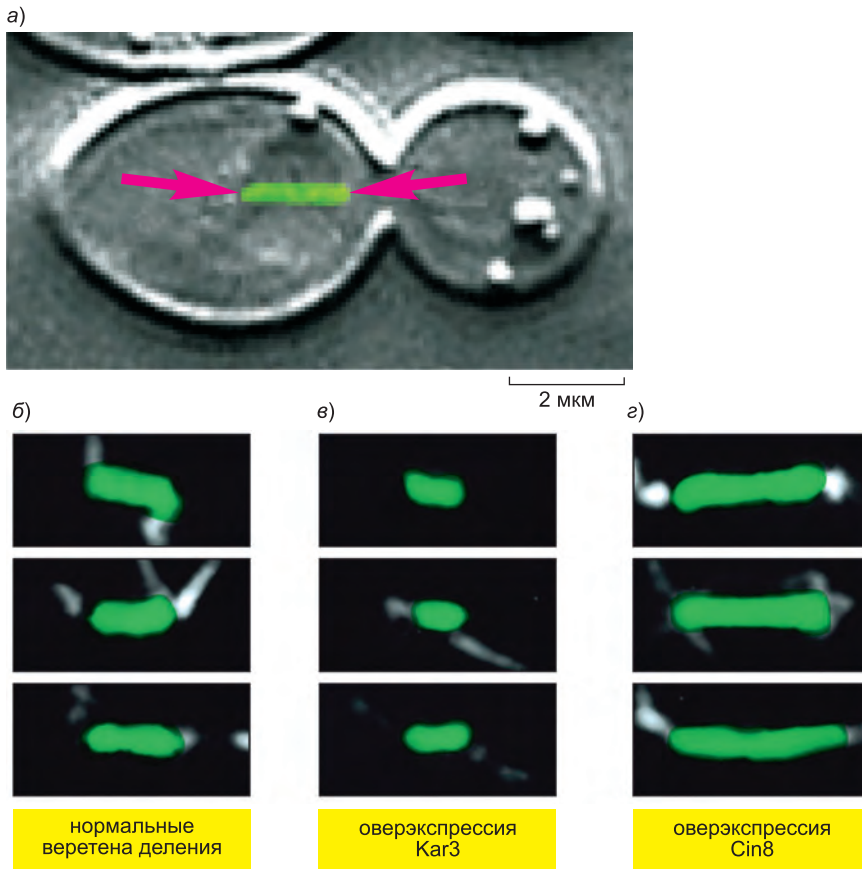


Рис. 17.32. Влияние противоположно направленных моторных белков на длину веретена в почкующихся дрожжах. (а) Дифференциальная интерференционная контрастная микрофотография митотической дрожжевой клетки. Веретено деления окрашено зеленым, а положение полюсов веретена отмечено красными стрелками. У дрожжей ядерная оболочка во время митоза не разрушается, и веретено образуется внутри ядра. На (б–г) веретена деления окрашены флуоресцентными антитубулиновыми антителами. (б) Нормальная дрожжевая клетка. (в) Оверэкспрессия направленного к минус-концу моторного белка Kar3 (белка кинезина-14) приводит к патологически коротким веретенам деления. (г) Оверэкспрессия направленного к плюс-концам моторного белка Cin8 (белка кинезина-5) приводит к патологически длинным веретенам деления. По-видимому, в этих клетках длина веретена деления определяется равновесием между противоположно направленными моторными белками. (а, с любезного разрешения Kerry Bloom; б–г из W. Saunders, V. Lengyel and M. A. Hoyt, *Mol. Biol. Cell* 8: 1025–1033, 1997. С любезного разрешения American Society for Cell Biology.)

филаментов, преобразуется во множество коротких динамических микротрубочек, окружающих каждую centrosому. Во время профазы и особенно прометафазы и метафазы (см. приложение 17.1) время полужизни микротрубочек значительно снижается. Усиление нестабильности микротрубочек, наряду с упомянутым ранее усилением способности centrosом к их нуклеации, приводит к образованию удивительно плотных и динамических микротрубочек веретена, идеально подходящих для захвата сестринских хроматид.

M-Cdk, по крайней мере частично, инициирует эти изменения поведения микротрубочек за счет фосфорилирования двух классов белков, контролирующих динамику микротрубочек (см. главу 16): связанных с микротрубочками моторных белков и **ассоциированных с микротрубочками белков (МАР)**. Эксперименты на бесклеточных экстрактах яйцеклеток *Xenopus*, позволяющие воспроизвести многие процессы клеточного цикла, пролили свет на роль этих регуляторов в контроле динамики микротрубочек. Если к таким экстрактам добавить centrosомы и флуоресцентный тубулин, centrosомы будут нуклеировать флуоресцентные микротрубочки, что позволяет наблюдать поведение отдельных микротрубочек методом замедленной видеомикроскопии. Микротрубочки в митотических экстрактах отличаются от микротрубочек интерфазных экстрактов в основном увеличением частоты катастроф, характеризующихся внезапными переключениями от медленного роста к быстрому укорочению.

В митозе динамика микротрубочек управляется двумя классами белков. Белки **катастрофины (факторы катастроф)** дестабилизируют микротрубочки за счет увеличения частоты катастроф (см. рис. 16.16). Одним из этих белков является родственник кинезину белок, не служащий мотором. МАР, с другой стороны, обладают противоположным влиянием и различными способами стабилизируют микротрубочки: они могут увеличивать частоту спасений, при которых микротрубочки переключаются от укорочения к росту, и либо увеличивать скорость роста, либо снижать скорость укорочения. Таким образом, изменения активности катастрофинов или МАР могут сделать микротрубочки более динамичными в М-фазе за счет увеличения общей скорости деполимеризации микротрубочек или снижения общей скорости их полимеризации, или и того, и другого.

В экстрактах яйцеклеток *Xenopus* частота катастроф и стационарная длина микротрубочек определяются равновесием между единственным типом катастрофинов и единственным типом МАР (рис. 17.33). Это равновесие, в свою очередь, управляет сборкой веретена деления, поскольку слишком длинные или слишком короткие микротрубочки не способны образовать нормальное веретено. Одним из способов регуляции длины микротрубочек являются фосфорилирование киназой M-Cdk этого МАР и снижение его способности стабилизировать микротрубочки. Даже если активность катастрофина остается постоянной на протяжении всего клеточного цикла, равновесие между двумя противодействующими друг другу активностями смещается в сторону усиления динамической нестабильности микротрубочек.

17.4.11. Митотические хромосомы помогают сборке биполярного веретена деления

В процессе сборки веретена деления хромосомы — не просто пассивные пассажиры. Создавая локальное окружение, благоприятствующее нуклеации и стабилизации микротрубочек, они играют активную роль в образовании веретена. Влияние хромосом можно показать, изменив при помощи тонкой стеклянной иглы их положение в клетке после сборки веретена. В некоторых метафазных клетках, если сместить одну хромосому, вокруг нее немедленно образуется масса новых микротрубочек веретена, а микротрубочки в первоначальном месте расположения хромосомы быстро деполимеризуются. Данное свойство хромосом, по-видимому, зависит от связанного с хроматином фактора обмена гуаниновых нуклеотидов

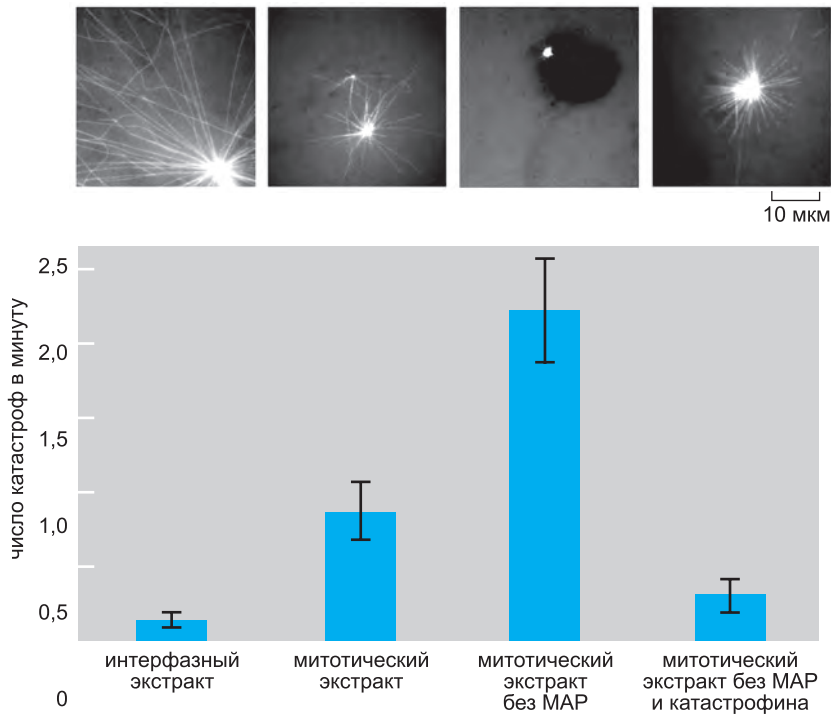


Рис. 17.33. Экспериментальные доказательства того, что равновесие между катастрофинами и MAP влияет на частоту катастроф и длину микротрубочек. Интерфазные или митотические яйцеклетки *Xenopus* инкубировали с центросомами и флуоресцентным тубулином. За поведением нуклеированных в центросомах отдельных микротрубочек наблюдали при помощи флуоресцентной видеомикроскопии. Как и ожидалось, в митотических экстрактах частота катастроф выше, чем в интерфазных. Удаление из митотических экстрактов определенного MAP (носящего название Xmap215) увеличивает частоту катастроф, т. е. MAP ингибирует катастрофы. Ингибирование специфического катастрофина (родственного кинезину белка Мсак) значительно снижает частоту катастроф, т. е. в митотических экстрактах этот фактор отвечает за стимуляцию катастроф. Таким образом, частота катастроф зависит от равновесия между MAP и катастрофином. Вверху показаны флуоресцентные микрофотографии микротрубочек, образовавшихся при различных экспериментальных условиях; обратите внимание, что чем выше частота катастроф, тем короче микротрубочки. (Из R. Tournebize et al., *Nat. Cell Biol.* 2: 13–19, 2000. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

(GEF); GEF заставляет небольшую цитоплазматическую GTPазу *Ran* связывать GTP вместе GDP. Активированная *Ran*-GTP, которая также участвует в ядерном транспорте (см. главу 12), высвобождает белки стабилизации микротрубочек из белковых комплексов в цитозоле, стимулируя локальную нуклеацию и стабилизацию микротрубочек вблизи хромосом.

Именно способность хромосом стабилизировать и организовывать микротрубочки позволяет клеткам образовывать биполярные веретена деления в отсутствие центросом, как обсуждалось ранее. Предполагают, что сборка бесцентросомных веретен начинается с нуклеации и стабилизации микротрубочек вокруг хромосом. Затем моторные белки, в особенности представители семейства кинезинов-5 (см. рис. 17.30), поперечно сшивают микротрубочки в антипараллельной ориентации и расталкивают их минус-концы. Кинезины-4 и -10 на плечах хромосом также

способствуют отталкиванию минус-концов от хромосом. Затем динеин, кинезин-14 и различные связывающие минус-концы белки поперечно сшивают минус-концы микротрубочек вместе с образованием двух полюсов веретена деления (рис. 17.34).

Клетки, в которых centrosомы в норме отсутствуют, например, клетки высших растений и многие ооциты животных, используют зависящий от хромосом процесс самоорганизации для сборки веретен деления. Этот процесс также применяется для сборки веретен в некоторых зародышах насекомых, развитие которых индуцировано без оплодотворения (т.е. *партеногенетически*); поскольку обычно centrosома приходит из сперматозоида при оплодотворении им яйцеклетки (см. главу 21), митотические веретена деления в таких партеногенетических эмбрионах развиваются без centrosом (рис. 17.35). Даже в клетках, в которых centrosомы в норме содержатся, хромосомы помогают организовать микротрубочки веретена и при помощи различных моторных белков могут способствовать сборке биполярного веретена деления после удаления centrosом. Несмотря на то что образующееся в таком случае веретено деления способно нормально разделять хромосомы, у него нет астральных микротрубочек, отвечающих за расположение веретена в животных клетках; в результате веретено часто оказывается неправильно расположенным, что приводит к нарушениям цитокинеза.

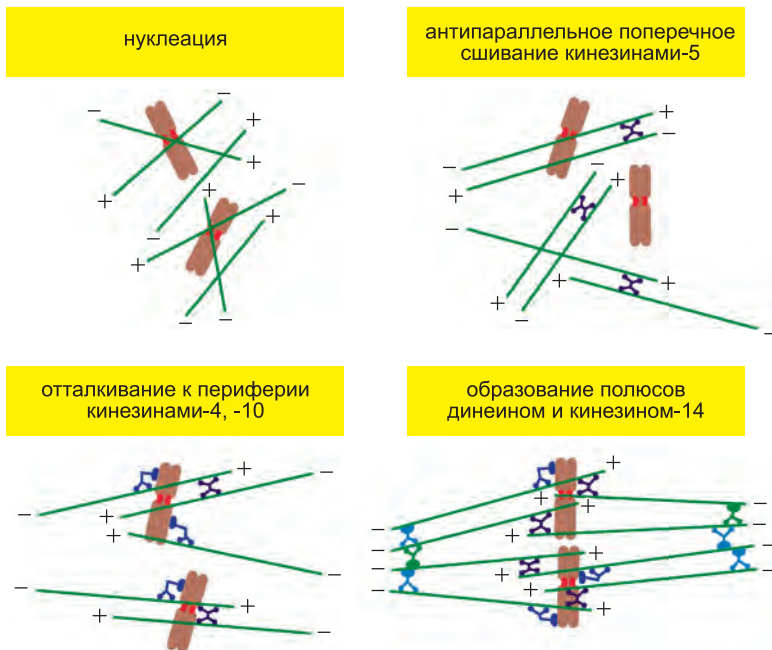
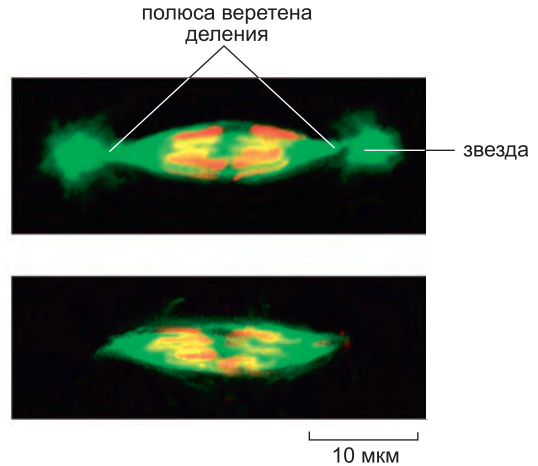


Рис. 17.34. Самоорганизация веретена деления моторными белками. Митотические хромосомы стимулируют локальное образование Ran-GTP (не показано). Ran-GTP активирует белки, нуклеирующие микротрубочки вблизи хромосом. Моторные белки кинезины-5 (см. рис. 17.30) составляют из этих микротрубочек антипараллельные пучки, а направленные к плюс-концам кинезины-4 и -10 прикрепляют микротрубочки к плечам хромосом и отталкивают от них минус-концы. Моторы динеин и кинезин-14, а также и другие белки, сосредотачивают эти минус-концы в двух полюсах веретена деления.

Рис. 17.35. Сборка биполярного веретена деления без центросом в партеногенетических зародышах насекомого *Sciara* (грибного комарика). Микротрубочки окрашены зеленым, хромосомы — красным. На верхней флуоресцентной микрофотографии показано нормальное веретено, образованное с центросомами в оплодотворенном зародыше *Sciara*. На нижней микрофотографии показано веретено деления, образованное без центросом в зародыше, чье развитие началось без оплодотворения. Обратите внимание, что веретено с центросомами несет лучевую структуру в полюсах, тогда как у веретена, образованного без центросом, такой структуры нет. Оба типа веретен способны растаскивать реплицированные хромосомы. (Из B. de Saint Phalle and W. Sullivan, *J. Cell Biol.* 141: 1383–1391, 1998. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)



17.4.12. Кинетохоры прикрепляют сестринские хроматиды к веретену деления

После сборки биполярной микротрубочковой структуры вторым основным этапом образования веретена деления является прикрепление этих микротрубочек к хромосомам. Микротрубочки веретена прикрепляются к сестринским хроматидам в *кинетохорах*, крупных многослойных белковых структурах, образующихся на гетерохроматине в центромерной области хромосом (рис. 17.36). Плюс-концы кинетохорных микротрубочек погружены в специализированные сайты на кинетохорах. Кинетохоры животных клеток несут 10–40 таких сайтов, тогда как кинетохоры дрожжей — всего один. Каждый сайт связывания содержит белковое кольцо, окружающее микротрубочку вблизи кончика и крепко удерживающее ее в кинетохоре, но не мешающее добавлению или удалению тубулиновых субъединиц (рис. 17.37). Регуляция полимеризации и деполимеризации плюс-конца кинетохора играет критическую роль в контроле движения хромосом на веретене, как мы обсудим позднее.

Несущие центросомы клетки используют механизм «поиска и захвата» для прикрепления своих митотических хромосом к веретену. Динамические плюс-концы микротрубочек исходят из центросом и в конце концов захватывают кинетохор сестринской хроматиды. В клетках легких тритона, на которых в микроскоп можно наблюдать событие захвата, кинетохор сначала связывается с боковой поверхностью микротрубочки, а затем быстро скользит вдоль нее к центросоме. Латеральное прикрепление быстро преобразуется в концевое. Одновременно растущие из противоположного полюса веретена деления микротрубочки прикрепляются к кинетохору на противоположной стороне хромосомы, и образуются биполярные связи (рис. 17.38).

Как происходит прикрепление хромосом в отсутствие центросом? Один из возможных механизмов — короткие микротрубочки вблизи хромосом взаимодействуют с кинетохорами и закориваются в их связывающих плюс-концы сайтах. Затем полимеризация этих плюс-концов может привести к росту микротрубочек

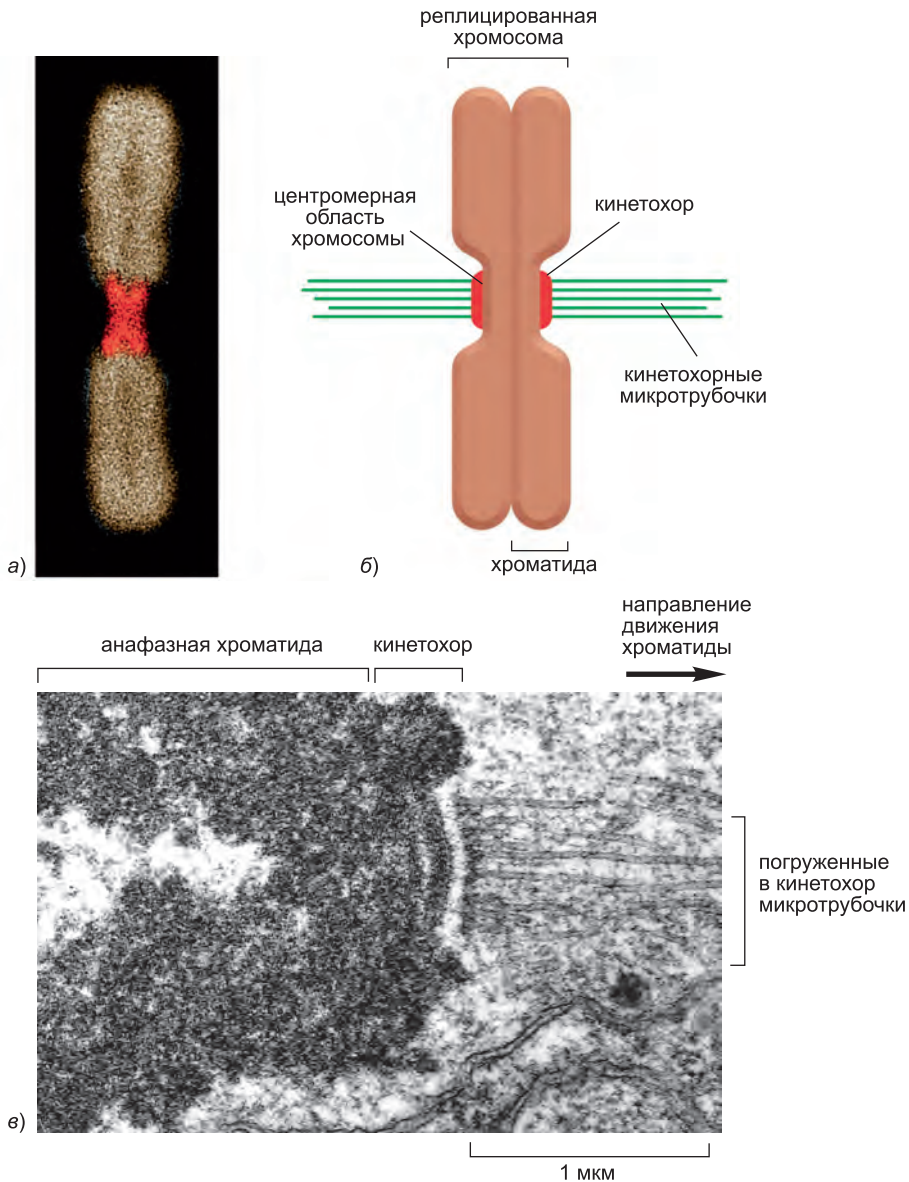


Рис. 17.36. Кинетохор. (а) Флуоресцентная микрофотография метафазной хромосомы, окрашенной ДНК-связывающим флуоресцентным красителем и человеческими антителами, взаимодействующими с определенными кинетохорными белками. Два кинетохора, каждый из которых связан с одной хроматидой, окрашены *красным*. (б) Схема метафазной хромосомы. Две сестринские хроматиды прикреплены к плюс-концам кинетохорных микротрубочек. Кинетохоры образуют бляшки на поверхности центромеры. Число связанных с метафазным кинетохором микротрубочек изменяется от 1 в почкующихся дрожжах до 40 в некоторых клетках млекопитающих. (в) Электронная микрофотография анафазной хроматиды и прикрепленных к ее кинетохору микротрубочек. Обычно кинетохоры обладают трехслойной структурой, но показанный здесь (из зеленой водоросли) кинетохор исключительно сложен и несет дополнительные слои. (а, с любезного разрешения В. R. Brinkley; в, из J. D. Pickett-Heaps and L. C. Fowke, *Aust. J. Biol. Sci.* 23: 71–92, 1970. С любезного разрешения CSIRO.)

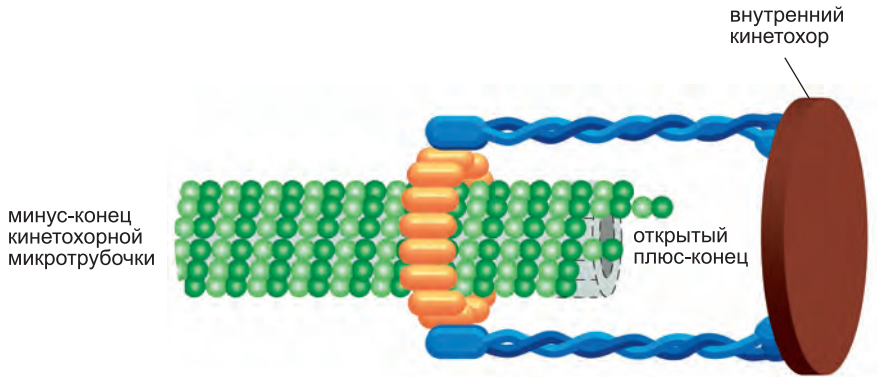


Рис. 17.37. Прикрепление микротрубочек к кинетохору. Предполагают, что каждый сайт несет кольцевую структуру (желтая), окружающую плюс-конец микротрубочки и допускающую полимеризацию и деполимеризацию открытого плюс-конца без нарушения связывания микротрубочки и кинетохора.

от кинетохоров. Минус-концы кинетохорных микротрубочек, как и минус-концы бесцентросомных веретен деления, в конце концов будут поперечно сшиты и сосредоточены моторными белками в полюсах веретена деления (см. рис. 17.34).

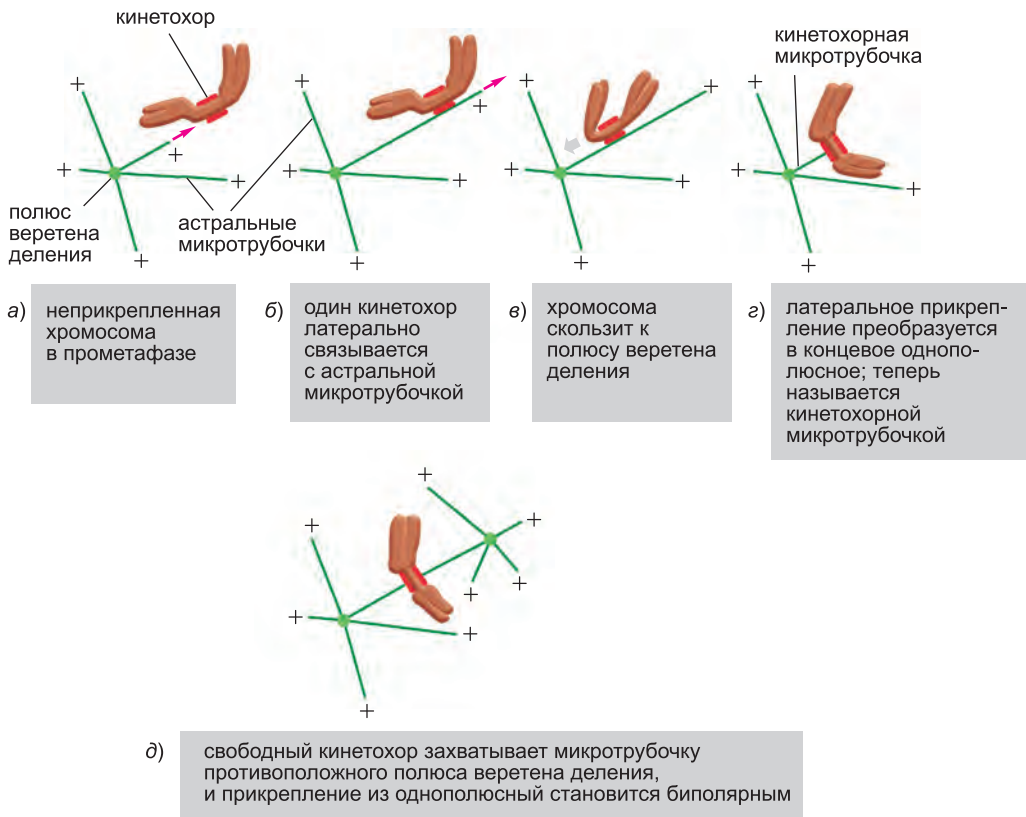


Рис. 17.38. Захват centrosomных микротрубочек кинетохором. Красная стрелка на (а) указывает направление роста микротрубочек, а серая стрелка на (в) указывает направление скольжения хромосом.

17.4.13. Би-ориентация достигается методом проб и ошибок

Для успеха митоза необходимо, чтобы сестринские хроматиды в паре прикреплялись к противоположным полюсам веретена деления и при их расхождении в анафазе двигались в разные концы клетки. Как осуществляется такое прикрепление, или **би-ориентация**? Что мешает прикреплению обоих кинетохоров к одному полюсу веретена деления или прикреплению одного кинетохора к обоим полюсам? Частично ответ заключается в том, что кинетохоры сестринских хроматид уложены в ориентации «спина к спине». Это снижает вероятность того, что оба кинетохора будут обращены к одному полюсу веретена. Однако неправильное прикрепление все равно происходит, и в работу вступают изящные регуляторные механизмы, направленные на исправление таких ошибок.

Неправильное прикрепление исправляется системой проб и ошибок, основанной на простом принципе: неправильное прикрепление очень нестабильно и существует недолго, тогда как правильное прикрепление запирается в таком состоянии. Но как кинетохор чувствует правильное прикрепление? По-видимому, ответ заключается в напряженности (**рис. 17.39**). Когда сестринские хроматиды правильно би-ориентированы на веретене деления, кинетохоры растаскиваются в противоположных направлениях к полюсам. Когезия сестринских хроматид препятствует этим направленным к полюсам силам, что приводит к высокой напря-

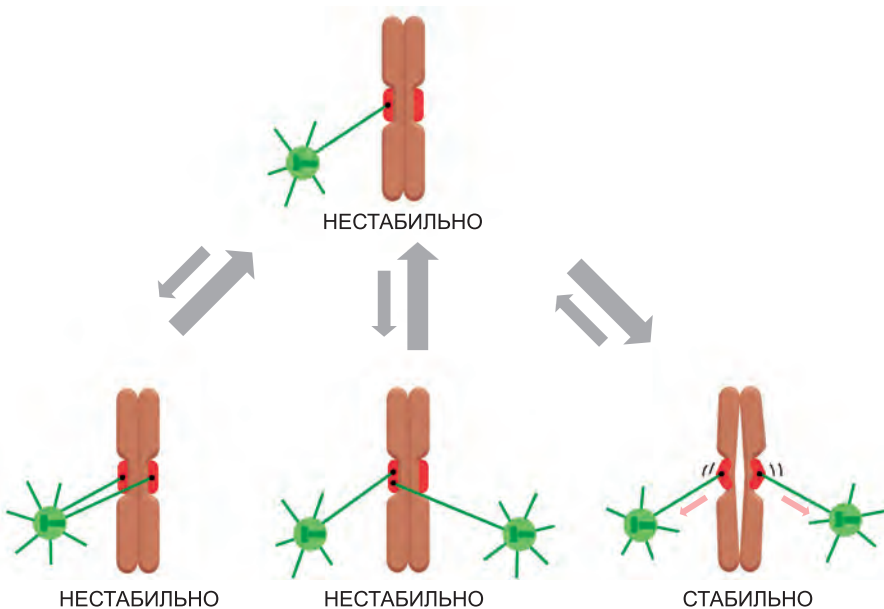


Рис. 17.39. Альтернативные формы прикрепления хромосом. Исходно единственная микротрубочка полюса веретена деления связывается с кинетохором одной сестринской хроматиды. Дополнительные микротрубочки могут несколькими способами связаться с хромосомой. Микротрубочка того же полюса веретена деления может прикрепиться к другой кинетохоре хроматиды, или микротрубочки обоих полюсов могут соединиться к одному кинетохору. Однако такие неправильные способы прикрепления нестабильны, и одна из двух микротрубочек диссоциирует. Когда со вторым кинетохором связывается микротрубочка противоположного полюса веретена деления, кинетохоры сестринских хроматид чувствуют напряжение в сайтах прикрепления микротрубочек, что увеличивает сродство связывания микротрубочек. Такое правильное прикрепление закрепляется.

женности кинетохоров. Когда хромосомы прикреплены неправильно — например, обе сестринские хроматиды прикреплены к одному полюсу веретена деления, — напряженность мала, и кинетохор посылает ингибиторные сигналы, ослабляющие связывание в сайте прикрепления микротрубочек, что приводит к отцеплению микротрубочек. Когда случается би-ориентация, высокая напряженность кинетохора отключает ингибиторный сигнал, усиливая прикрепление микротрубочек. В животных клетках напряжение не только увеличивает сродство сайта прикрепления, но и способствует прикреплению к кинетохору дополнительных микротрубочек. Это приводит к образованию толстого *кинетохорного волокна*, состоящего из множества микротрубочек.

Механизм чувствительности к напряжению зависит от киназы Аугога-В, связанной с кинетохором. Предполагают, что Аугога-В посылает ингибиторный сигнал, снижающий силу прикрепления микротрубочек в отсутствие напряженности. Она фосфорилирует несколько компонентов сайта прикрепления микротрубочек, уменьшая сродство сайта к плюс-концу. Аугога-В инактивируется при би-ориентации, снижая, таким образом, фосфорилирование кинетохора и увеличивая сродство сайта прикрепления.

После прикрепления к противоположным полюсам веретена деления хромосомы движутся туда-обратно, пока не окажутся на равном расстоянии от полюсов. Такое расположение хромосом называется метафазной пластинкой. В клетках позвоночных хромосомы в метафазной пластинке мягко колеблются в ожидании сигнала расхождения сестринских хроматид. Сигнал поступает с предсказуемой временной задержкой после биполярного прикрепления последней хромосомы, что мы обсудим позднее.

17.4.14. На хромосомы на веретене действуют многочисленные силы

Моторные белки и другие механизмы создают силы, воздействующие на хромосомы на микротрубочках веретена деления. Считают, что особенно важны три силы.

Первая сила тянет кинетохор и его хромосому вдоль кинетохорной микротрубочки к полюсу веретена деления. Она создается белками самого кинетохора. По неизвестному механизму деполимеризация на плюс-конце микротрубочки создает силу, тянущую кинетохор в направлении полюса (**рис. 17.40**). Эта сила действует на хромосомы во время прометафазы и особенно важна для перемещения сестринских хроматид к полюсам после расхождения хромосом в анафазе (см. ниже). Любопытно, что для этой накладываемой кинетохорами направленной к полюсам силы не требуется АТФ. Сперва это может показаться маловероятным, но было показано, что очищенные кинетохоры в пробирке в отсутствие АТФ остаются прикрепленными к деполимеризующимся микротрубочкам и, следовательно, движутся. Энергия для этого движения запасена в микротрубочках и высвобождается при их деполимеризации; исходно это энергия гидролиза GTP, происходящего после присоединения субъединицы тубулина к концу микротрубочки (см. главу 16).

Вторая направленная к полюсам сила в некоторых типах клеток создается **микротрубочковым током**, при котором сами микротрубочки движутся к полюсам веретена деления и одновременно разбираются на минус-конце. До начала анафазы добавление новых тубулинов к плюс-концу уравнивается потерей тубулина на минус-конце, и длина микротрубочки остается постоянной, несмотря на движение к полюсу веретена. Микротрубочковый ток в метафазных ядрах

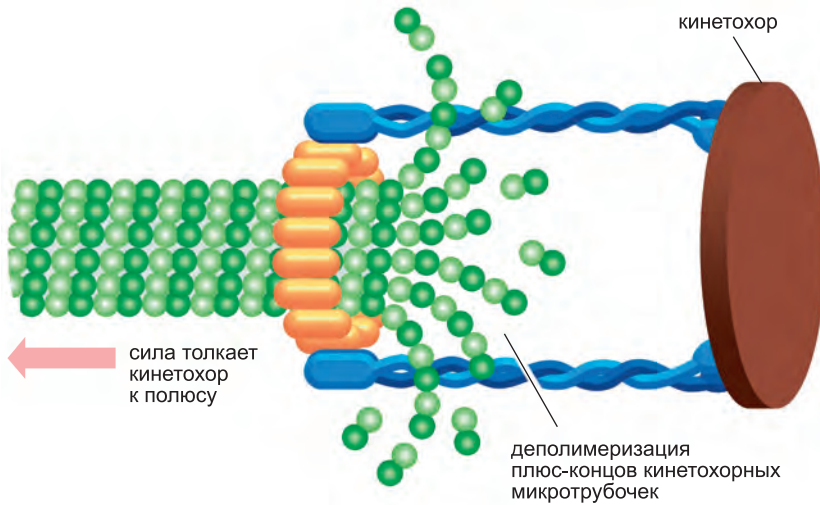


Рис. 17.40. Возможный механизм движения кинетохоров к полюсу веретена деления за счет деполимеризации. При деполимеризации протофиламенты микротрубочки изгибаются (см. рис. 16.16) и дают на кольцевую структуру, окружающую плюс-конец микротрубочки. В принципе, это может привести к движению кинетохора к минус-концу микротрубочки в полюсе веретена деления.

можно наблюдать при помощи остроумного метода, в котором в живые клетки вводят очень небольшое количество флуоресцентного тубулина (**рис. 17.41**). Это приводит к появлению в межполюсных микротрубочках и кинетохорах очень маленьких флуоресцентных пятнышек, движущихся в направлении полюсов. Все прикрепленные к микротрубочкам кинетохоры, претерпевающие такой ток, испытывают воздействие направленной к полюсам силы, что вносит вклад в создание напряжения в кинетохоре и в движение сестринских хроматид к полюсам после их расхождения в анафазе.

Третья сила, воздействующая на хромосомы, представляет собой *полярную выталкивающую силу*. Направленные к плюс-концам моторы кинезин-4 и -10 на плечах хромосом взаимодействуют с межполюсными микротрубочками и транспортируют хромосомы от полюсов веретена деления. Эта сила играет важную роль в прометафазе и метафазе, когда она помогает правильно выстроить би-ориентированные пары сестринских хроматид в метафазной пластинке (**рис. 17.42**).

Одним из наиболее интересных аспектов митоза в клетках позвоночных является непрерывное колебательное движение хромосом в прометафазе и метафазе. При наблюдении при помощи видеомикроскопии клеток легких тритона обнаружили, что движение переключается между двумя состояниями: движением в направлении полюса (*poleward, P*) и движением от полюса (*away-from-the-pole, AP*) или нейтральным состоянием, когда направленные к полюсам силы отключаются, и полярная выталкивающая сила отталкивает хромосомы от полюсов. Переключение между этими состояниями может зависеть от напряжения кинетохоров. Например, одна из гипотез заключается в том, что по мере движения хромосом к полюсу веретена деления увеличение выталкивающей силы создает напряжение в ближайшем к полюсу кинетохоре, что запускает переключение в *AP*-состояние. В конце концов хромосомы выстраиваются на экваторе веретена деления.

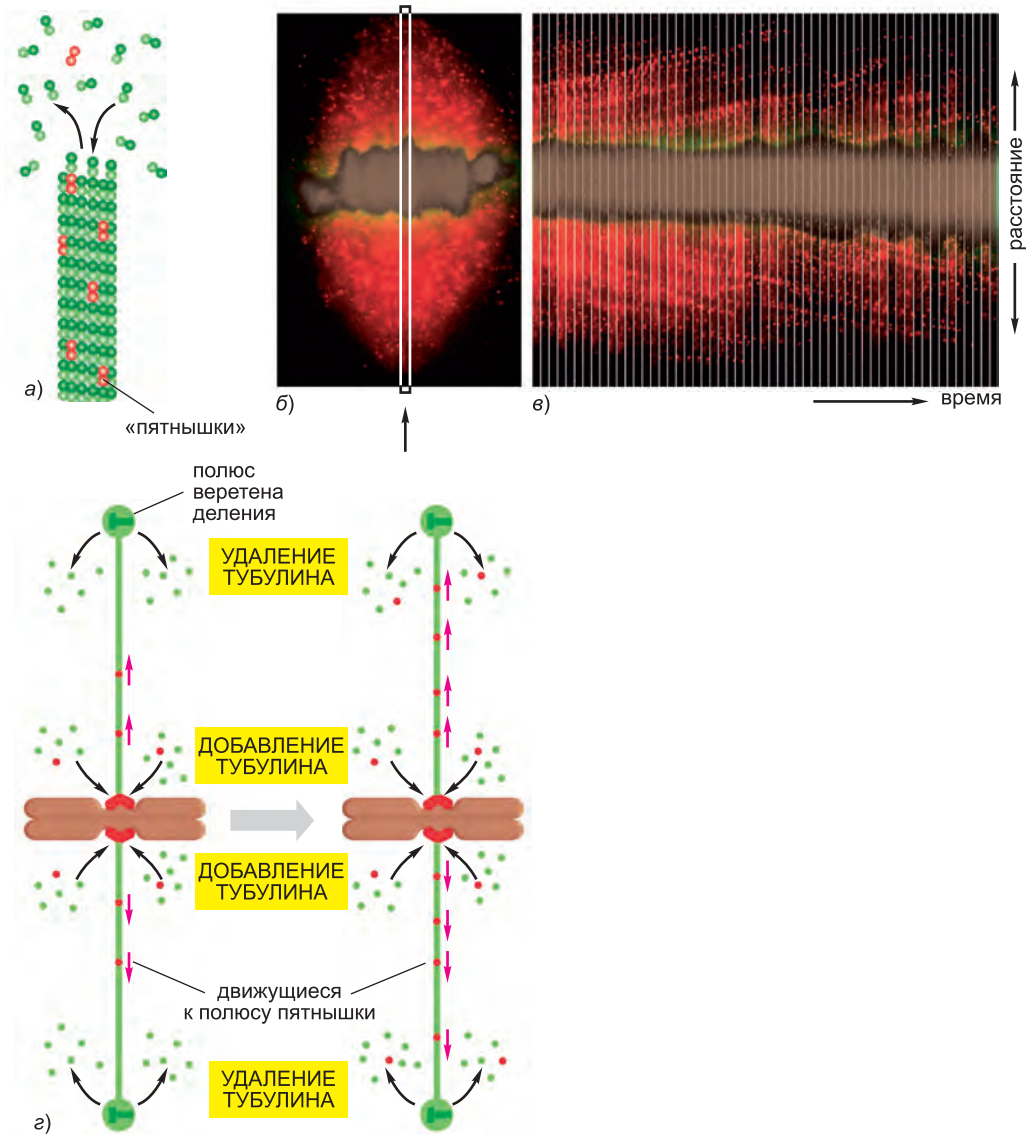


Рис. 17.41. Микротрубочковый ток в метафазном веретене деления. (а) Чтобы наблюдать микротрубочковый ток, в живые клетки вводят очень небольшое количество флуоресцентного тубулина. Образующиеся микротрубочки будут нести немного такого тубулина и в микроскоп будут выглядеть пятнистыми. (б) Флуоресцентные микрофотографии веретена деления в живой клетке эпителия легкого тритона. Хромосомы окрашены *коричневым*, пятнышки тубулина — *красным*. (в) Движение отдельных пятен можно наблюдать при помощи замедленной видеомикроскопии. Через равные промежутки времени снимали изображения узкого прямоугольного участка (*стрелка*) на (б), после чего их расположили последовательно для создания видеоролика изменения области во времени. Отдельные пятнышки движутся в направлении полюсов со скоростью около 0,75 мкм/мин, т. е. микротрубочки перемещаются к полюсам. (г) Длина микротрубочек в метафазном веретене деления почти не изменяется, поскольку новые субъединицы добавляются к плюс-концам микротрубочек с той же скоростью, с какой тубулиновые субъединицы удаляются с минус-концов. (б и в, из Т. J. Mitchison and E. D. Salmon, *Nat. Cell Biol.* 3: E17–21, 2001. С любезного разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)

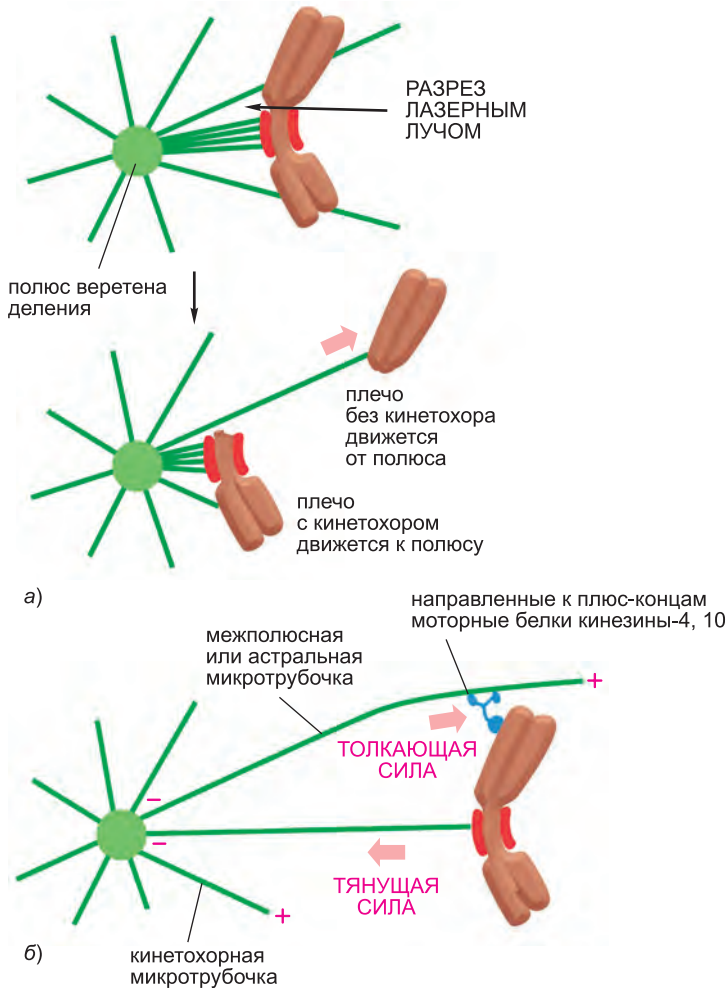


Рис. 17.42. Как противоположно направленные силы располагают хромосомы в метафазной пластинке. (а) Доказательства существования полярной выталкивающей силы, отталкивающей хромосомы от полюсов веретена деления в направлении экватора. В данном эксперименте лазерный луч разрезает прометафазную хромосому, прикрепленную к одному полюсу кинетохорной микротрубочкой. Лишенная кинетохора часть хромосомы быстро движется от полюса, а часть с кинетохором движется к полюсу, что отражает снижение отталкивания. (б) Модель того, как две противоположно направленные силы согласованно выстраивают хромосомы в метафазной пластинке. По-видимому, направленные к плюс-концам моторные белки (кинезин-4 и кинезин-10) на плечах хромосомы взаимодействуют с микротрубочками и создают полярную выталкивающую силу, толкающую хромосомы к экватору веретена деления (см. рис. 17.30). Считают, что направленные к полюсам силы, создаваемые деполимеризацией в кинетохорах, и микротрубочковый ток толкают хромосомы к полюсам.

17.4.15. APC/C запускает расхождение сестринских хроматид и завершение митоза

После запуска киназой M-Cdk сложных перестроек, происходящих в раннем митозе, клеточный цикл достигает своей кульминации — расхождения сестринских

хроматид в момент перехода от метафазы к анафазе (рис. 17.43). Несмотря на то что активность М-Cdk подготавливает клетку к этому событию, стимулирующий анафазу комплекс (APC/С) инициирует расхождение сестринских хроматид путем убиквитинирования нескольких митотических белков-регуляторов и, следовательно, запуска их разрушения (см. рис. 17.20, а).

Во время метафазы удерживающие вместе сестринские хроматиды когезины противодействуют растаскивающим хроматиды, направленным к полюсам силам. Анафаза начинается с внезапного нарушения когезии сестринских хроматид, что позволяет им разделиться и начать двигаться к противоположным полюсам веретена деления. APC/С инициирует процесс, направляя ингибиторный белок **секурин** на деградацию. До анафазы секурин связывается с протеазой **сепаразой** и ингибирует ее. Разрушение секурина в конце метафазы высвобождает сепаразу, которая теперь может отрезать одну из субъединиц когезина. Когезины отваливаются от хромосом, и сестринские хроматиды быстро и синхронно расходятся (рис. 17.44).

Помимо секурина, APC/С воздействует также на S- и М-циклины, запуская их разрушение. Это приводит к потере большей части активности Cdk в анафазе. Инактивация Cdk позволяет фосфатазам дефосфорилировать субстраты-мишени Cdk клетки, что необходимо для завершения митоза и цитокинеза (смотри ниже).

Если APC/С запускает анафазу, что активирует APC/С? Ответ известен лишь частично. Как упомянуто ранее, для активации APC/С необходим белок Cdc20, связывающий и активирующий APC/С в митозе (см. рис. 17.20, а). Сначала по мере приближения к митозу, за счет усиления транскрипции гена увеличивается синтез Cdc20. Затем фосфорилирование APC/С способствует связыванию Cdc20 с APC/С с образованием активного комплекса. Одной из киназ, фосфорилирующих и, таким образом, активирующих APC/С, является М-Cdk. В результате М-Cdk не только запускает события раннего митоза, приводящие к анафазе, но и подготавливает клетку к прохождению анафазы. Способность М-Cdk активировать Cdc20-APC/С создает петлю отрицательной обратной связи: М-Cdk запускает регуляторный процесс, приводящий к разрушению циклинов и, следовательно, ее собственной инактивации.

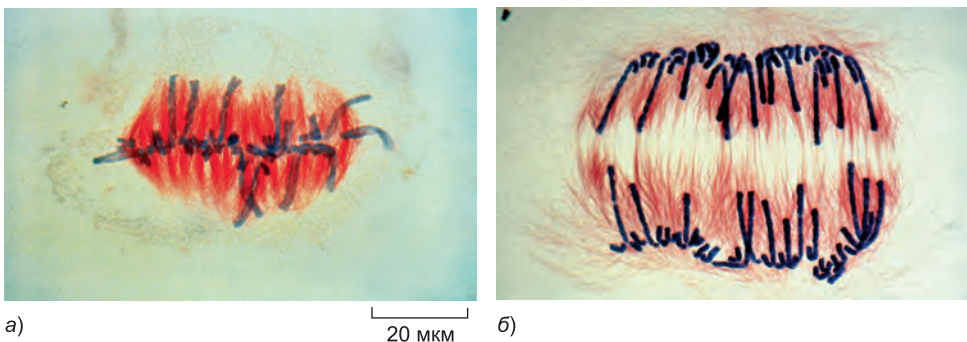


Рис. 17.43. Расхождение сестринских хроматид в анафазе. При переходе от метафазы (а) к анафазе (б) сестринские хроматиды внезапно разделяются и начинают двигаться к противоположным полюсам веретена деления — как показано на данных световых микрофотографиях клеток эндосперма *Haemanthus* (лилии), окрашенных меченными золотом антителами против тубулина. (С любезного разрешения Andrew Bajer.)

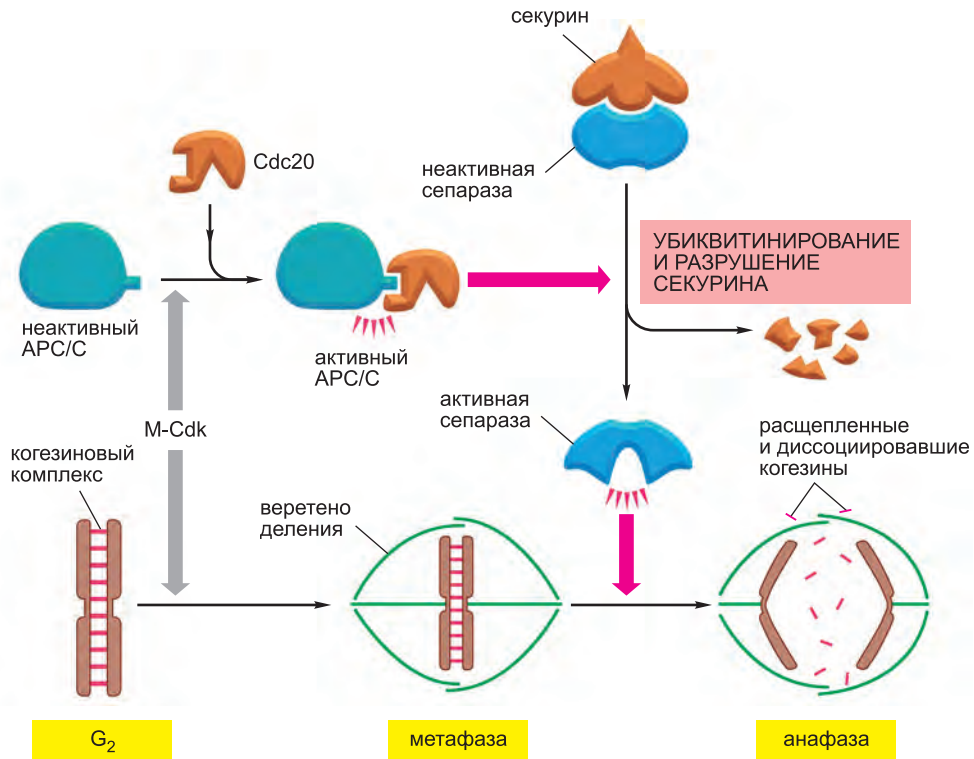


Рис. 17.44. Инициация расхождения сестринских хроматид комплексом APC/C. Активация APC/C белком Cdc20 приводит к убиквитинированию и разрушению секурина, который в норме удерживает сепаразу в неактивном состоянии. Разрушение секурина позволяет сепаразе отрезать Scc1, субъединицу когезинового комплекса, удерживающую вместе сестринские хроматиды (см. рис. 17.24). Затем тянущие силы веретена деления растаскивают сестринские хроматиды. В животных клетках фосфорилирование киназами Cdk также ингибирует сепаразу (не показано). Таким образом, инактивация Cdk в анафазе (результат разрушения циклинов) также способствует активации сепаразы в результате снятия блока ее дефосфорилирования.

17.4.16. Неприкрепленные хромосомы блокируют расхождение сестринских хроматид: контрольная точка сборки веретена деления

Обычно клетки проводят примерно половину времени митоза в метафазе, когда хромосомы выстроены в метафазной пластинке в ожидании сигнала APC/C, индуцирующего расхождение сестринских хроматид. Токсины, дестабилизирующие микротрубочки, например колхицин или винбластин (см. главу 16), удерживают клетки в митозе часами или даже днями. Это наблюдение привело к обнаружению механизма **контрольной точки сборки веретена деления**, активируемого обработкой токсинами и блокирующего переход от метафазы к анафазе. Эта контрольная точка не позволяет клеткам войти в анафазу до того, как все хромосомы не будут правильно би-ориентированы на веретене деления.

Контрольная точка сборки веретена деления основана на сенсорном механизме, следящем за силой прикрепления микротрубочек и, возможно, напряженностью кинетохоров. Неправильно прикрепленный к веретену кинетохор посылает от-

рицательный сигнал, блокирующий активацию Cdc20-APC/C и, следовательно, ингибирующий переход от метафазы к анафазе. Этот блок снимается только после правильного прикрепления последнего кинетохора, после чего происходит расхождение сестринских хроматид.

Предполагают, что неправильно прикрепленные кинетохоры генерируют диффундирующий сигнал, ингибирующий активность Cdc20-APC/C во всей клетке. Молекулярные основы этого сигнала неизвестны, но несколько белков, включая *Mad2*, рекрутируются к неприкрепленным кинетохорам и необходимы для функционирования контрольной точки сборки веретена деления (рис. 17.45). Одна из привлекательных возможностей, основанная на детальном структурном анализе *Mad2*, состоит в том, что неприкрепленные кинетохоры функционируют как ферменты, катализирующие изменение конформации *Mad2*, что позволяет *Mad2* связывать и ингибировать Cdc20-APC/C.

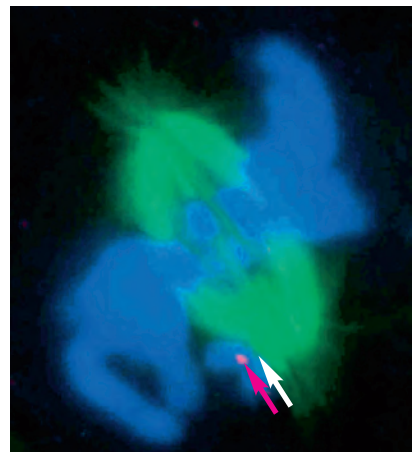
В соматических клетках млекопитающих контрольная точка сборки веретена деления определяет нормальное время начала анафазы. Разрушение секурина в этих клетках начинается в течение секунд после би-ориентации последней пары сестринских хроматид на веретене деления, а анафаза начинается через 20 минут. Искусственное ингибирование механизма контрольной точки приводит к преждевременному расхождению сестринских хроматид и ранней анафазе. Как ни странно, в некоторых клетках, например в дрожжах и клетках ранних эмбрионов мушек и лягушек, нормальное время начала анафазы не зависит от контрольной точки сборки веретена деления. Время анафазы в этих клетках должно зависеть от какого-то другого, до сих пор неизвестного механизма.

17.4.17. Хромосомы расходятся в анафазе A и B

Внезапная потеря когезии сестринских хроматид в начале анафазы приводит к разделению хроматид и позволяет силам веретена деления растянуть их к противоположным полюсам клетки. Этот процесс называется *расхождением хромосом*. Хромосомы движутся за счет двух независимых перекрывающихся процессов. Первый процесс, называемый **анафазой А**, представляет собой исходное направленное к полюсам движение хромосом, сопровождающееся укорочением кинетохорных микротрубочек. Второй процесс, называемый **анафазой В**, представляет собой расхождение самих полюсов веретена деления, начинающееся после

Рис. 17.45. Белок *Mad2* на неприкрепленных кинетохорах.

На данной флуоресцентной микрофотографии показана клетка млекопитающего в прометафазе. Веретено деления окрашено *зеленым*, а сестринские хроматиды — *синим*. Одна пара сестринских хроматид прикреплена только к одному полюсу веретена деления. Окрашивание анти-*Mad2* антителами показывает, что *Mad2* связан с кинетохором неприкрепленной сестринской хроматиды (*красная точка*, на которую указывает *красная стрелка*). С прикрепленной к веретену деления сестринской хроматидой связано небольшое количество *Mad2* (*светлая точка*, на которую указывает *белая стрелка*). (Из J. C. Walters et al., J. Cell Biol. 141: 1181–1191, 1998. С любезного разрешения издательства The Rockefeller University Press.)



разделения сестринских хроматид и расхождения дочерних хромосом на некоторое расстояние (**рис. 17.46**).

Движение хромосом в анафазе А зависит от двух описанных ранее направленных к полюсам сил. Первая сила создается деполимеризацией микротрубочек в кинетохоре, приводящей к потере тубулиновых субъединиц на плюс-конце по мере движения кинетохора к полюсу, а вторая сила — микротрубочковым током, представляющим собой движение микротрубочек к полюсу веретена деления, где происходит деполимеризация минус-концов. Относительная важность этих двух сил во время анафазы изменяется в различных типах клеток: в клетках эмбрионов, например, движение хромосом зависит в основном от микротрубочкового тока, а в дрожжах и соматических клетках позвоночных — от генерирующихся в кинетохорах сил.

Расхождение полюсов веретена деления в анафазе зависит от моторных белков. Этот процесс во многом похож на разделение двух centrosom в раннем митозе (см. рис. 17.30). Направленные к плюс-концам моторные белки кинезины-5, поперечно сшивающие перекрывающиеся плюс-концы межполюсных микротрубочек, отталкивают полюса друг от друга. Более того, динеиновые моторы, закоривающие плюс-концы астральных микротрубочек в клеточном кортексе, тянут полюса в разные стороны.

Несмотря на то что разделение сестринских хроматид инициирует движение хромосом анафазы А, другие механизмы также обеспечивают правильное расхождение хромосом в анафазе А и удлинение веретена деления в анафазе В. За-

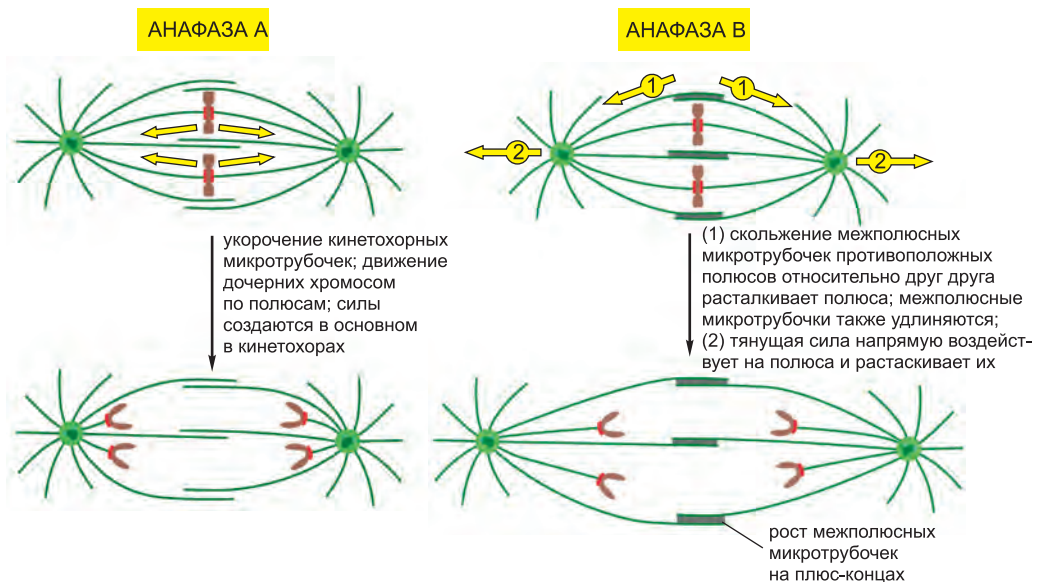


Рис. 17.46. Основные силы, разделяющие сестринские хроматиды клеток млекопитающих в анафазе. Движение хромосом к полюсам в анафазе А зависит от деполимеризации кинетохорных микротрубочек и направленного к полюсам микротрубочкового тока. В анафазе В полюса веретена деления движутся в противоположные стороны. Считается, что за анафазу В отвечают две силы: удлинение и скольжение межполюсных микротрубочек относительно друг друга в центральной зоне веретена расталкивает полюса, а моторные белки, прикрепленные к плазматической мембране вблизи полюсов, воздействуют на астральные микротрубочки и тянут полюса в противоположных направлениях к поверхности клетки.

вершение нормальной анафазы зависит от дефосфорилирования субстратов Cdk, которое в большинстве клеток является результатом APC/C-зависимого разрушения циклинов. Если предотвратить разрушение М-циклина (например, путем создания мутантной формы, которую не узнает APC/C), разделение сестринских хроматид обычно происходит, но движение хромосом и поведение микротрубочек в анафазе нарушены.

Относительные вклады анафазы А и анафазы В в расхождение хромосом значительно изменяются в зависимости от типа клеток. В клетках млекопитающих анафаза В начинается вскоре после анафазы А и заканчивается, когда веретено деления становится в два раза длиннее, чем оно было в метафазе; с другой стороны, веретена деления дрожжей и некоторых простейших используют в основном анафазу В для разделения хромосом в анафазе, и длина этих веретен деления может в 15 раз превышать метафазную длину.

17.4.18. В телофазе разошедшиеся хромосомы упаковываются в дочерние ядра

В конце анафазы дочерние хромосомы разделяются на две равные группы в противоположных концах клетки. В телофазе, финальной стадии митоза, два набора хромосом упаковываются в пару дочерних ядер. Первое основное событие телофазы — это разборка веретена деления, за которой следует образование ядерной оболочки. Сначала фрагменты ядерной мембраны связываются с поверхностью отдельных хромосом. Эти мембранные фрагменты сливаются и частично окружают группы хромосом, а затем объединяются с образованием ядерной оболочки. В оболочку встраиваются ядерные поровые комплексы, восстанавливается ядерная ламина, и оболочка вновь становится сопряженной с эндоплазматическим ретикуломом. После воссоздания ядерной оболочки поровые комплексы закачивают ядерные белки, ядро расширяется и конденсированные митотические хромосомы переходят в свое интерфазное состояние, позволяющее начаться транскрипции генов. После создания новых ядер завершается митоз. Клетке остается только разделиться надвое.

Ранее мы видели, как фосфорилирование различных белков киназой М-Cdk способствует сборке веретена деления, конденсации хромосом и разрушению ядерной оболочки в раннем митозе. Поэтому неудивительно, что дефосфорилирование тех же самых белков необходимо для разборки веретена деления и образования дочерних ядер в телофазе. В принципе, это дефосфорилирование и завершение митоза могут запускаться инактивацией Cdk, активацией фосфатаз или и тем, и другим. Несмотря на то что в большинстве клеток эти процессы зависят в основном от инактивации Cdk, являющейся результатом разрушения циклинов, некоторые клетки также полагаются на активацию фосфатаз. В почкующихся дрожжах, например, завершение митоза зависит от активации фосфатазы *Cdc14*, дефосфорилирующей набор участвующих в анафазе и телофазе субстратов Cdk.

17.4.19. Мейоз — это особый вид деления ядер, участвующий в половом размножении

Большинство эукариотических клеток размножается половым путем: геномы двух родителей смешиваются для производства потомства, генетически отличного

от обоих родителей (см. главу 21). Клетки этих организмов обычно *диплоидны*, т.е. они несут две немного отличающиеся друг от друга копии, или *гомологи*, каждой хромосомы, по одной от каждого родителя. Половое размножение зависит от специализированного процесса деления ядер, носящего название *мейоза*, в результате которого образуются *гаплоидные* клетки, несущие только одну копию каждой хромосомы. Во многих организмах гаплоидные клетки дифференцируются в специализированные половые клетки, носящие название *гамет*, — у большинства видов это яйцеклетки и сперматозоиды. У этих видов репродуктивный цикл завершается, когда сперматозоид и яйцеклетка сливаются с образованием диплоидной зиготы, способной дать начало новому организму. Здесь мы рассмотрим базовые механизмы и регуляцию мейоза, уделяя основное внимание его отличиям от митоза. Более подробно мейоз рассматривается в главе 21.

Мейоз начинается с удвоения хромосом, носящего название *мейотической S-фазы*, за которым следуют два этапа расхождения хромосом — *мейоз I* и *мейоз II*. В мейозе I происходит расхождение гомологов (каждый из которых состоит из крепко связанной пары сестринских хроматид). В мейозе II, как и в митозе, происходит расхождение сестринских хроматид гомологов (**рис. 17.47**).

Первое мейотическое деление решает главную задачу мейоза: как разделить гомологи хромосом. Как и расхождение сестринских хроматид в митозе, расхождение гомологов в мейозе I зависит от образования связей между гомологами. Эти связи позволяют парам гомологов би-ориентироваться на первом мейотическом веретене деления таким образом, что гомологи в паре прикрепляются к противоположным полюсам веретена. Связи между гомологами удаляются в начале анафазы I, что позволяет веретену растащить гомологи к противоположным концам клетки.

Связи между гомологами образуются посредством удивительно сложного и продолжительно процесса, происходящего в S-фазе мейоза на этапе, носящем название *мейотическая профазы* или *профаза I*. Этот процесс начинается со спаривания гомологов, при котором гомологи постепенно сближаются в ядре за счет взаимодействий между их комплементарными последовательностями ДНК. Связи между гомологами затем закрепляются гомологичной рекомбинацией между не-сестринскими хроматидами каждой пары гомологов: в двойной цепочке ДНК каждой сестринской хроматиды в нескольких положениях образуются разрывы, что приводит к многочисленным событиям рекомбинации ДНК между гомологами. Некоторые из этих событий приводят к взаимному обмену ДНК, носящему название *кроссинговера*, когда ДНК хроматиды сливается с ДНК гомологичной хроматиды (**рис. 17.48**). В каждой гомологичной паре происходит по крайней мере один кроссинговер, благодаря чему, когда клетка входит в первое мейотическое деление, гомологи в паре физически связаны.

Другая уникальная задача мейоза должна быть решена, когда гомологичные пары прикрепляются к первому мейотическому веретену деления. Каждый гомолог несет две крепко связанные сестринские хроматиды, и, следовательно, прикрепление гомолога к веретену требует прикрепления обоих кинетохоров сестринских хроматид к одному полюсу веретена. Такой тип прикрепления в митозе в норме избегается (см. рис. 17.39). Однако в мейозе I два кинетохора сестринских хроматид каким-то образом сливаются в единую связывающую микротрубочки структуру, прикрепляющуюся только к одному полюсу (см. рис. 21.12, *а*). Эти механизмы не действуют в мейозе II, так как там необходимо, чтобы пары сестринских хроматид би-ориентировались на веретене деления, как в митозе.

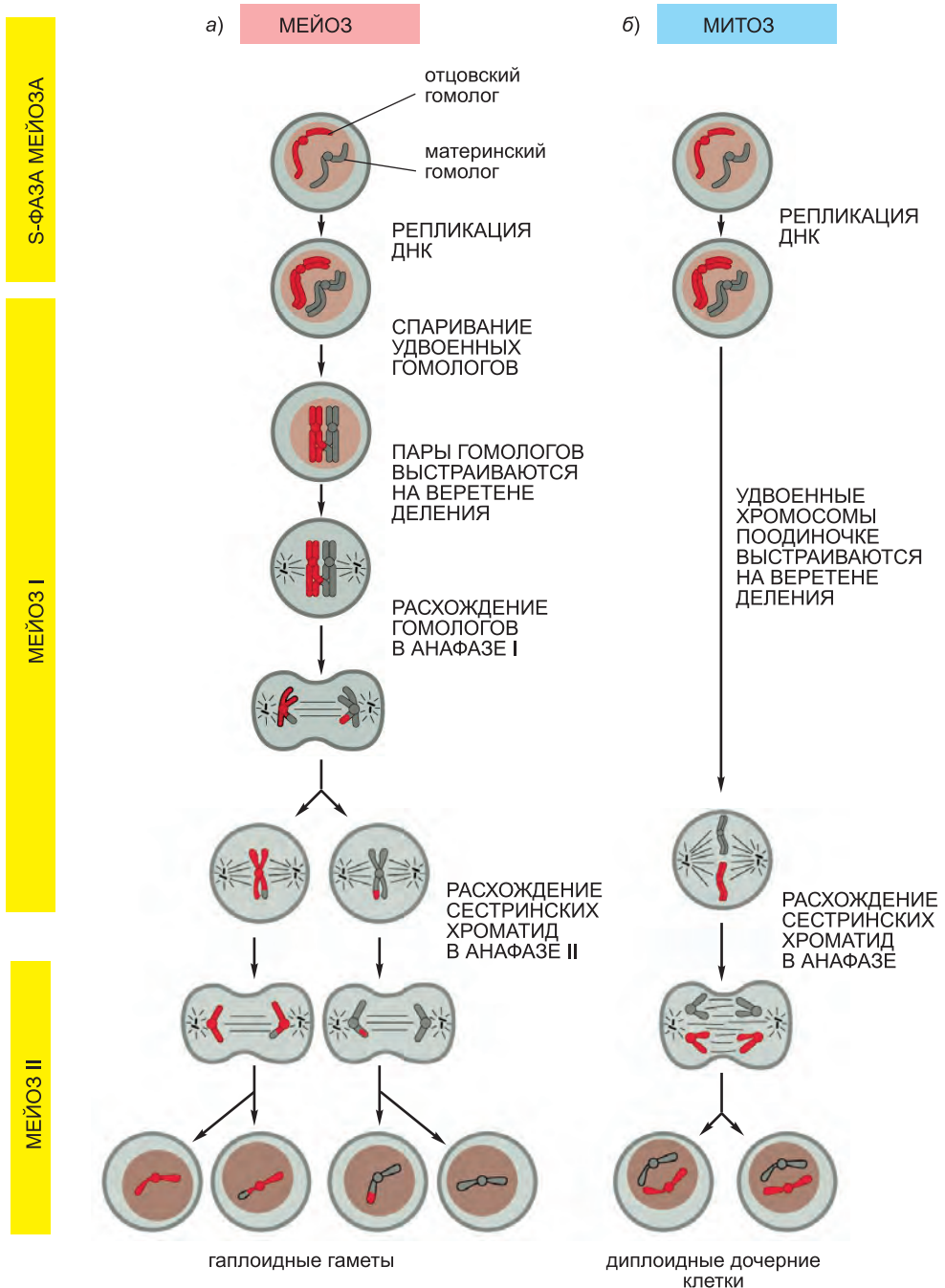


Рис. 17.47. Сравнение мейоза и митотического клеточного цикла. (а) Мейоз — это разновидность деления ядер, при которой за удвоением ДНК (мейотической S-фазой) следуют два этапа расхождения хромосом. Первый этап, мейоз I, разделяет гомологи, а второй, мейоз II, разделяет сестринские хроматиды. (б) С другой стороны, в митотическом клеточном цикле гомологи не спариваются, и сестринские хроматиды расходятся за одно деление.

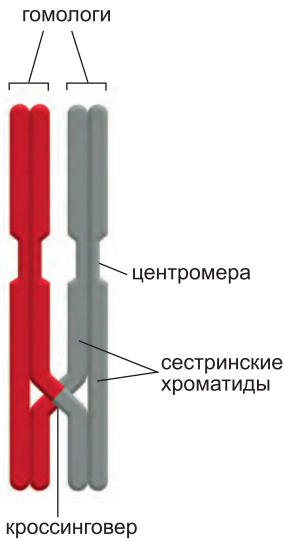


Рис. 17.48. Кроссинговер между гомологами. Как и в митозе, сестринские хроматиды в гомологе крепко связаны друг с другом по всей длине. В данном примере между двумя хроматидами произошел один кроссинговер, но любая из двух хроматид способна образовать кроссинговер с другим гомологом, и обычно их формируется несколько.

Кроссинговеры удерживают гомологичные пары вместе только потому, что плечи сестринских хроматид связаны за счет когезии (см. рис. 17.48). Потеря когезии сестринскими хроматидами запускает расхождение гомологов в начале анафазы I. В большинстве видов потеря когезии плеч в мейозе I зависит от активации APC/C, приводящей к разрушению секурина, активации сепаразы и разрезанию когезинов вдоль плеч (см. рис. 17.44). Однако, в отличие от митоза, когезиновые комплексы вблизи центромер в мейозе I не разрезаются, поскольку в этой области когезин защищен от сепаразы (см. главу 21).

Таким образом, сестринские хроматиды остаются связанными в центромерах на протяжении всего мейоза I, что позволяет им правильно би-ориентироваться на веретене деления в мейозе II. Механизмы, блокирующие разрезание когезинов в центромере в мейозе I, не действуют в мейозе II. В начале анафазы II активация APC/C запускает расщепление центромерного когезина и расхождение сестринских хроматид, как это происходит в митозе.

Заключение

M-Cdk запускает события раннего митоза, включая конденсацию хромосом, сборку веретена деления и биполярное прикрепление пар сестринских хроматид к микротрубочкам веретена. Образование веретена деления в животных клетках во многом зависит от способности митотических хромосом стимулировать локальную нуклеацию и стабилизацию микротрубочек, а также от способности моторных белков организовывать микротрубочки в биполярную структуру. Многие клетки также используют центросомы для ускорения сборки веретена. Анафаза запускается APC/C, стимулирующим разрушение белков, удерживающих вместе сестринские хроматиды. APC/C также способствует разрушению циклинов и, следовательно, инактивации M-Cdk. Для завершающих событий митоза, включая разборку веретена деления и образование ядерной оболочки, необходимо дефосфорилирование мишеней Cdk, вызванное активностью APC/C. Мейоз — это специализированная разновидность деления ядер, при которой за удвоением хромосом следуют два этапа их расхождения, что приводит к образованию гаплоидных ядер.

17.5. Цитокинез

Последним этапом клеточного цикла является **цитокинез** — разделение цитоплазмы. В типичной клетке цитокинез сопровождает каждый митоз, но существуют клетки, например, клетки ранних зародышей *Drosophila* (см. ниже) и некоторые гепатоциты и клетки сердечной мышцы млекопитающих, претерпевающие митоз

без цитокинеза и приобретающие, таким образом несколько ядер. В большинстве клеток млекопитающих цитокинез начинается в анафазе и заканчивается вскоре после завершения митоза в телофазе.

Первым видимым изменением, сопровождающим цитокинез в животных клетках, является внезапное появление складки, или *борозды деления*, на поверхности клетки. Борозда быстро углубляется и распространяется вокруг клетки до тех пор, пока полностью не поделит клетку надвое. В животных клетках и многих одноклеточных эукариотах в основе этого процесса лежит *сократительное кольцо* — динамическая структура, состоящая из актиновых филаментов, филаментов миозина II и многочисленных структурных и регуляторных белков. Во время анафазы кольцо собирается вблизи плазматической мембраны (рис. 17.49; см. также приложение 17.1). Кольцо постепенно сокращается, и одновременно за счет слияния внутриклеточных везикул с плазматической мембраной вблизи кольца встраивается новая мембрана. Такое добавление мембраны компенсирует увеличение площади поверхности, сопровождающее цитоплазматическое деление. После завершения сокращения кольца встраивание и слияние мембран запечатывают промежуток между дочерними клетками. Таким образом, считают, что цитокинез состоит из четырех стадий: инициации, сокращения, встраивания мембраны и завершения.

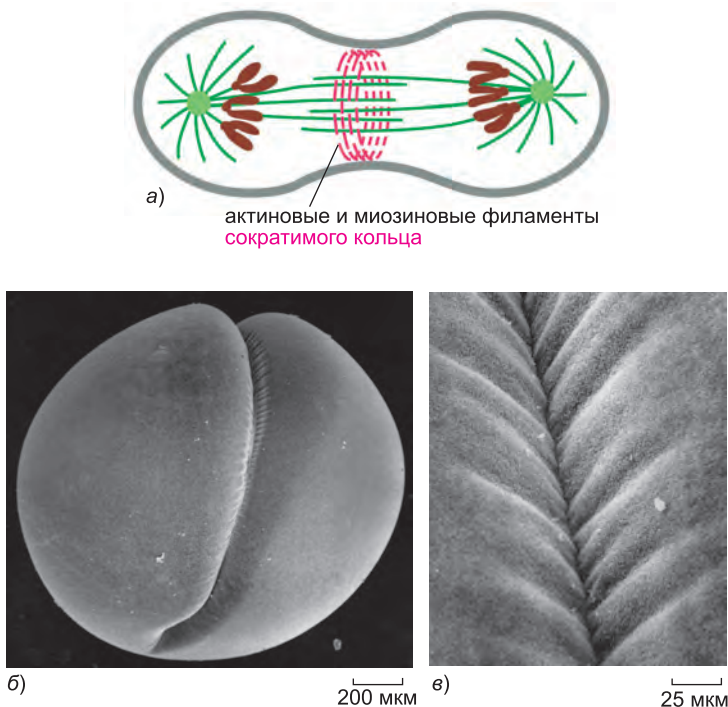


Рис. 17.49. Цитокинез. (а) Показана ориентация актомиозиновых пучков сократительного кольца, сокращение которых утягивает мембрану внутрь. (б) На данной сканирующей электронной микрофотографии дробящейся яйцеклетки лягушки борозда деления очень хорошо выражена, поскольку клетка очень крупная. Образование борозды в плазматической мембране вызвано активностью нижележащего сократимого кольца. (в) Поверхность борозды при большем увеличении. (б и в, из H. W. Beams and R. G. Kessel, *Am. Sci.* 64: 279–290, 1976. С любезного разрешения Sigma Xi.)

17.5.1. Актин и миозин II сократимого кольца генерируют силы цитокинеза

В интерфазной клетке актиновые и миозиновые филаменты образуют кортикальную сеть, подстилающую плазматическую мембрану. В некоторых клетках они также формируют крупные цитоплазматические пучки, носящие название *стрессовые фибриллы* (см. главу 16). Когда клетки входят в митоз, эти актиновые и миозиновые структуры разбираются; большая часть актина перестраивается, и филаменты миозина II высвобождаются. По мере расхождения сестринских хроматид в анафазе актин и миозин II начинают накапливаться в быстро собирающемся **сократительном кольце** (рис. 17.50), несущем также множество других белков, обеспечивающих структурную поддержку или помогающих сборке кольца. Образование сократимого кольца частично является результатом локальной сборки новых актиновых филаментов, зависящей от белков *форминов*. Формины нуклеируют

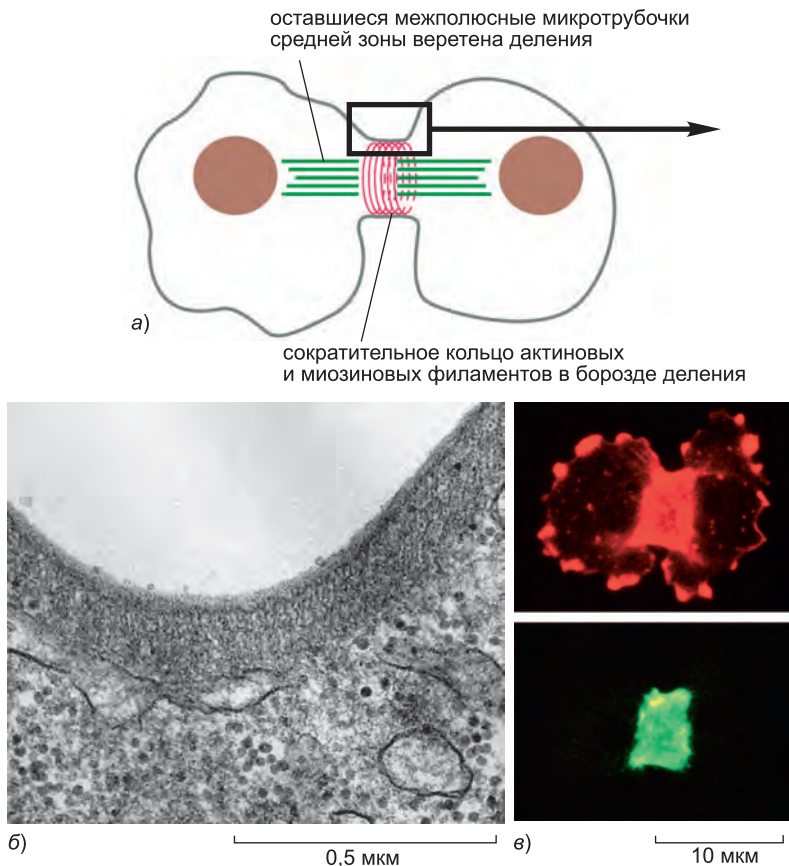


Рис. 17.50. Сократительное кольцо. (а) Схема борозды деления. (б) Электронная микрофотография растущего внутрь края борозды деления животной клетки. (в) Флуоресцентная микрофотография делящегося слизевика с окрашиванием по актину (красный) и миозину (зеленый). Тогда как весь видимый миозин II перемещается в сократительное кольцо, только часть актина делает то же самое; большая часть актина остается в кортексе зарождающихся дочерних клеток. (б, из H. W. Beams and R. G. Kessel, *Am. Sci.* 64: 279–290, 1976. С любезного разрешения Sigma Xi; в, с любезного разрешения Yoshio Fukui.)

сборку параллельных пучков линейных, неразветвленных актиновых филаментов (см. главу 16). После анафазы перекрывающиеся актиновые филаменты и филаменты миозина II сокращаются и создают силу, разделяющую цитоплазму пополам. После начала сокращения накладываемой кольцом силы достаточно для того, чтобы согнуть тонкую стеклянную иглку. По мере сокращения кольцо сохраняет свою толщину, то есть его объем и число содержащихся в нем филаментов постепенно уменьшаются. Более того, в отличие от актина мышц, актиновые филаменты кольца очень динамичны, и во время цитокинеза их упаковка постоянно изменяется.

Сократительное кольцо исчезает после завершения деления, когда плазматическая мембрана борозды деления сужается с образованием **остаточного тельца**. Остаточное тельце служит связкой между дочерними клетками и содержит антипараллельные микротрубочки средней зоны веретена деления, упакованные в плотное вещество матрикса (рис. 17.51). После полного разделения дочерних клеток некоторые компоненты остаточного тельца часто остаются на внутренней стороне мембраны каждой дочерней клетки, где они могут служить меткой на кортексе, способствующей ориентации веретена деления следующего клеточного деления.

17.5.2. Локальная активация RhoA запускает сборку и сокращение сократимого кольца

RhoA, малая GTPаза суперсемейства Ras (см. таблицу 15.5), контролирует сборку и функционирование сократительного кольца в области деления. RhoA активируется в клеточном кортексе в будущем сайте деления, где она способствует образованию актиновых филаментов, сборке миозина II и сокращению кольца. Она стимулирует формирование актиновых филаментов за счет активации форминов, а сборку миозина II и сокращение кольца — за счет активации нескольких протеинкиназ, включая Rho-активируемую киназу Rock (рис. 17.52). Эти киназы фосфорилируют регуляторную легкую цепь миозина (RMLC) — одну из субъединиц миозина II. Фосфорилирование RMLC стимулирует образование биполярных филаментов миозина II и его моторную активность, способствуя таким образом сборке и сокращению актомиозинового кольца.

Как и другие GTPазы, RhoA неактивна в связанной с GDP форме и активна, когда связана с GTP (см. главу 15). Локальная активация RhoA в борозде деления, по-видимому, зависит от фактора обмена гуаниновых нуклеотидов Rho (RhoGEF), расположенного в клеточном кортексе в сайте будущего деления и стимулирующего высвобождение GDP и связывание GTP белком RhoA. Нам мало известно о локализации или активации RhoGEF в сайте деления, но, по-видимому, в этом процессе участвуют микротрубочки анафазного веретена деления.

17.5.3. Микротрубочки веретена деления определяют плоскость деления животных клеток

Центральная задача цитокинеза состоит в том, чтобы деление произошло в правильное время и в правильном месте. Цитокинез должен осуществиться только после того, как два набора хромосом полностью разделились, и сайт деления расположится между дочерними хромосомами таким образом, чтобы каждая дочерняя клетка получила полный набор. Правильное время и локализация цитокинеза достигается в животных клетках благодаря изящным механизмам, зависящим от веретена деления. Во время анафазы веретено посылает сигналы, инициирующие формирование

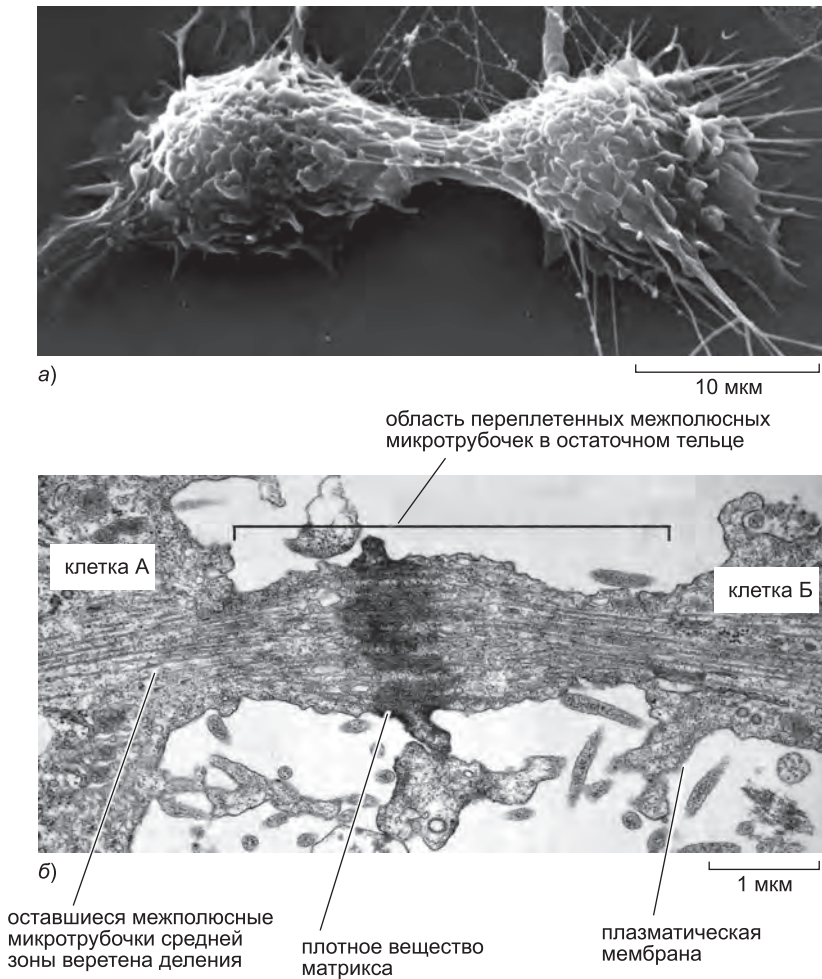
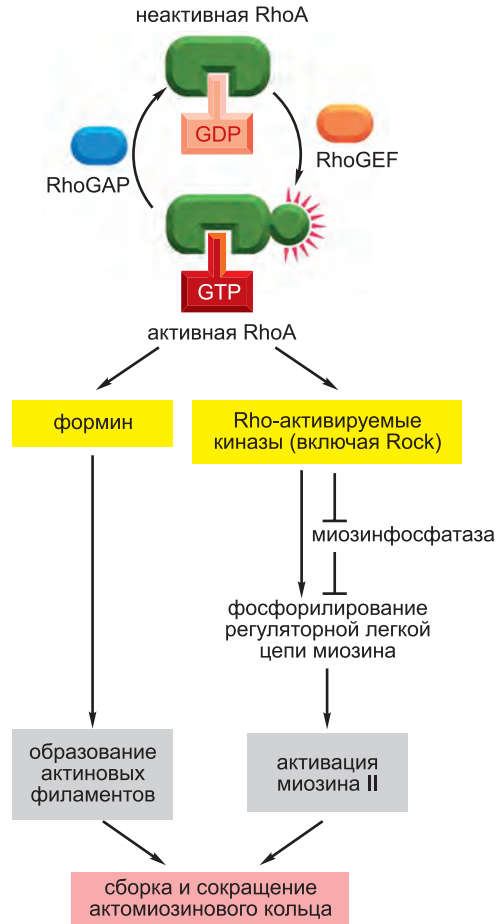


Рис. 17.51. Остаточное тельце. (а) Сканирующая электронная микрофотография делящейся животной клетки в культуре; остаточное тельце все еще соединяет две дочерние клетки. (б) Обычная электронная микрофотография остаточного тельца делящейся животной клетки. Деление почти завершилось, но дочерние клетки остаются связанными тонкой нитью цитоплазмы, несущей остатки веретена деления. (а, с любезного разрешения Guenter Albrecht-Buehler; б, с любезного разрешения J. M. Mullins.)

борозды в положении посередине между полюсами веретена, в результате чего деление происходит между двумя наборами хромосом. Поскольку сигналы исходят из анафазного веретена деления, этот механизм также вносит вклад в правильное время цитокинеза в позднем митозе. Цитокинез также протекает в нужное время потому, что дефосфорилирование субстратов Cdk, зависящее от разрушения циклинов в метафазе и анафазе, инициирует цитокинез. Теперь мы более подробно опишем эти механизмы, делая ударение на цитокинезе в животных клетках.

Изучение оплодотворенных яйцеклеток морских позвоночных показало важность микротрубочек веретена деления для определения локализации сократительного кольца. После оплодотворения эти зародыши быстро дробятся без роста. Таким обра-

Рис. 17.52. Регуляция сократительного кольца ГТРазой RhoA. Как и другие ГТРазы семейства Rho, RhoA активируется белком RhoGEF и инактивируется белком RhoGAP. Активная связанная с GTP форма RhoA концентрируется в будущем сайте деления. Связывая формины, активированная RhoA способствует сборке актиновых филаментов в сократительном кольце. За счет активации Rho-активируемых протеинкиназ, например Rock, она стимулирует образование и активность филаментов миозина II, способствуя сокращению кольца.



зом, исходная яйцеклетка быстро делится на все уменьшающиеся клетки. Поскольку цитоплазма прозрачна, веретено деления можно наблюдать в микроскоп в реальном времени. Если в ранней анафазе веретено переместить в другое положение тонкой стеклянной иглой, зарождающаяся борозда дробления исчезает и развивается новая в соответствии с новым местоположением веретена. Это наблюдение поддерживает предположение о том, что локальное формирование борозды инициируется сигналами веретена деления.

Как митотическое веретено определяет сайт деления? Предложено три механизма, и большинство клеток, по-видимому, используют их одновременно (рис. 17.53). Первый механизм называется *моделью астральной стимуляции*, согласно которой астральные микротрубочки передают сигналы формирования борозды в клеточный кортекс, где они неким образом концентрируются в кольце посередине между полюсами веретена деления. Подтверждения этой модели получены в остроумных экспериментах на крупных эмбриональных клетках, показавших, что борозда деления формируется посередине между двумя звездами, даже если две нуклеирующие звезды centrosомы не связаны веретеном деления (рис. 17.54).

Второй возможный механизм, носящий название *модели стимуляции центральным веретеном деления*, состоит в том, что средняя зона веретена, или центральное веретено, посылает сигналы образования борозды, определяющие место формирования борозды в клеточном кортексе. Перекрывающиеся межполюсные микротрубочки центрального веретена связаны с многочисленными регуляторными белками, включая белки, способные стимулировать RhoA (рис. 17.55). Нарушения функционирования этих белков (например, в мутантах *Drosophila*) приводят к остановке цитокинеза.

Третья модель предполагает, что в некоторых типах клеток астральные микротрубочки способствуют локальной релаксации актомиозиновых пучков в клеточном кортексе. В соответствии с *моделью астральной релаксации* релаксация кортекса

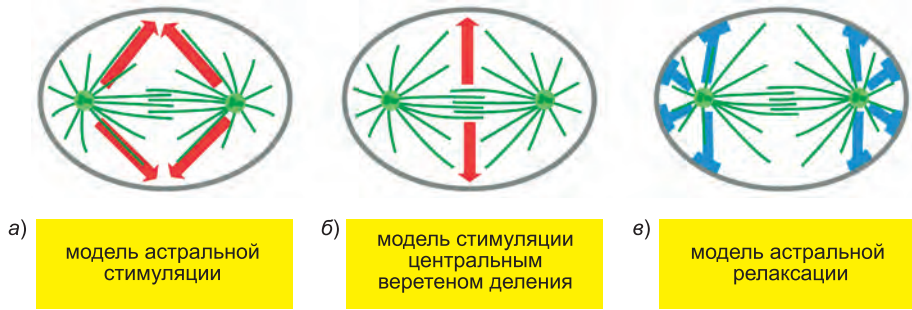


Рис. 17.53. Три современные модели того, как микротрубочки анафазного веретена деления посылают сигналы, влияющие на расположение сократимого кольца. Ни одна модель сама по себе не объясняет наблюдения, и, вероятно, расположение борозды деления определяется комбинацией этих механизмов, причем вклад отдельных механизмов в процесс изменяется в разных организмах.

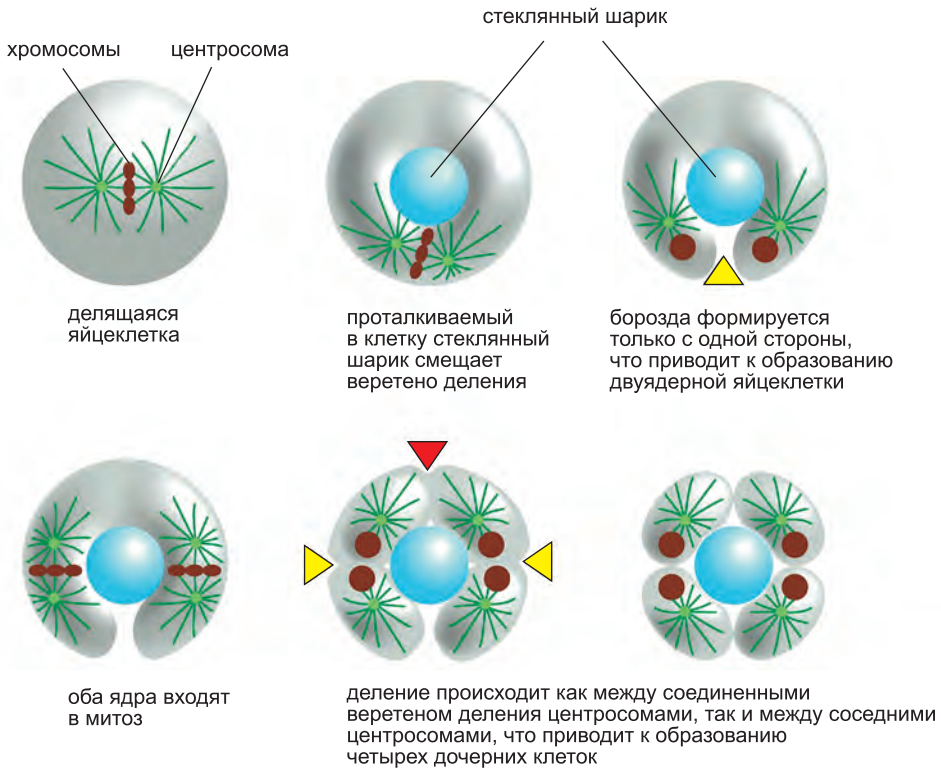


Рис. 17.54. Эксперимент, показывающий влияние звезд микротрубочек на последующую плоскость дробления в крупной яйцеклетке. Если веретено деления механически переместить на одну сторону клетки при помощи стеклянного шарика, образование борозды в мембране не может завершиться, так как не достигает противоположной стороны клетки. Последующие дробления протекают не только в средней зоне двух последующих веретен деления (*желтые стрелки*), но и между двумя соседними не связанными веретеном звездами, располагающимися в такой ненормальной клетке в одной цитоплазме (*красная стрелка*). По-видимому, сократительное кольцо, образующее в таких клетках борозду дробления, всегда формируется между двумя звездами. Таким образом, можно предположить, что «звезды» изменяют прилегающую к ним область клеточного кортекса и индуцируют формирование между собой борозды.

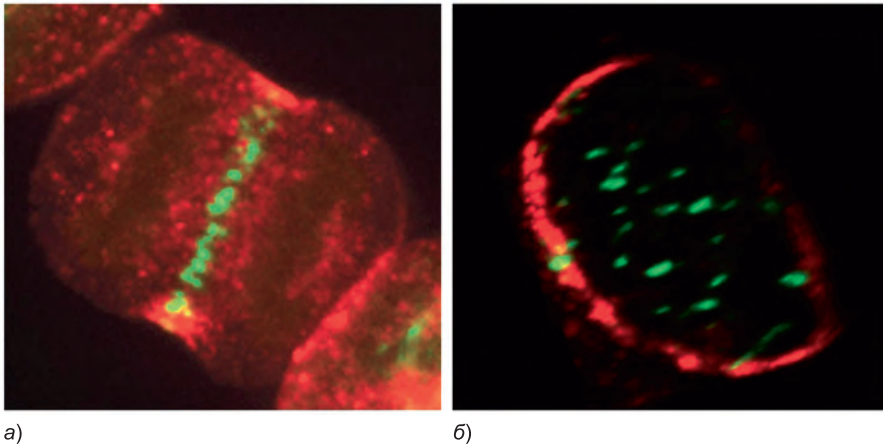


Рис. 17.55. Локализация регуляторов цитокинеза в центральном веретене деления человеческой клетки. (а) Флуоресцентная микрофотография человеческой клетки в культуре в начале цитокинеза. Видно расположение GTPазы RhoA (красная) и белка Cdc42 (зеленый), служащего одним из нескольких регуляторных белков, образующих комплексы на перекрывающихся плюс-концах межполюсных микротрубочек. Предполагается, что эти белки посылают сигналы, способствующие регуляции активности RhoA в клеточном кортексе (см. рис. 17.52 и 17.53, б). (б) На поперечном срезе клетки в плоскости сократительного кольца видно, что RhoA (красная) образует кольцо под поверхностью клетки, а белок центрального веретена Cdc42 (зеленый) связан с пучками микротрубочек, разбросанными по экваториальной плоскости клетки. (С любезного разрешения Alisa Piekny и Michael Glotzer.)

на экваторе веретена деления минимальна, что стимулирует его сокращение в этой области. Показано, что искусственное удаление астральных микротрубочек из ранних эмбрионов *C. elegans* приводит к повышенной сократительной активности всего клеточного кортекса, что подтверждает данную модель.

В некоторых типах клеток сайт сборки кольца выбирается до митоза. В почкующихся дрожжах, например, в поздней G_1 -фазе в месте будущего деления собирается кольцо белков, носящих название *септинов*. Считают, что септины формируют каркас, на котором собираются другие компоненты сократительного кольца, включая миозин II. В растительных клетках незадолго до начала митоза собирается структурированный пучок микротрубочек и актиновых филаментов, носящий название **препрофазного пучка**. Он отмечает место, где будет формироваться клеточная стенка, разделяющая клетку надвое.

17.5.4. Фрагмопласт направляет цитокинез в высших растениях

В большинстве животных клеток движение борозды деления внутрь углубляется за счет увеличения площади поверхности плазматической мембраны. К внутреннему краю борозды добавляется новая мембрана, приходящая из транспортируемых из аппарата Гольджи по микротрубочкам небольших мембранных везикул.

Встраивание мембраны особенно важно для цитокинеза в клетках высших растений. Эти клетки окружены полужесткой *клеточной стенкой*. В отличие от сократительного кольца, разделяющего цитоплазму снаружи внутрь, цитоплазма растительных клеток разделяется изнутри наружу за счет сборки между дочерними ядрами новой клеточной стенки, носящей название **клеточная пластинка** (рис. 17.56). Сбор-

ка клеточной пластинки начинается в поздней анафазе и направляется структурой, называемой **фрагмопластом**. Фрагмопласт содержит микротрубочки, исходно составлявшие веретено деления. Вдоль этих микротрубочек моторные белки транспортируют небольшие везикулы из аппарата Гольджи, расположенного в центре клетки. Эти везикулы, заполненные необходимыми для синтеза новой клеточной стенки полисахаридами и гликопротеинами, сливаются с образованием замкнутой мембранной структуры — *ранней клеточной пластинки*. Пластинка расширяется за счет слияния с ней новых везикул до тех пор, пока не достигнет плазматической мембраны. После этого исходная клеточная стенка разделяет клетку надвое. Позднее в матрикс клеточной пластинки встраиваются целлюлозные микрофибриллы, и формирование новой клеточной стенки завершается (рис. 17.57).

17.5.5. Во время цитокинеза мембранные органеллы должны быть распределены по дочерним клеткам

В результате процесса митоза дочерние клетки получают по одному полному набору хромосом. Однако при делении эукариотических клеток каждая дочерняя клетка должна также унаследовать все остальные жизненно важные клеточные компоненты, включая мембранные органеллы. Как обсуждалось в главе 12, такие органеллы, как митохондрии и хлоропласты, не могут быть собраны *de novo* из отдельных составляющих; они могут возникнуть только в результате роста и деления уже существующих органелл. Точно так же клетки не могут создать эндоплазматический ретикулум (ЭР), если в клетке не содержится хотя бы его часть.

Как тогда при делении клетки расходятся различные мембранные органеллы? Такие органеллы, как митохондрии и хлоропласты, обычно присутствуют в клетке в достаточно большом числе для того, чтобы надежно наследоваться, если в среднем

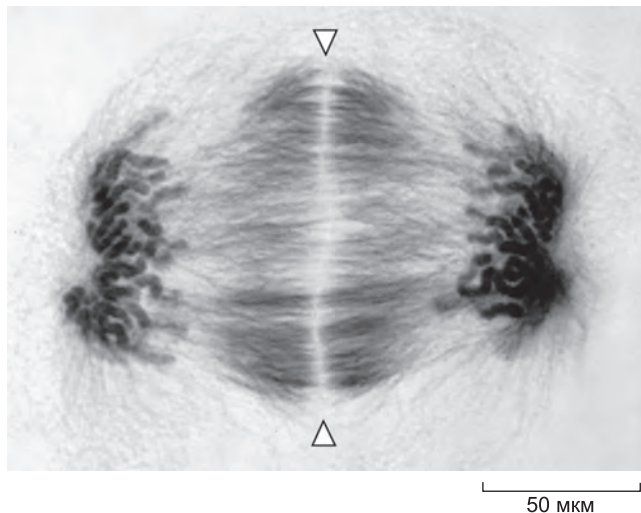


Рис. 17.56. Цитокинез растительной клетки в телофазе. На данной световой микрофотографии видна ранняя клеточная пластинка (между двумя стрелками), образовавшаяся в плоскости, перпендикулярной плоскости страницы. Микротрубочки веретена деления окрашены мечеными золотом антителами против тубулина, а ДНК двух наборов дочерних хромосом окрашена флуоресцентным красителем. Обратите внимание, что здесь нет астральных микротрубочек, поскольку в клетках высших растений отсутствуют centrosomes. (С любезного разрешения Andrew Bajer.)

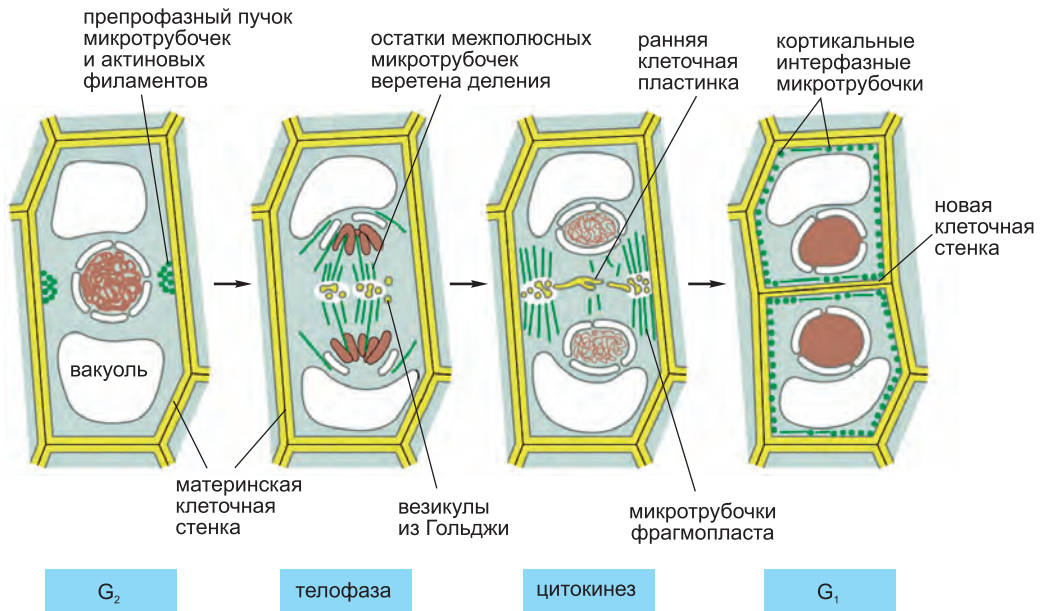


Рис. 17.57. Особенности цитокинеза в клетках высших растений. Плоскость деления задается до М-фазы пучком микротрубочек и актиновых филаментов (препрофазным пучком) в клеточном кортексе. В начале телофазы, после расхождения хромосом внутри клетки, на экваторе старого веретена деления начинает собираться новая клеточная стенка. Межполюсные микротрубочки веретена в телофазе образуют фрагмопласт. Плюс-концы этих микротрубочек больше не перекрываются, но заканчиваются на экваторе клетки. Выходящие из аппарата Гольджи везикулы, заполненные веществами клеточной стенки, транспортируются вдоль этих микротрубочек и сливаются с образованием новой клеточной стенки, расширяющейся в направлении к плазматической мембране и исходной клеточной стенке. Плазматическая мембрана и мембрана, окружающая новую клеточную стенку сливаются, полностью разделяя дочерние клетки.

их количество удваивается за один клеточный цикл. В интерфазных клетках ЭР сообщается с ядерной мембраной и связан с микротрубочковым цитоскелетом. Сопровождающие входение в М-фазу перестройка микротрубочек и разрушение ядерной оболочки высвобождают ЭР. В большинстве клеток ЭР почти не нарушается и при цитокинезе разрезается пополам. Аппарат Гольджи в митозе перестраивается и фрагментируется. Фрагменты Гольджи связываются с полюсами веретена деления, благодаря чему каждая дочерняя клетка получает строительные блоки, необходимые для восстановления аппарата Гольджи в телофазе.

17.5.6. Некоторые клетки смещают свое веретено деления для асимметричного деления

Большинство животных клеток делится симметрично: сократительное кольцо формируется по экватору родительской клетки и образуются две равные дочерние, содержащие одинаковые компоненты. Эта симметрия является результатом локализации веретена деления, которое в большинстве случаев стремится расположиться в центре цитоплазмы. Астральные микротрубочки и моторные белки, толкающие или тянущие эти микротрубочки, также вносят вклад в процесс центрирования.

Однако во время эмбрионального развития часто происходит асимметричное деление с образованием двух клеток, различающихся по размеру, составу цитоплазмы или по тому и другому. Обычно две разные дочерние клетки пойдут по разным путям развития. Для создания дочерних клеток с разной судьбой материнская клетка сначала должна изолировать определенные компоненты (носящие название *детерминанты клеточной судьбы*) на одной стороне клетки, а затем расположить плоскость деления таким образом, чтобы соответствующая дочерняя клетка унаследовала эти компоненты (рис. 17.58). Для асимметричной локализации плоскости деления необходимо контролировать перемещение веретена в пределах делящейся клетки. По-видимому, такое движение направляется изменениями в ограниченных областях клеточного кортекса и расположенными там моторными белками, перетягивающими один из полюсов веретена посредством его астральных микротрубочек в соответствующую область. Генетический анализ *C. elegans* и *Drosophila* позволил идентифицировать некоторые белки, необходимые для такого асимметричного деления (см. главу 22). Часть этих белков, по-видимому, выполняет сходную роль в позвоночных.

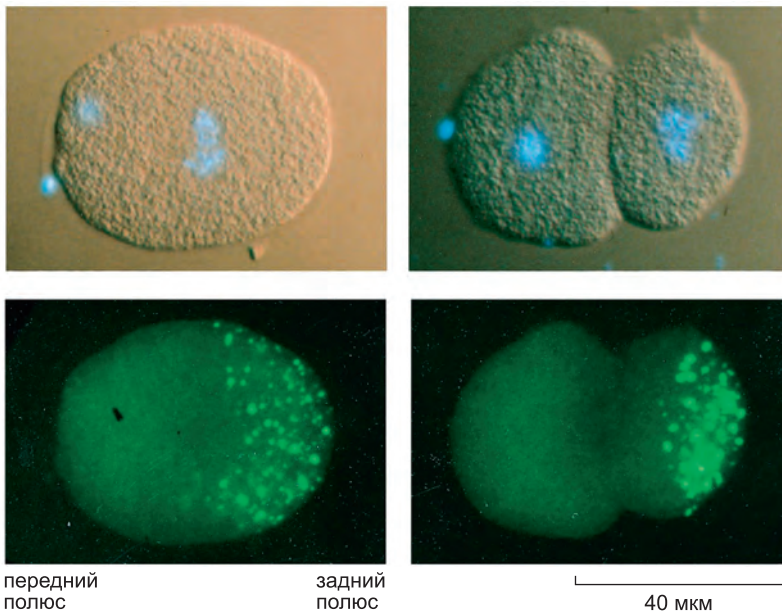


Рис. 17.58. Асимметричное клеточное деление, передающее цитоплазматические компоненты только одной дочерней клетке. Данные световые микрофотографии иллюстрируют контролируемую асимметричную изоляцию цитоплазматических компонентов в одну дочернюю клетку во время первого деления оплодотворенной яйцеклетки нематоды *C. elegans*. Клетка *вверху* окрашена голубым ДНК-связывающим флуоресцентным красителем для визуализации ядра (и полярных телец); клетки наблюдали методами дифференциальной интерференционной контрастной и флуоресцентной микроскопии. Клетки *внизу* — это те же клетки, окрашенные антителами против Р-гранул и наблюдаемые методом флуоресцентной микроскопии. Маленькие Р-гранулы состоят из РНК и белков и определяют, какие клетки станут половыми. Они случайным образом распределяются по цитоплазме неоплодотворенной яйцеклетки (не показано), но потом концентрируются на заднем полюсе оплодотворенной яйцеклетки, как показано *слева*. Плоскость деления ориентирована таким образом, чтобы при дроблении яйцеклетки только задняя дочерняя клетка получила Р-гранулы, как показано *справа*. Аналогичный процесс повторяется в следующие несколько клеточных делений, благодаря чему Р-гранулы оказываются только в тех клетках, которые станут яйцеклетками или сперматозоидами. (С любезного разрешения Susan Strome.)

17.5.7. Митоз может протекать без цитокинеза

Несмотря на то что обычно за делением ядер следует деление цитоплазмы, в этом правиле существуют исключения. Некоторые клетки претерпевают несколько последовательных ядерных делений без разделения цитоплазмы. В раннем зародыше *Drosophila*, например, первые 13 ядерных делений происходят без цитоплазматического деления, что приводит к образованию одной крупной клетки, несущей тысячи ядер, образующих монослой под мембраной. Клетка, в которой многочисленные ядра делят одну цитоплазму, называется **синцитием**. Такой процесс значительно ускоряет раннее развитие, поскольку клеткам не нужно тратить время на прохождение всех этапов цитокинеза после каждого деления. После таких быстрых ядерных делений вокруг каждого ядра формируются мембраны за один контролируемый цитокинез, носящий название *целлюляризация*. Плазматическая мембрана расширяется внутрь и с помощью актомиозинового кольца отщипуется, окружая каждое ядро (рис. 17.59).

Ядерное деление без цитокинеза также происходит в некоторых типах клеток млекопитающих. Мегакариоциты, из которых образуются тромбоциты, и некоторые гепатоциты и клетки сердечной мышцы, например, по такому механизму становятся многоядерными.

После цитокинеза большинство клеток входит в G_1 -фазу, в которой Cdk почти неактивны. Мы закончим данный раздел рассмотрением того, как клетка достигает такого состояния в конце М-фазы.

17.5.8. G_1 -фаза — это стационарное состояние неактивности Cdk

Ключевым регуляторным событием поздней М-фазы является инактивация Cdk, зависящая в основном от APC/C-зависимого разрушения циклинов. Как описано ранее в данной главе, инактивация Cdk в поздней М-фазе выполняет множество функций: она запускает события позднего митоза, стимулирует цитокинез и способствует синтезу пререпликативных комплексов в точках начала репликации ДНК. Она также служит механизмом восстановления системы контроля клеточного цикла в состоянии неактивности Cdk, позволяющем клетке подготовиться к новому клеточному циклу. В большинстве клеток такое состояние инактивации Cdk приводит ко входу в промежуточную фазу G_1 , во время которой клетка растет и наблюдает за своим окружением в ожидании следующего деления.

В ранних зародышах животных инактивация М-Cdk в позднем митозе происходит за счет работы Cdc20-APC/C, рассмотренного ранее. Вспомним, однако, что М-Cdk стимулирует активность Cdc20-APC/C. Таким образом, разрушение М-циклина в позднем митозе вскоре приводит к инактивации всей активности APC/C в эмбриональной клетке. Такая быстрая инактивация APC/C после митоза особенно полезна для быстрых клеточных циклов эмбрионов, поскольку она позволяет клетке почти сразу начать накапливать новые М-циклины для следующего цикла (рис. 17.60, а).

Однако быстрое накопление циклинов сразу после митоза невыгодно для клеток, чьи клеточные циклы содержат G_1 -фазу. Такие клетки обладают несколькими механизмами предотвращения реактивации Cdk после митоза. В одном из этих механизмов используется другой APC/C-активирующий белок, носящий название Cdh1. Cdh1 является близким родственником Cdc20. Несмотря на то что Cdc20 и Cdh1 оба связывают и активируют APC/C, между ними существует одно

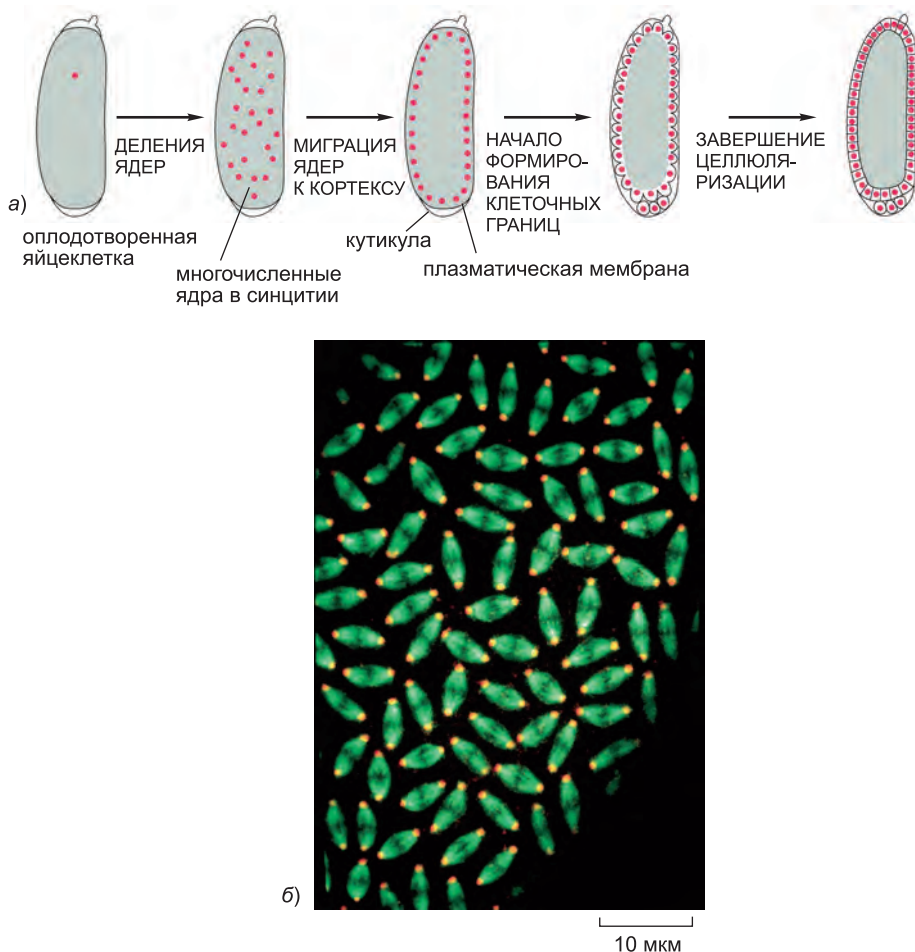


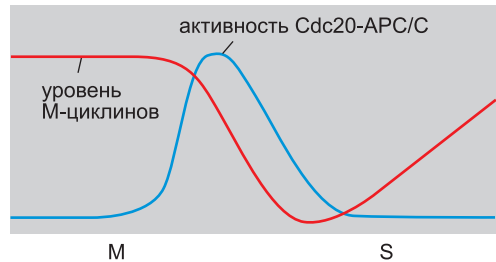
Рис. 17.59. Митоз без цитокинеза в раннем зародыше *Drosophila*. (а) Первые 13 ядерных делений происходят синхронно и без деления цитоплазмы с образованием крупного синцития. Затем большинство ядер мигрирует к кортексу, и плазматическая мембрана расширяется внутрь и отшнуровывается, окружая каждое ядро с образованием отдельных клеток. Этот процесс называют целлюляризацией. (б) Флуоресцентная микрофотография многочисленных веретен деления в зародыше *Drosophila* до целлюляризации. Микротрубочки окрашены зеленым, centrosомы — красным. Обратите внимание, что ядра проходят через цикл синхронно; здесь они все находятся в метафазе. (б, с любезного разрешения Kristina Yu и William Sullivan.)

принципиальное различие. Тогда как M-Cdk активирует комплекс Cdc20-APC/C, она ингибирует комплекс Cdh1-APC/C путем прямого фосфорилирования Cdh1. В результате активность Cdh1-APC/C усиливается в позднем митозе, после того как комплекс Cdc20-APC/C инициирует разрушение M-циклина. Таким образом, разрушение M-циклина продолжается и после митоза: несмотря на снижение активности Cdc20-APC/C, активность Cdh1-APC/C остается высокой (рис. 17.60, б).

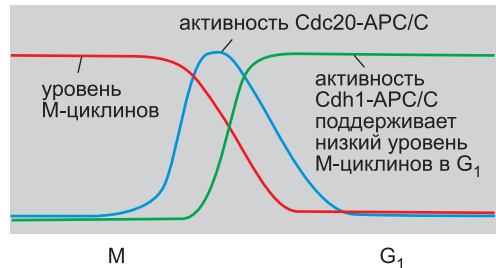
Второй механизм, подавляющий активность Cdk в G_1 , зависит от увеличения синтеза SKI, рассмотренных ранее белков-ингибиторов Cdk. Клетки почкующихся дрожжей, в которых этот механизм наиболее изучен, несут белок SKI, называемый

Рис. 17.60. Установление G_1 -фазы путем стабильного ингибирования Cdk после митоза. (а) В ранних эмбриональных клеточных циклах активность Cdc20-APC/C усиливается в конце метафазы, запуская разрушение М-циклинов. Поскольку активность М-Cdk стимулирует активность Cdc20-APC/C, потеря М-циклинов приводит к инактивации APC/C после митоза, что позволяет клетке снова накапливать М-циклины. (б) В клетках, у которых есть G_1 -фаза, падение активности М-Cdk в позднем митозе приводит к активации Cdh1-APC/C (и накоплению белков-ингибиторов Cdk; не показано). Благодаря этому активность Cdk после митоза непрерывно подавляется, что необходимо для установления G_1 -фазы.

а) эмбриональные клетки без G_1 -фазы



б) клетки с G_1 -фазой



Sic1. Sic1 связывает и инактивирует М-Cdk в позднем митозе и G_1 -фазе. Как и Cdh1, Sic1 ингибируется М-Cdk, которая фосфорилирует его во время митоза и, таким образом, способствует его убиквитинированию белком SCF. В результате Sic1 и М-Cdk, как и пара Cdh1 и М-Cdk, ингибируют друг друга. Таким образом, происходящее в позднем митозе снижение активности М-Cdk приводит к накоплению белка Sic1, и этот СКІ поддерживает низкую активность М-Cdk после митоза. Возможно, белок СКІ *p27* (см. рис. 17.19) выполняет аналогичную функцию в животных клетках.

В большинстве клеток снижение транскрипции генов М-циклинов также инактивирует М-Cdk в позднем митозе. В почкующихся дрожжах, например, М-Cdk стимулирует экспрессию этих генов, что приводит к формированию петли положительной обратной связи. Эта петля выключается, когда клетка выходит из митоза: инактивация М-Cdk белками Cdh1 и Sic1 приводит к снижению транскрипции генов М-циклинов и, следовательно, к снижению синтеза М-циклинов. Белки-регуляторы генов, способствующие экспрессии G_1 /S- и S-циклинов, также ингибируются в G_1 -фазе.

Таким образом, благодаря активации Cdh1-APC/C, накоплению СКІ и снижению экспрессии генов циклинов ранняя G_1 -фаза представляет собой состояние, в котором практически вся активность Cdk подавлена. Как и во многих других аспектах контроля клеточного цикла, использование множественных регуляторных механизмов делает систему подавления жесткой, что позволяет ей сохранять значительную эффективность даже после потери одного из механизмов. Как же тогда клетка покидает это устойчивое состояние G_1 и начинает новый клеточный цикл? Ответ состоит в том, что активность G_1 /S-Cdk, усиливающаяся в поздней G_1 -фазе, снимает все тормозные механизмы, подавляющие активность Cdk. Этот процесс мы рассмотрим в следующем разделе.

Заключение

После того как митоз оканчивается образованием двух дочерних ядер, цитокinesis завершает клеточный цикл, разделяя саму клетку. Цитокinesis зависит

от расположенного посередине между разошедшимися хромосомами кольца актина и миозина, сокращающегося в позднем митозе. В животных клетках расположение сократительного кольца определяется сигналами, исходящими из микротрубочек анафазного веретена деления. Дефосфорилирование мишеней Cdk, приводящее к инактивации Cdk в анафазе, запускает цитокинез в нужное время после анафазы. После цитокинеза клетка входит в устойчивое состояние G_1 , характеризующееся низкой активностью Cdk, и ожидает сигналов начала нового клеточного цикла.

17.6. Регуляция деления и роста клеток

Оплодотворенная яйцеклетка мыши и оплодотворенная яйцеклетка человека одинаковы по размеру, но они дают начало очень разным животным. Какие факторы контроля поведения клеток в людях и мышах отвечают за эти различия? Этот же вопрос можно задать про любой орган или ткань организма животного. Какие факторы контроля клеточного поведения отвечают за длину хобота слона или размеры его печени или мозга? На эти вопросы не существует однозначных ответов, по крайней мере потому, что им уделялось значительно меньше внимания, чем другим вопросам биологии клеток и развития. Однако можно сказать, из чего будут складываться ответы на эти вопросы.

Размер органа или организма в основном зависит от общей массы его клеток, которая определяется числом клеток и их размером. Число клеток, в свою очередь, зависит от числа клеточных делений и клеточных смертей. Таким образом, размеры органа и организма определяются тремя фундаментальными процессами: клеточным ростом, клеточным делением и клеточной смертью. Все эти процессы точно регулируются как внутриклеточными программами, так и внеклеточными сигнальными молекулами, контролирующими эти программы.

Внеклеточные сигнальные молекулы, контролирующие размеры и число клеток, обычно представляют собой растворимые секретируемые белки, связанные с поверхностью клеток, или компоненты внеклеточного матрикса. Их можно условно подразделить на три основных класса.

1. *Митогены* стимулируют клеточное деление за счет инициации волны активности G_1/S -Cdk, инактивирующего внутриклеточные отрицательные регуляторы, которые в противном случае блокируют прохождение через клеточный цикл.

2. *Факторы роста* стимулируют рост клеток (увеличение клеточной массы), способствуя синтезу белков и других макромолекул и ингибируя их деградацию.

3. *Факторы выживания* способствуют выживанию клеток путем подавления формы запрограммированной клеточной смерти — апоптоза.

Многие внеклеточные сигнальные молекулы стимулируют все эти процессы, тогда как другие — только один или два. В самом деле, термин *фактор роста* часто используется неправильно для описания фактора, обладающего любой из приведенных выше активностей. Еще хуже то, что термин *клеточный рост* часто используют для обозначения увеличения числа клеток, или *пролиферации клеток*.

Помимо данных трех классов стимулирующих сигналов, существуют внеклеточные сигнальные молекулы, подавляющие пролиферацию и рост клеток; в общем случае о них известно меньше. Также существуют внеклеточные сигнальные молекулы, активирующие апоптоз.

В данном разделе мы сконцентрируемся в основном на том, как митогены и другие факторы, например повреждение ДНК, контролируют скорость деле-

ния клеток. Затем мы обратимся к важному, но малоизученному вопросу о том, как пролиферирующая клетка координирует свой рост с клеточными делениями для поддержания нужного размера. Мы рассмотрим регуляцию выживания клеток и клеточную смерть посредством апоптоза в главе 18.

17.6.1. Митогены стимулируют деление клеток

Одноклеточные организмы стремятся расти и делиться как можно быстрее, и скорость их пролиферации во многом зависит от доступности питательных веществ в окружающей среде. Однако клетки многоклеточных организмов делятся только тогда, когда организму нужно больше клеток. Таким образом, чтобы животная клетка пролиферировала, она должна получить от других клеток, обычно ее соседей, стимулирующие внеклеточные сигналы в форме **митогенов**. Митогены преодолевают внутриклеточные тормозные механизмы, блокирующие прохождение через клеточный цикл.

Одним из первых идентифицированных митогенов стал *тромбоцитарный фактор роста* (*Platelet-Derived Growth Factor, PDGF*), и с тех пор открыто множество других. Путь выделения начался с наблюдения того, что фибробласты в культуральной чашке пролиферируют при добавлении *сыворотки крови*, но не *плазмы*. Плазму приготавливают путем удаления клеток из крови без образования тромбов; сыворотку готовят, позволяя крови сворачиваться, и затем берут оставшуюся свободную от клеток жидкость. Когда кровь сворачивается, тромбоциты, встраивающиеся в тромб, высвобождают содержимое своих секреторных везикул (**рис. 17.61**). Способность сыворотки поддерживать клеточную пролиферацию позволила сделать предположение о том, что тромбоциты содержат один или несколько митогенов. Эта гипотеза была подтверждена, когда показали, что экстракты тромбоцитов способны стимулировать пролиферацию фибробластов вместо сыворотки. Установили, что ключевым фактором в экстрактах является белок, который впоследствии выделили и назвали PDGF. В организме высвобождаемый из кровяных тромбов PDGF стимулирует деление клеток при заживлении ран.

PDGF — один из более 50 известных белков, действующих как митогены. Большинство этих белков обладает широкой специфичностью. PDGF, например, способен стимулировать деление многих типов клеток, включая фибробласты, гладкомышечные и нейроглиальные клетки. Точно так же *эпидермальный фактор*

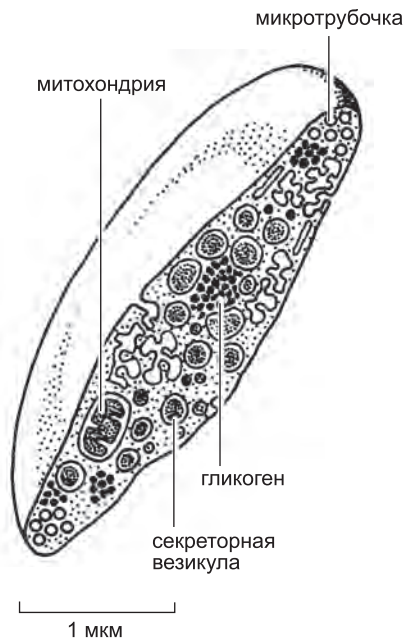


Рис. 17.61. Тромбоцит. Тромбоциты — это маленькие клетки, лишенные ядра. Они циркулируют в кровяном русле и способствуют стимуляции сворачивания крови в местах повреждения тканей, препятствуя избыточному кровотечению. Они также высвобождают различные факторы, стимулирующие заживление. Показанный здесь тромбоцит разрезан пополам для того, чтобы были видны его секреторные везикулы, некоторые из которых содержат тромбоцитарный фактор роста (PDGF).

роста (*Epidermal Growth Factor, EGF*) воздействует не только на клетки эпидермиса, но и на многие другие, включая как эпителиальные, так и неэпителиальные клетки. Однако некоторые митогены обладают узкой специфичностью; *эритропоэтин*, например, индуцирует пролиферацию только предшественников эритроцитов. Многие митогены, включая PDGF, обладают другими функциями, помимо стимуляции клеточного деления: они могут стимулировать клеточный рост, выживание, дифференциацию или миграцию, в зависимости от обстоятельств и типа клеток.

В некоторых тканях ингибиторные внеклеточные сигнальные белки противодействуют положительным регуляторам и, таким образом, блокируют рост органов. Наиболее изученными ингибиторными сигнальными белками являются TGF β и его родственники. TGF β (*Transforming Growth Factor- β* — трансформирующий фактор роста β) ингибирует пролиферацию нескольких типов клеток, блокируя вход клеточного цикла в G₁ или стимулируя апоптоз.

17.6.2. Клетки могут отложить деление, войдя в специализированное неделящееся состояние

В отсутствие митогенного сигнала к пролиферации ингибирование Cdk в G₁ поддерживается многочисленными рассмотренными ранее механизмами, и вхождение в новый клеточный цикл блокируется. В некоторых случаях клетки частично разбирают свою систему контроля клеточного цикла и выходят из цикла в специализированное неделящееся состояние G₀.

Большинство клеток нашего организма находятся в G₀, но молекулярные основы и обратимость этого состояния изменяются в различных типах клеток. Большинство наших нейронов и клеток скелетных мышц, например, *терминально дифференцированы* в состоянии G₀, т.е. их система контроля клеточного цикла полностью разобрана: экспрессия генов, кодирующих различные Cdk и циклины, навсегда отключена, и клеточное деление происходит редко. Другие типы клеток выходят из клеточного цикла только временно и сохраняют способность заново быстро собрать систему контроля клеточного цикла и войти в цикл. Большинство клеток печени, например, находится в G₀, но их можно стимулировать к делению при повреждении печени. Наконец, существуют типы клеток, включая фибробласты и некоторые лимфоциты, которые на протяжении жизни несколько раз выходят из клеточного цикла и возвращаются в него.

Почти все различия в продолжительности клеточного цикла во взрослом организме зависят от времени, которое клетка проводит в G₁ или G₀. С другой стороны, клетке для прохождения от начала S-фазы до митоза обычно требуется немного времени (12–24 часа для млекопитающих), и этот промежуток относительно постоянен вне зависимости от времени между делениями.

17.6.3. Митогены стимулируют активность G₁-Cdk и G₁/S-Cdk

В абсолютном большинстве животных клеток митогены контролируют уровень клеточного деления, воздействуя на G₁-фазу клеточного цикла. Как отмечено ранее, в G₁ действуют различные механизмы, направленные на подавление активности Cdk и блокирующие вхождение в S-фазу. Митогены снимают эти тормоза активности Cdk, позволяя начаться S-фазе.

Как мы обсуждали в главе 15, митогены взаимодействуют с поверхностными рецепторами и запускают многочисленные внутриклеточные сигнальные пути.

Один из этих путей действует через малую GTPазу **Ras**, стимулирующую активацию *MAP-киназного каскада*. Это приводит к увеличению синтеза нескольких белков-регуляторов генов, включая **Мус**. Считают, что Мус стимулирует вхождение в клеточный цикл посредством нескольких механизмов, один из которых усиливает экспрессию генов, кодирующих циклины G_1 (D-циклины), и, следовательно, увеличивает активность G_1 -Cdk (циклина D-Cdk4). Как мы обсудим позднее, Мус также играет важную роль в активации транскрипции генов, усиливающих клеточный рост.

Ключевой функцией комплексов G_1 -Cdk в животных клетках является активация группы генов регуляторных факторов, носящих название **белков E2F**. Эти белки связывают специфические последовательности ДНК в промоторах разнообразных генов, кодирующих белки вхождения в S-фазу, включая G_1 /S-циклины, S-циклины и белки, участвующие в синтезе ДНК и удвоении хромосом. В отсутствие митогенной стимуляции E2F-зависимая экспрессия генов ингибируется взаимодействиями между E2F и представителями семейства **белков ретинобластомы** (*Retinoblastoma Proteins*, **Rb**). Когда клетки получают стимулирующие сигналы митогенов, активная G_1 -Cdk накапливается и фосфорилирует белки семейства Rb, уменьшая их связывание с E2F. Затем высвобожденные белки E2F активируют экспрессию своих генов-мишеней (рис. 17.62).

Данная система контроля транскрипции, как и многие другие регулирующие клеточный цикл системы контроля, включает в себя петли обратных связей, делающие переход G_1 /S более резким. Высвобожденные белки E2F, например, усиливают транскрипцию своих собственных генов. Более того, E2F-зависимая транскрипция генов G_1 /S-циклина (циклина E) и S-циклина (циклина A) приводит к повышению активности G_1 /S-Cdk и S-Cdk, которая, в свою очередь, увеличивает фосфорилирование Rb и способствует дальнейшему высвобождению E2F (см. рис. 17.62).

Главный представитель семейства Rb, сам белок Rb, идентифицировали при изучении формы наследственного рака глаз у детей, известного как *ретинобластома* (см. главу 20). Потеря обеих копий гена Rb приводит к избыточной пролиферации развивающейся сетчатки, что указывает на особую роль белка Rb в ограничении клеточного деления в этой ткани. Полная потеря Rb не сразу вызывает увеличение пролиферации клеток сетчатки или других типов клеток, с одной стороны, потому, что Cdh1 и CKI также способствуют ингибированию прохождения через G_1 , а с другой — потому, что другие типы клеток содержат родственные Rb белки, обеспечивающие дополнительную поддержку в отсутствие Rb. Также существует вероятность того, что другие, неродственные Rb белки, также регулируют активность E2F.

Дополнительные уровни контроля способствуют огромному увеличению активности S-Cdk в начале S-фазы. Ранее мы упоминали, что активатор APC/C Cdh1 подавляет циклины после митоза. Однако в животных клетках G_1 - и G_1 /S-циклины устойчивы к Cdh1 и, следовательно, могут независимо от APC/C стимулировать фосфорилирование белка Rb и экспрессию E2F-зависимых генов. S-циклин, с другой стороны, чувствителен к Cdh1, и сначала его концентрация снижается за счет действия Cdh1-APC/C. Однако G_1 /S-Cdk также фосфорилирует и инактивируют Cdh1-APC/C, позволяя S-циклину накапливаться и способствовать активации S-Cdk. Общий эффект всех этих взаимодействий состоит в быстрой и полной активации комплексов S-Cdk, необходимых для инициации S-фазы.

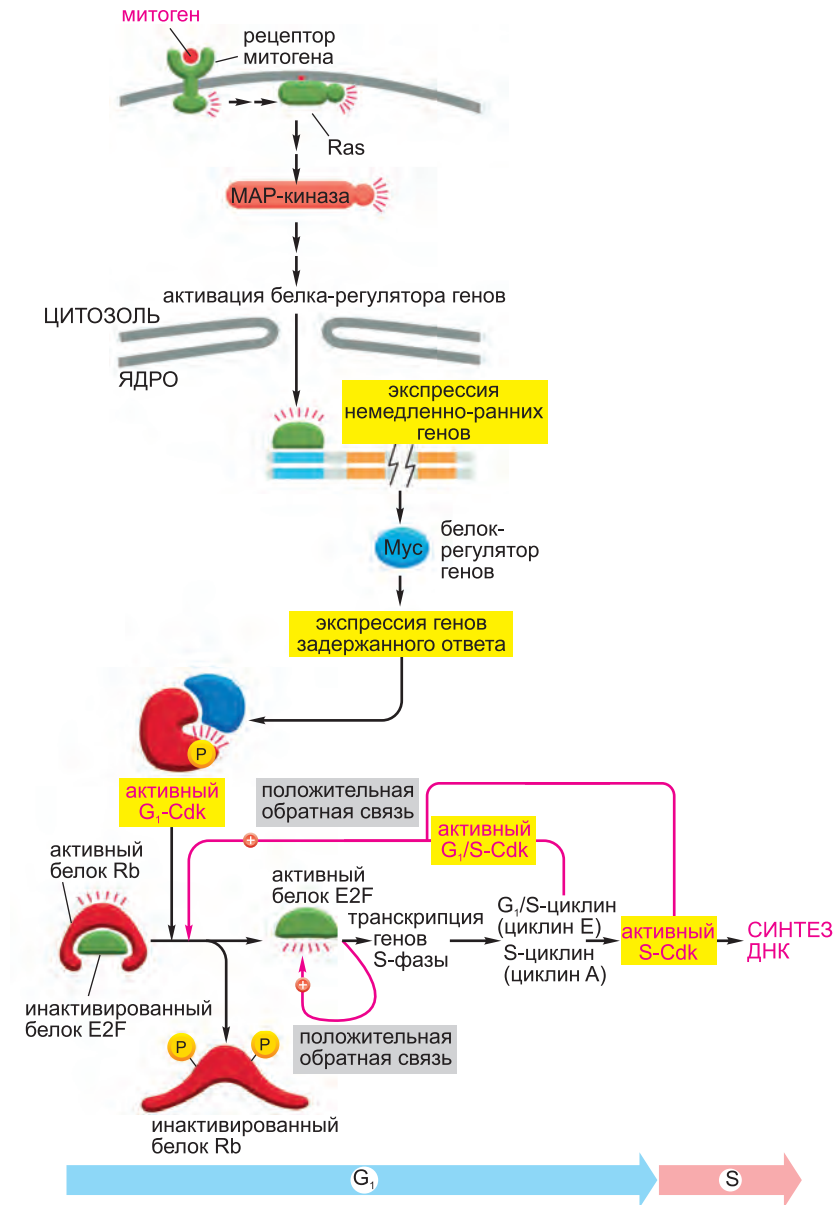


Рис. 17.62. Механизмы, контролирующие вхождение в клеточный цикл и инициацию S-фазы в животных клетках. Как обсуждалось в главе 15, митогены связываются с поверхностными рецепторами и инициируют внутриклеточные сигнальные пути. Один из основных путей включает в себя активацию малой GTPазы Ras, которая активирует MAP-киназный каскад, приводящий к усилению экспрессии многочисленных *немедленно-ранних генов*, включая гены, кодирующие регуляторный белок Мус. Мус усиливает экспрессию *генов задержанного ответа*, включая гены, приводящие к повышению активности G_1 -Cdk (циклина D-Cdk4), запускающего фосфорилирование белков семейства Rb. Это инактивирует белки Rb, высвобождая белок-регулятор генов E2F, активирующий транскрипцию генов G_1/S , включая гены G_1/S -циклина (циклина E) и S-циклина (циклина A). Активность G_1/S -Cdk и S-Cdk еще больше усиливает фосфорилирование белков Rb, создавая петлю положительной обратной связи. Белки E2F также стимулируют транскрипцию собственных генов, формируя еще одну петлю положительной обратной связи.

17.6.4. Повреждение ДНК блокирует клеточное деление: ответ на повреждение ДНК

Прохождение клеточного цикла и, следовательно, скорость пролиферации клеток контролируются не только внеклеточными митогенами, но и другими внеклеточными и внутриклеточными механизмами. Одно из наиболее важных влияний оказывает повреждение ДНК, которое может стать результатом самопроизвольных химических реакций в ДНК, ошибок репликации или воздействия радиации или определенных химических веществ. Очень важно, чтобы клетка репарировала поврежденные хромосомы до их удвоения или расхождения. Система контроля клеточного цикла быстро обнаруживает повреждение ДНК и останавливает цикл в одной из двух контрольных точек — Старте в поздней G_1 -фазе, не позволяющей клетке войти в цикл и S-фазу, и в точке G_2/M , не дающей начаться раннему митозу (см. рис. 17.21).

Повреждение ДНК инициирует сигнальный путь, активируя одну из пары родственных протеинкиназ, носящих название **ATM** и **ATR**. Эти киназы связываются с поврежденным участком и фосфорилируют различные белки-мишени, включая две другие протеинкиназы *Chk1* и *Chk2*. Вместе эти киназы фосфорилируют белки-мишени, вызывающие остановку клеточного цикла. Основной мишенью является белок-регулятор генов **p53**, стимулирующий транскрипцию гена, кодирующего белок СКІ p21; p21 связывается с комплексами G_1/S -Cdk и S-Cdk и ингибирует их активность, способствуя блокировке входа в клеточный цикл (рис. 17.63).

Повреждение ДНК активирует p53 по непрямому механизму. В неповрежденных клетках p53 очень нестабилен и присутствует в очень низкой концентрации. Это во многом является результатом его взаимодействия с другим белком, *Mdm2* — убиквитин-лигазой, направляющей p53 в протеасомы для разрушения. Фосфорилирование p53 после повреждения ДНК снижает его связывание с *Mdm2*. В результате снижается деградация p53, и его концентрация в клетке возрастает. Более того, уменьшение связывания с *Mdm2* усиливает способность p53 стимулировать транскрипцию генов (см. рис. 17.63).

Протеинкиназы *Chk1* и *Chk2* также блокируют клеточный цикл за счет фосфорилирования представителей семейства протеинфосфатаз *Cdc25* и ингибирования их функции. Как описывалось ранее, эти киназы особенно важны для активации M-Cdk в начале митоза (см. рис. 17.25). Таким образом, ингибирование активности *Cdc25* повреждением ДНК способствует блокировке входа в ранний митоз (см. рис. 17.21).

Ответ на повреждение ДНК также определяет проблемы, связанные с нарушением работы репликационной вилки при репликации ДНК. Например, при истощении запасов нуклеотидов во время фазы элонгации синтеза ДНК репликационная вилка останавливается. Чтобы клетка не попыталась разделить частично реплицированные хромосомы, те же механизмы, которые отвечают на повреждение ДНК, обнаруживают остановившуюся репликационную вилку и блокируют вход в ранний митоз до тех пор, пока проблемы с вилкой не будут решены.

Ответ на повреждение ДНК не является жизненно важным для нормального деления клеток, если условия среды идеальны. Однако условия редко идеальны: низкий уровень повреждения ДНК присутствует во всех клетках, и это повреждение накапливается в потомстве клетки, если ответ на него не функционирует. За про-

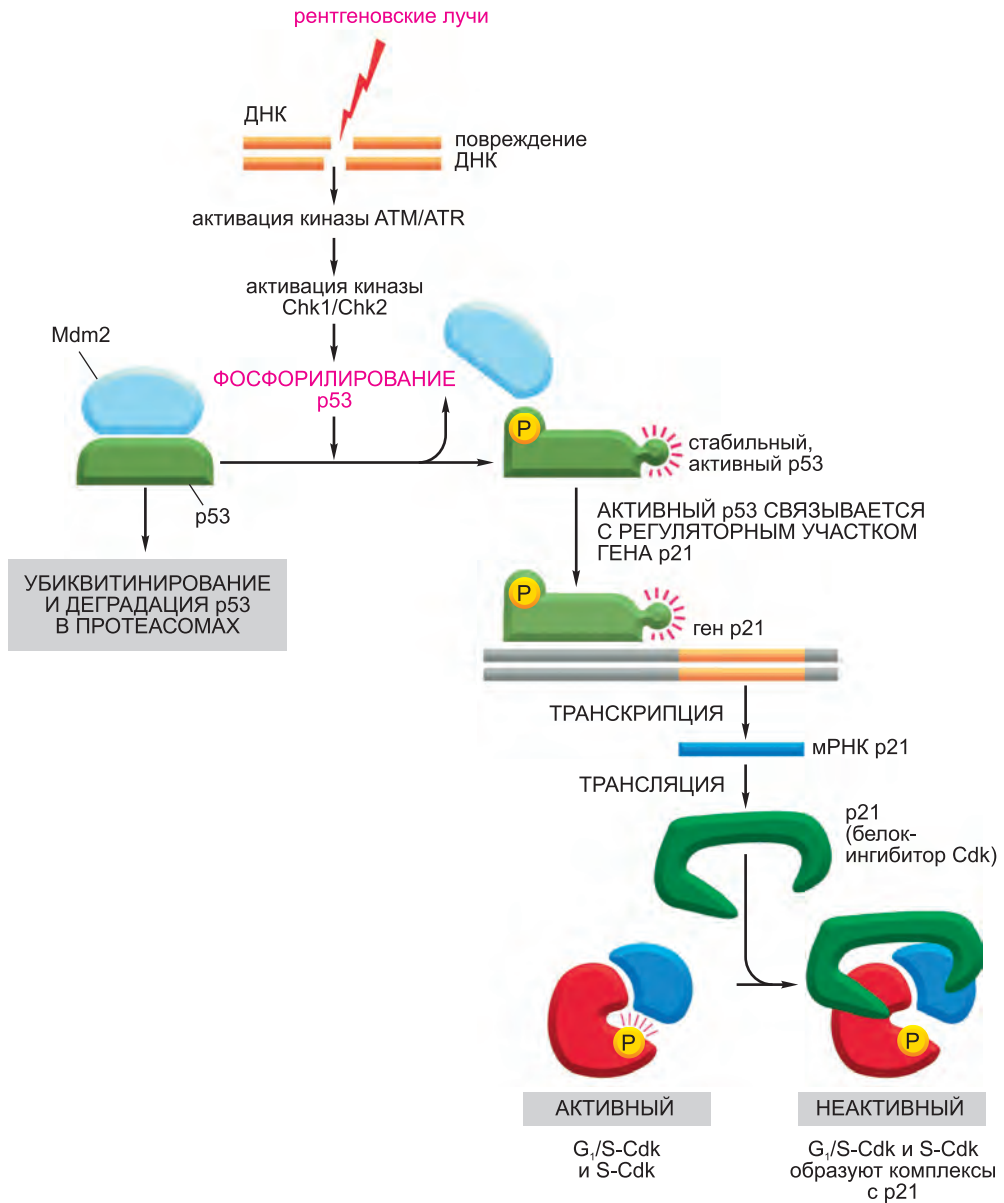


Рис. 17.63. Как повреждение ДНК останавливает клеточный цикл в G_1 . При повреждении ДНК различные протеинкиназы рекрутируются к сайту повреждения и инициируют сигнальный путь, вызывающий остановку клеточного цикла. Первой киназой, приходящей в сайт повреждения, является ATM или ATR в зависимости от типа повреждения. Затем рекрутируются и активируются дополнительные протеинкиназы, носящие названия Chk1 и Chk2, что приводит к фосфорилированию белка-регулятора генов p53. В норме Mdm2 связывает p53, убиквитинирует его и направляет на деградацию в протеасомах. Фосфорилирование p53 блокирует его связывание с Mdm2; в результате p53 накапливается и стимулирует транскрипцию гена, кодирующего CKI-белок p21. p21 связывает и инактивирует комплексы G_1 /S-Cdk и S-Cdk, останавливая цикл в G_1 . В некоторых случаях повреждение ДНК также запускает фосфорилирование Mdm2 или снижение его синтеза, что тоже увеличивает концентрацию p53 (не показано).

должительное время накопление генетических ошибок в клетках, лишенных ответа на повреждение ДНК, приводит к увеличению частоты вызывающих рак мутаций. В самом деле, мутации гена p53 свойственны по крайней мере половине раков человека (см. главу 20). Потеря функции p53 позволяет раковой клетке накапливать мутации. Точно так же редкое генетическое заболевание *атаксия-телеангиэктазия* вызывается дефектом АТМ, одной из протеинкиназ, активирующихся в ответ на вызванное рентгеновским излучением повреждение ДНК; страдающие этим заболеванием очень чувствительны к рентгеновским лучам и характеризуются повышенной частотой развития рака.

Что происходит, если повреждение ДНК настолько сильное, что репарация невозможна? Ответ отличается для разных организмов. Одноклеточные организмы, например почкующиеся дрожжи, временно останавливают клеточный цикл и пытаются устранить повреждения, но цикл возобновляется, даже если репарация не закончена. Для одноклеточного организма жизнь с мутациями, по-видимому, лучше, чем никакой жизни. Однако в многоклеточных организмах здоровье всего организма важнее жизни отдельной клетки. Клетки, делящиеся со значительным повреждением ДНК, угрожают жизни организма, поскольку генетические ошибки часто могут привести к раку и другим заболеваниям. Таким образом, животные клетки со значительным повреждением ДНК не пытаются продолжить деление и кончают жизнь самоубийством, претерпев апоптоз. Следовательно, если повреждение ДНК не устранено, ответ на повреждение может привести к остановке клеточного цикла или к клеточной смерти. Как мы обсудим в следующей главе, вызванный повреждением ДНК апоптоз зависит от активации p53. Стимулирующая апоптоз функция p53 играет важнейшую роль в защите нас от рака.

17.6.5. Многие клетки человека обладают встроенным ограничением на число делений

Многие клетки человека делятся ограниченное число раз, после чего претерпевают постоянную остановку клеточного цикла. Популяция фибробластов, выделенных из нормальной ткани человека, например, при культивировании в стандартной митогенной среде удваивается всего 25–50 раз. К концу этого времени пролиферация замедляется и, наконец, останавливается, и клетки навсегда входят в неделящееся состояние. Это явление называется **репликативным старением клеток**, хотя маловероятно, что оно отвечает за старение всего организма. Считают, что старение организма как целого частично зависит от прогрессирующего окислительного повреждения долгоживущих макромолекул. Это подтверждается тем, что снижающие метаболизм и, следовательно, образование активных форм кислорода подходы (например, меньшее потребление пищи) способны увеличить продолжительность жизни лабораторных животных.

Репликативное старение человеческих фибробластов вызывается, по-видимому, изменением структуры **теломер**, повторяющихся последовательностей ДНК и связанных с ними белков на концах хромосом. Как обсуждалось в главе 5, когда клетка делится, теломерные последовательности ДНК не реплицируются, как весь остальной геном, а синтезируются ферментом **теломеразой**. Теломераза также способствует образованию копирующих белковых структур, защищающих концы хромосом. Поскольку человеческие фибробласты и многие другие соматические клетки несут немного теломеразы, их теломеры становятся с каждым клеточным

делением все короче, а защитные белковые кэпы постепенно исчезают. В конце концов оголенные концы хромосом начинают восприниматься клеткой, как повреждение ДНК, и активируется р53-зависимая остановка клеточного цикла, напоминающая остановку, вызванную другими повреждениями ДНК (см. рис. 17.63). Клетки грызунов, с другой стороны, поддерживают теломеразную активность при пролиферации в культуре и, следовательно, не обладают таким зависимым от теломеразы механизмом ограничения деления. Искусственное усиление экспрессии теломеразы в нормальных фибробластах человека методами генной инженерии блокирует эту форму старения клеток. К сожалению, большинство раковых клеток восстанавливает способность синтезировать теломеразу и поддерживает функционирование теломер по мере пролиферации; в результате у них не происходит репликативного старения.

17.6.6. Патологические сигналы пролиферации вызывают в клетках, за исключением раковых, остановку клеточного цикла или апоптоз

Многие компоненты митогенного сигнального пути кодируются генами, которые исходно идентифицированы как гены, способствующие развитию рака, или *онкогены*, поскольку их мутации вносят вклад в возникновение опухолей. Мутация единственной аминокислоты в малой GTPазе Ras, например, делает белок постоянно активным, что приводит к стимуляции Ras-зависимых сигнальных путей даже в отсутствие митогенной сигнализации. Точно так же мутации, вызывающие сверхэкспрессию Мус, стимулируют патологический рост и пролиферацию клеток, что также способствует развитию рака.

Однако как ни странно, когда гиперактивированная форма Ras или Мус искусственно экспрессируется в большинстве нормальных клеток, это приводит не к избыточной пролиферации, а к остановке клеточного цикла или апоптозу. По-видимому, нормальные клетки способны зарегистрировать патологическую митогенную стимуляцию и отвечают на нее путем остановки дальнейшего деления. Такие ответы помогают предотвратить выживание и пролиферацию клеток, несущих различные вызывающие рак мутации.

Несмотря на то, что неизвестно, как клетка определяет избыточную митогенную стимуляцию, такая стимуляция часто приводит к синтезу белка-ингибитора клеточного цикла *Arf*, который связывает и ингибирует Mdm2. Как показано выше, Mdm2 в норме стимулирует деградацию р53. Таким образом, активация Arf вызывает увеличение концентрации р53, инициирующее остановку клеточного цикла или апоптоз (**рис. 17.64**).

Как тогда возникают раковые клетки, если эти механизмы блокируют деление или выживание мутантных клеток с гиперактивными сигналами пролиферации? Ответ состоит в том, что в раковых клетках защитная система часто инактивирована мутациями в генах, кодирующих основные компоненты системы ответа контрольных точек, например Arf или р53, или активирующие их белки.

17.6.7. Рост организма и органов зависит от роста клеток

Для роста организма или органа недостаточно клеточного деления. Если клетки будут пролиферировать без роста, с каждым делением они будут становиться все меньше и не будет происходить увеличения общей клеточной массы. Таким образом,

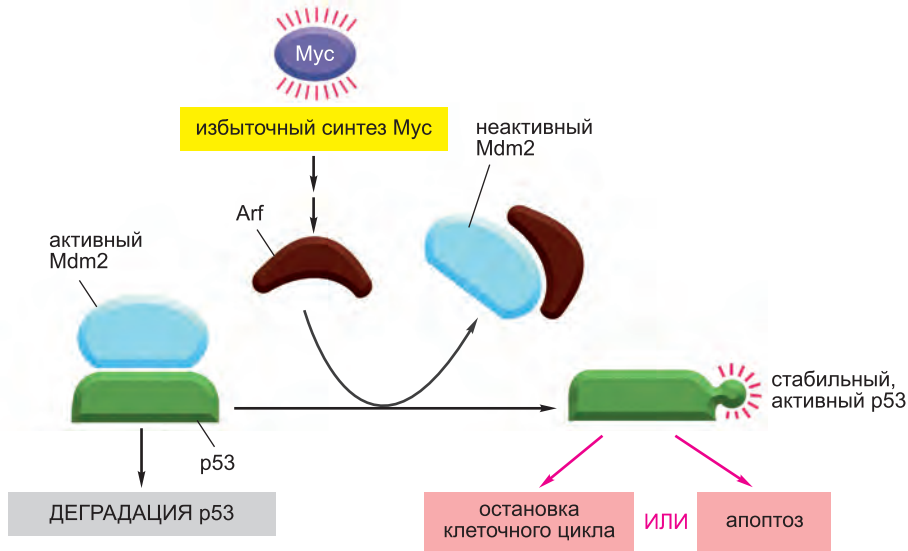


Рис. 17.64. Остановка клеточного цикла или апоптоз, вызванные избыточной стимуляцией митогенных путей. Ненормально высокая концентрация Мус приводит к активации Arf, связывающей и ингибирующей Mdm2. В результате увеличивается концентрация p53 (см. рис. 17.60). В зависимости от типа клетки и внеклеточных условий p53 вызывает остановку клеточного цикла или апоптоз.

в большинстве пролиферирующих популяций клеток клеточное деление сопровождается ростом. В таких одноклеточных организмах, как дрожжи, для клеточного роста и деления необходимы только питательные вещества. С другой стороны, в животных рост и пролиферация клеток зависят от синтезируемых другими клетками внеклеточных сигнальных молекул, которые мы называем **факторами роста** и митогенами соответственно.

Как и митогены, внеклеточные факторы роста, стимулирующие рост животных клеток, связываются с поверхностными рецепторами и активируют внутриклеточные сигнальные пути. Эти пути способствуют накоплению белков и других макромолекул, что происходит за счет усиления синтеза и снижения деградации. Факторы роста также запускают увеличение скорости захвата питательных веществ и образования АТФ, необходимого для усиления синтеза белков. Один из наиболее важных внутриклеточных сигнальных путей, активируемых рецепторами факторов роста, включает в себя фермент *PI3-киназу*, добавляющую фосфат АТФ к положению 3 инозитолфосфолипидов плазматической мембраны. Как отмечено в главе 15, активация PI3-киназы приводит к активации киназы *TOR*, на которую завязаны регуляторные пути роста всех эукариот. TOR активирует множество мишеней в клетке, стимулирующих метаболические процессы и усиление синтеза белков. Одна из мишеней, протеинкиназа *S6-киназа (S6K)*, фосфорилирует рибосомный белок S6, усиливая способность рибосом транслировать набор мРНК, кодирующий в основном компоненты рибосом. TOR также косвенно активирует фактор инициации трансляции *eIF4E* и напрямую — белки-регуляторы, способствующие усилению экспрессии генов, кодирующих рибосомные субъединицы (рис. 17.65).

17.6.8. Проллиферирующие клетки обычно координируют свой рост и деление

Чтобы пролиферирующие клетки могли поддерживать постоянный размер, они должны координировать свой рост и клеточные деления таким образом, чтобы их размер удваивался после каждого деления: если клетки будут расти слишком медленно, с каждым делением они будут становиться все меньше, а если слишком быстро — то все больше. Неизвестно, как клетки достигают такой скоординированности, но, вероятно, в этом процессе участвует множество механизмов, изменяющихся для различных организмов и даже типов клеток одного организма (рис. 17.66).

Однако рост и деление животных клеток не всегда скоординированы. Во многих случаях они совершенно не связаны, что приводит к росту без деления или к делению без роста. Мышечные и нервные клетки, например, могут значительно увеличиться в размере после остановки клеточного цикла. Точно так же яйцеклетки многих животных становятся очень крупными без деления; однако после оплодот-

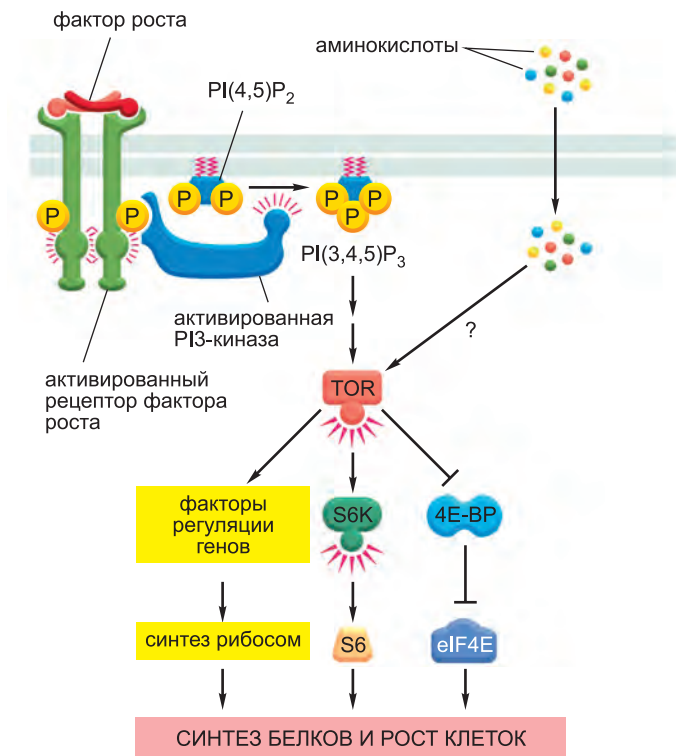


Рис. 17.65. Стимуляция клеточного роста внеклеточными факторами роста и питательными веществами. Как показано в главе 15, связывание поверхностных рецепторов с факторами роста приводит к активации PI3-киназы, стимулирующей синтез белков посредством сложного сигнального пути. Этот путь приводит к активации протеинкиназы TOR. Внеклеточные питательные вещества, например аминокислоты, также способствуют активации TOR, но сигнальный путь этого процесса неизвестен. TOR по нескольким механизмам стимулирует белковый синтез. Она также ингибирует деградацию белков (не показано). Факторы роста также стимулируют усиление синтеза белка-регулятора генов Мус (не показано), активирующего транскрипцию различных способствующих метаболизму клетки генов. 4E-BP — это ингибитор фактора инициации трансляции eIF4E.

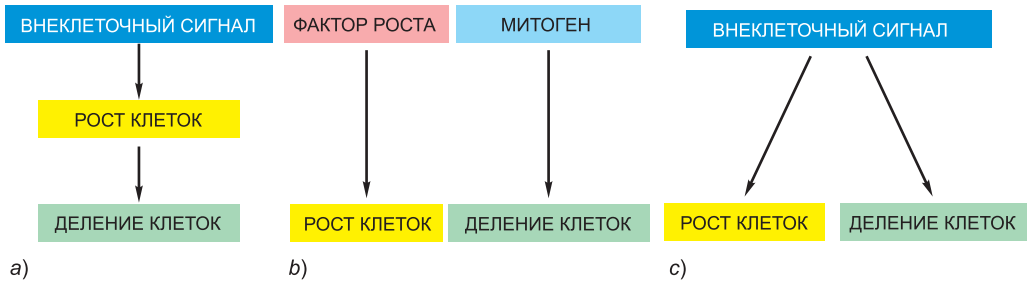


Рис. 17.66. Возможные механизмы координации клеточного роста и деления. Размер пролиферирующих клеток поддерживается механизмами, координирующими клеточное деление и клеточный рост. Предположительно, существуют многочисленные сопряженные механизмы, и различные типы клеток используют различные их сочетания. (а) Во многих типах клеток, особенно в дрожжах, скорость деления клеток управляется скоростью роста, т. е. деление происходит только тогда, когда скорость роста достигает определенного минимального порога; у дрожжей рост и, следовательно, частота делений зависят в основном от внеклеточных питательных веществ. (б) В некоторых типах животных клеток рост и деление могут контролироваться различными внеклеточными факторами (факторами роста и митогенами соответственно), и размер зависит от относительного содержания двух типов факторов. (в) Некоторые внеклеточные факторы способны стимулировать как клеточный рост, так и клеточное деление, одновременно активируя сигнальные пути роста и прохождения через клеточный цикл.

ворения ситуация меняется на противоположную, и происходят множественные деления без роста (см. рис. 17.9).

По сравнению с делением клеток удивительно мало известно о контроле клеточного роста у животных. В результате остается неизвестным, чем определяется размер клетки и почему различные типы клеток в одном организме растут по-разному (рис. 17.67). Одним из наиболее изученных примеров в случае животных является *симпатический нейрон*, который навсегда выходит из клеточного цикла. Его размер зависит от количества *фактора роста нервов* (*Nerve Growth Factor, NGF*), секретируемого иннервируемыми нейроном клетками-мишенями; чем больше NGF воздействует на нейрон, тем больше он становится. Вероятно, экспрессируемые клеткой гены накладывают ограничения на размер, которого она может достигнуть, а внеклеточные сигнальные молекулы и питательные вещества регулируют размер в пределах этих границ. Задача состоит в том, чтобы идентифицировать соответствующие гены и сигнальные молекулы для каждого типа клеток.

17.6.9. Соседние клетки конкурируют за внеклеточные сигнальные белки

При культивировании большинства типов клеток млекопитающих в чашке Петри в присутствии сыворотки они прикрепляются к поверхности чашки, распластываются и делятся до тех пор, пока не образуют сплошной монослой. Каждая клетка сообщается с чашкой и контактирует с соседями по сторонам. К этому моменту нормальные клетки, в отличие от раковых, перестают пролиферировать. Это явление называется *зависимым от плотности ингибированием клеточного деления*. Сначала этот процесс объяснили в терминах «контактного ингибирования», но маловероятно, что межклеточные контакты являются единственной его причиной. Плотность популяции клеток, при которой останавливается пролиферация в сплошном монослое, становится выше при увеличении в среде концентрации сыворотки.

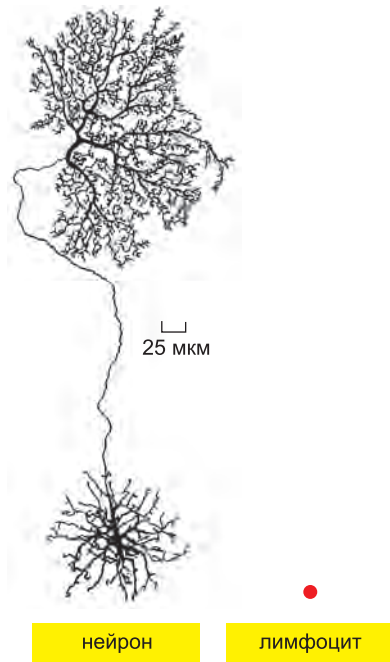


Рис. 17.67. Различия в размерах нейрона (сетчатки) и лимфоцита млекопитающих. Обе клетки содержат одинаковое количество ДНК. Нейрон после выхода из клеточного цикла становится все больше. При этом соотношение между количеством цитоплазмы и ДНК значительно увеличивается (в некоторых нейронах в 10^5 раз). (Нейрон из В. В. Boycott, в *Essays on the Nervous System* [R. Bellairs and E. G. Gray, eds.]. Oxford, UK: Clarendon Press, 1974.)

Более того, если по поверхности монослоя фибробластов пустить поток свежей культуральной среды и увеличить таким образом количество митогенов, клетки вновь начинают делиться (**рис. 16.68**). Следовательно, зависящее от плотности ингибирование клеточной пролиферации по крайней мере частично отражает способность клеток поглощать из среды внеклеточные митогены, лишая их своих соседей.

Такой тип конкуренции может играть важную роль в тканях и культурах, поскольку он не дает клеткам превышать определенную плотность популяции, определяемую доступностью митогенов, факторов роста и факторов выживания. Концентрация этих факторов в тканях обычно бывает лимитирующей, т.е. ее увеличение приводит к увеличению численности или размера клеток. Таким образом, количество этих веществ в тканях имеет большое значение для определения числа и размера клеток и, возможно, конечного размера ткани или органа.

трация этих факторов в тканях обычно бывает лимитирующей, т.е. ее увеличение приводит к увеличению численности или размера клеток. Таким образом, количество этих веществ в тканях имеет большое значение для определения числа и размера клеток и, возможно, конечного размера ткани или органа.

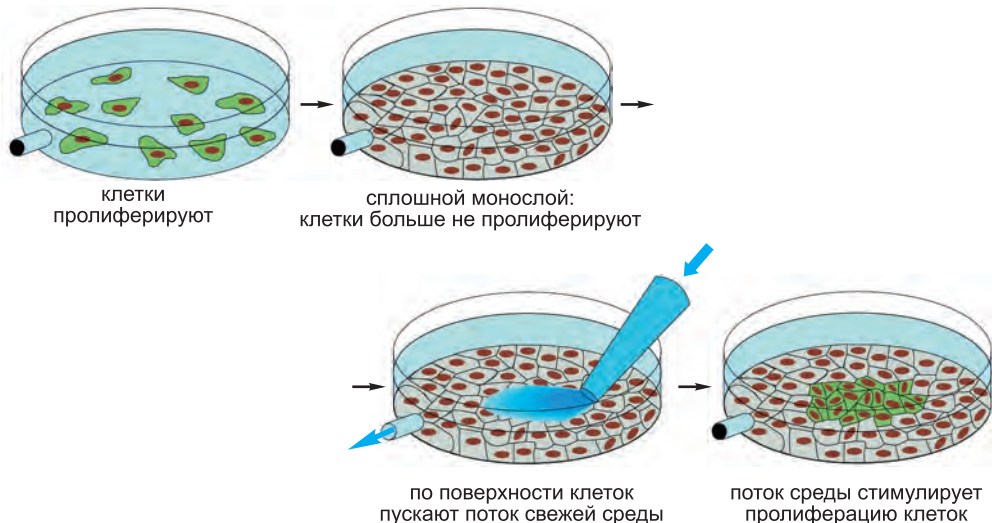


Рис. 17.68. Влияние свежей среды на сплошной монослой клеток. Клетки в сплошном слое не делятся (серые). Клетки возобновляют деление (зеленые) при обработке их свежей культуральной средой. Очевидно, в не нарушенном сплошном монослое пролиферация останавливается потому, что среда вблизи клеток лишена митогенов, за которые идет конкуренция.

Общий размер ткани в некоторых случаях также может управляться внеклеточными ингибиторными факторами. *Миостатин*, например, является представителем семейства TGF β и в норме ингибирует пролиферацию миобластов, сливающихся с образованием клеток скелетных мышц. Если мышцы удалить ген, кодирующий миостатин, ее мышцы становятся в несколько раз больше, чем в норме. Оказалось, что две породы скота, выведенные для получения большего количества мышечной ткани, несут мутации в гене миостатина (рис. 17.69).

17.6.10. Животные контролируют общую массу клеток по неизвестному механизму

Размер животного или одного из его органов во многом зависит от числа и размера содержащихся в нем клеток, т. е. от общей массы клеток. Животные способны оценивать общую клеточную массу ткани или органа и регулировать ее: например, часто при искусственном увеличении или уменьшении размера клеток в органе численность клеток изменяется для поддержания нормального размера органа. Это было наиболее ярко показано на саламандрах, в которых размером клеток манипулировали путем изменения их пloidности (во всех организмах размер клетки зависит от пloidности, т. е. от количества генома). Саламандры с различной пloidностью обладают одинаковыми размерами, но содержат разное количество клеток. Отдельные клетки в пентапloidной саламандре примерно в пять раз превышают по объему клетки гапloidной саламандры, и в каждом органе пентапloidов в пять раз меньше клеток, чем в их гапloidных аналогах. В результате размеры органов в этих животных примерно равны (рис. 17.70 и рис. 17.71). Очевидно, в данном случае (и во многих других) размеры органов и организмов зависят от механизмов, способных каким-то образом измерять общую массу клеток. Однако как животные оценивают и подстраивают общую массу, остается неизвестным.

Развитие конечностей и органов определенного размера и формы зависит от сложных позиционных регуляторов, а также от локальных концентраций внеклеточных сигнальных белков, стимулирующих рост, деление и выживание клеток.



Рис. 17.69. Влияние мутации миостатина на размер мышц. Мутация приводит к значительному увеличению массы мышечной ткани, как у этого быка породы бельгийской голубой. Бельгийская голубая выведена скотоводами, и лишь недавно обнаружено, что она несет мутацию гена миостатина. (Из H. L. Sweeny, *Sci. Am.* 291: 62, 2004. С любезного разрешения Scientific American.)

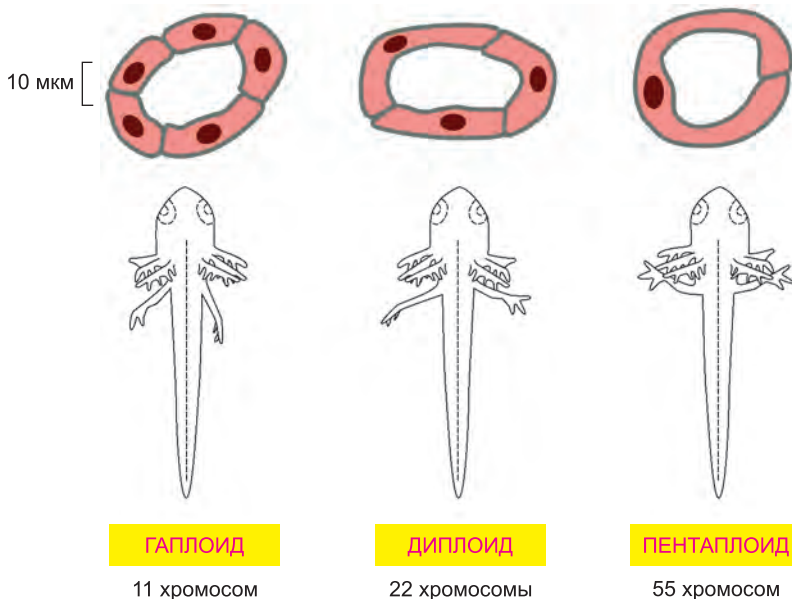


Рис. 17.70. Срезы почечных канальцев личинок саламандры различной плоидности. Во всех организмах, от бактерий до человека, размер клеток пропорционален плоидности. Пентаплоидные саламандры, например, несут значительно более крупные клетки, чем клетки гаплоидных саламандр. Однако животные и их отдельные органы обладают теми же размерами, поскольку ткани в пентаплоидных организмах содержат меньше клеток. Это указывает на то, что размер организма или органа контролируется не простым подсчетом клеточных делений или численности клеток; общая клеточная масса должна каким-то образом регулироваться. (Адаптировано из G. Fankhauser, в *Analysis of Development* [B. H. Willier, P. A. Wiess и V. Hamburger, eds.], стр. 126–150. Philadelphia: Saunders, 1955.)

Как мы обсудим в главе 22, нам известно множество генов, способствующих координации этих процессов в зародыше. Однако еще многое предстоит узнать о том, как эти гены регулируют рост, деление, выживание и дифференциацию клеток и приводят к формированию сложного организма.

Регуляторы, управляющие этими процессами во взрослых организмах, также малопонятны. Например, когда у позвоночных заживает повреждение кожи, для восстановления ткани должна быть регенерирована в правильных количестве, размере и положении примерно дюжина типов клеток — от фибробластов до шванновских клеток. Механизмы, контролирующие рост и пролиферацию клеток в тканях, также лежат в основе нашего понимания рака, болезни, при которой регуляция работает неправильно (см. главу 20).

Заключение

Во многоклеточных организмах размер, деление и гибель клеток точно контролируются, позволяя организмам и органам достичь соответствующего размера и поддерживать его. Митогены стимулируют скорость клеточных делений, удаляя внутриклеточные молекулярные тормоза, ограничивающие входение в G_1 . Факторы роста способствуют росту клеток (увеличению их массы), стимулируя синтез и ингибируя деградацию макромолекул. Для под-

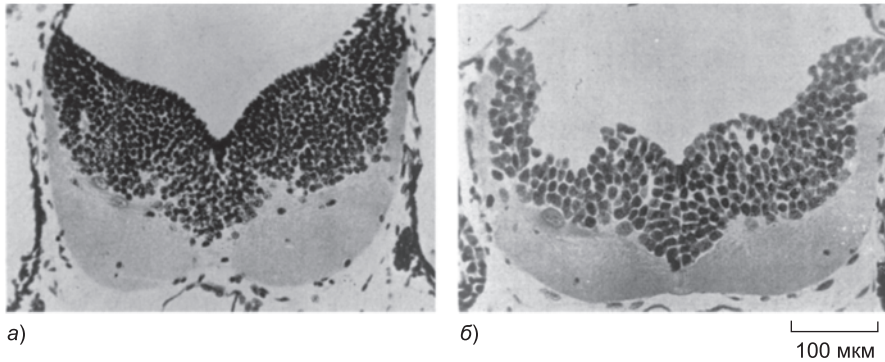


Рис. 17.71. Задний мозг гаплоидной и тетраплоидной саламандры. (а) На данной световой микрофотографии показан поперечный срез заднего мозга гаплоидной саламандры. (б) Аналогичный поперечный срез заднего мозга тетраплоидной саламандры. Видно, как снижение общего числа клеток компенсирует увеличение размеров клеток, в результате чего общий размер заднего мозга у животных разной ploidy одинаков. (Из G. Fankhauser, *Int. Rev. Cytol.* 1: 165–193, 1952. С любезного разрешения издательства Elsevier.)

держания постоянного размера пролиферирующие клетки используют многочисленные механизмы, координирующие клеточный рост и деление. Животные поддерживают нормальный размер тканей и органов, подстраивая размер клеток для компенсации потери их числа, или наоборот. Механизмы этих процессов неизвестны.

ЗАДАЧИ

Какие из этих утверждений соответствуют действительности?

Объясните почему

17.1. Поскольку во взрослом человеке около 10^{13} клеток, и из них примерно 10^{10} погибают и замещаются новыми каждый день, мы становимся новыми людьми каждые три года.

17.2. Регуляция комплексов циклин-Cdk зависит только от фосфорилирования и дефосфорилирования.

17.3. Для поддержания относительно постоянного размера пролиферирующих клеток необходимо, чтобы продолжительность клеточного цикла была равна времени удвоения размера клетки.

17.4. В отличие от других белков, белки комплекса узнавания точки начала репликации остаются связанными с ДНК на протяжении всего клеточного цикла.

17.5. Хромосомы удерживаются в метафазной пластинке равными и противоположно направленными силами, тянущими их к полюсам веретена деления.

17.6. Если бы мы могли включить в наших клетках теломеразную активность, нам бы удалось остановить старение.

Решите следующие задачи

17.7. Многие гены клеточного цикла человеческих клеток нормально функционируют при экспрессии в дрожжах. Почему это считается удивительным? В конце

концов, многие человеческие гены, кодирующие ферменты метаболических реакций, сохраняют активность в дрожжах, и никому это не кажется странным.

17.8. Вы изолировали нового мутанта по *Cdc* почкующихся дрожжей, образующего колонии при 25° С, но не при 37° С. Теперь вы бы хотели выделить ген дикого типа, соответствующих дефектному гену в вашем мутанте *Cdc*. Как вы это сделаете при помощи плазмидной библиотеки ДНК, приготовленной из дрожжевых клеток дикого типа?

17.9. Вы идентифицировали температурно-чувствительного мутанта почкующихся дрожжей. Он пролиферирует при 25° С, но при 37° С на всех клетках формируется крупная почка, останавливающая их клеточный цикл. Характерная морфология дрожжей в момент остановки цикла называется пограничной морфологией.

Очень сложно получить синхронные культуры таких дрожжей, но вам хотелось бы узнать, когда именно в клеточном цикле функционирует продукт температурно-чувствительного гена, для того чтобы закончить цикл. Сообразительный друг, у которого есть хороший микроскоп с подогреваемым предметным столиком и видеокамерой, предлагает вам сделать видеозапись поля клеток по мере увеличения температуры и следить за морфологией клеток, когда в них останавливается клеточный цикл. Поскольку клетки не очень подвижны, довольно легко наблюдать отдельные клетки. Чтобы понять, что вы видите, вы составляете круг из изображений клеток в начале эксперимента в порядке увеличения их дочерних почек. Затем вы находите изображения соответствующих клеток через 6 часов, когда рост и деление полностью остановились. Результаты для вашего мутанта представлены на **рис. Q17.1**.

а. Укажите на схеме на рис. Q17.1, когда функционирует ваш мутант.

б. Соответствует ли время функционирования продукта мутантного гена времени остановки клеточного цикла? Почему?

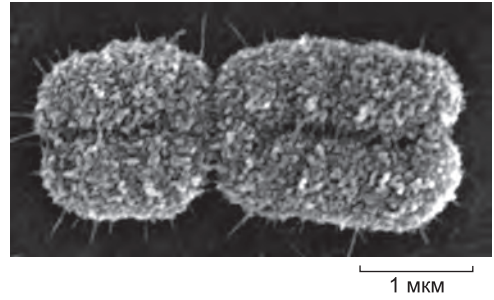
17.10. Субъединицу *Scc1* дрожжевого когезина, необходимую для когезии сестринских хроматид, можно искусственно экспрессировать в любой момент клеточного цикла. Если экспрессию включить в начале S-фазы, клетки удовлетворительно делятся и выживают. С другой стороны, если экспрессия *Scc1* включается после завершения S-фазы, клетки не делятся и погибают, несмотря на то что *Scc1* накапливается в ядре и эффективно взаимодействует с хромосомами. Почему для нормального деления клеток когезин должен присутствовать в ядре во время S-фазы?

17.11. Если когезины соединяют сестринские хроматиды по всей длине, как тогда конденсины формируют такие митотические хромосомы, как



Рис. Q17.1. Фотографии через равные промежутки времени температурозависимого мутанта почкующихся дрожжей (**задача 17.9**). Клетки во *внутреннем кольце* расположены по размеру почки, соответствующему положению в клеточном цикле. После 6 часов при 37° С эти клетки привели к формированию клеток *внешнего кольца*. Дальнейшего роста и деления не происходило.

Рис. Q17.2. Сканирующая электронная микрофотография конденсированной хромосомы клетки позвоночного (задача 17.11). (С любезного разрешения Terry D. Allen.)



например, изображенная на **рис. Q17.2**, у которой сестринские хроматиды представляют собой отдельные домены?

17.12. В клетках млекопитающих высокие дозы кофеина взаимодействуют с контрольной точкой проверки репликации ДНК. Почему же тогда министерства здравоохранения по всему миру до сих пор не выпустили предупреждений для людей, потребляющих много кофе и колы? Обычная чашка кофе (150 мл) содержит 100 мг кофеина (196 г/моль). Сколько чашек кофе вам нужно выпить для того, чтобы получить дозу (10 мМ), необходимую для воздействия на контрольную точку проверки репликации ДНК? (В среднем взрослом человеке содержится примерно 40 литров воды.)

17.13. На **рис. Q17.3** показана живая клетка эпителия легкого тритона на различных стадиях митоза. Расположите эти микрофотографии в правильном порядке и идентифицируйте изображенные на них стадии митоза.

17.14 Сколько кинетохоров в человеческой клетке во время митоза?

17.15. В классической работе установлены признаки, отличающие астральные микротрубочки от кинетохорных. Для инициации роста микротрубочек использовали центросомы, затем добавляли хромосомы. Хромосомы связывались со свободными концами микротрубочек, как показано на **рис. Q17.4**. Затем комплексы разбавляли до очень низкой концентрации тубулина (значительно меньшей, чем критическая концентрация сборки микротрубочек) и заново исследованы (рис. Q17.4). Установлено, что только кинетохорные микротрубочки устойчивы к разбавлению.

а. Почему кинетохорные микротрубочки стабильны?

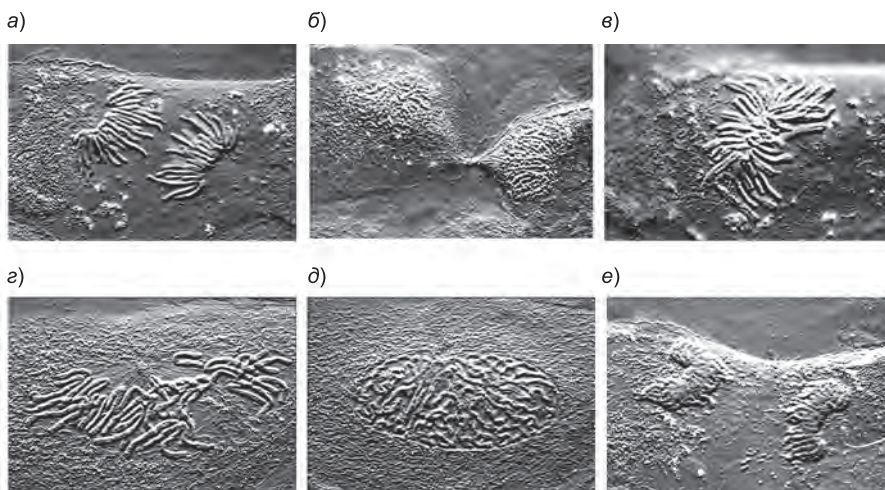


Рис. Q17.3. Световые микрофотографии клетки на различных стадиях М-фазы (задача 17.13). (С любезного разрешения Conly L. Rieder.)

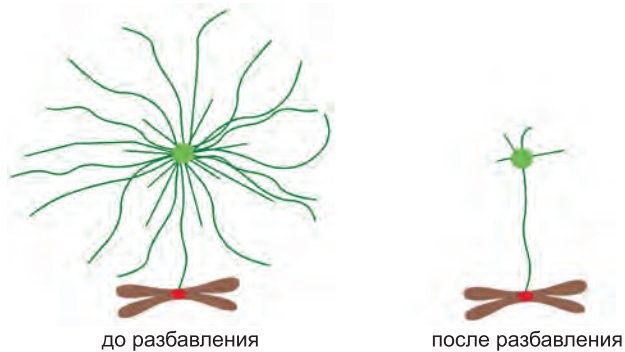


Рис. Q17.4. Центросомы, хромосомы и микротрубочки до и после разбавления до низкой концентрации тубулина (задача 17.15).

б. Как вы объясните исчезновение астральных микротрубочек после разбавления? Они отсоединяются от centrosомы, деполимеризуются со свободного конца или случайным образом разбираются по всей длине?

в. Как временная зависимость после разбавления могла бы помочь понять, какой из возможных механизмов отвечает за исчезновение астральных микротрубочек?

17.16. Какие две цитоскелетные машины лежат в основе механических процессов, управляющих митозом и цитокинезом?

17.17. Чем отличаются друг от друга митогены, факторы роста и факторы выживания?

Литература

Общая

Morgan D. O. (2007) *The Cell Cycle: Principles of Control*. London: New Science Press.

Murray A. W. & Hunt T. (1993) *The Cell Cycle: An Introduction*. New York: W. H. Freeman and Co.

Обзор клеточного цикла

Forsburg S. L. & Nurse P. (1991) Cell cycle regulation in the yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 227–256.

Hartwell L. H., Culotti J., Pringle J. R. et al. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46–51.

Kirschner M., Newport J. & Gerhart J. (1985) The timing of early developmental events in *Xenopus*. *Trends Genet.* 1: 41–47.

Nurse P., Thuriaux P. & Nasmyth K. (1976) Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Gen. Genet.* 146: 167–178.

Система контроля клеточного цикла

Evans T., Rosenthal E. T., Youngblom J. et al. (1983) Cyclin: a protein specified by maternal mRNA in sea urchin eggs that is destroyed at each cleavage division. *Cell* 33: 389–396.

Lohka M.J., Hayes M.K. & Mailer J.L. (1988) Purification of maturation-promoting factor, an intracellular regulator of early mitotic events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 3009–3013.

Masui Y. and Markert C.L. (1971) Cytoplasmic control of nuclear behavior during meiotic maturation of frog oocytes. *J. Exp. Zool.* 177: 129–146.

Morgan D.O. (1997) Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13: 261–291.

Murray A.W. & Kirschner M.W. (1989) Cyclin synthesis drives the early embryonic cell cycle. *Nature* 339: 275–280.

Pavletich N.P. (1999) Mechanisms of cyclin-dependent kinase regulation: structures of Cdks, their cyclin activators, and CIP and Ink4 inhibitors. *J. Mol. Biol.* 287: 821–828.

Peters J.M. (2006) The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 7: 644–656.

Petroski M.D. & Deshaies R.J. (2005) Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 9–20.

Wittenberg C. & Reed S.I. (2005) Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene* 24: 2746–2755.

S-фаза

Arias E.E. & Walter J.C. (2007) Strength in numbers: preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes. Dev.* 21: 497–518.

Bell S.P. & Dutta A. (2002) DNA replication in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* 71: 333–374.

Bell S.P. & Stillman B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357: 128–134.

Diffley J.F. (2004) Regulation of early events in chromosome replication. *Curr. Biol.* 14: R778–R786.

Groth A., Rocha W., Verreault A. et al. (2007) Chromatin challenges during DNA replication and repair. *Cell* 128: 721–733.

Tanaka S., Umemori T., Hirai K. et al. (2007) CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* 445: 328–332.

Zegerman P. & Diffley J.F. (2007) Phosphorylation of Sld2 and Sld3 by cyclin-dependent kinases promotes DNA replication in budding yeast. *Nature* 445: 281–285.

Mumoz

Cheeseman I.M., Chappie J.S., Wilson-Kubalek E.M. et al. (2006) The conserved KMN network constitutes the core microtubule-binding site of the kinetochore. *Cell* 127: 983–997.

Dong Y., Vanden Beldt K.J., Meng X. et al. (2007) The outer plate in vertebrate kinetochores is a flexible network with multiple microtubule interactions. *Nature Cell Biol.* 9: 516–522.

Heald R., Tournebise R., Blank T. et al. (1996) Self-organization of microtubules into bipolar spindles around artificial chromosomes in *Xenopus* egg extracts. *Nature* 382: 420–425.

Hirano T. (2005) Condensins: organizing and segregating the genome. *Curr. Biol.* 15: R265–R275.

Kapoor T. M., Lampson M. A., Hergert P. et al. (2006) Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* 311: 388–391.

Mitchison T. & Kirschner M. (1984) Dynamic instability of microtubule growth. *Nature* 312: 237–242.

Mitchison T. J. (1989) Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. *J. Cell Biol.* 109: 637–652.

Mitchison T. J. & Salmon E. D. (2001) Mitosis: a history of division. *Nature Cell Biol.* 3: E17–E21.

Musacchio A. & Salmon E. D. (2007) The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 8: 379–393.

Nasmyth K. (2002) Segregating sister genomes: the molecular biology of chromosome separation. *Science* 297: 559–565.

Nigg E. A. (2007) Centrosome duplication: of rules and licenses. *Trends* 17: 215–221.

Nurse P. (1990) Universal control mechanism regulating onset of M-phase. *Nature* 344: 503–508.

Page S. L. & Hawley R. S. (2003) Chromosome choreography: the meiotic ballet. *Science* 301: 785–789.

Petronczki M., Siomos M. F. & Nasmyth K. (2003) Un menage a quatre: the molecular biology of chromosome segregation in meiosis. *Cell* 112: 423–440.

Salmon E. D. (2005) Microtubules: a ring for the depolymerization motor. *Curr. Biol.* 15: R299–R302.

Tanaka T. U., Stark M. J. & Tanaka K. (2005) Kinetochore capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 929–942.

Uhlmann F., Lottspeich F. & Nasmyth K. (1999) Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scc1. *Nature* 400: 37–42.

Wadsworth P. & Khodjakov A. (2004) E pluribus unum: towards a universal mechanism for spindle assembly. *Trends Cell Biol.* 14: 413–419.

Цитокинез

Albertson R., Riggs B. & Sullivan W. (2005) Membrane traffic: a driving force in cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 15: 92–101.

Burgess D. R. & Chang F. (2005) Site selection for the cleavage furrow at cytokinesis. *Trends Cell Biol.* 15: 156–162.

Dechant R. & Glotzer M. (2003) Centrosome separation and central spindle assembly act in redundant pathways that regulate microtubule density and trigger cleavage furrow formation. *Dev. Cell* 4: 333–344.

Eggert U. S., Mitchison T. J. & Field C. M. (2006) Animal cytokinesis: from parts list to mechanisms. *Annu. Rev. Biochem.* 75: 543–566.

Glotzer M. (2005) The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307: 1735–1739.

Grill S. W., Gonczy P., Stelzer E. H. et al. (2001) Polarity controls forces governing asymmetric spindle positioning in the *Caenorhabditis elegans* embryo. *Nature* 409: 630–633.

Jurgens G. (2005) Plant cytokinesis: fission by fusion. *Trends Cell Biol.* 15: 277–283.

Rappaport R. (1986) Establishment of the mechanism of cytokinesis in animal cells. *Int. Rev. Cytol.* 105: 245–281.

Регуляция деления и роста клеток

Adhikary S. & Eilers M. (2005) Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 635–645.

Campisi J. (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513–522.

Conlon I. & Raff M. (1999) Size control in animal development. *Cell* 96: 235–244.

Frolov M. V., Huen D. S., Stevaux O. et al. (2001) Functional antagonism between E2F family members. *Genes. Dev.* 15: 2146–2160.

Harrison J. C. & Haber J. E. (2006) Surviving the breakup: the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Genet.* 40: 209–235.

Jorgensen P. & Tyers M. (2004) How cells coordinate growth and division. *Curr. Biol.* 14: R1014–R1027.

Levine A. J. (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331.

Raff M. C. (1992) Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 356: 397–400.

Sherr C. J. & DePinho R. A. (2000) Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell* 102: 407–410.

Sherr C. J. & Roberts J. M. (1999) CDK inhibitors: positive and negative regulators of G₁-phase progression. *Genes. Dev.* 13: 1501–1512.

Trimarchi J. M. & Lees J. A. (2002) Sibling rivalry in the E2F family. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 3: 11–20.

Vousden K. H. & Lu X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev. Cancer.* 2: 594–604.

Zetterberg A. & Larsson O. (1985) Kinetic analysis of regulatory events in G₁ leading to proliferation or quiescence of Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5365–5369.

Апоптоз

Клеточная смерть играет важную роль в индивидуальном развитии животных и растений и, как правило, не прекращается и у взрослых особей. В костном мозге и кишечнике здорового взрослого человека каждый час погибают миллиарды клеток. Наши ткани остаются в целости и сохранности лишь благодаря тому, что деление клеток в точности компенсирует клеточную смерть. Механизмы такой регуляции еще не известны. Сегодня мы знаем, что подобная «нормальная» клеточная смерть, по сути, является самоубийством: клетка запускает внутреннюю программу смерти и управляемо убивает самое себя. Этот процесс известен как **программируемая клеточная смерть**. Идея того, что у животных клеток имеется встроенная программа смерти, выдвинута в 1970-х гг., но для ее всеобщего признания потребовалось еще 20 лет. Эту концепцию убедительно подтвердили генетические исследования, проведенные на нематоде *C. elegans*, в которых впервые идентифицировали гены, ответственные за клеточную смерть и ее регуляцию.

Программируемая клеточная смерть обычно, хоть и не всегда, протекает путем апоптоза (от греческого слова, означающего «отпадение», подобно тому, как опадают листья). Хотя апоптоз — лишь одна из форм программированной клеточной смерти, он встречается несравненно чаще остальных и изучен гораздо лучше, так что биологи зачастую ошибочно используют эти термины как взаимозаменяемые. Клетки, погибающие путем апоптоза, претерпевают характерные морфологические изменения. Они уменьшаются в объеме и уплотняются, их цитоскелет перестраивается, ядерная оболочка разрушается, а ядерный хроматин конденсируется и фрагментируется (рис. 18.1, а). Поверхность клетки часто образует пузырьки, и если клетка большая, то она распадается на окруженные мембраной фрагменты, называемые *апоптотическими тельцами*. Более важно, что поверхность клетки или апоптотических телец претерпевает химические изменения, так что соседние клетки, или макрофаги (специализированные фагоциты, см. главу 23), быстро поглощают их, прежде чем те смогут выплеснуть свое содержимое наружу (рис. 18.1, б). Таким образом, клетки быстро и аккуратно перестают существовать, не вызывая опасной воспалительной реакции. Поскольку клетки поглощаются и рассасываются столь стремительно, обычно можно увидеть лишь небольшое количество клеточных смертей, даже в тех случаях, когда апоптоз претерпевает множество клеток. Вероятно, поэтому биологи много лет не замечали апоптоз и до сих пор не оценили в должной мере его значение.

В противоположность апоптозу и менее изученным формам программированной клеточной смерти (т. е. тем формам, при которых приводится в действие внутриклеточная программа гибели), животные клетки, погибающие случайно в результате повреждения, вызванного травмой или нарушением кровоснабжения, обычно умирают путем так называемого *некроза*. Некротические клетки набухают и разрываются, выплескивая свое содержимое на соседние клетки и вызывая воспалительную реакцию (рис. 18.1, в).

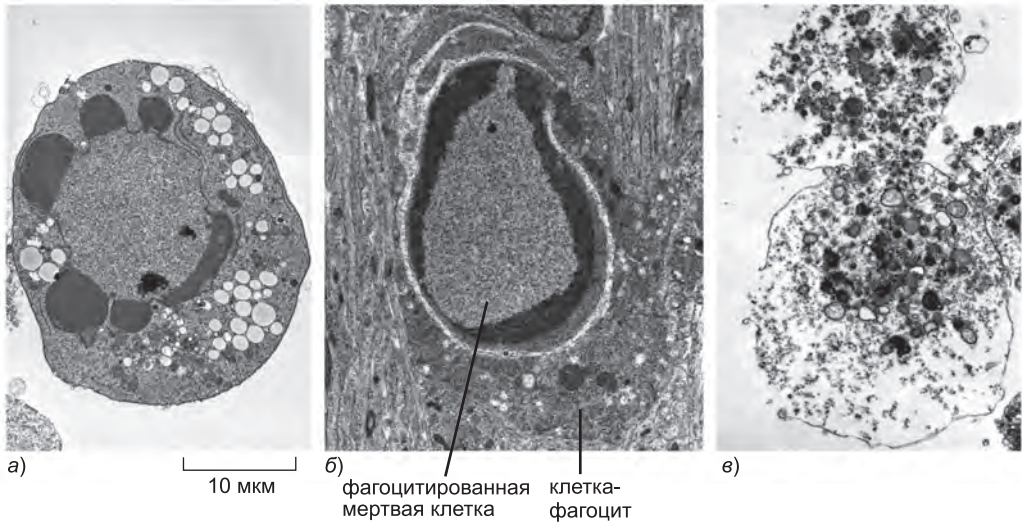


Рис. 18.1. Две различные формы смерти клеток. На этих электронных микрофотографиях показаны клетки, погибающие путем апоптоза (а и б) и неуправляемо — путем некроза (в). Клетки на рисунках (а) и (в) погибли в чашке с культурой клеток, а клетка на рисунке (б) претерпела апоптоз в развивающейся ткани и была поглощена клеткой-фагоцитом. Обратите внимание, что содержимое клеток на рисунках (а) и (б) стало более плотным, хотя форма самих клеток почти не изменилась, а клетка на рисунке (в) выглядит будто бы после взрыва. Большие вакуоли в клетке на рисунке (а) при апоптозе появляются не всегда. (Фотографии предоставлены Julia Burne.)

Программируемая клеточная смерть свойственна не только животным клеткам. У растений это происходит в процессе индивидуального развития и при старении цветов и листьев, а также в ответ на повреждение или инфекцию. Программированная клеточная смерть встречается даже у одноклеточных организмов, включая дрожжи и бактерии. Молекулярные механизмы, участвующие в этих процессах, отличны от тех, что опосредуют апоптоз у животных, и мы не будем их рассматривать. В этой главе мы обсудим функции программированной клеточной гибели у животных, молекулярный механизм апоптоза и его регуляцию, а также то, каким образом слишком частая или, наоборот, недостаточно интенсивная гибель клеток путем апоптоза может приводить к заболеваниям.

18.1. Клетки, подлежащие элиминации, уничтожаются посредством программируемой клеточной смерти

Частота случаев программируемой клеточной смерти в норме в развивающихся и взрослых тканях поразительна. При развитии нервной системы позвоночного, к примеру, в норме больше половины нервных клеток различных типов умирают вскоре после своего возникновения.

Казалось бы, гибель стольких клеток влечет за собой неоправданные расходы, особенно если учесть, что большинство из них в момент самоубийства совершенно здоровы. Для чего же нужны такие массовые самоубийства клеток?

В некоторых случаях ответ ясен. В процессе индивидуального развития животных программируемая клеточная смерть (обычно это апоптоз) элиминирует

клетки, подлежащие уничтожению. К примеру, клеточная смерть помогает сформировать форму руки или ступни в эмбриональном развитии: они закладываются в виде структур, напоминающих по форме лопату, а отдельные пальцы появляются при отмирании клеток между ними, как показано на примере мышинной лапки на [рис. 18.2](#). В других случаях клетки умирают, когда образуемая ими структура больше не нужна. При превращении головастика в лягушку клетки хвоста отмирают, и хвост, в котором лягушка не нуждается, исчезает ([рис. 18.3](#)). Во многих других случаях клеточная смерть помогает регулировать количество клеток. При развитии нервной системы, например, клеточная смерть так подстраивает количество нервных клеток, чтобы оно соответствовало количеству иннервируемых клеток, с которыми нужно установить контакт; это мы обсудим позже.

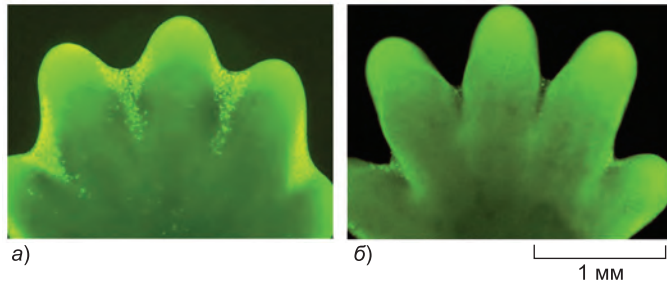


Рис. 18.2. Роль апоптоза в формировании пальцев развивающейся лапы мыши. (а) Лапа этого зародыша мыши окрашена специфическим красителем, отмечающим клетки в состоянии апоптоза. Апоптотические клетки выглядят как яркие зеленые точки в перемычках между развивающимися пальцами. (б) На фотографии, сделанной на следующий день, видно, что клеточная смерть уничтожила ткань между пальцами, и апоптотических клеток почти не осталось. (Из W. Wood et al., *Development* 127: 5245–5252, 2000. С разрешения The Company of Biologists.)

Программируемая клеточная смерть также выполняет функцию контроля качества при индивидуальном развитии, уничтожая нездоровые, оказавшиеся не на своем месте, нефункциональные или потенциально опасные для животного клетки. Яркий пример являет собой адаптивная иммунная система позвоночных, где апоптоз уничтожает развивающиеся Т- и В-лимфоциты, которые либо оказались неспособными производить потенциально полезные антиген-специфичные рецепторы, либо оказались аутореактивными; таким путем погибает также большинство лимфоцитов, активированных инфекцией, после того как они помогли уничтожить возбудителя (см. главу 25).



Рис. 18.3. Апоптоз при метаморфозе головастика в лягушку. Когда головастик превращается в лягушку, клетки его хвоста получают сигнал к апоптозу; вследствие этого хвост отпадает. Повышение концентрации гормонов щитовидной железы в крови стимулирует все изменения, сопутствующие метаморфозу, в том числе и апоптоз.

В тканях взрослого, которые не растут и не становятся меньше, смерть и деление клеток должны тонко регулироваться, чтобы между ними поддерживался точный баланс. Если, к примеру, у взрослой крысы удалить часть печени, то клетки печени начинают делиться чаще, чтобы скомпенсировать потерю. И наоборот, если крысе вводить фенobarбитал, стимулирующий деление клеток печени (и, соответственно, увеличение печени в размерах), а затем прекратить ввод вещества, то частота апоптоза сильно увеличится и будет высокой до тех пор, пока печень не приобретет свой первоначальный размер. Это занимает обычно неделю или около того. Таким образом, постоянство размера печени обеспечивается как за счет регуляции частоты клеточной смерти, так и за счет контроля частоты деления клеток, хотя механизмы, ответственные за эту регуляцию, практически неизвестны.

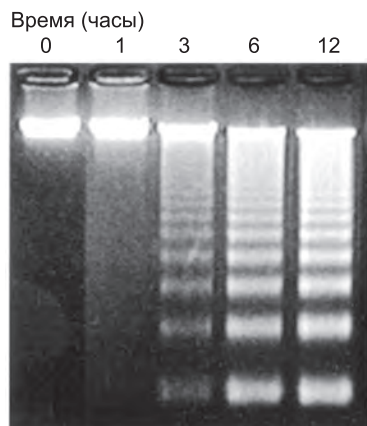
Апоптоз происходит с ошеломляющей частотой в костном мозге взрослого — ткани, где производятся клетки крови. К примеру, в костном мозге нейтрофилы (один из типов белых кровяных телец, обсуждаемых в главе 23) производятся постоянно в очень больших количествах, но подавляющее их большинство гибнет путем апоптоза здесь же, в течение нескольких дней, не успевая выполнить какую-либо функцию. Этот холостой цикл производства и уничтожения необходим для поддержания готового запаса короткоживущих нейтрофилов, который можно было бы быстро мобилизовать для борьбы с инфекцией, когда бы она ни проникла в организм. По сравнению с жизнью целого организма жизнь клетки, очевидно, стоит гораздо меньше.

Животные клетки могут распознавать повреждения в своих многочисленных органеллах, и, если повреждение достаточно сильно, они убивают себя, запуская апоптоз. Важный пример — повреждение ДНК, которое (если система репарации с ним не справится) может привести к образованию раковой клетки. У клеток есть много способов детектирования повреждений ДНК, и в случае, если они не справляются с репарацией, клетки часто губят себя путем апоптоза.

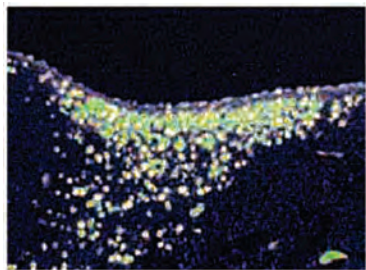
18.2. Апоптозные клетки можно распознать биохимически

Клетки в состоянии апоптоза не только приобретают характерные морфологические признаки, но также претерпевают специфические биохимические изменения, которые можно использовать для определения апоптозных клеток. При апоптозе, например, эндонуклеазы расщепляют хромосомную ДНК на фрагменты специфической длины; поскольку разрывы появляются в области линкеров между нуклеосомами, при анализе этих фрагментов методом гель-электрофореза они выстраиваются в характерную лестничную структуру (**рис. 18.4, а**). Более того, из-за расщепления у ДНК появляется множество новых свободных концов, которые можно увидеть в апоптозных ядрах с помощью так называемого TUNEL-метода, используя меченый нуклеотид (**рис. 18.4, б**).

Особенно важное изменение касается плазматической мембраны апоптозной клетки. Отрицательно заряженный фосфолипид *фосфатидилсерин* обычно расположен исключительно во внутреннем слое липидного бислоя плазматической мембраны (см. **рис. 10.3** и **10.16**), но в апоптозных клетках он перескакивает на внешнюю сторону и может служить маркером таких клеток. Фосфатидилсерин на поверхности апоптозных клеток можно выявить с помощью меченого белка *аннексина V*, который специфически связывается с этим фосфолипидом. Фосфатидилсерин на поверхности клетки — не только удобный маркер апоптоза для биологов; он



а)



б)

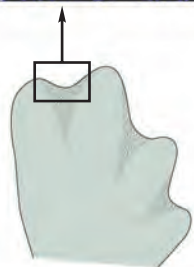


Рис. 18.4. Маркеры апоптоза. (А) Расщепление ДНК на фрагменты характерного размера. Мышинные лимфоциты тимуса подвергли взаимодействию с антителами к находящемуся на поверхности клеток «рецептору смерти» Fas (см. ниже), что приводило к апоптозу. Спустя различные промежутки времени (обозначенные сверху в часах) ДНК выделяли и фрагменты разделяли по размерам методом электрофореза в агарозном геле и окрашивали этидий-бромидом. (Б) С помощью метода TUNEL в ядрах апоптозных клеток на срезе развивающейся почки конечности цыпленка были помечены концы ДНК, образовавшиеся при ее расщеплении; этот срез проходит через кожу и лежащие под ней ткани между развивающимися пальцами, как показано на схеме. Метод TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*) назван так потому, что в нем используется фермент терминальная дезоксиинуклеотидил-трансфераза (TdT), которая присоединяет цепочки меченого нуклеотида (dUTP) к 3'-ОН-концу фрагмента ДНК. (А, из D. McIlroy et al., *Genes Dev.* 14: 549–558, 2000. С разрешения Cold Spring Harbor Laboratory Press; Б, из V. Zuzarte-Luís & J. M. Hurlé, *Int. J. Dev. Biol.* 46: 871–876, 2002. С разрешения издательства UBC Press.)

участвует в передаче соседним клеткам и макрофагам сигнала к фагоцитозу умирающей клетки. Помимо передачи сигнала «съешь меня», он также не дает развиваться воспалению, часто сопутствующему фагоцитозу: фосфатидилсерин-зависимое поглощение апоптозной клетки ингибирует производство клеткой-фагоцитом сигнальных белков (цитокинов), индуцирующих воспаление.

Макрофаги могут фагоцитировать практически любые маленькие частицы, в том числе масляные капельки и стеклянные бусинки, но они не фагоцитируют здоровые клетки в организме животного в основном благодаря тому, что на поверхности

здоровых клеток находятся молекулы, сигнализирующие «не ешь меня». Таким образом, чтобы макрофаг мог поглотить апоптозные клетки, последние, помимо выработки сигналов «ешь меня», стимулирующих фагоцитоз (таких как фосфатидилсерин на поверхности клетки), должны также избавиться от сигнала «не ешь меня» или инактивировать его.

Клетки, претерпевающие апоптоз, часто теряют электрический потенциал, который обычно поддерживается на внутренней мембране их митохондрий (см. главу 14). Этот мембранный потенциал можно измерить, используя положительно заряженные флуоресцентные красители, которые аккумулируются в митохондриях благодаря тому, что обращенная к матриксу поверхность внутренней мембраны митохондрии заряжена отрицательно. Снижение уровня аккумуляции таких красителей в митохондриях помогает идентифицировать клетки, претерпевающие апоптоз. Как мы увидим далее, такие белки, как *цитохром с*, при апоптозе обычно выходят из пространства между внутренней и внешней мембранами митохондрий, и переход *цитохрома с* из митохондрий в цитозоль может служить еще одним маркером апоптоза (см. [рис. 18.7](#)).

18.3. В апоптозе участвует внутриклеточный протеолитический каскад, опосредованный каспазами

Внутриклеточные механизмы, ответственные за апоптоз, схожи у всех животных клеток. В них принимает участие семейство протеаз, у которых в активном сайте имеется цистеин и которые расщепляют белки по остаткам аспарагиновой кислоты. Поэтому они называются **каспазами** (от англ. *caspase*: “с” означает цистеин, “asp” — аспартат). Каспазы синтезируются в клетках в виде неактивных предшественников, или **прокаспаз**, которые, как правило, активируются посредством протеолитического расщепления. Прокаспазы расщепляются по одному или двум особым аспартатам, и это катализируется другими (уже активными) каспазами; прокаспаза разделяется на две субъединицы — большую и маленькую, которые формируют гетеродимер, и два таких димера соединяются вместе, образуя активный тетрамер (рис. 18.5, а). Будучи однажды активированной, каспаза расщепляет, тем самым активируя, другие прокаспазы, приводя к усилению протеолитического каскада (рис. 18.5, б).

Не все каспазы участвуют в апоптозе. В самом деле, первая идентифицированная каспаза — человеческий белок, называемый *интерлейкин-1-конвертирующий фермент* (*interleukin-1-converting enzyme, ICE*), участвующий в воспалительной реакции, а не в процессах клеточной смерти; ICE вырезает индуцирующий воспаление цитокин интерлейкин-1 (IL1) из большого белка-предшественника. Вслед за открытием ICE показано, что ген, необходимый для апоптоза у *C. elegans*, кодирует белок, который структурно и функционально подобен ICE. Это явилось первым доказательством того, что при апоптозе происходит протеолиз и что каспазы участвуют в этом процессе. Теперь ясно, что, хотя несколько человеческих каспаз принимают участие в воспалительных и иммунных реакциях, большинство из них участвуют в апоптозе (таблица 18.1).

Как показано на рис. 18.5, б и в таблице 18.1, некоторые из прокаспаз, задействованных в апоптозе, запускают протеолитический каскад и называются инициаторными прокаспазами; будучи активированными, они расщепляют и активируют следующие, эффекторные каспазы, которые затем подвергают процессингу и активируют другие эффекторные каспазы, а также расщепляют определенные белки-мишени в клетке. Среди этих многих белков-мишеней, подвергающихся протеолизу со стороны эффекторных каспаз, — белки ядерной ламинаы (см. рис. 18.5, б), расщепление которых вызывает необратимое разрушение ядерной ламинаы (см. главу 16). Другая мишень — белок, который в норме удерживает фермент, разрушающий ДНК (эндонуклеазу) в неактивной форме; его расщепление позволяет эндонуклеазе разрезать ДНК в ядре клетки. Кроме того, мишенями являются компоненты цитоскелета и белки клеточной адгезии, которые стыкуют клетки с их соседями; разрушение этих белков помогает апоптозной клетке принять округлую форму и разорвать соединения с соседними клетками, что облегчает поглощение клетки соседями или, в случае эпителиальных клеток, удаление апоптозной клетки из клеточного слоя. Каспазный каскад не только приносит разрушения и сам себя усиливает, но также является необратимым, так что если клетка достигает критической точки на пути к самоуничтожению, то для нее обратной дороги нет.

В зависимости от типа клетки и стимула для апоптоза могут потребоваться разные каспазы. Например, у мыши инактивация гена, кодирующего каспазу-3

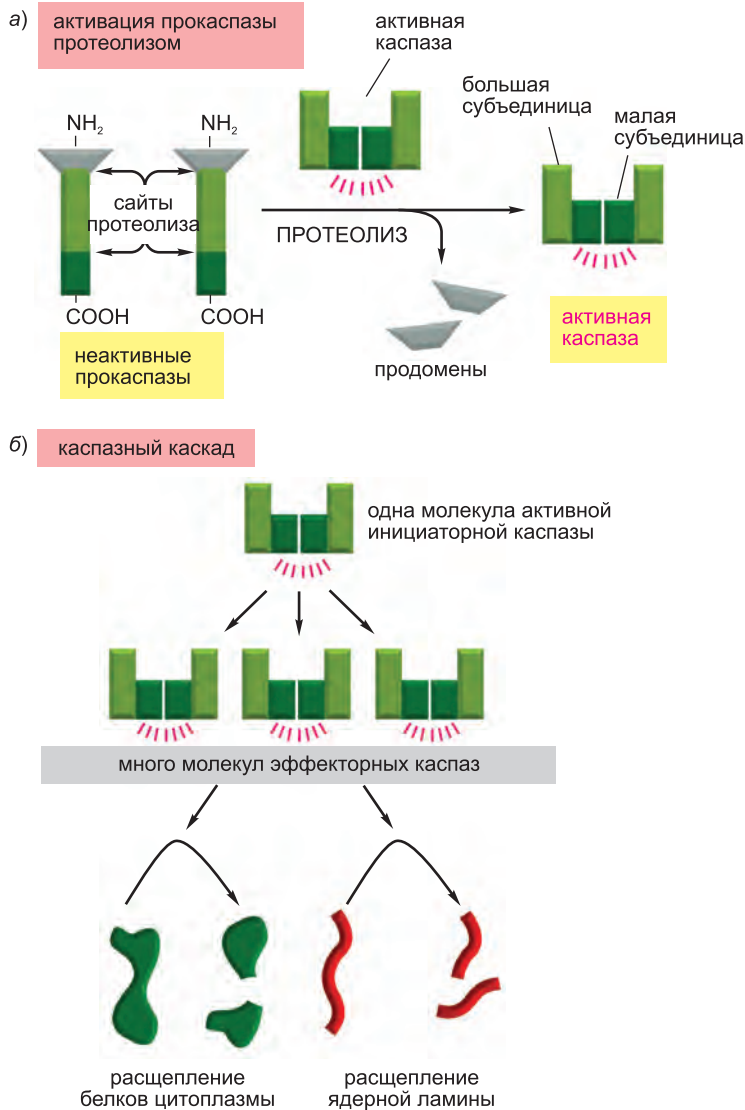


Рис. 18.5. Активация прокаспаз при апоптозе. (а) В клетке все каспазы находятся в виде фермента-предшественника (прокаспазы). Некоторые прокаспазы активируются протеолитическим расщеплением, которое осуществляет активированная к тому времени каспаза: по два фрагмента от каждой подвергшейся протеолизу прокаспазы образуют активную каспазу, представляющую собой тетрамер из двух малых и двух больших субъединиц; продомены, как показано на рисунке, обычно не участвуют в дальнейших процессах. (б) Прокаспазы, активируемые в первую очередь, носят название инициаторных. Они расщепляют и активируют многие эффекторные прокаспазы, запуская самоусиливающуюся цепную реакцию (протеолитический каспазный каскад). Эффекторные каспазы затем расщепляют многие ключевые клеточные белки, в том числе, как отмечено на рисунке, отдельные белки цитоплазмы и ядерной ламины, что приводит к управляемой смерти клетки. Инициаторные прокаспазы активируются адаптерными белками, которые способствуют сильному сближению прокаспаз и формированию активационного комплекса (здесь не отображено); несмотря на то что инициаторные прокаспазы, будучи объединенными в комплекс, расщепляют друг друга, это расщепление служит лишь для стабилизации активной протеазы.

Таблица 18.1. Некоторые каспазы человека

ФУНКЦИЯ	ВИД КАСПАЗЫ
Учаие в воспалительной реакции	каспазы-1 (ICE), -4, -5
Учаие в апоптозе	
Инициаторные	каспазы-2, -8, -9, -10
Эффекторные	каспазы-3, -6, -7

(эффекторную), снижает уровень апоптоза в развивающемся мозге. В результате этого мышь часто умирает вскоре после рождения, а мозг ее оказывается деформированным и содержит слишком много клеток. Однако во многих других органах такой мыши апоптоз протекает нормально.

Начиная с самых ранних стадий индивидуального развития животного, здоровые клетки непрерывно производят прокаспазы и другие белки, необходимые для апоптоза. Таким образом, в любой момент в клетке есть все, что требуется для апоптоза, нужен лишь стимул для его запуска. Как же инициируется каспазный каскад? В частности, как активируется первая прокаспаза в каскаде? Инициаторные прокаспазы имеют длинный *продомен*, в состав которого входит *домен рекрутирования каспазы* (*caspase recruitment domain, CARD*). Благодаря этому домену прокаспазы могут формировать *активационные комплексы* с адаптерными белками в ответ на сигнал к апоптозу. В подобном комплексе инициаторные прокаспазы оказываются столь близко друг к другу, что могут стать активными; тогда они расщепляют друг друга, делая процесс необратимым. Затем активированные инициаторные прокаспазы расщепляют и активируют эффекторные прокаспазы, запуская протеолитический каспазный каскад. Таким образом сигнал смерти передается всей клетке.

Наилучшим образом описаны два пути активации каспазного каскада, который ведет к апоптозу в клетках млекопитающих, — *внешний и внутренний*. Как мы сейчас увидим, для каждого из них характерны свои, особые инициаторные прокаспазы и активационные комплексы.

18.4. Внешний путь активации апоптоза лежит через рецепторы смерти, находящиеся на поверхности клетки

Внеклеточные сигнальные белки, связывающиеся **death-рецепторами (рецепторами смерти)** на поверхности клетки, запускают апоптоз по **внешнему пути**. Рецепторы смерти представляют собой трансмембранные белки, единственный трансмембранный домен которых связывается с лигандом, а внутриклеточный «*домен смерти*» необходим для активации программы апоптоза. Рецепторы являются гомотримерами и принадлежат к семейству *рецепторов факторов некроза опухоли* (*tumor necrosis factors, TNF*), которое включает в себя рецептор самого TNF (см. главу 15) и рецептор смерти *Fas*. Лиганды, активирующие рецепторы смерти, также представляют собой гомотримеры; они схожи по структуре и принадлежат к одному и тому же семейству сигнальных белков *TNF*.

Известный пример того, как рецепторы смерти запускают внешний путь апоптоза, представляет собой активация *Fas* на поверхности клетки-мишени *Fas*-лигандом, располагающимся на поверхности лимфоцита-киллера (цитотоксического лимфоцита; см. главу 25). При присоединении лиганда *Fas*-рецептор активиру-

ется, и его цитоплазматический домен смерти связывает внутриклеточные адаптерные белки, которые, в свою очередь, связывают инициаторные прокаспазы-8 и/или -10. В результате образуется **DISC-комплекс** (*death-inducing signaling complex* — сигнальный комплекс, индуцирующий смерть). Становясь активными в DISC-комплексе, инициаторные каспазы активируют эффекторные прокаспазы и индуцируют апоптоз (рис. 18.6). Как мы обсудим позже, в некоторых клетках внешний путь должен задействовать также и внутренний путь апоптоза, чтобы усилить каспазный каскад и убить клетку.

Многие клетки вырабатывают белки-ингибиторы, препятствующие передаче сигнала смерти и действующие как вне, так и внутри клетки. Например, некоторые из клеток экспрессируют на своей поверхности *рецепторы-приманки*, у которых есть лиганд-связывающий домен, но нет домена смерти; поскольку такие рецепторы могут связать лиганд смерти, не активируя апоптоз, они конкурентно ингибируют рецепторы смерти. Клетки также вырабатывают внутриклеточные белки-блокаторы, подобные инициаторной прокаспазе, но только без протеолитического домена. К таким белкам относится белок *FLIP*; он конкурирует с прокаспазой-8 и прокаспазой-10 за сайты связывания на DISC, ингибируя тем самым активацию

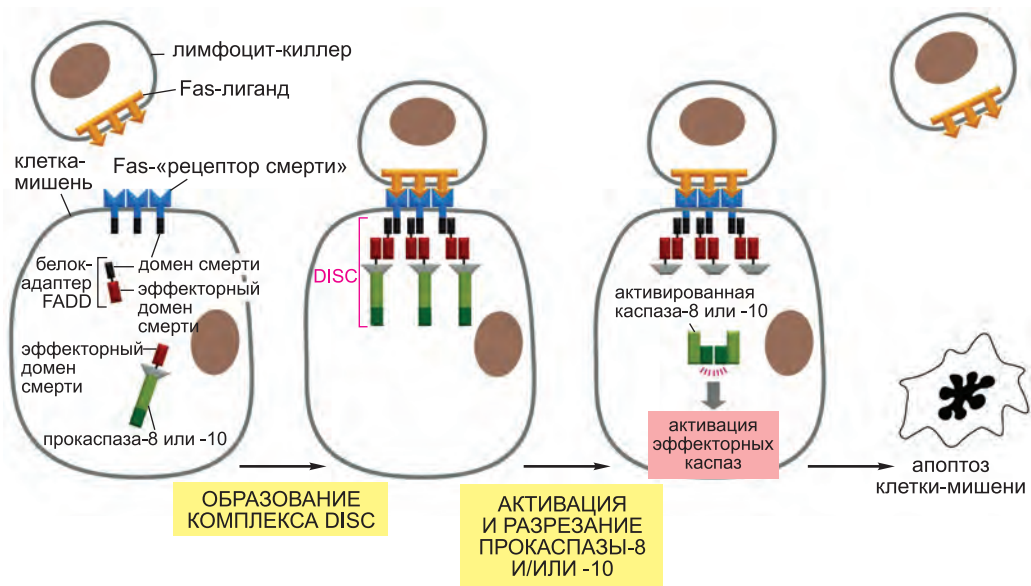


Рис. 18.6. Внешний путь запуска апоптоза активируется через «рецепторы смерти» Fas. Fas-лиганд на поверхности лимфоцита-киллера активирует Fas-рецепторы смерти на поверхности клетки-мишени. Как лиганд, так и рецептор являются гомотримерами. Затем цитоплазматическая часть Fas и белок-адаптер FADD стыкуются друг с другом через домен смерти, имеющийся на каждом из белков (FADD расшифровывается как *Fas-associated death domain*). Каждый FADD-белок образует комплекс с инициаторной прокаспазой (прокаспазой-8, прокаспазой-10 или обеими прокаспазами) через эффекторный домен смерти, имеющийся и на FADD, и на прокаспазе. Таким образом формируется DISC (*death-induced signaling complex*). Молекулы инициаторных прокаспаз в этом комплексе находятся очень близко друг от друга, что приводит к их активации; затем активированные прокаспазы разрезают друг друга, в результате чего активированные протеазы стабилизируются и превращаются в каспазы. После этого активированные каспазы-8 и каспазы-10 разрезают и активируют эффекторные прокаспазы, вызывая каспазный каскад, приводящий к апоптозу.

инициаторных прокаспаз. Подобные механизмы ингибирования помогают предотвратить спонтанный запуск апоптоза по внешнему пути.

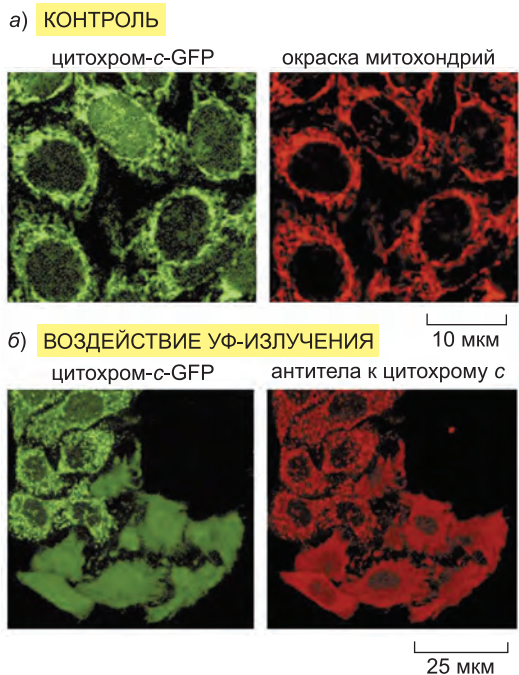
При некоторых обстоятельствах рецепторы смерти передают другие внутриклеточные сигналы, не приводящие к апоптозу. К примеру, TNF-рецепторы могут также активировать NF κ B-путь (см. главу 15), который может способствовать выживанию клетки и активирует гены, участвующие в воспалительной реакции. Какой ответ будет преобладать — зависит от типа клетки и от поступающих к ней сигналов.

18.5. В запуске апоптоза по внутреннему пути участвуют митохондрии

Клетки могут также запускать свою программу апоптоза изнутри, обычно в ответ на стрессовое воздействие, такое как повреждение ДНК или недостаток кислорода, питательных веществ или внеклеточных сигналов выживания (см. ниже). В клетках позвоночных такая внутриклеточная активация апоптотической программы смерти происходит особым образом: в цитоплазму выходят митохондриальные белки, в норме находящиеся в межмембранном пространстве этих органелл (см. рис. 12.21, а). Некоторые из вышедших в цитоплазму белков активируют там каспазный протеолитический каскад, что приводит к апоптозу.

Среди белков митохондрий, участвующих в запуске апоптоза изнутри клетки, особую роль играет **цитохром с**, водорастворимый компонент митохондриальной электрон-транспортной цепи. В цитоплазме (рис. 18.7) он выполняет совершенно другую функцию: он связывается с адаптерным белком Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1* — *апоптотический фактор активации протеаз*), активирующим прокаспазу, в результате чего Apaf1 олигомеризуется, образуя колесовидный гептамер, получивший название **апоптосомы**. Белки Apaf1 затем связывают

Рис. 18.7. Выход цитохрома с из митохондрии при апоптозе. Флуоресцентные микрофотографии раковых клеток человека в культуре. (а) В контрольные клетки введен ген, кодирующий гибридный белок, состоящий из цитохрома с, связанного с зеленым флуоресцентным белком (цитохром-с-GFP); кроме того, они содержали положительно заряженный красный краситель, накапливающийся в митохондриях. Перекрывание распределений красного и зеленого говорит о том, что цитохром-с-GFP локализован в митохондриях. (б) Клетки, экспрессирующие цитохром-с-GFP, подвергали действию ультрафиолетового излучения, вызывающего апоптоз, и спустя 5 часов окрасили антителами к цитохрому с (красный цвет); зеленым показано распределение цитохрома-с-GFP. В шести клетках в нижней части микрофотографий на рисунке (б) цитохром с вышел из митохондрий в цитоплазму, а в остальных — еще нет. (Из J. C. Goldstein et al., *Nat. Cell Biol.* 2: 156-162, 2000. С разрешения издательства Macmillan Publishers Ltd.)



инициаторные прокаспазы (*прокаспазу-9*), которые активируются, сближаясь друг с другом в апоптосоме, точно так же, как прокаспазы-8 и -10 активируются в комплексе DISC. Молекулы активной каспазы-9 затем активируют следующие — эффекторные — прокаспазы и индуцируют апоптоз (рис. 18.8).

Как упомянуто выше, в некоторых клетках внешний путь запуска апоптоза нуждается в поддержке внутреннего пути для усиления сигнала к убийству клетки. Это происходит через активацию белка, принадлежащего к семейству *Bcl2*, к обсуждению чего мы сейчас перейдем.

18.6. Белки Bcl2 регулируют внутренний путь запуска апоптоза

Внутренний путь запуска апоптоза строго контролируется, чтобы самоубийство клеток происходило только тогда, когда это необходимо. Большой класс внутриклеточных регуляторов апоптоза составляет семейство белков **Bcl2**, которые, подобно каспазам, практически одинаковы у всех животных — от червей до человека; человеческий белок Bcl2, к примеру, может подавлять апоптоз, если его экспрессировать в *C. elegans*.

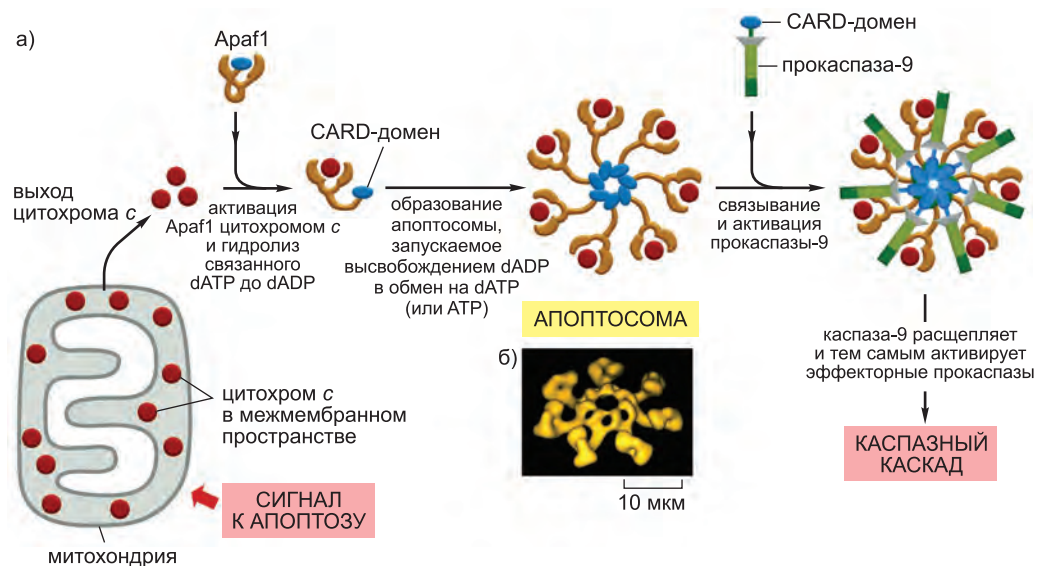


Рис. 18.8. Внутренний путь апоптоза. (а) Схема активации Apaf1 вышедшим в цитоплазму цитохромом с. Связывание с цитохромом с приводит к тому, что Apaf1 гидролизует связанный с ним dATP до dADP (не показано). Замена dADP на dATP или ATP (не показано) индуцирует образование большой гексамерной апоптосомы, состоящей из комплексов Apaf1 с цитохромом с, после чего апоптосома связывает прокаспазу-9 с помощью CARD-домена (caspase recruitment domain), имеющегося на каждом из участвующих белков. В составе апоптосомы молекулы прокаспазы-9 активируются и становятся способными к расщеплению и активации следующих — эффекторных — прокаспаз. Другие белки, высвобожденные из межмембранного пространства, не показаны. (б) Модель трехмерной структуры апоптосомы. Обратите внимание, что некоторые специалисты употребляют термин «апоптосома» по отношению к комплексу, содержащему прокаспазу-9. (б, из D. Aceham et al., *Mol. Cell* 9: 423–432, 2002. С разрешения издательства Elsevier.)

Белки Bcl2 млекопитающих регулируют внутренний путь запуска апоптоза, контролируя выход цитохрома *c* и других межмембранных митохондриальных белков в цитоплазму. Некоторые белки Bcl2 являются проапоптотическими и способствуют апоптозу, ускоряя высвобождение белков в цитоплазму, в то время как другие являются антиапоптотическими и ингибируют апоптоз, препятствуя выходу белков. Проапоптотические и антиапоптотические белки Bcl2 могут в различных комбинациях связываться друг с другом, образуя гетеродимеры, в которых два белка ингибируют активность друг друга. Баланс активностей этих двух функциональных классов белков Bcl2 во многом определяет, выживет ли клетка или погибнет путем апоптоза, запущенного изнутри нее.

Как показано на [рис. 18.9](#), антиапоптотические белки Bcl2, включая сам белок Bcl2 (главный член семейства Bcl2) и Bcl-X_L, имеют в своем составе четыре различных ВН-домена (Bcl2 homology (BH) domains, BH1-4). Проапоптотические белки Bcl2 состоят из двух суперсемейств — белки BH123 и белки, включающие только BH3 (BH3-only proteins). Основными белками BH123 являются Bax и Bak, структурно подобные Bcl2, но без домена BH4. Белки, содержащие лишь домен BH3, гомологичны Bcl2 только в той части последовательности, которая отвечает этому домену (см. рис. 18.9).

Когда сигнал к апоптозу запускает внутренний путь, проапоптотические **BH123-белки** активируются и агрегируют с образованием олигомеров во внешней мембране митохондрий, запуская высвобождение цитохрома *c* и других межмембранных белков по неизвестному механизму ([рис. 18.10](#)). В клетках млекопитающих **Bax** и **Bak** — основные BH123-белки, и по крайней мере один из них необходим для запуска апоптоза изнутри: мутантные клетки мыши, лишенные обоих белков, не чувствительны к проапоптотическим сигналам, которые обычно активируют этот путь. В то время как Bak прочно связан с внешней мембраной митохондрии даже в отсутствие сигнала к апоптозу, Bax по большей части локализуется в цитоплазме и доставляется на поверхность митохондрии только после того, как апоптотический сигнал активирует его. Как мы увидим позже, в активации Bax и Bak обычно участвуют активированные проапоптотические белки с единственным доменом BH3. Кроме того, как Bax, так и Bak функционируют на поверхности эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и ядерной мембраны; считают, что, будучи активированным в ответ на повреждение ЭПР, они способствуют выходу Ca²⁺ в цитоплазму, и это

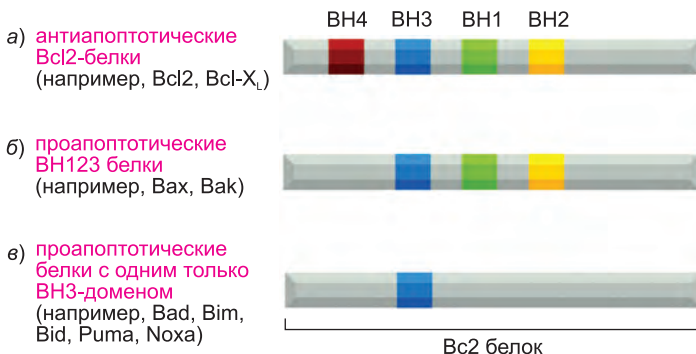


Рис. 18.9. Три класса Bcl2-белков. Обратите внимание, что только один домен присущ всем белкам семейства Bcl2 — это домен BH3; он участвует в прямом взаимодействии между проапоптотическими и антиапоптотическими белками.

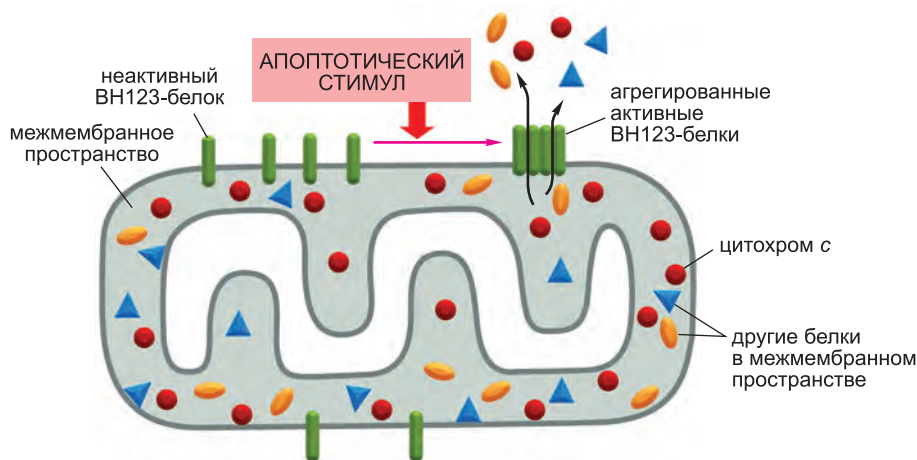


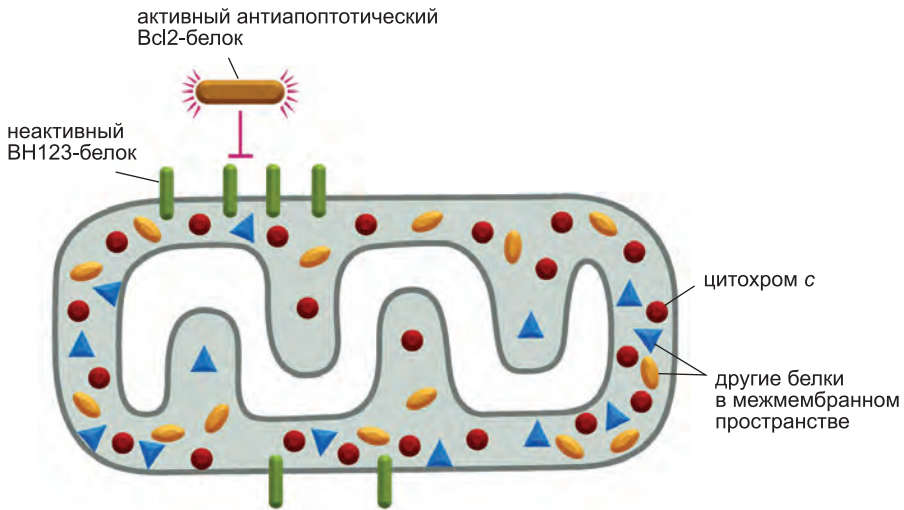
Рис. 18.10. Роль проапоптотических Bcl2-белков семейства Bcl2 (в основном Bax и Bak) в высвобождении митохондриальных межмембранных белков при запуске апоптоза по внутреннему пути. Активированные стимулом к апоптозу Bcl2-белки агрегируют на внешней мембране митохондрии и высвобождают цитохром c и другие белки из межмембранного пространства по неизвестному механизму.

помогает запустить апоптоз изнутри клетки с участием митохондрии по плохо изученному механизму.

Антиапоптотические белки, такие как сам **Bcl2** и **Bcl-X_L**, также локализованы по большей части на цитоплазматической поверхности внешней мембраны митохондрий, ЭПР и ядерной оболочки, помогая сохранить целостность мембраны, например, предотвращая несвоевременное высвобождение межмембранных белков из митохондрии либо Ca^{2+} из ЭПР. Эти белки подавляют апоптоз в основном за счет связывания проапоптотических Bcl2-белков и их ингибирования — как на упомянутых мембранах, так и в цитоплазме. На внешней мембране митохондрий, к примеру, они связывают Bak и предотвращают его олигомеризацию, тем самым ингибируя высвобождение цитохрома c и других межмембранных белков. У млекопитающих имеется по меньшей мере пять антиапоптотических Bcl2-белков, и каждой клетке млекопитающего необходим для выживания хотя бы один из них. Более того, для успешной активации апоптоза изнутри клетки количество таких белков должно уменьшиться; в этом участвуют белки, содержащие лишь домен BH3.

BH3-only-белки представляют собой наиболее широкий подкласс в семействе белков Bcl2. Клетка либо вырабатывает, либо активирует их в ответ на сигнал к апоптозу, и считается, что они способствуют апоптозу в основном за счет ингибирования антиапоптотических Bcl2-белков. Их BH3-домен связывается с длинным гидрофобным желобом антиапоптотических Bcl2-белков, нейтрализуя их активность. По недостаточно изученному механизму это связывание и ингибирование позволяет Bax и Bak агрегировать на поверхности митохондрии, что вызывает апоптоз (**рис. 18.11**). Некоторые из BH3-only-белков могут связываться непосредственно с Bax и Bak, способствуя активации и агрегации этих BH3-проапоптотических белков на поверхности митохондрий, тем самым облегчая выход межмембранных белков.

а) ВНУТРЕННИЙ ПУТЬ АПОПТОЗА НЕ АКТИВИРОВАН



б) АКТИВАЦИЯ ВНУТРЕННЕГО ПУТИ АПОПТОЗА

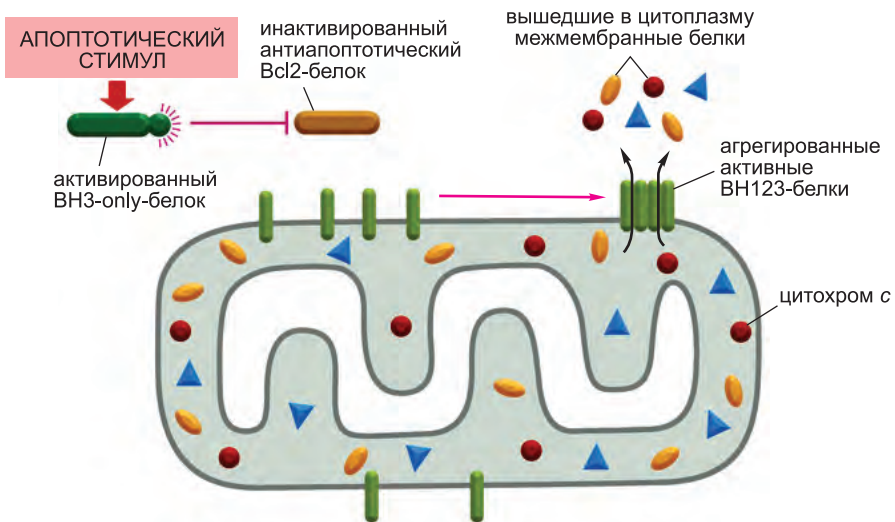


Рис. 18.11. Регуляция внутреннего пути апоптоза проапоптотическими BH3-only- и антиапоптотическими Bcl2-белками. (а) В отсутствие апоптотического стимула антиапоптотические Bcl2-белки связываются с BH123-белками на внешней мембране митохондрии (а также в цитоплазме; на рисунке не отображено) и ингибируют их. (б) При поступлении сигнала к апоптозу BH3-only-белки активируются и связываются с антиапоптотическими Bcl2-белками, блокируя их способность ингибировать BH123-белки, которые теперь становятся активными и агрегируют на внешней митохондриальной мембране, способствуя выходу белков из межмембранного пространства в цитоплазму. Некоторые активированные BH3-only-белки могут стимулировать высвобождение митохондриальных белков, напрямую связываясь с BH123-белками и активируя их. Антиапоптотические Bcl2-белки связаны с поверхностью митохондрии (не показано).

BH3-only-белки являются принципиальным соединительным звеном между сигналами к апоптозу и активацией апоптоза изнутри клетки, причем различные стимулы активируют различные *BH3-only*-белки. Когда какая-либо клетка перестает получать достаточное количество внеклеточных сигналов выживания, внутриклеточный сигнальный путь, в котором участвует MAP-киназа *JNK*, активирует транскрипцию гена, кодирующего *BH3-only*-белок *Bim*, который затем запускает внутренний путь апоптоза. Аналогично в ответ на неисправимое повреждение ДНК накапливается белок-супрессор опухоли **p53** (см. главы 17 и 20), активирующий транскрипцию генов, которые кодируют *BH3-only*-белки *Puma* и *Noxa*; эти *BH3-only*-белки вслед за тем запускают апоптоз изнутри клетки, тем самым уничтожая потенциально опасную клетку, которая иначе могла бы стать раковой.

Как упомянуто выше, в некоторых клетках внешний путь требует запуска внутреннего пути для усиления каспазного сигнала и убийства клетки. *BH3-only*-белок *Bid* связывает два этих пути. Когда рецепторы смерти активируют внешний путь в этих клетках, инициаторная каспаза, каспаза-8, разрезает *Bid*, образуя деформированную форму белка *Bid*, называемую *tBid* [от англ. *truncated* — искаженный — прим. пер.]. *tBid* перемещается к поверхности митохондрий, где ингибирует антиапоптотические *Bcl2*-белки и запускает агрегацию проапоптотических *BH123*-белков, способствуя высвобождению цитохрома *c* и других межмембранных белков, тем самым усиливая сигнал апоптоза.

BH3-only-белки *Bid*, *Bim* и *Puma* (см. рис. 18.9) могут ингибировать все антиапоптотические *Bcl2*-белки, в то время как другие *BH3-only*-белки способны ингибировать лишь небольшой набор антиапоптотических белков. Таким образом, *Bid*, *Bim* и *Puma* являются наиболее мощными активаторами апоптоза в подсемействе *BH3-only*-белков *Bcl2*.

Bcl2-белки — не единственные внутриклеточные регуляторы апоптоза. Белки *IAP* (*inhibitor of apoptosis*) также играют важную роль в подавлении апоптоза, особенно у *Drosophila*.

18.7. Белки IAP ингибируют каспазы

Ингибиторы каспаз (*IAP*, *inhibitors of apoptosis*) впервые обнаружены в составе некоторых вирусов насекомых (бакуловирусов), кодирующих *IAP*-белки для предотвращения самоубийства инфицированной клетки-хозяина. (Зараженные вирусом клетки животных зачастую уничтожают сами себя, чтобы предотвратить размножение вируса и инфицирование других клеток.) Известно, что многие клетки животных также вырабатывают *IAP*-белки.

Все *IAP*-белки содержат одну или несколько последовательностей *BIR* (*baculovirus IAP repeats*, *повторы бакуловирусных IAP*), которые позволяют им связываться с активированными каспазами и ингибировать их. Некоторые *IAP*-белки, кроме того, обладают способностью полиубиквитинировать каспазы, обрекая их на разрушение в протеасоме. Таким образом, *IAP*-белки устанавливают определенный порог концентрации активных каспаз, который необходимо превысить для запуска апоптоза.

У *Drosophila* по крайней мере этот порог ингибирования, обусловленный *IAP*-белками, может быть нейтрализован анти-*IAP*-белками, вырабатываемыми в ответ на различные апоптотические стимулы. У фруктовой мушки известны пять анти-*IAP*-белков, включая *Reaper*, *Grim* и *Hid*, и по структуре они сходны лишь своим коротким N-концевым *IAP*-связывающим доменом, который соединяется с *BIR*-

доменом IAP-белка, предотвращая его взаимодействие с каспазой. Удаление трех генов, кодирующих *Reaper*, *Grim* и *Hid*, блокирует апоптоз у мушек. И обратно, инактивация одного из двух генов, кодирующих IAP-белки у *Drosophila*, приводит к тому, что все клетки развивающегося зародыша мушки претерпевают апоптоз. Очевидно, что равновесие между IAP- и анти-IAP-белками строго контролируется и играет принципиальную роль в управлении апоптозом у плодовой мушки.

Роль анти-IAP-белков в апоптозе у млекопитающих менее ясна. Как показано на [рис. 18.12](#), анти-IAP-белки выходят из межмембранного пространства митохондрий при активации внутреннего пути апоптоза, блокируя IAP-белки в цитоплазме и запуская таким образом апоптоз. Однако если в клетках мыши гены, кодирующие два известных анти-IAP-белка млекопитающих, *Smac* (также называемый *DIABLO*) и *Omi*, инактивировать, то уровень апоптоза остается практически неизменным, отсюда и противоречивость данных об их роли в регуляции апоптоза в норме.

Резюмируя, можно сказать, что суммарная активность Bcl2-, IAP- и анти-IAP-белков определяет чувствительность животных клеток к стимулам, вызывающим апоптоз, причем у плодовых мушек более активны IAP- и анти-IAP-белки, а у млекопитающих — Bcl2-белки.

18.8. Внеклеточные факторы выживания различными способами ингибируют апоптоз

Как обсуждалось в главе 15, межклеточные сигналы регулируют большинство процессов жизнедеятельности животных клеток, включая апоптоз. Эти внеклеточные сигналы являются частью обычного «социального» контроля, обеспечивающего поведение индивидуальных клеток, выгодное для целого организма, в данном случае — выживание, если эти клетки нужны, или самоуничтожение, если не нужны. Некоторые внеклеточные сигнальные молекулы стимулируют апоптоз, в то время как другие ингибируют его. Мы уже обсуждали сигнальные белки, такие как Fas-лиганд, активирующий рецептор смерти и запускающий тем самым внешний путь апоптоза. Другие сигнальные молекулы, стимулирующие апоптоз, особенно важны при индивидуальном развитии животного: например, увеличение концентрации гормонов щитовидной железы в крови на определенной стадии метаморфоза является сигналом к апоптозу клеток хвоста у головастика (см. [рис. 18.3](#)), а белки костного морфогенеза (BMP, bone morphogenic proteins, см. главы 15 и 22) стимулируют самоубийство клеток перепонки между пальцами рук и ног при их развитии (см. [рис. 18.2](#)). Здесь, однако, мы сфокусируем внимание на сигнальных молекулах, ингибирующих апоптоз, которые объединяются под общим названием **факторов выживания**.

Большинству животных клеток необходимо постоянно получать сигналы от других клеток, чтобы избежать апоптоза. Это поразительное обстоятельство позволяет выживать клеткам лишь в том случае, когда они необходимы и только там, где это нужно. Нервные клетки, к примеру, при развитии нервной системы производятся в избытке, а затем конкурируют за ограниченное количество факторов выживания, выделяемых теми клетками, с которыми обычно устанавливается контакт. Выживают нервные клетки, получающие достаточное количество факторов выживания подходящего типа, а остальные отмирают. Таким образом, количество выживших нейронов автоматически приводится в соответствие числу клеток, с которыми они устанавливают

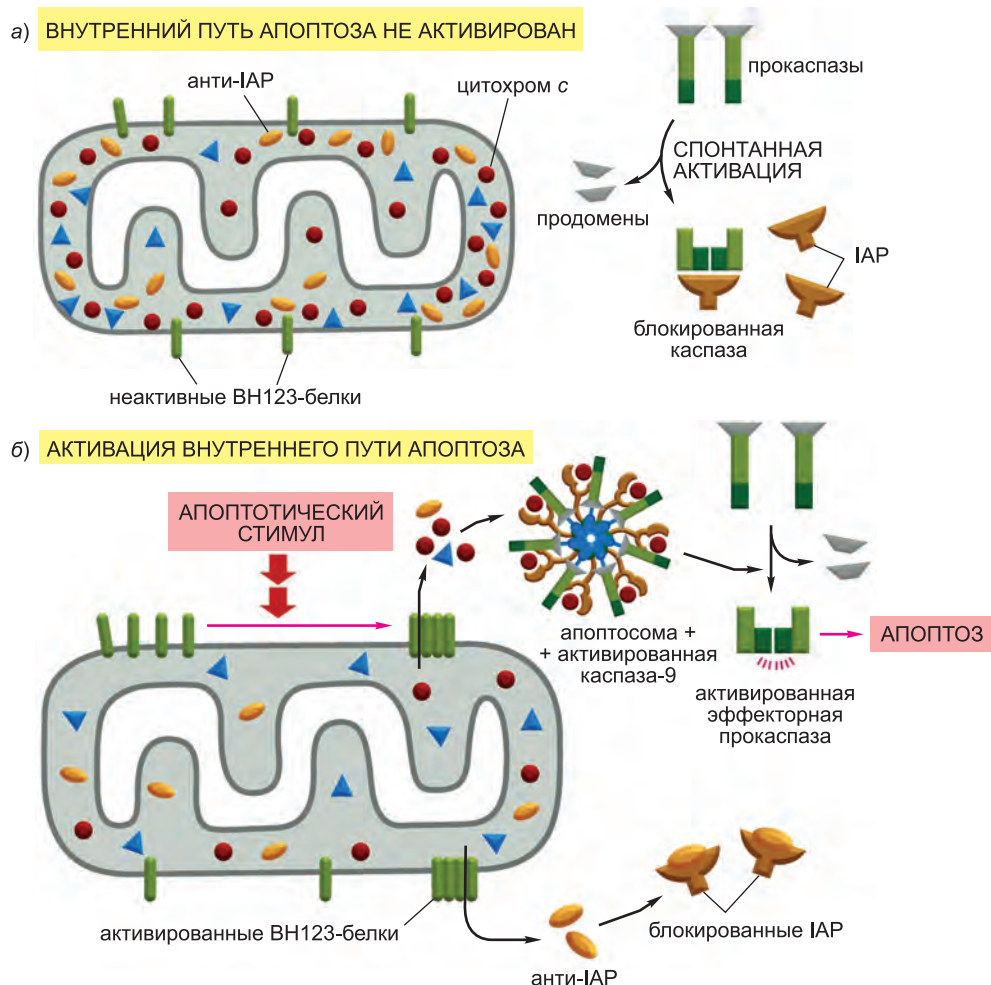


Рис. 18.12. Предполагаемая роль IAP и анти-IAP в управлении апоптозом у млекопитающих. (а) В отсутствие апоптотического стимула IAP предотвращают спонтанный апоптоз, который могла бы вызвать самоактивация прокаспаз. IAP локализованы в цитоплазме и связываются со спонтанно активированными прокаспазами, ингибируя их. Некоторые IAP являются также убиквитин-лигазами, навешивая убиквитиновые метки на каспазы, с которыми они связываются, обрекая их на расщепление в протеасоме (не показано). (б) Когда апоптотический стимул активирует внутренний путь, среди белков, вышедших из межмембранного пространства, оказываются анти-IAP-белки, связывающиеся с IAP и блокирующие их ингибиторные свойства. В то же время высвобожденный цитохром с запускает сборку апоптосом, которые затем активируют каспазный каскад, приводя к апоптозу.

связь (см. [рис. 18.13](#)). Предполагают, что подобная конкуренция за ограниченное количество факторов выживания, вырабатываемых соседними клетками, имеет место и в других тканях, причем как при онтогенезе, так и во взрослом организме.

Факторы выживания обычно связываются с рецепторами на поверхности клеток, активирующими внутриклеточные сигнальные пути, которые подавляют программу апоптоза. Часто это происходит через регуляцию белков семейства Bcl2. Например, некоторые факторы выживания стимулируют повышенную выработку

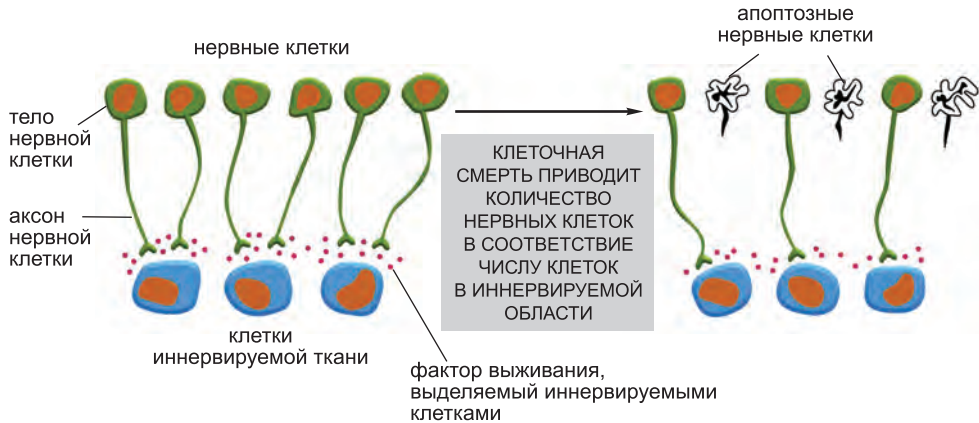


Рис. 18.13. Роль факторов выживания и клеточной смерти при установлении соответствия числа развивающихся нервных клеток количеству клеток иннервируемой ткани. Ограниченного количества факторов выживания, выделяемых иннервируемыми клетками, недостаточно для выживания всех возникающих нервных клеток. Поэтому некоторым клеткам не хватает факторов выживания для предотвращения апоптоза. Подобная стратегия перепроизводства с последующей отбраковкой позволяет с надежностью установить такое количество нейронов, что у всех иннервируемых клеток установится контакт с нервной клеткой, и лишние нервные клетки будут автоматически удалены.

антиапоптозных Bcl2 белков, таких как сам Bcl2 или Bcl-X_L (рис. 18.14, а). Другие действуют, подавляя активность проапоптозных Bcl2-белков, таких как Bad (рис. 18.14, б). В случае *Drosophila* некоторые факторы выживания фосфорилируют и инактивируют анти-IAP-белки, тем самым позволяя IAP-белкам подавлять апоптоз (рис. 18.14, в).

Если клетки млекопитающего недостаточно снабжаются факторами выживания, они совершают самоубийство, вырабатывая и активируя проапоптозные Bcl2-белки в количестве, превышающем концентрацию антиапоптозных Bcl2-белков, необходимых для выживания клетки, тем самым запуская апоптоз по внутреннему пути. Клетки мыши, в которых отсутствуют Bax, и Bak, неспособны активировать внутренний путь и поэтому могут по нескольку недель жить в культуре при отсутствии факторов выживания; однако без сигналов выживания клетки оказываются неспособными эффективно всасывать питательные вещества. Такие клетки восполняют свои метаболические затраты за счет *аутофагии*, при которой клетка превращает органеллы и куски цитоплазмы в аутофагосомы, которые впоследствии сливаются с лизосомами (см. обсуждение в главе 13). Клетки в конце концов погибают от истощения, но не от апоптоза.

18.9. Как избыточный, так и недостаточный уровень апоптоза может приводить к нарушениям

Известно множество болезней человека, при которых слишком много клеток переживают апоптоз, приводя к повреждению ткани. Среди наихудших проявлений — сердечный приступ или удар. При этих острых заболеваниях многие клетки погибают путем некроза в результате ишемии (недостаточного кровоснабжения), но некоторые из менее пострадавших клеток погибают путем апоптоза. Можно надеяться, что в буду-

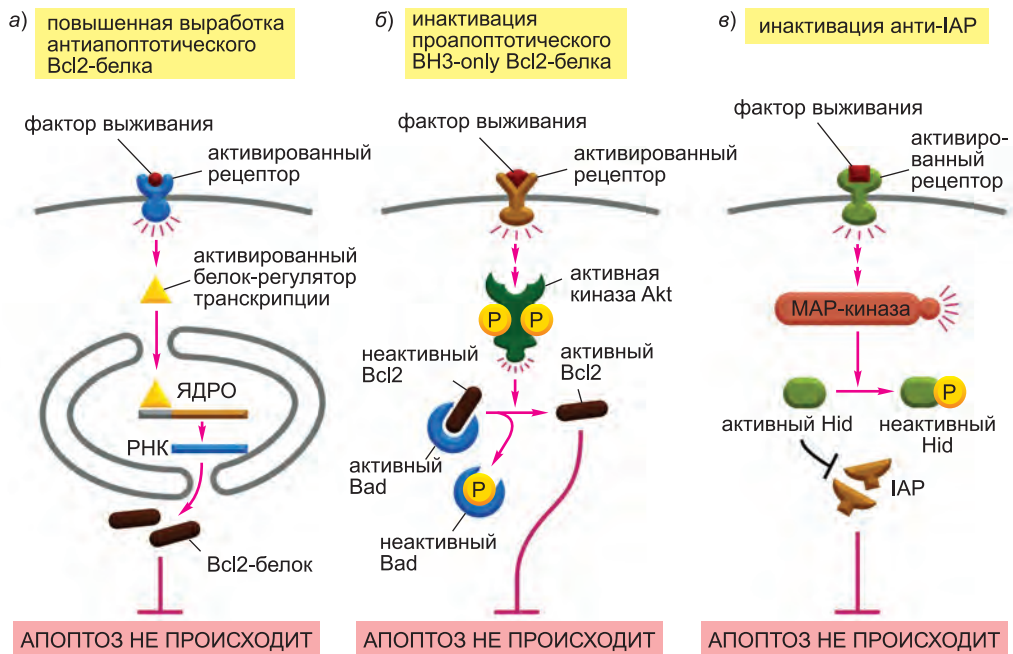


Рис. 18.14. Три способа предотвращения апоптоза внеклеточными факторами выживания. (а) Некоторые факторы выживания подавляют апоптоз, стимулируя транскрипцию генов, кодирующих антиапоптотические Bcl2-белки, такие как сам Bcl2 или Bcl-XL. (б) Многие другие активируют серин-треониновую протеинкиназу Akt, которая, помимо прочего, фосфорилирует и инактивирует BH-only проапоптотический Bcl2-белок Bad (см. рис. 15.64). Нефосфорилированный Bad способствует апоптозу, связываясь с Bcl2 и ингибируя его; при фосфорилировании Bad отсоединяется, освобождая препятствующий апоптозу Bcl2. Кроме того, Akt подавляет апоптоз путем фосфорилирования и инактивации белков семейства Forkhead, которые стимулируют транскрипцию генов, кодирующих белки, способствующие апоптозу (не показано). (в) У *Drosophila* некоторые факторы выживания ингибируют апоптоз, стимулируя фосфорилирование анти-IAP белка Hid. В немодифицированной форме Hid способствует клеточной смерти, ингибируя IAP. Будучи фосфорилирован, Hid больше не ингибирует IAP-белки, которые становятся активными и блокируют апоптоз.

щем будут разработаны лекарства, действующие как ингибиторы каспаз и блокирующие апоптоз, которые действительно помогут сохранить клетки в этих условиях.

Случается, однако, и так, что апоптоз претерпевает слишком мало клеток. Например, мутации генов мыши и человека, которые инактивируют гены, кодирующие Fas-рецептор, или Fas-лиганд, снижают нормальную частоту апоптоза некоторых лимфоцитов, вызывая избыточное накопление этих клеток в селезенке и лимфоузлах. Во многих случаях это ведет к аутоиммунным заболеваниям, при которых лимфоциты действуют против тканей того же организма.

Снижение уровня апоптоза также играет важную роль в образовании опухолей, так как регуляция апоптоза у раковых клеток часто нарушена. Ген *Bcl2*, например, впервые идентифицирован в лимфоцитах человека, переродившихся в распространенную форму рака, в которой хромосомная транслокация вызывает избыточную выработку белка Bcl2; кстати, название Bcl2 происходит от *B cell lymphoma* (лимфома В-клеток). Высокое содержание белка Bcl2 в лимфоцитах, несущих эту транслокацию, способствует развитию рака, так как ингибирует

апоптоз, тем самым удлиняя срок жизни клеток и увеличивая их численность; оно также снижает чувствительность клеток к противораковым препаратам, которые, как правило, принуждают раковые клетки к апоптозу.

Аналогично этому ген, кодирующий белок-супрессор опухоли p53, у 50% человеческих форм рака мутирован и более не способствует апоптозу или остановке клеточного цикла при повреждении ДНК. Следовательно, отсутствие p53 позволяет раковым клеткам выживать и пролиферировать даже в том случае, когда их ДНК повреждена; таким образом, клетки аккумулируют все больше мутаций, и некоторые из них делают раковые клетки еще более опасными (см. обсуждение в главе 20). Поскольку многие противораковые препараты вызывают апоптоз (или остановку клеточного цикла) по p53-зависимому механизму (см. главы 17 и 20), исчезновение активности p53 также делает раковые клетки менее чувствительными к подобным лекарствам.

Большинство человеческих форм рака развивается из клеток эпителиальных тканей, таких как легочный, кишечный эпителии, молочные железы и простата. Такие раковые клетки демонстрируют множество отклонений в своем поведении, в том числе пониженную способность прикрепляться к внеклеточному матриксу и друг к другу с помощью специальных межклеточных контактов. В следующей главе мы рассмотрим поразительно сложное устройство таких контактов и их функции.

Заключение

Клетки могут активировать внутриклеточную программу смерти и самоуничтожиться регулируемым способом; этот процесс называется программируемой клеточной смертью. Таким образом, необратимо поврежденные клетки, которые больше не требуются организму или представляют для него угрозу, могут быть быстро и аккуратно ликвидированы. В большинстве случаев такая смерть протекает путем апоптоза: клетка сжимается, уплотняется, зачастую распадается на фрагменты, после чего соседние клетки либо специализированные макрофаги быстро фагоцитируют клетки или их фрагменты, пока не произошла утечка содержимого поврежденной клетки. В апоптозе участвуют протеолитические ферменты, называемые каспазами, которые расщепляют определенные внутриклеточные белки, помогая убить клетку. Каспазы присутствуют в виде предшественников — прокаспаз — во всех животных клетках, содержащих ядра. Инициаторные прокаспазы активируются, сближаясь друг с другом в активационном комплексе: будучи активированы, они расщепляют и активируют следующие, эффекторные, прокаспазы, которые разрезают другие эффекторные прокаспазы (и многие другие внутриклеточные белки-мишени), вызывая усиливающийся необратимый протеолитический каскад.

Клетки используют как минимум два различных пути активации инициаторных прокаспаз и запуска каспазного каскада, приводящего к апоптозу: внешний путь, активируемый через связывание внеклеточных лигандов с рецепторами смерти, находящимися на поверхности клеток; и внутренний путь, активируемый внутриклеточными сигналами, генерируемыми при повреждении клетки. Каждый путь использует свои собственные инициаторные прокаспазы, которые активируются в различных активационных комплексах, называемых соответственно DISC-комплекс и апоптосома. При внешнем запуске апоптоза рецепторы смерти связывают прокаспазы-8 и -10 с помощью адаптерных бел-

ков, формируя DISC; в случае внутреннего пути цитохром с выходит из межмембранного пространства митохондрии и активирует белки Araf1, которые формируют апоптосому и связывают и активируют прокаспазу-9.

Как внеклеточные сигнальные белки, так и внутриклеточные Bcl2- и IAP-белки строго контролируют программу апоптоза, в норме допуская самоубийство клетки лишь в том случае, когда это выгодно животному. Как антиапоптотические, так и проапоптотические Bcl2-белки регулируют внутренний путь запуска апоптоза, контролируя выход белков из межмембранного пространства митохондрий, а IAP-белки ингибируют активированные прокаспазы и способствуют их расщеплению.

Задачи

Какое из утверждений верное? Обоснуйте свой ответ

18.1. В норме в ткани взрослого клеточная смерть уравнивает деление клеток.

18.2. Клетки млекопитающих, в которых нет цитохрома с, должны быть устойчивы к апоптозу, индуцированному УФ-излучением.

Поразмышляйте над следующим

18.3. Одна из важных функций Fas-рецептора и Fas-лиганда состоит в том, что они опосредуют уничтожение опухолевых клеток лимфоцитами-киллерами. При исследовании 35 случаев первичного рака легких и толстой кишки в половине из них была зарегистрирована амплификация и повышенная экспрессия гена, кодирующего белок, который связывается с Fas-лигандом. Как вы думаете, каким образом повышенная экспрессия этого белка может способствовать выживанию опухолевых клеток? Объясните свой ответ.

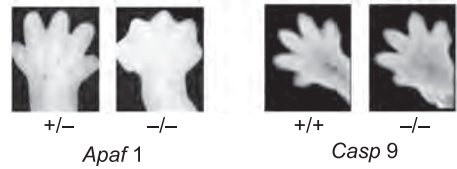
18.4. В онтогенезе нематоды *Caenorhabditis elegans* образуется ровно 959 соматических клеток; помимо того, образуется еще 131 клетка, которая впоследствии уничтожается путем программированной клеточной гибели. В классических генетических экспериментах на *C. elegans* впервые выявлены мутанты по генам, участвующим в апоптозе. Среди множества мутаций, влияющих на апоптоз у этой нематоды, мутация в гене цитохрома с не обнаружена. Как вы думаете, почему мутация в гене, кодирующем эту важнейшую для апоптоза эффекторную молекулу, не обнаружена в многочисленных скринингах «генов смерти», проведенных на *C. elegans*?

18.5. Представьте, что у вас есть возможность сделать микроинъекцию цитохрома с в цитоплазму клеток дикого типа и клеток, у которых отсутствует и белок Вах, и белок Вак. Должны ли мы ожидать апоптоз в одном из этих случаев, или в обоих случаях, или ни в каком случае? Аргументируйте свою позицию.

18.6. Несмотря на сходные нарушения мозга, новорожденные мыши, у которых отсутствует Araf1 либо каспаза-9, сильно различаются по нарушениям формирования лап. У мышей, дефектных по Araf1, не исчезают перепонки между формирующимися фалангами пальцев, а у дефектных по каспазе-9 мышей фаланги формируются нормально (рис. Q18.1). Если Araf1 и каспаза-9 участвуют в одном и том же пути апоптоза, почему эти мутантные мыши различаются по апоптозу клеток перепонки?

18.7. Когда человеческие раковые клетки (HeLa) подвергаются облучению УФ при интенсивности 90 мДж/см², большинство клеток претерпевают апоптоз

Рис. Q18.1. Развитие лапки у *Araf1*^{-/-} и *Casp9*^{-/-} новорожденных мышей в сравнении с нормальными новорожденными мышатами (к задаче 18.6). (Из Н. Yoshida et al., *Cell* 94: 739–750, 1998. С разрешения издательства Elsevier.)



в течение 24 часов. Высвобождение цитохрома *c* из митохондрии начинает быть заметным не позднее чем через 6 часов после облучения и продолжается еще более 10 часов. Значит ли это, что каждая отдельная клетка медленно высвобождает цитохром *c* в течение всего этого периода? Или же, напротив, каждая клетка быстро высвобождает свой цитохром *c*, но в течение всего периода запускается выход цитохрома *c* из разных клеток?

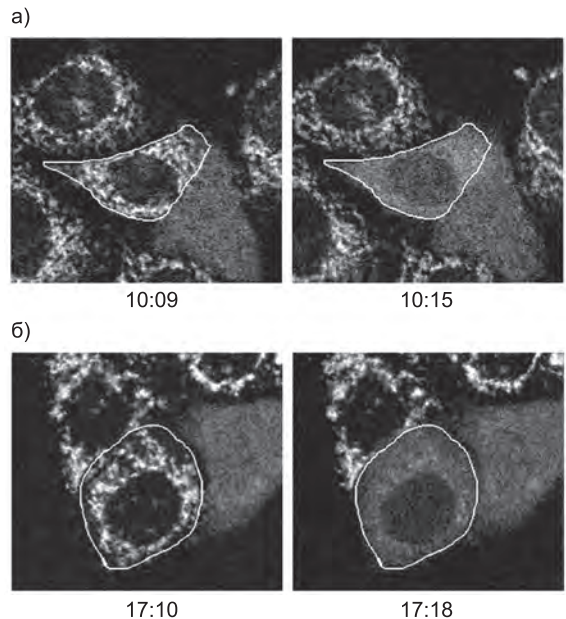
Чтобы ответить на этот фундаментальный вопрос, необходимо присоединить ген зеленого флуоресцентного белка (GFP) к гену цитохрома *c* так, чтобы можно было наблюдать поведение отдельных клеток с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. В клетках, экспрессирующих подобный гибридный продукт — цитохром *c*-GFP, — флуоресцентное исследование выявляет пятнистую структуру, которая обычно наблюдается при окрашивании митохондриальных белков. Затем нужно подвергнуть эти клетки облучению УФ-светом и наблюдать за изменениями точечной окраски. Две такие клетки (выделенные белым) показаны на рис. Q18.2, а и б. Выход цитохрома *c*-GFP определяется по смене точечного распределения флуоресценции на диффузное. Время после УФ-облучения указано под каждой панелью в формате часы : минуты.

В пользу какой из предложенных моделей высвобождения цитохрома *c* говорят эти наблюдения? Аргументируйте.

Литература

Adams J. M., Huang D. C., Strasser A. et al. (2005) Subversion of the Bcl-2 life/death switch in cancer development and therapy. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 70: 469–77.

Рис. Q18.2. Флуоресцентно-микроскопический анализ высвобождения цитохрома *c*-GFP из митохондрий в индивидуальных клетках: кадры, полученные методом цейтраферной съемки (к задаче 18.7). (а) Наблюдение велось в течение 6 минут по прошествии 10 часов после УФ-облучения. (б) Наблюдение за клетками велось в течение 8 минут по прошествии 17 часов после УФ-облучения. В одной клетке на рисунке (а) и одной — на рисунке (б), обведенных белым, произошло высвобождение цитохрома *c*-GFP за время наблюдения, указанное в формате часы : минуты под каждой из панелей. (Из J. C. Goldstein et al., *Nat. Cell Biol.* 2: 156–162, 2000. С разрешения издательства Macmillan Publisher Ltd.)



Boatright K. M. & Salvesen G. S. (2003) Mechanisms of caspase activation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15: 725–731.

Danial N. N. & Korsmeyer S. J. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* 116: 205–219.

Ellis R. E., Yuan J. Y. & Horvitz R. A. (1991) Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 7: 663–698.

Fadok V. A. & Henson P. M. (2003) Apoptosis: giving phosphatidylserine recognition an assist — with a twist. *Curr. Biol.* 13: R655–R657.

Galonek H. L. & Hardwick J. M. (2006) Upgrading the BCL-2 network. *Nature Cell Biol.* 8: 1317–1319.

Green D. R. (2005) Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121: 671–674.

Horvitz H. R. (2003) Worms, life, and death (Nobel lecture). *ChemBiochem.* 4:697–711.

Hyun-Eui K., Fenghe D., Fang M. & Wang X. (2005) Formation of apoptosome is initiated by cytochrome c-induced dATP hydrolysis and subsequent nucleotide exchange on Apaf-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17545–17550.

Jacobson M. D., Weil M. & Raff M. C. (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell* 88: 347–354.

Jiang X. & Wang X. (2004) Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 73: 87–106.

Kerr J. F., Wyllie A. H. & Currie A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *B. J. Cancer* 26: 239–257.

Kumar S. (2007) Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ.* 14:32–43.

Lavrik I., Golks A. & Krammer P. H. (2005) Death receptor signaling. *J. Cell Sci.* 118: 265–267.

Lowe S. W., Cepero E. & Evan G. (2004) Intrinsic tumour suppression. *Nature* 432: 307–315.

Lum J. J., Bauer D. E., Kong M. et al. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237–48.

McCall K. & Steller H. (1997) Facing death in the fly: genetic analysis of apoptosis in *Drosophila*. *Trends Genet.* 13: 222–226.

Nagata S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu. Rev. Genet.* 33: 29–55.

Nagata S. (2005) DNA degradation in development and programmed cell death. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 853–875.

Pop C., Timmer J., Sperandio S. & Salvesen G. S. (2006) The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol. Cell* 22: 269–275.

Raff M. C. (1999) Cell suicide for beginners. *Nature* 396: 119–122.

Rathmell J. C. & Thompson C. B. (2002) Pathways of apoptosis in lymphocyte development, homeostasis, and disease. *Cell* 109: 597–107.

Tittel J. N. & Steller H. (2000) A comparison of programmed cell death between species. *Genome Biol.* 1.

Verhagen A. M., Coulson E. J. & Vaux D. L. (2001) Inhibitor of apoptosis proteins and their relatives: IAPs and other BIRPs. *Genome Biol.* 2: 3009.1–3009.10.

Vousden K. H. (2005) Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science* 309: 1685–1686.

Willis S. N. & Adams J. M. (2005) Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 617–625.

Брюс Альбертс, Александр Джонсон, Юлиан Льюис,
Мартин Рафф, Кит Робертс, Питер Уолтер

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

Дизайнер ?. ?. ?

Технический редактор ?. ?. ?

Компьютерный набор и верстка Н. С. Агафонова

Корректор О. А. Шемякина

Подписано в печать 02.09.2023. Формат 60 Ч 841/16.

Печать офсетная. Усл. печ. л. ????. Уч. изд. л. ?????.

Гарнитура ????. Бумага офсетная №1.

Тираж ????? экз. Заказ № .

Научно-издательский центр «Регулярная и хаотическая динамика»

426034, г. Ижевск, ул. Университетская, 1.

<http://shop.rcd.ru> E-mail: mail@rcd.ru Тел./факс: (+73412) 500—295